

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Evaluación del inmunofenotipo en sangre periférica y en
biopsias intestinales de perros con Enfermedad Inflamatoria
Crónica Intestinal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Agulla Pérez

Directores

Ángel Sainz Rodríguez
Mercedes Guadalupe García-Sancho Téllez
Alejandra Villaescusa Fernández

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Evaluación del inmunofenotipo en sangre periférica y en biopsias intestinales de perros con
Enfermedad Inflamatoria Crónica Intestinal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Agulla Pérez

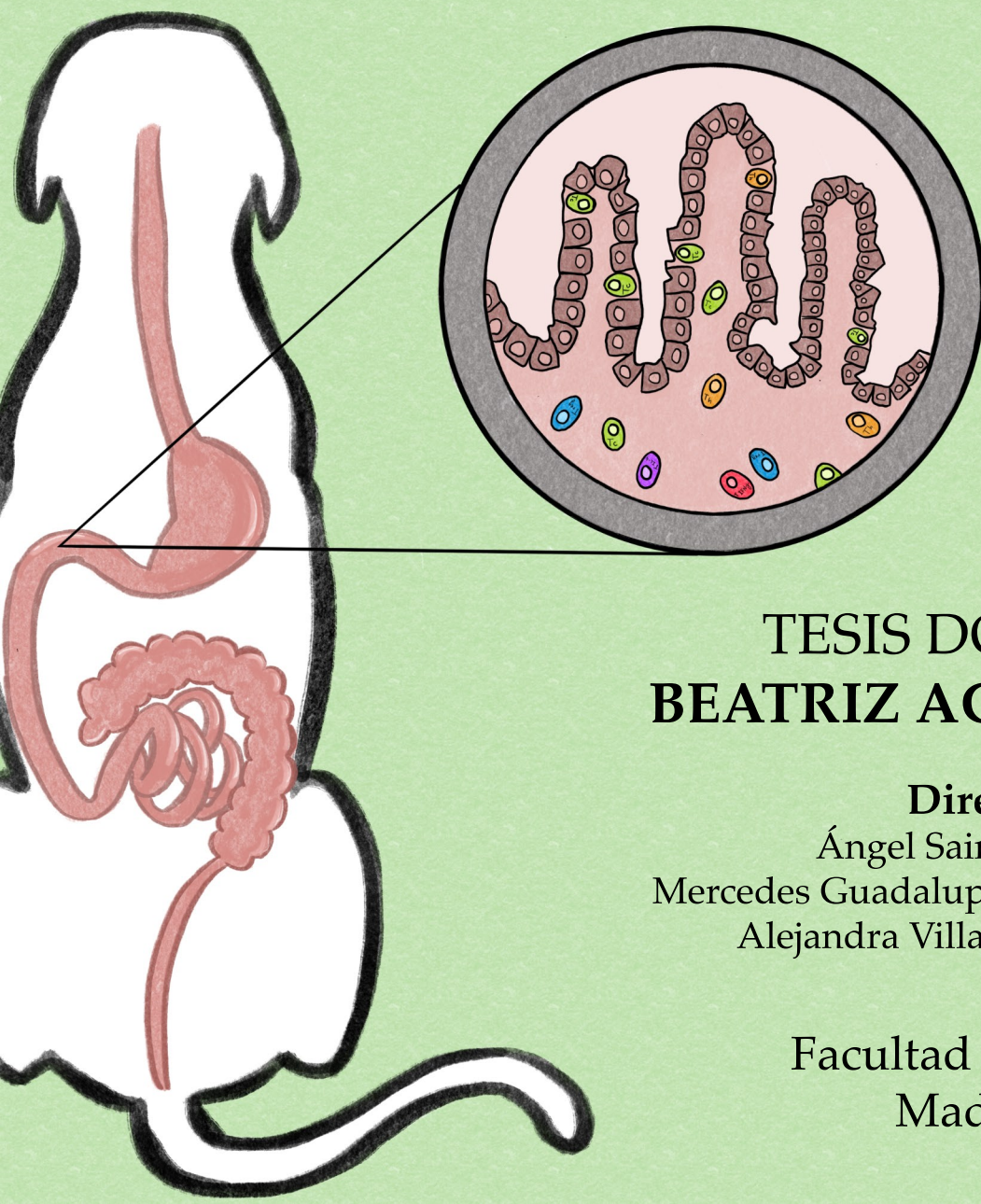
DIRECTOR

Ángel Sainz Rodríguez
Mercedes Guadalupe García-Sancho Téllez
Alejandra Villaescusa Fernández



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO EN SANGRE PERIFÉRICA Y EN BIOPSIAS INTESTINALES DE PERROS CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA INTESITAL



TESIS DOCTORAL
BEATRIZ AGULLA PÉREZ

Directores

Ángel Sainz Rodríguez
Mercedes Guadalupe García-Sancho Téllez
Alejandra Villaescusa Fernández

Facultad de Veterinaria
Madrid, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**Evaluación del inmunofenotipo en sangre periférica y
en biopsias intestinales de perros con Enfermedad
Inflamatoria Crónica Intestinal**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

Beatriz Agulla Pérez

Directores

Ángel Sainz Rodríguez

Mercedes Guadalupe García-Sancho Téllez

Alejandra Villaescusa Fernández

Madrid, 2020

A todos los que me quieren

*A todos los perros que han formado
parte de este proyecto*

*“Por todos los que un día se atrevieron a gritar que la tierra era redonda
y que había algo más que dragones y abismo donde acababan los mapas”*

Amaral.

AGRADECIMIENTOS

Aquí estoy, al final de tantas cosas intentando resumir en unas líneas, y tratando de no emocionarme mucho, el agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado a alcanzar esta meta profesional y personal y sin las que este proyecto no habría sido posible.

A mis directores, Ángel Sainz, Mercedes García-Sancho y Alejandra Villaescusa por darme esta oportunidad y por creer en mí. Gracias por vuestra profesionalidad, dedicación y tiempo. Ángel, gracias por la pasión que pones en tu trabajo y que contagias a todos los que estamos a tu alrededor. Merche, gracias por enseñarme a cuidar los detalles y darme todas las oportunidades para crecer profesionalmente. Alejandra, gracias por tu perfeccionismo y por solucionar siempre todos mis problemas con una sonrisa. Pero sobre todo, gracias por vuestra calidad humana, vuestra alegría y vuestro cariño. Me siento muy afortunada de haberos tenido de guía todo el camino y siempre llevaré un trocito de vosotros conmigo.

Fernando, el padre de este gran grupo de investigación. Gracias por tu apoyo y confianza, por enseñarme tanto de gastroenterología y de la vida, por cuidarme y por estar siempre ahí. Para mí ya sabes que eres un director más.

Al mejor amigo y compañero que se puede tener, David. Gracias por tu ayuda constante, por haber compartido tantos momentos, por linfocito, por tu entusiasmo y tus ganas de mejorar todos los días. Espero que nuestros caminos profesionales se vuelvan a juntar algún día porque ya sabes que somos el yin yang perfecto. Vas a llegar muy lejos, estoy muy orgullosa de ti.

Gracias a Jacinto y a Bernardo por su inestimable ayuda y cariño, por tantas endoscopias y por esa biopsia de más..."la garrapatilla" os va a echar mucho de menos.

A Carlos, Amalia y Carmen del Centro de Ayuda a la Investigación de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la UCM, gracias por vuestro gran trabajo y amabilidad. Carlos, creo que nunca podré agradecerle todo lo que me has ayudado y enseñado. Gracias por hacer siempre hueco a mis millones de tubos, por todos los consejos para ahorrar tiempo y dormir un poquito más, por las incontables horas delante del apasionante mundo de los puntitos y por tu amistad. Gracias de corazón.

A Ricardo García, gracias por tu infinita paciencia durante el estudio estadístico de este trabajo, por tu cariño y por recibirme siempre con una sonrisa a pesar de que todos los días te prometía que iba a ser lo último y nunca era así.

Gracias a todos los integrantes de los laboratorios de Biopatología Clínica, Microbiología y Anatomía Patológica del HCVC en los que tantas horas he pasado. Gracias por vuestras palabras de ánimo y por echarme una mano cuando lo he necesitado. Gracias a Antonio Rodríguez-Bertos por todo el tiempo que me has dedicado, a mí y a mis biopsias, y por interesarte por mi trabajo.

Por otro lado, gracias a mi amiga Irene y a Francisco Javier Horcajada de la Clínica Veterinaria Don Can y a los compañeros del Centro de Protección Animal de Madrid Salud por su ayuda al inicio de este proyecto.

Thank you to Karin Allenspach, Albert Jergens and their team: Yoko, Dana, Chelsea, Vojtech and Sichao for giving me the opportunity to be part of this amazing project and team. Bhairav and Abdul, thank you for that incredible summer, for your friendship, support and love. You made me feel at home.

A los que fueron mis profesores y después mis compañeros y amigos: Juan Pablo, Isabel, Pedro, Iñaki, Marigel y Luis. Gracias por tantos buenos momentos juntos y por hacer tan grande esta facultad.

Quisiera continuar agradeciendo a todos los residentes de HCVC con los he crecido durante estos últimos años, de los que tanto he aprendido y con los que tan bien me lo he pasado. Os habéis convertido en unos grandes especialistas.

Y como no, a todos mis compañeros del HCVC, del Departamento de Medicina y Cirugía Animal y de la Facultad de Veterinaria en general, gracias por vuestra ayuda de una u otra manera y por hacer de este centro mi segundo hogar durante estos once años.

Un incendio resultó ser el inicio de una gran amistad, gracias Paula y Dani por aceptarnos en el despacho ocupado de nuestros jefes. Dani, gracias por estar siempre ahí para calmar mi histeria, ayudarme en cualquier cosa que te pido y seguirme en mis locuras, se acaba la tesis pero no la escalada. Paula, mi compañera de fatigas, de ideas sin sentido o con mucho y mi psicóloga personal. Gracias por ser mi apoyo diario, por tu inteligencia, por nuestras interminables conversaciones sobre ciencia y sobre la vida en cualquier lugar, aunque nuestro favorito siempre será Debod, que suerte descubrirnos.

A mis amigas de siempre, Selene, Patri, Noe, Tami, Ana y Fabi, por llevar tantos años aguantando mis sermones, por estar al pie del cañón en todos los momentos importantes de mi vida y porque sé que estaréis siempre, muchísimas gracias. Sin vosotras llegar hasta aquí habría sido mucho más difícil.

Mis compañeros de profesión y de vida, mi familia veterinaria: Jose, Estef, Ramón, Nere, Ana, Eva, Tamara, Fer, Juan, David, Isa y Lau, gracias por todo lo que compartimos, por vivir los éxitos de cada uno como si fueran propios, por tantas aventuras y por estar, después de tantos años, más unidos incluso que cuando pasábamos doce horas en la facultad. En especial quiero dar las gracias a Lau e Isa, por esta maravillosa amistad que todo lo puede incluida la distancia, por ser siempre mi consuelo y porque sin vosotras no habría llegado tan lejos.

Y dejando para el final a los más importantes, mi familia. Gracias a mis padres Juan y Amparo por dárme todo, la mejor educación y hacer de mi la persona que soy a día de hoy. Gracias por darme siempre la libertad de elegir mi camino siendo el paracaídas que nunca falla. Gracias por vuestro apoyo, vuestro amor incondicional y por ser las personas más maravillosas que conozco. A mi hermana Lara, porque si hoy soy veterinaria es por el amor que me has inculcado por los animales desde que tengo uso de razón y por creer siempre en mí, incluso cuando ni yo misma lo hago. Gracias a mi cuñado Daniel por ser mi hermano y por darle significado a esa palabra, y también por el diseño de la portada. A mi sobrina Olivia, perdón porque esta tesis me ha hecho perderme mucho de tus primeros años, gracias por ser mi mayor alegría y porque solo con decir “tata” haces que desaparezcan todos los problemas. A mi tía Elena por ser mi ejemplo de fuerza y superación y por estar ahí en todo momento. A mi abuela y a mi tío Luis, porque a pesar de que no han podido verme alcanzar esta meta siempre han estado conmigo. A Suspi y a Eve por tantas prácticas de exploración y por estar a mi lado todas y cada una de las horas de estudio y escritura. Y, por su puesto, al resto de mi familia, gracias por animarme siempre.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
ALT	Alanina aminotransferasa
AMP	Péptido antimicrobiano
APC	Alofocianina
APMNA	Anticuerpos frente a leucocitos polimorfonucleares
ARN	Ácido ribonucleico
ASB	Albúmina sérica bovina
ASCA	Anticuerpos anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BCR	Receptor del antígeno de los linfocitos B
Breg	Linfocitos B reguladores
CCECAI	<i>Canine chronic enteropathy clinical activity index</i>
CD	Grupo de diferenciación (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CDR	Región determinante de complementariedad
CIBDAI	<i>Canine inflammatory bowel disease activity index</i>
CIBDAISI	<i>Canine inflammatory bowel disease activity index for small intestine</i>
CLR	Receptores de lectina tipo C
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CPA	Célula presentadora de antígeno
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	Tetra-acetato de etilendiamida
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EICI	Enfermedad inflamatoria crónica intestinal
ELISA	Prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMO	Fluorescencia menos uno
FODMAD	Dietas bajas en carbohidratos fermentables
FSC	Dispersión frontal de luz (<i>forward scatter</i>)
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino (<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>)
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HCVC	Hospital Clínico Veterinario Complutense
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón

Ig	Inmunoglobulina
IQR	Rango intercuartílico
IL	Interleucina
KIR	<i>Killer immunoglobulin-like receptor</i>
LIE	Linfocitos intraepiteliales
LLP	Linfocitos de la lámina propia
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
Máx.	Máximo
MIF	Mertiolato-Iodo-Formaldehído
Mín.	Mínimo
NF-κB	Factor nuclear κB
NK	Células “ <i>natural killer</i> ” o linfocitos asesinos naturales
OmpC	Anticuerpo frente a la porina C de la membrana externa bacteriana
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
p-ANCA	Anticuerpos perinucleares anti-citoplasma de los neutrófilos
PBL	Linfocitos de sangre periférica (<i>peripheral blood lymphocytes</i>)
PBMC	Células mononucleares sanguíneas
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RT	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
PE	Ficoeritrina
PECy7	Ficoeritrina-cianina 7
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PO	Vía oral
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Dispersión lateral de la luz (<i>side scatter</i>)
Tc	Linfocitos T citotóxicos
TCR	Receptor del antígeno de los linfocitos T
T DN	Linfocitos T dobles negativos
T DP	Linfocitos T dobles positivos
TGF	Factor de crecimiento transformante

Th	Linfocitos T “ <i>helper</i> ” o colaboradores
TLI	<i>Tripsin Like Immunoreactivity</i>
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocitos T reguladores
UCM	Universidad Complutense de Madrid
WSAVA	<i>World Small Animal Veterinary Association</i>
5-ASA	Derivados del ácido 5-aminosalicílico
7-AAD	7-aminoactinomicina D

ÍNDICE



1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. SISTEMA INMUNITARIO EN LA ESPECIE CANINA	7
2.1.1. Inmunidad innata.....	7
2.1.1.1. Barreras físicas, químicas y microbiológicas.....	8
2.1.1.2. Componentes humorales de la inmunidad innata.....	9
2.1.1.3. Componentes celulares de la inmunidad innata.....	11
2.1.2. Inmunidad adaptativa	16
2.1.2.1. Órganos y tejidos de la inmunidad adaptativa	17
2.1.2.2. Componentes humorales de la inmunidad adaptativa.....	21
2.1.2.3. Componentes celulares de la inmunidad adaptativa	26
2.2. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO AL INTESTINO (<i>GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE</i> , GALT).....	35
2.2.1. Compartimentación del GALT.....	36
2.2.2. Respuesta inmunitaria en el GALT.....	39
2.3. ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA INTESTINAL (EICI).....	42
2.3.1. Definición.....	42
2.3.2. Clasificación.....	43
2.3.3. Prevalencia	45
2.3.4. Etiopatogenia.....	46
2.3.4.1. Factores genéticos	47
2.3.4.2. Microbiota	48
2.3.4.3. Factores dietéticos	50
2.3.4.4. Factores medioambientales.....	52
2.3.4.5. Factores psicológicos.....	53
2.3.4.6. Otros factores etiopatogénicos.....	54
2.3.5. Signos clínicos	56
2.3.5.1. Vómito.....	56

2.3.5.2. Diarrea	57
2.3.5.3. Pérdida de peso y alteraciones del apetito	58
2.3.5.4. Dolor abdominal	58
2.3.5.5. Otros signos clínicos.....	59
2.3.6. Diagnóstico	60
2.3.6.1. Hallazgos clínicos.....	60
2.3.6.2. Hallazgos laboratoriales	62
2.3.6.3. Hallazgos radiográficos y ecográficos.....	66
2.3.6.4. Hallazgos endoscópicos.....	67
2.3.6.5. Hallazgos histopatológicos	69
2.3.6.6. Diagnóstico diferencial.....	72
2.3.7. Tratamiento	72
2.3.7.1. Tratamiento dietético.....	73
2.3.7.2. Tratamiento antibiótico	76
2.3.7.3. Tratamiento inmunosupresor.....	78
2.3.7.4. Nuevos agentes terapéuticos.....	82
2.3.7.5. Moduladores de la microbiota	84
2.3.8. Pronóstico.....	86
2.4. IMNUNOPATOGENIA DE LA EICI	88
2.4.1. Alteraciones del sistema inmunitario innato en la EICI.....	88
2.4.2. Alteraciones del sistema inmunitario adaptativo en la EICI	93
2.4.3. Alteraciones del inmunofenotipo periférico en la EICI	98
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	101
4. MATERIALES Y MÉTODOS	107
4.1. PLAN DE TRABAJO	109
4.2. ANIMALES	111
4.3. PROTOCOLO DIAGNÓSTICO DE LA EICI	113
4.3.1. Anamnesis	113

4.3.2. Exploración física.....	114
4.3.3. Analítica sanguínea	114
4.3.4. Análisis parasitológico de las heces	116
4.3.5. Pruebas de funcionalidad pancreática	117
4.3.6. Índices de actividad clínica de la EICI.....	117
4.3.7. Exploración endoscópica.....	119
4.3.7.1. Preparación del animal	119
4.3.7.2. Procedimiento anestésico	120
4.3.7.3. Exploración endoscópica.....	120
4.3.7.4. Obtención de las biopsias	122
4.3.8. Estudio histopatológico de las biopsias.....	122
4.3.8.1. Procesado de las biopsias endoscópicas	123
4.3.8.2. Valoración histopatológica	123
4.4. PROTOCOLO DE TRATAMIENTO PARA LA EICI	125
4.4.1. Tratamiento dietético	125
4.4.2. Tratamiento farmacológico	125
4.5. PUESTA A PUNTO DE LOS PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA CITOMETRÍA DE FLUJO.....	126
4.5.1. Aislamiento de los linfocitos intraepiteliales duodenales	126
4.5.2. Aislamiento de los linfocitos de la lámina propia duodenal	127
4.6. CITOMETRÍA DE FLUJO	129
4.6.1. Anticuerpos monoclonales empleados.....	129
4.6.2. Aislamiento linfocitario en sangre periférica	130
4.6.3. Aislamiento de linfocitos intraepiteliales duodenales	131
4.6.4. Aislamiento de linfocitos de la lámina propia duodenal	131
4.6.5. Protocolo de marcaje de los linfocitos para su análisis por citometría de flujo	132
4.6.5.1. Protocolo de marcaje para la determinación de las poblaciones de linfocitos objeto de estudio.....	132
4.6.5.2. Análisis de las poblaciones linfocitarias e inmunofenotipaje.....	135

4.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO	142
4.7.1. Estadística descriptiva	142
4.7.2. Estadística analítica.....	142
5. RESULTADOS	145
5.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES	147
5.2. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, ENDOSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS	150
5.2.1. Descripción estadística de los datos de la reseña del grupo de perros sanos	150
5.2.2. Descripción de los signos clínicos en el grupo de perros sanos.....	152
5.2.3. Descripción estadística de los parámetros de la analítica sanguínea del grupo de perros sanos....	152
5.2.4. Descripción de los parámetros del estudio endoscópico en el grupo de perros sanos.....	154
5.2.5. Descripción de los parámetros del estudio histopatológico en el grupo de perros sanos	156
5.3. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, ENDOSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON EICI	160
5.3.1. Descripción estadística de los datos de la reseña del grupo de perros con EICI.....	160
5.3.2. Descripción de los signos clínicos en el grupo de perros con EICI	162
5.3.3. Descripción estadística de los parámetros de la analítica sanguínea del grupo de perros con EICI	166
5.3.4. Descripción de los índices clínicos de la enfermedad en el grupo de perros con EICI	168
5.3.5. Descripción de los parámetros del estudio endoscópico en el grupo de perros con EICI...	172
5.3.6. Descripción de los parámetros del estudio histopatológico en los perros con EICI.....	176
5.3.7. Estudio de las asociaciones entre los sumatorios de los índices clínicos, endoscópicos e histopatológicos en los perros con EICI	179
5.4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS ENTRE EL GRUPO DE PERROS SANOS Y EL GRUPO DE PERROS CON EICI	183

5.4.1. Estudio comparativo de los datos de la reseña	183
5.4.2. Estudio comparativo de los parámetros de la analítica sanguínea	184
5.4.3. Estudio comparativo de los parámetros endoscópicos	186
5.4.4. Estudio comparativo de los parámetros histopatológicos	191
5.5. ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPO.....	198
5.5.1. Estudio del inmunofenotipo en sangre periférica.....	198
5.5.1.1. Inmunofenotipaje en sangre periférica en el grupo de perros sanos.....	198
5.5.1.2. Inmunofenotipaje en sangre periférica en el grupo de perros con EICI	200
5.5.2. Estudio del inmunofenotipo intestinal.....	203
5.5.2.1. Resultados de la puesta a punto del protocolo de aislamiento de los linfocitos intraepiteliales	203
5.5.2.2. Resultados de la puesta a punto del protocolo de aislamiento de los linfocitos de la lámina propia.....	205
5.5.2.3. Inmunofenotipaje de los linfocitos intestinales en el grupo de perros sanos...	206
5.5.2.4. Inmunofenotipaje de los linfocitos intestinales en el grupo de perros con EICI.....	208
5.5.3. Estudio comparativo del inmunofenotipo entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI.....	210
5.5.3.1. Estudio comparativo del inmunofenotipo sanguíneo entre los perros sanos y los perros con EICI	211
5.5.3.2. Estudio comparativo del inmunofenotipo intestinal entre los perros sanos y los perros con EICI	214
5.5.4. Estudio comparativo del inmunofenotipo entre los diferentes compartimentos inmunitarios.....	216
5.5.4.1. Estudio comparativo entre las poblaciones linfocitarias sanguíneas y del epitelio intestinal en los perros sanos y en los perros con EICI	216
5.5.4.2. Estudio comparativo entre las poblaciones linfocitarias sanguíneas y de la lámina propia intestinal de los perros sanos y de los perros con EICI	219
5.5.4.3. Estudio comparativo entre las poblaciones linfocitarias del epitelio y de la lámina propia intestinal en los perros sanos y en los perros con EICI	221

5.6. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	224
5.6.1. Evolución clínica y de los parámetros de la analítica sanguínea.....	224
5.6.2. Evolución de las lesiones endoscópicas	231
5.6.3. Evolución de las lesiones histopatológicas	236
5.6.4. Evolución del inmunofenotipo	240
5.7. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO SANGUÍNEO CON LAS VARIABLES CLÍNICAS, ENDOSCÓPICAS E HISTOPATOLÓGICAS EN LOS PERROS CON EICI.....	247
5.7.1. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices clínicos de la enfermedad	247
5.7.2. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices endoscópicos	248
5.7.3. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices histopatológicos.....	249
6. DISCUSIÓN	253
6.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, ENDOSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DE LA EICI CANINA	255
6.1.1. Reseña	255
6.1.2. Analítica sanguínea	257
6.1.3. Signos clínicos	259
6.1.4. Índices de actividad clínica	261
6.1.5. Evaluación endoscópica	263
6.1.6. Evaluación histopatológica	266
6.2. PUESTA A PUNTO DE LOS PROTOCOLOS DE AISLAMIENTO DE LINFOCITOS DEL EPITELIO Y DE LA LÁMINA PROPIA DUODENAL.....	272
6.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES DEL INMUNOFENOTIPO EN LA EICI CANINA	275
6.3.1. Caracterización de las alteraciones del inmunofenotipo sanguíneo en la EICI canina..	275

6.3.2. Caracterización de las alteraciones del inmunofenotipo intestinal en la EICI canina.....	282
6.3.3. Estudio comparativo del inmunofenotipo entre los diferentes compartimentos inmunitarios.....	288
6.4. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	290
6.4.1. Evolución clínica y de los parámetros de la analítica sanguínea.....	290
6.4.2. Evolución de las lesiones endoscópicas.....	290
6.4.3. Evolución de las lesiones histopatológicas.....	294
6.4.4. Evolución del inmunofenotipo.....	295
6.5. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO SANGUÍNEO CON LAS VARIABLES CLÍNICAS, ENDOSCÓPICAS E HISTOPATOLÓGICAS EN LOS PERROS CON EICI.....	298
6.5.1. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices clínicos de la enfermedad.....	298
6.5.2. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices endoscópicos.....	299
6.5.3. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices histopatológicos.....	300
7. CONCLUSIONES	303
8. CONCLUSIONS	307
9. RESUMEN	311
10. SUMMARY	317
11. BIBLIOGRAFÍA	321

1. INTRODUCCIÓN

Bajo el término “enfermedad inflamatoria crónica intestinal” (EICI o IBD, de sus siglas en inglés *inflammatory bowel disease*) se engloban un conjunto de enfermedades de naturaleza idiopática caracterizadas por la presencia de un infiltrado inflamatorio mixto en la lámina propia de la mucosa intestinal. Esta patología, presente tanto en el ser humano como en la especie canina, puede afectar al intestino delgado, al intestino grueso o a ambos, habiéndose descrito su extensión también al estómago (Hall y Day, 2017; Torres *et al.*, 2017). En el perro, el infiltrado de linfocitos y células plasmáticas es el más habitual y el intestino delgado la localización más frecuentemente afectada (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017).

La EICI es considerada la causa más frecuente de vómito y diarrea crónicos en la especie canina. Este cuadro clínico gastrointestinal inespecífico hace necesario la realización de un completo y correcto protocolo de exclusión de todas aquellas causas que puedan dar lugar un proceso inflamatorio intestinal para poder llegar al diagnóstico de esta enfermedad idiopática. El diagnóstico definitivo siempre será histológico (Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a).

A pesar de los múltiples esfuerzos investigadores llevados a cabo para tratar de esclarecer los mecanismos fisiopatológicos implicados en esta enfermedad tanto en medicina humana como en veterinaria, la etiología de la EICI a día de hoy sigue siendo desconocida. La hipótesis más defendida sostiene que una compleja interacción entre factores genéticos, de la microbiota e inmunitarios desencadena una respuesta inmunitaria intestinal exacerbada, responsable de las lesiones y de los signos clínicos característicos. Basándose en este supuesto, se puede concluir que la EICI puede considerarse una enfermedad de carácter inmunomediado. Es por ello que el tratamiento de elección en estos pacientes es inmunosupresor (Jergens y Simpson, 2012; de Souza, 2017; Torres *et al.*, 2017).

Las líneas de investigación más recientes están centradas en el estudio de las alteraciones de la microbiota y del sistema inmunitario intestinal y en la relación entre ambos factores durante el curso de la enfermedad (Packey y Sartor, 2009; Park *et al.*, 2017). Tal es la importancia del sistema inmunitario en este proceso que en medicina humana una de las bases del tratamiento actual de los pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa es la inmunoterapia. La amplia investigación desarrollada en este campo ha permitido describir las alteraciones más frecuentes

en el hombre en los diferentes componentes del sistema inmunitario intestinal y periférico y crear anticuerpos dirigidos a bloquear las funciones de estas células alteradas y de sus productos, con muy buenos resultados (de Mattos *et al.*, 2015; Binder *et al.*, 2018).

Sin embargo, en la especie canina la descripción de las alteraciones inmunitarias en el curso de la EICI es mucho más limitada. Como se abordará a lo largo del apartado de “Revisión bibliográfica”, la mayoría de los componentes de la inmunidad tienen un papel en esta enfermedad, si bien los linfocitos T de la inmunidad adaptativa parecen tener una relevancia destacada tanto en el desarrollo como en la perpetuación y en la patogenia de la EICI. En el perro, la literatura disponible hasta la fecha en este sentido no permite establecer conclusiones claras acerca de las alteraciones inmunofenotípicas existentes en la EICI. Además, las poblaciones de linfocitos T de los dos compartimentos intestinales efectores, el epitelio y la lámina propia, no han sido caracterizados en la especie canina en general. Todo ello ha conducido a que en esta tesis doctoral se hayan tratado de caracterizar las poblaciones de linfocitos T de mayor relevancia tanto a nivel periférico como en los dos compartimentos intestinales mencionados, para tratar de profundizar en el conocimiento de la inmunopatogenia de la EICI linfoplasmocitaria que afecta al intestino delgado en el perro.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. SISTEMA INMUNITARIO EN LA ESPECIE CANINA

El sistema inmunitario es una compleja red de estructuras y mecanismos interrelacionados que tienen por objetivo la protección del individuo frente a agresiones externas, ya sean de naturaleza biológica (agentes patógenos) o físico-química (como contaminantes o radiaciones), e internas (por ejemplo, células cancerosas) y el reconocimiento de lo propio frente a lo ajeno (Tizard, 2009j).

Su función resulta esencial para la vida del individuo, ya que situaciones de disminución de su eficacia pueden dar lugar a la aparición de graves infecciones o tumores. Por el contrario, situaciones de actividad exacerbada pueden derivar en reacciones alérgicas o enfermedades autoinmunes. En cualquier caso, sus alteraciones pueden conllevar la muerte del animal (Parkin y Cohen, 2001).

El sistema inmunitario está constituido por una serie de barreras de contención, elementos solubles o moléculas y elementos celulares. La respuesta coordinada de todos estos elementos frente a un patógeno o sustancia extraña recibe el nombre de respuesta inmunitaria (Tizard, 2009j).

En función de la velocidad y especificidad de la respuesta inmunitaria, el sistema inmunitario puede dividirse en inmunidad innata y adquirida, a pesar de la gran interrelación existente entre ambas (Iwasaki y Medzhitov, 2015).

Con el fin de facilitar la posterior comprensión de la organización inmunológica en los órganos del sistema inmunitario, en concreto del tejido linfoide asociado al intestino (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) y la inmunopatogenia de la EICI en la especie canina, a continuación se describen los elementos y las interacciones más relevantes de la inmunidad innata y adquirida.

2.1.1. Inmunidad innata

La protección más efectiva de los organismos frente a los agentes patógenos o elementos extraños es el rechazo a la entrada de los mismos. Para ello, el sistema inmunitario cuenta con una serie de barreras con capacidad creciente de contención y eliminación de estos agentes ajenos al organismo. Esto quiere decir que cuando un patógeno consigue atravesar una barrera, deberá enfrentarse a otra de capacidad superior (Tizard, 2009j).

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a patógenos, siendo crucial para el mantenimiento de la homeostasis orgánica, mediante la eliminación de gran variedad de agentes nocivos y la activación y regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa (Iwasaki y Medzhitov, 2015; Riera Romo *et al.*, 2016). Se trata de una forma de inmunidad rápida, semiespecífica y ampliamente distribuida, compuesta por barreras físicas, químicas, microbiológicas y componentes humorales y celulares (Parkin y Cohen, 2001). Los principales componentes de la inmunidad innata se detallan a continuación:

2.1.1.1. Barreras físicas, químicas y microbiológicas

Las barreras físicas están constituidas por la piel y las superficies mucosas del aparato respiratorio, digestivo y urinario. La función de estas barreras es aislar el medio interno de factores externos. Para llevar a cabo su cometido, cuentan con un epitelio continuo de uniones muy estrechas. La infección por un patógeno podrá ocurrir si este consigue atravesar o colonizar dichas barreras, por lo que su integridad, así como la presencia de ciertos elementos protectores tales como el flujo mucoso del sistema respiratorio, el flujo urinario, el peristaltismo gastrointestinal, etc., son de gran importancia (Murphy, 2012f).

Además, estos epitelios son capaces de producir sustancias que actúan como barreras químicas frente a la invasión microbiana. Las secreciones de estas superficies contienen diversas moléculas con capacidad microbicida entre las que destacan la lisocima y los péptidos antimicrobianos (AMPs, de sus siglas en inglés). De forma particular, la piel presenta una gran capacidad de descamación, un pH débilmente ácido y una secreción sebácea rica en glucoproteínas y lípidos que previenen eficientemente las infecciones. Las mucosas del tracto gastrointestinal y respiratorio producen mucus rico en mucina, enzimas como la pepsina y presentan un pH bajo en el estómago con el mismo objetivo (Riera Romo *et al.*, 2016).

Finalmente, los microorganismos simbioses asociados a estas superficies constituyen la barrera microbiológica de la inmunidad innata. Estos microorganismos organizados en comunidades denominadas microbiota, impiden la colonización de agentes patógenos compitiendo con ellos por los nutrientes, produciendo metabolitos antimicrobianos como el ácido láctico y estimulando la producción de AMPs por parte de las células epiteliales (Riera Romo *et al.*, 2016; Thaïs *et al.*, 2016).

2.1.1.2. Componentes humorales de la inmunidad innata

Como se ha comentado anteriormente, las células epiteliales y los fagocitos producen diversos tipos de proteínas con actividad antimicrobiana, siendo las enzimas antibacterianas y los AMPs los más importantes. Por otro lado, en el plasma sanguíneo y otros fluidos corporales encontramos diferentes proteínas que juegan un papel muy importante en la inmunidad mediante el reconocimiento de células diana y patógenos y su acción efectora en la respuesta inmunitaria, destacando las proteínas de fase aguda, el sistema del complemento, algunas citocinas y anticuerpos naturales. Todos estos elementos constituyen los componentes humorales de la inmunidad innata (Murphy, 2012f).

- *Enzimas antibacterianas*: la diana de estas enzimas son componentes específicos de las paredes bacterianas. Las más importantes son la lisozima y la fosfolipasa A₂ (Murphy, 2012f).
- *Péptidos antimicrobianos, AMPs*: las tres familias más importantes de AMPs son las defensinas, las catelicidinas y las histatinas, cuya función es desestabilizar la membrana de bacterias, hongos y la cápside de algunos virus (Murphy, 2012f). Además, también regulan la producción de ciertas quimiocinas y promueven la quimiotaxis leucocitaria (Riera Romo *et al.*, 2016).
- *Proteínas de fase aguda*: son proteínas presentes en el plasma y en las secreciones epiteliales. Son sintetizadas en situaciones de infección, inflamación o traumatismo, aumentando sus concentraciones séricas en más de un 25% en respuesta al estímulo de citocinas proinflamatorias (Cray *et al.*, 2009; Riera Romo *et al.*, 2016). Las más importantes en la especie canina son la proteína C reactiva, el amiloide sérico A, la haptoglobina, la glicoproteína ácida- α 1, la ceruloplasmina y el fibrinógeno (Eckersall y Bell, 2010). Cada una de ellas tiene funciones concretas, pero de forma general intervienen en el reconocimiento antigénico, en la aglutinación, la opsonización y la activación del complemento, en la quimiotaxis leucocitaria, en la reparación tisular, etc. (Petersen *et al.*, 2004; Cray *et al.*, 2009; Riera Romo *et al.*, 2016).
- *Sistema del complemento*: se trata de uno de los elementos más importantes de la inmunidad innata. Está constituido por más de 30 proteínas plasmáticas diferentes mayoritariamente producidas en el hígado y en los macrófagos. Estas proteínas son sintetizadas como proenzimas inactivas denominadas zimógenos, circulando por el organismo en este estado en ausencia de infección. Cuando son activados por algún estímulo, los zimógenos sufren una escisión proteolítica tornándose en enzimáticamente

activos. La activación inicial de un zimógeno desencadena una cascada de proteólisis por la que se van activando el resto de zimógenos secuencialmente hasta generar el componente efector del complemento que llevará a cabo la eliminación del patógeno. La detección de un pequeño estímulo es capaz de producir una respuesta rápida que se va amplificando en cada paso de la cascada de activación (Parkin y Cohen, 2001; Murphy, 2012f). La activación del complemento puede ocurrir por tres vías: la clásica, la alternativa y la de la lectina. Las vías alternativa y de la lectina se activan por la presencia del agente patógeno, mientras que la vía clásica depende de la unión antígeno-anticuerpo, por lo que solo actúa en asociación con la inmunidad adquirida (Murphy, 2012f). Las funciones del complemento incluyen la opsonización de elementos patógenos, la quimiotaxis y reclutamiento de células efectoras de la inmunidad al lugar de activación y la lisis directa de los agentes patógenos mediante la formación de poros en las membranas celulares (Dunkelberger y Song, 2010).

- *Citocinas*: se trata de proteínas de bajo peso molecular secretadas fundamentalmente por células del sistema inmunitario que actúan como mensajeros moleculares regulando la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa mediante la comunicación entre las células (Sokol y Luster, 2015). Son secretadas en respuesta a numerosos estímulos, tales como la unión del antígeno a los receptores de linfocitos y la unión de los complejos antígeno-anticuerpo a los receptores de anticuerpos en la respuesta adaptativa o la unión de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, de sus siglas en inglés) a los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, de sus siglas en inglés) presentes en las células de la inmunidad innata, entre otros (O'Shea *et al.*, 2002; Commins *et al.*, 2010).

Tras su secreción participan en el crecimiento, diferenciación y activación celular y en el movimiento celular y el desarrollo inmunitario de tejidos y órganos. La naturaleza de las citocinas secretadas frente a un estímulo determinará el tipo de respuesta inmunitaria, pudiendo conducir fundamentalmente hacia una respuesta citotóxica, humoral, mediada por células, alérgica o inmunosupresora (Commins *et al.*, 2010; Sokol y Luster, 2015).

Estas proteínas presentan grandes diferencias estructurales y funcionales, y, sin embargo, comparten una serie de características: presentan una vida corta, son sintetizadas en respuesta a un estímulo, son secretadas rápidamente y no se almacenan, pueden ejercer efectos locales y/o sistémicos, autocrinos, paracrinos o endocrinos y pleiotrópicos o redundantes. Además, entre ellas pueden actuar de forma sinérgica o antagónica (Tizard, 2009g).

Para que las citocinas puedan llevar a cabo su acción biológica deben unirse a receptores de membrana específicos localizados en las células diana. Tras su unión se activa una cascada de transducción de señales que dará lugar a la transcripción génica. La regulación de la acción y la síntesis de las citocinas viene dada por tres mecanismos principales: cambios en la expresión del receptor, unión de proteínas específicas y la acción de las propias citocinas. Estos mecanismos pueden dar lugar a una retroalimentación positiva o negativa en la síntesis de las citocinas, regulando sus efectos (O'Shea *et al.*, 2002; Tizard, 2009g).

Estas moléculas pueden clasificarse estructuralmente en interleucinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF) o quimiocinas (Tizard, 2009g; Commins *et al.*, 2010).

La clasificación funcional de las citocinas describe sus actividades biológicas. A grandes rasgos, encontramos las estimuladoras de la hematopoyesis, destacando la IL-7 y la IL-13, entre otras, y las mediadoras y reguladoras de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa. Cada una de ellas es sintetizada por ciertos tipos celulares concretos, ejerciendo su función mediadora y reguladora sobre dianas específicas. Además, muchas citocinas participan tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adquirida o actúan de nexo de unión entre ambos tipos de respuesta (Tizard, 2009g). Las de mayor relevancia para este trabajo serán abordadas en detalle en el apartado de componentes humorales de la inmunidad adaptativa.

- *Anticuerpos naturales*: los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs) naturales están constituidos mayoritariamente por el isotipo IgM y son sintetizados por los linfocitos B en ausencia de patógenos. Estas inmunoglobulinas preexistentes circulan libremente por el plasma y son un componente destacado de la inmunidad innata, ya que son capaces de reaccionar frente a antígenos y sustancias microbianas activando la cascada del complemento por la vía clásica (Riera Romo *et al.*, 2016). Su existencia en la especie canina ha sido demostrada en estudios de transfusiones fundamentalmente (Priolo *et al.*, 2018).

2.1.1.3. Componentes celulares de la inmunidad innata

Los componentes celulares de la inmunidad innata se originan en la médula ósea a partir de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales. Estas células madre dan lugar a todos los elementos de la sangre: la serie roja, para el transporte de oxígeno, las plaquetas, que participan en la coagulación, y la serie blanca o leucocitos del sistema inmunitario. En función de sus

progenitores, las células del sistema inmunitario innato y adquirido podrán pertenecer a la estirpe linfoide o mieloide (Murphy, 2012d).

A continuación haremos una revisión de las características y funciones más relevantes de los elementos celulares que participan en la respuesta inmunitaria innata y su forma de desarrollarla, comenzando por los pertenecientes a la estirpe mieloide.

- *Neutrófilos*: también denominados fagocitos e incluidos entre los granulocitos polimorfonucleares. Son los leucocitos más abundantes en la sangre de los pequeños animales, tienen una vida media corta y se encuentran en el torrente sanguíneo mayoritariamente, salvo un pequeño grupo que se localiza secuestrado en los capilares. En situaciones de inflamación, su número en sangre puede incrementarse hasta diez veces. Constituyen una de las primeras líneas de defensa mediante su rápido reclutamiento al lugar de infección. Su función principal es la fagocitosis y destrucción de agentes patógenos por mecanismos oxidativos o enzimáticos. También tienen capacidad de sintetizar ciertas citocinas (Tizard, 2009h; Kubes, 2018).
- *Monocitos-macrófagos*: conforman el sistema mononuclear fagocitario. Una vez liberados de la médula ósea circulan por el torrente sanguíneo como monocitos, para posteriormente migrar a diferentes órganos y tejidos. Los monocitos permanecen unos tres días en la circulación sistémica antes de migrar a los tejidos, donde maduran y se transforman en macrófagos que, en ausencia de infección, tienen una vida media prolongada. Su función más destacada es la fagocitosis y eliminación de agentes patógenos y restos celulares. Junto con las células dendríticas y los mastocitos constituyen el brazo centinela de la inmunidad, detectando microorganismos gracias a sus receptores PRR. Además, cuando se activan, liberan gran cantidad de citocinas proinflamatorias y presentan antígenos a los linfocitos T, promoviendo su activación. Por ello, tienen un papel central tanto en la respuesta inmunitaria innata tardía como en la adquirida (Tizard, 2009i; Riera Romo *et al.*, 2016).
- *Eosinófilos y basófilos*: también forman parte de los granulocitos polimorfonucleares. Son leucocitos poco abundantes en el torrente sanguíneo. Sus gránulos citoplasmáticos poseen gran variedad de enzimas y proteínas con actividad tóxica y se cree que son importantes en la defensa frente a parásitos. Además, participan en las respuestas inflamatorias de base alérgica, donde sus efectos son más lesivos que protectores (Murphy, 2012d).
- *Mastocitos*: su progenitor en la médula ósea no está claramente definido. Los mastocitos, una vez liberados, migran a lugares del organismo altamente expuestos a patógenos, encontrándose en gran medida en la piel, el intestino y las vías respiratorias en localización perivascular. Su función en la inmunidad innata y, en concreto, en la inflamación aguda es

muy importante, ya que, ante la presencia de un patógeno, liberan las moléculas inflamatorias confinadas en sus gránulos citoplasmáticos, regulando el flujo sanguíneo y la migración celular (Tizard, 2009f).

- *Células dendríticas*: se trata de una mezcla de células heterogéneas que pueden ser clasificadas en dos poblaciones en función de sus precursores: las de origen mieloide, que se originan a partir de monocitos sanguíneos; y las de origen plasmocitoide, que derivan de precursores linfoides. Se encuentran prácticamente en todos los órganos, siendo especialmente abundantes en lugares de gran exposición antigénica, tales como los nódulos linfáticos, la piel y las superficies mucosas. Presentan una morfología característica, con prolongaciones citoplasmáticas llamadas dendritas, que facilitan la captación del antígeno y la comunicación celular.

Actúan como células centinela junto con los macrófagos y los mastocitos, siendo capaces de captar patógenos y desencadenar una respuesta inflamatoria aguda, actuando así como agentes de la inmunidad innata. Su función más importante es la de presentar el antígeno, desencadenando la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Por ello, se considera que constituyen el nexo o puente entre ambas respuestas. Tienen una gran capacidad para captar, procesar y presentar un amplio repertorio de antígenos a través del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Una vez procesado el antígeno, migran a los diversos órganos linfoides para llevar a cabo la presentación antigénica y la expansión de la respuesta inmunitaria. Además, las células dendríticas son las únicas células presentadoras de antígeno (CPA) capaces de activar a los linfocitos T vírgenes o *naive*. También desempeñan un papel importante en la tolerancia inmunitaria mediante la inducción de la apoptosis de linfocitos que reconocen antígenos propios y mediante la estimulación de la producción de linfocitos T reguladores (Treg) (Collin y Bigley, 2018; Macri *et al.*, 2018).

Los componentes de origen linfoide con gran implicación en la respuesta inmunitaria innata son los que se detallan a continuación:

- *Células asesinas naturales (NK, de sus siglas en inglés)*: constituyen una población de linfocitos grandes y granulares que no pertenecen ni a la población de linfocitos B ni T en función de sus marcadores de superficie y a la falta de expresión de receptores de antígeno propios de los linfocitos. Se distribuyen ampliamente tanto por tejidos linfoides como no linfoides y en la sangre, llegando a suponer del 2 al 18% de los linfocitos presentes en sangre circulante. Se consideran células efectoras de la inmunidad innata debido a su función centinela sobre células tumorales e infecciones microbianas, limitando su

expansión y el consecuente daño tisular (Vivier *et al.*, 2008). Además, también presentan características reguladoras mediante sus interacciones recíprocas con células dendríticas, macrófagos, linfocitos T y células endoteliales. Por ello, tienen la capacidad para limitar o exacerbar las respuestas inmunitarias tanto innatas como adquiridas (Hamerman *et al.*, 2005).

La regulación de sus funciones viene determinada por el equilibrio en la expresión de receptores de superficie activadores o inhibidores. Sus receptores más importantes son los receptores para moléculas del CMH clase I, como los KIRs (*Killer immunoglobulin-like receptor*, de sus siglas en inglés). El CMH I está presente en la mayor parte de células sanas del organismo, de modo que cuando una célula presenta una expresión adecuada de esta molécula se induce tolerancia inmunológica y, sin embargo, cuando esta molécula no es identificada por las células NK o se encuentra alterada, se inician sus funciones. Su capacidad citotóxica viene determinada por la liberación de sustancias citolíticas contenidas en sus gránulos citoplasmáticos, siendo la más importante la perforina. Son capaces de producir diversas citocinas, destacando el IFN- γ y el TNF- α . (Kirwan y Burshtyn, 2007; Vivier *et al.*, 2008).

- *Linfocitos T $\gamma\delta$* : conforman una pequeña población de linfocitos T caracterizados por presentar un receptor de antígeno (TCR) diferente del de los linfocitos T convencionales. Son más abundantes en el epitelio de superficies mucosas, donde el contacto con agentes patógenos es mayor. Sin embargo, también se encuentran en la sangre y en otras localizaciones, como el hígado. Son considerados células efectoras de la inmunidad innata por el hecho de que, a diferencia de los linfocitos T $\alpha\beta$ convencionales, no requieren del reconocimiento del antígeno unido a moléculas del CMH para llevar a cabo sus funciones. Participan en la eliminación de patógenos de diversa índole, además de eliminar células infectadas y/o alteradas mediante la producción de diversas citocinas, quimiocinas y enzimas líticas (Zhao *et al.*, 2018).
- *Linfocitos B fagocíticos o B-1*: se corresponden con un linaje minoritario de linfocitos B localizados en las cavidades pleural y peritoneal. Tienen capacidad de producir anticuerpos naturales (IgM) y fagocitar antígenos que posteriormente presentan a los linfocitos T colaboradores o *helper* (Th). Por ello, tienen un papel importante tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa (Riera Romo *et al.*, 2016).

La respuesta inmunitaria innata se inicia cuando el organismo detecta una agresión, bien una invasión microbiana o la presencia de células lesionadas, alteradas o muertas. Tanto los

microorganismos como las células dañadas presentan una serie de moléculas con características específicas que hacen que puedan ser reconocidas por los diferentes componentes de la inmunidad innata detallados anteriormente e inducir su activación y, con ello, el inicio de una respuesta inmunitaria rápida (Tizard, 2009f).

En el caso de los microorganismos, estas moléculas son los PAMPs. Estos PAMPs son moléculas altamente conservadas en el genoma de los microorganismos debido a su gran relevancia en la supervivencia y patogenicidad de los mismos. Algunos de los más relevantes son los ácidos lipoproteicos y los peptidoglucanos de las paredes de las bacterias Gram-positivas, el lipopolisacárido (LPS) de las paredes de las bacterias Gram-negativas, los mananos presentes en las levaduras o el ADN bacteriano. Por otro lado, las células dañadas del organismo liberan moléculas denominadas alarminas, entre las que se incluyen los AMPs y algunas citocinas y quimiocinas con propiedades antimicrobianas intrínsecas y capacidad de activar a las células del sistema inmunitario innato e, indirectamente, promover el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa, como se detalló anteriormente (Tizard, 2009f; Brubaker *et al.*, 2015).

La detección de estas moléculas es llevada a cabo especialmente por las células centinela del sistema inmunitario innato, los macrófagos, los mastocitos y las células dendríticas, aunque también por los neutrófilos, las células endoteliales y epiteliales y algunos tipos de linfocitos. Para ello, estas células emplean un tipo de receptores con una alta especificidad para los diversos PAMPs, predeterminada genéticamente: los receptores PRRs (Tizard, 2009f; Murphy, 2012d). Los PRRs pueden ser clasificados en cinco familias en función de su estructura proteica. Los receptores tipo Toll (TLR, de sus siglas en inglés), sin duda los PRRs de mayor importancia, son glucoproteínas de cadena corta capaces de reconocer una o más moléculas microbianas cada uno, habiéndose descrito 14 tipos diferentes. También encontramos los receptores de lectina tipo C (CLRs, de sus siglas en inglés), los receptores tipo NOD, los receptores tipo RIG-1 y los sensores de ADN citosólico. Los TLRs y los CLRs se localizan en la membrana celular y en vesículas endosómicas, mientras que los NOD, RIG-1 y sensores de ADN citosólico se localizan en el citoplasma celular (Brubaker *et al.*, 2015).

Tras el reconocimiento de un PAMP o una alarmina por parte de un PRR, se iniciará una cascada de transducción de señales en la célula efectora de la inmunidad innata que le permitirá llevar a cabo sus funciones biológicas. Esta respuesta puede ser transcripcional y derivar en la producción de diversas citocinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos, para iniciar la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, o no conllevar transcripción e inducir funciones como la fagocitosis o la activación del sistema del complemento. La coordinación de estas vías de señalización regula la respuesta inmunitaria inicial para evitar la propagación de las infecciones

y dirigirla hacia una correcta respuesta adaptativa (Brubaker *et al.*, 2015; Iwasaki y Medzhitov, 2015).

Desde hace varios años, múltiples estudios han demostrado la existencia de ciertas características propias de la inmunidad adaptativa en células centinela de la inmunidad innata, concretamente en los monocitos-macrófagos y en las células NK. Estas dos poblaciones celulares parecen presentar cierta memoria inmunológica, característica que se ha propuesto denominar como “inmunidad entrenada”. Este hecho se basa en que ambas líneas celulares son capaces de sufrir cambios epigenéticos en sus histonas y modular sus receptores de reconocimiento antigénico localizados en su membrana tras la interacción con un antígeno, de forma que tras una segunda exposición al mismo o a otro semejante son capaces de conferir protección al organismo independientemente de la inmunidad adaptativa. Este hecho se sustenta, además, en una mayor capacidad de proliferación de estas células en reinfecciones y en el largo tiempo de supervivencia de las mismas en órganos linfoides tras un primer contacto antigénico (Quintin *et al.*, 2014; Hajishengallis *et al.*, 2019).

2.1.2. Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa se caracteriza por llevar a cabo un reconocimiento antigénico más amplio y específico que la inmunidad innata, tanto de antígenos propios como ajenos. Su puesta en marcha depende de una interacción muy regulada entre las células presentadoras de antígeno de la inmunidad innata y los linfocitos T y B de la adaptativa, lo que desencadena sus principales funciones: respuesta patógeno-específica, generación de memoria inmunológica de larga duración y regulación de la homeostasis inmunitaria (Parkin y Cohen, 2001; Tizard, 2009e; Bonilla y Oettgen, 2010; den Haan *et al.*, 2014).

Los linfocitos son las principales células de la inmunidad adaptativa y su desarrollo, maduración y activación se producen en los diferentes órganos linfoides. Durante su desarrollo, tiene lugar una reorganización y un ensamblaje de diversos segmentos génicos para la generación de nuevos genes, que codificarán unos receptores antigénicos de gran especificidad tanto en linfocitos T como B, a diferencia de los receptores de las células de la inmunidad innata, cuyos receptores se encuentran codificados en la línea germinal del genoma y son por ello limitados. Gracias a estos mecanismos de reordenamiento, se genera un gran repertorio de receptores capaces de reconocer diversos componentes de la mayoría de los potenciales patógenos y generar una respuesta inmunitaria de gran flexibilidad y especificidad (Tizard, 2009d; Bonilla y Oettgen, 2010; Murphy, 2012b).

Otra de las grandes funciones de la inmunidad adaptativa es la generación de células de memoria. El primer contacto patogénico con los linfocitos de la inmunidad adaptativa da lugar a la aparición de poblaciones de gran longevidad con capacidad de responder rápidamente y generar una respuesta protectora de mayor potencia e intensidad ante una nueva exposición al mismo antígeno (Parkin y Cohen, 2001; Tizard, 2009e; Bonilla y Oettgen, 2010).

Por otra parte, cabe destacar la capacidad de expansión clonal de la inmunidad adaptativa, que consiste en el desarrollo de numerosos linfocitos con receptores específicos frente a un mismo patógeno, aumentando la magnitud de la respuesta. Este fenómeno no solo es mediado por los elementos celulares, sino también por los elementos humorales que conforman este tipo de inmunidad (Tizard, 2009e; Bonilla y Oettgen, 2010; Murphy, 2012c).

Dada la generación al azar de los receptores que ligan antígenos en los linfocitos T y B, la producción inicial de células autorreactivas no puede evitarse. Para solventar este problema y evitar daños al organismo, la inmunidad adquirida cuenta con un sofisticado sistema de tolerancia por el cual estas células autorreactivas son eliminadas o sufren una modificación en sus receptores. Este fenómeno recibe el nombre de auto-tolerancia inmunitaria (Tizard, 2009e; Murphy, 2012c).

La gran especificidad en el reconocimiento antigénico de la inmunidad adquirida ha permitido la especialización de la respuesta inmunitaria en función del tipo de agente patógeno. A grandes rasgos podemos dividir estas respuestas en humoral y celular. La respuesta adaptativa humoral suele desencadenarse frente a patógenos extracelulares y es mediada por los linfocitos B, que producen unas moléculas denominadas inmunoglobulinas o anticuerpos, que son específicas frente a un determinado antígeno. Por otro lado, la respuesta adaptativa celular se activa en presencia de patógenos intracelulares y es mediada por los linfocitos T (Tizard, 2009d; Murphy, 2012d).

A continuación, se detallarán los principales componentes tanto humorales como celulares de la inmunidad adaptativa y los órganos linfoides implicados en la generación de este tipo de respuesta inmunitaria.

2.1.2.1. Órganos y tejidos de la inmunidad adaptativa

Como ya se ha comentado previamente en esta revisión, los linfocitos se originan en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas pluripotenciales. Posteriormente, migran a los denominados órganos linfoides primarios, donde tiene lugar su desarrollo y maduración. A continuación, estos linfocitos “vírgenes”, es decir, que no han tenido contacto antigénico,

acudirán a los órganos linfoides secundarios de la inmunidad, donde se encontrarán con las células presentadoras de antígeno o con los propios antígenos. En estos órganos linfoides secundarios tendrá lugar el reconocimiento antigénico, la activación de los linfocitos y el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa (Pabst, 2007; Tizard, 2009k; Pereira *et al.*, 2019). En la última década, dada la gran semejanza estructural y conformación celular de los lugares de inflamación crónica con los órganos linfoides secundarios, la comunidad científica ha consensuado denominar a estas localizaciones órganos linfoides terciarios (Mueller *et al.*, 2018).

- *Órganos linfoides primarios:* en ellos tiene lugar el proceso de maduración de los linfocitos por el cual expresarán sus receptores específicos de antígeno y con ello su diferenciación fenotípica y funcional. Los principales órganos linfoides primarios en los mamíferos son el timo, la médula ósea, las placas de Peyer y los complejos linfoglandulares.

El **timo** es un órgano localizado en la región mediastínica, cuya función principal es el desarrollo y maduración de los linfocitos T, y que involuciona con la edad. Está constituido por una región cortical y una región medular que albergan células epiteliales tímicas que participan activamente en el proceso de maduración linfocítica. Una vez que los progenitores de linfocitos T penetran en la región cortical tímica, son guiados por quimiocinas producidas por dichas células epiteliales a través del timo y sufrirán un proceso de maduración que incluye su multiplicación, la expresión del receptor de superficie específico de antígeno de estas células (TCR), una selección negativa de las células T potencialmente autorreactivas y la selección positiva de linfocitos T capaces de reconocer antígenos unidos al CMH. Posteriormente, estos linfocitos T “vírgenes” abandonarán el timo para dirigirse a los órganos linfoides secundarios donde tendrá lugar el encuentro con el antígeno y el inicio de sus funciones efectoras (Thapa y Farber, 2019).

La **médula ósea**, por su parte, es un órgano hematopoyético donde se localizan las células madre hematopoyéticas pluripotenciales, que darán lugar a todas las células sanguíneas circulantes, incluidos los linfocitos. En ella tiene lugar la proliferación y maduración de los linfocitos B en algunas especies, tales como los primates. Sin embargo, en la especie canina parece que este proceso se desarrolla mayoritariamente en las placas de Peyer intestinales, como se detallará a continuación (Tizard, 2009k).

Cabe destacar que, además de las típicas funciones de órganos linfoides primarios, tanto en el timo como en la médula ósea parecen tener lugar fenómenos habituales de los órganos linfoides secundarios. En el timo, se ha descrito la presencia de células dendríticas, de colonias de granulocitos macrófagos y de aferentes linfáticos similares a los encontrados en los nódulos linfáticos, que permiten la llegada de diversas células del sistema inmunitario diferentes a los progenitores linfocitarios. Por su parte, la médula ósea parece

jugar un papel importante en la migración y proliferación de linfocitos T de memoria, constituyendo un gran reservorio de linfocitos T citotóxicos de memoria. Además, en ella se encuentran gran cantidad de células dendríticas, macrófagos y linfocitos B maduros productores de anticuerpos o células plasmáticas, constituyendo una fuente importante de los mismos (Pabst, 2007).

Del mismo modo, las **placas de Peyer**, concretamente en la especie canina y en otras especies de mamíferos, presentan funciones tanto de órganos linfoides primarios como secundarios. Las placas de Peyer se localizan en el intestino delgado, la mayoría (80-90%) en el íleon, y también se encuentran, aunque en menor número, en el duodeno y en el yeyuno. Están constituidas por folículos linfoides separados por una envoltura de tejido conectivo y albergan en su gran mayoría linfocitos B. En las placas de Peyer encontramos centros germinales, donde llegan progenitores de linfocitos B desde la médula ósea, teniendo lugar procesos de multiplicación, maduración y selección de esta subpoblación linfocitaria. Las placas de Peyer, debido a su localización, están expuestas a una gran cantidad de antígenos, tanto bacterianos como derivados de alimentos y del ambiente. En ellas encontramos unas células epiteliales especializadas denominadas células M, que captan los antígenos y los interiorizan para que las células presentadoras de antígeno los presenten tanto a los linfocitos T como B. Por lo tanto, en esta localización tiene lugar la maduración de los linfocitos B y el desarrollo de células plasmáticas, siendo el lugar de mayor producción de IgA del organismo (Tizard, 2009k; Reboldi y Cyster, 2016).

Los **complejos linfoglandulares** son acúmulos de tejido linfoide localizados en la submucosa del colon de algunas especies de mamíferos, entre las que se encuentran los perros. Están formados por células caliciformes, linfocitos intraepiteliales, células M y plasmáticas. Aunque su función no está muy clara, dada su composición celular se cree que tienen una participación muy activa en la captación antigénica y en la respuesta inmunitaria adaptativa (Tizard, 2009k).

- *Órganos linfoides secundarios*: estos órganos persisten durante toda la vida del animal. Además, a diferencia de los primarios, aumentan en respuesta a las estimulaciones antigénicas. Los de mayor importancia son los nódulos linfáticos, el bazo, las tonsilas y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, de sus siglas en inglés). En ellos, tiene lugar la captación antigénica por parte de las células presentadoras de antígeno y la activación de linfocitos tras su reconocimiento, dando lugar a las respuestas inmunitarias adaptativas (Tizard, 2009k).

Los **nódulos linfáticos** son pequeñas estructuras redondeadas localizadas estratégicamente entre los vasos linfáticos, que capturan los antígenos transportados en la

linfa. Presentan múltiples células inmunitarias, destacando linfocitos, macrófagos y células dendríticas, que están interconectadas formando una estructura reticular. Estructuralmente, presentan: una cápsula conjuntiva, por donde penetran múltiples vasos aferentes linfáticos; una corteza, donde predominan centros germinales con linfocitos B en diferentes estados de maduración y un pequeño número de linfocitos T rodeando estas estructuras; una paracorteza, con abundantes linfocitos T y células dendríticas; una médula con células dendríticas, macrófagos, linfocitos B y células plasmáticas principalmente; y un hilio, por donde sale un único vaso linfático eferente. Los antígenos son transportados desde cualquier zona del organismo a los nódulos linfáticos, bien libres en la linfa o en las células presentadoras de antígeno. Una vez el antígeno llega al nódulo linfático, tiene lugar la presentación antigénica y la activación de las diversas poblaciones linfocitarias presentes, desencadenando un tipo de respuesta que dependerá de la naturaleza del patógeno. Cabe destacar que los linfocitos vírgenes penetran en el nódulo linfático a través de las vénulas endoteliales altas y son conducidos mediante la acción de múltiples estímulos tales como las quimiocinas (von Andrian y Mempel, 2003; Tizard, 2009k).

El **bazo** es un órgano especializado en la filtración de la sangre, constituido por dos principales regiones claramente diferenciadas. La pulpa roja es la encargada de la eliminación de restos celulares, partículas y ciertas bacterias y protozoos encapsulados, entre otros. Además, también actúa como reservorio de glóbulos rojos y plaquetas, recicla el hierro y asume la producción de eritrocitos en el feto (Tizard, 2009k). Por otro lado, la pulpa blanca constituye el tejido linfoide altamente organizado del bazo. Este órgano carece de aferentes linfáticos y de vénulas endoteliales altas. Por ello, las células inmunitarias penetran en él directamente desde la sangre y mediante el uso de ciertas moléculas de adhesión. En la pulpa blanca, las células inmunitarias están organizadas en vainas periarteriolas que finalizan en senos venosos que drenan directamente a las vénulas esplénicas. Estas vainas pueden ser linfoides, con linfocitos B y T, o compuestas por macrófagos y células dendríticas. Una vez llega el antígeno, libre desde la sangre o captado por las células presentadoras de antígeno, se inicia la respuesta inmunitaria. El bazo también ejerce funciones de órgano linfoide primario, ya que en él también tienen lugar procesos de expansión clonal, desarrollo y maduración de linfocitos B (Pabst, 2007; Tizard, 2009k).

Las **tonsilas** están construidas por tejido linfoide asociado a un tejido epitelial reticular especializado en la captación antigénica. A pesar de no estar encapsuladas, presentan compartimentos claramente definidos. En ellas encontramos un área folicular y germinal con predominio de linfocitos B y un área parafolicular con linfocitos T y vénulas endoteliales altas que permiten la recirculación linfocítica. Su distribución es variable en la

cavidad oral y faríngea entre los mamíferos, destacando sus grandes variaciones de tamaño en función de la edad y en respuesta a ciertas infecciones (Pabst, 2007).

Otros órganos linfoides secundarios de gran importancia y mayor cantidad de tejido linfoide, aunque disperso, son la **piel** y el **MALT**. Como se ha comentado anteriormente, la piel constituye la primera barrera física, química y microbiológica del organismo frente a las agresiones, pero además cuenta con un sistema inmunitario organizado y complejo con elementos celulares especializados que participan en la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa. Por su parte el MALT se localiza en las mucosas de los tractos respiratorio, urogenital y digestivo, en contacto continuo con múltiples antígenos (Murphy, 2012e). En el siguiente apartado de esta revisión se abordará en detalle la estructura y función del MALT, concretamente del sistema inmunitario asociado al intestino (GALT, de sus siglas en inglés) dada su relevancia en este trabajo.

- **Órganos linfoides terciarios:** Las células inmunitarias que son reclutadas en un foco inflamatorio dan lugar a la formación de estructuras que se asemejan a los órganos linfoides secundarios. La estrecha interacción que tiene lugar entre los leucocitos y las células estromales o del tejido conjuntivo durante un proceso inflamatorio, da lugar a la formación de estructuras anatómicas definidas como órganos linfoides terciarios o ectópicos. Estas estructuras se constituyen para satisfacer los requerimientos de células inmunitarias en un tejido inflamado. Se caracterizan por desarrollarse en órganos y tejidos que no están predispuestos a la generación independiente de una respuesta inmunitaria (Mueller *et al.*, 2018). En estas formaciones tienen lugar procesos de linfomogénesis, que resultan en la aparición de áreas bien diferenciadas de agregaciones de linfocitos T y B, vénulas endoteliales altas, células endoteliales linfáticas, células dendríticas, etc. Son capaces de ir adquiriendo los elementos necesarios para que en ellos tenga lugar la maduración y desarrollo de linfocitos en respuesta a autoantígenos, la presentación antigénica y todo lo necesario para desencadenar su propia respuesta inmunitaria independiente de los órganos linfoides secundarios (Mueller *et al.*, 2018).

2.1.2.2. Componentes humorales de la inmunidad adaptativa

Los principales componentes humorales de la inmunidad adaptativa son las citocinas y los anticuerpos. Sin embargo, dada la interconexión e importancia de la inmunidad innata sobre las respuestas de tipo adaptativo, muchos componentes humorales ya descritos en la inmunidad innata también forman parte de los mecanismos adaptativos de la inmunidad. Algunos ejemplos son el sistema del complemento, algunos péptidos antimicrobianos y muchas citocinas, entre las

que destacan el TNF- α , el IFN- γ , la IL-10 y la IL-6 (Tizard, 2009g, 2009e; Iwasaki y Medzhitov, 2015).

➤ *Citocinas de la inmunidad adaptativa:* como se comentó en el apartado de componentes humorales de la inmunidad innata de esta revisión, las citocinas son los principales mensajeros moleculares que regulan la respuesta inmunitaria mediante la comunicación entre las células (Sokol y Luster, 2015). Las que destacan por sus funciones en la inmunidad adaptativa son las IL-2, -4, -5, -13, -17 y -21, el IFN- γ y el TNF- β . En esta revisión abordaremos en detalle la IL-4 y el IFN- γ dada su gran relevancia en este trabajo.

- **IL-4:** es una glucoproteína producida mayoritariamente por linfocitos T CD4⁺ o Th y en menor medida por una población de células NK, denominadas NKT. Además, algunas poblaciones celulares de la inmunidad innata tales como los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos son capaces de sintetizarla (Paul, 2015; Ho y Miaw, 2016).

La IL-4 es un potente factor de crecimiento y supervivencia de los linfocitos B, promueve el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas para la producción de IgE e IgG1 y aumenta la expresión del receptor de IgE (CD23) y del CMH tipo II en los linfocitos B. También juega un papel importante en la regulación de la función de los macrófagos, ya que induce su activación y la producción de IL-10 con efectos antiinflamatorios por parte de estas células. Aunque no es necesaria para el desarrollo de los mastocitos, promueve su proliferación, supervivencia, adhesión y quimiotaxis mediante el aumento de la expresión del receptor de IgE en su superficie, favoreciendo su degranulación (Ho y Miaw, 2016). Estudios *in vitro* han determinado su posible implicación en la diferenciación de las células dendríticas a partir de los precursores mieloides y de una nueva población de linfocitos T CD8⁺ innatos y en la inhibición de la actividad de las células NK (Lee *et al.*, 2011; Marcais *et al.*, 2013)

Otra de sus funciones importantes es favorecer la diferenciación de los linfocitos Th en Th2 que, a su vez, secretarán más IL-4, por lo que ejerce una retroalimentación positiva en su propia producción. Por el contrario, es capaz de inhibir la diferenciación de los linfocitos Th hacia otras subpoblaciones, como Th1 o Th17, ejerciendo sobre ellos el efecto contrario, es decir, de retroalimentación negativa. Por su parte las citocinas producidas por estas subpoblaciones linfocitarias, como el IFN- γ y la IL-17, respectivamente, también actúan como factores de transcripción negativos para IL-4, regulándose así los unos a los otros (Paul, 2015; Ho y Miaw, 2016).

Esta interleucina presenta además una serie de funciones que pueden ser consideradas no estrictamente inmunológicas, actuando directa o indirectamente sobre

células no inmunitarias. Entre ellas destacan la inhibición de la linfangiogénesis, mediante su acción directa sobre las células linfáticas endoteliales, y su participación en el control de la hipotermia, promoviendo la diferenciación de macrófagos activados en el tejido adiposo y favoreciendo la lipólisis de este tejido (Ho y Miaw, 2016).

- **IFN- γ** : los interferones son una familia de citocinas con actividad antivírica. Sin embargo, dentro de ellos, el IFN- γ es el de menor efectividad frente a las agresiones víricas (Young y Bream, 2007). Dicho interferón es una proteína homodimérica producido por células tanto de la inmunidad innata como adquirida y juega un papel muy relevante en el curso de ambas respuestas inmunitarias. En cuanto a las células de la inmunidad innata, es sintetizado mayoritariamente por las células NK activadas y en menor medida por los linfocitos T $\gamma\delta$ y por algunas células presentadoras de antígeno. Por su parte, los principales productores de esta citocina en las respuestas adquiridas son los linfocitos Th1, los linfocitos Tc y los linfocitos T reguladores (Treg) tras el reconocimiento antigénico. Su síntesis se ve incrementada en presencia de IL-12 e IL-18 (Schroder *et al.*, 2004; Young y Bream, 2007; Billiau y Matthys, 2009).

El IFN- γ tiene un papel crucial en las respuestas inmunitarias frente a patógenos intracelulares, en la inmunidad antitumoral y es considerado el principal activador macrofágico (Schroder *et al.*, 2004; Billiau y Matthys, 2009). Su efecto sobre los macrófagos consiste en estimular la síntesis de sustancias tales como radicales libres de oxígeno, que participan en la eliminación de los microorganismos fagocitados por los macrófagos. Además, esta citocina también estimula la citotoxicidad tumoral en dichas células (Billiau y Matthys, 2009). Otra función importante es la estimulación de la expresión del CMH I y II en una gran variedad de células, siendo otro factor de gran importancia en su efecto frente a agresores intracelulares (Schroder *et al.*, 2004).

Respecto a los linfocitos, induce la producción de ciertos isotipos de inmunoglobulinas tales como IgG2a e IgG3 por parte de los linfocitos B y se le han atribuido ciertos efectos antiapoptóticos sobre estas células. Del mismo modo que la IL-4, tiene un efecto de retroalimentación positiva en el desarrollo y diferenciación en su caso de los linfocitos Th en Th1, conllevando el aumento de su secreción, e inhibe la polarización de los linfocitos Th en las subpoblaciones Th2 o Th17 junto con la acción sinérgica de la IL-12. También hay evidencias de sus efectos en la generación y activación de los linfocitos Treg, participando por ello en la tolerancia inmunológica (Schroder *et al.*, 2004; Young y Bream, 2007).

Cabe destacar ciertas funciones de esta citocina sobre otras células: promueve la atracción y adhesión leucocitaria a focos de infección actuando sobre las células

endoteliales, estimula la fagocitosis y la citotoxicidad de los neutrófilos y puede afectar al desarrollo de las células progenitoras hematopoyéticas (positivamente si actúa junto con otras citocinas o negativamente si actúa en solitario, pudiendo tener un efecto supresor en esta situación) (Billiau y Matthys, 2009).

- *Anticuerpos*: son glucoproteínas heterodiméricas pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas y son considerados los principales componentes humorales de la inmunidad adaptativa. Estas proteínas son sintetizadas exclusivamente por los linfocitos B en sus diferentes estados de maduración. Pueden localizarse en la membrana del linfocito B formando su receptor de antígeno (BCR) o ser secretadas en su forma soluble y encontrarse en el plasma, en las secreciones mucosas o en el líquido intersticial de los tejidos (Tizard, 2009c; Schroeder y Cavacini, 2010).

Estructuralmente están constituidas por un par de cadenas pesadas (H) y un par de cadenas ligeras (L) unidas entre sí por puentes disulfuro y adoptando una morfología de “Y”. Tanto las cadenas ligeras como las pesadas presentan un dominio variable (V) y un dominio constante (C). Las cadenas ligeras presentan un único dominio constante, mientras que las pesadas pueden contener entre tres o cuatro. Dentro de las regiones variables de cada cadena encontramos varias regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs, de sus siglas en inglés) que se originan por procesos de reordenamiento génico e hipermutación somática tras la unión del antígeno y son por ello los lugares de unión específicos de antígeno. Los dominios constantes de las cadenas pesadas llevan a cabo las funciones efectoras específicas, siendo los lugares de unión al complemento y a los receptores celulares tales como los receptores Fc. Durante la respuesta inmunitaria, estas regiones pueden ser modificadas para variar la función efectora manteniendo intacta la especificidad antigénica asignada, determinando así el tipo de Ig. Existen cinco clases principales de dominios constantes de cadena pesada o de Ig, denominados isotipos. Estos isotipos se denominan IgA, IgD, IgG, IgM e IgE, con diferentes subclases en función de la especie. En la especie canina encontramos IgA, IgD, IgE (con las subclases IgE1 e IgE2), IgG (con las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM (Tizard, 2009b; Schroeder y Cavacini, 2010; Janda *et al.*, 2016). Los diferentes isotipos difieren en muchas propiedades, como el tamaño, la capacidad de fijación al complemento, la unión a los receptores Fc y la propia respuesta al antígeno. La síntesis de un isotipo u otro, por tanto, dependerá de la propia naturaleza del antígeno y de los mecanismos de señalización que sean activados tras la estimulación de la respuesta inmunitaria y del lugar donde ocurra este proceso (Schroeder y Cavacini, 2010).

Como se ha comentado, son secretadas exclusivamente por los linfocitos B en diferentes estados de maduración. Los linfocitos B inmaduros expresan genes para moléculas de inmunoglobulinas, pero solo producen pequeñas cantidades de estas glucoproteínas, la mayoría para la formación de su receptor BCR de membrana. Tras el reconocimiento antigénico, los linfocitos B comienzan su desarrollo y diferenciación hacia células plasmáticas, que son las mayores productoras de anticuerpos (Tizard, 2009c; Schroeder y Cavacini, 2010).

Sus funciones son muy variables dependiendo del isotipo. La IgM es la primera inmunoglobulina expresada durante el desarrollo de los linfocitos B. Los linfocitos B vírgenes expresan IgM monomérica en su superficie. Sin embargo, tras la estimulación antigénica y la maduración de los linfocitos B, es secretada en forma pentamérica. A pesar de ser la Ig de menor especificidad debido a la inmadurez de los linfocitos que la producen, su estructura pentamérica le otorga gran avidéz para unirse a antígenos. Por este motivo son llamados anticuerpos naturales. Esta Ig participa en la opsonización del antígeno y en su destrucción por fijación del complemento. La IgD se encuentra en baja concentración en el suero y tiene la capacidad de unirse a ciertas proteínas bacterianas mediante su región constante, dando lugar a la activación y diferenciación de linfocitos B. Se localiza sobre todo en la superficie de linfocitos B presentes en órganos linfoides secundarios. La IgG es formada y secretada por las células plasmáticas del bazo, los nódulos linfáticos y la médula ósea fundamentalmente. Es el isotipo predominante en el organismo y el de mayor vida media. Su pequeño tamaño le otorga una gran capacidad de extravasación y de acción en focos de infección. Las subclases existentes de IgG presentan funciones diferentes, pero a grandes rasgos se caracterizan por su capacidad de activación de la cascada del complemento, por su capacidad de neutralización de toxinas y virus y por su capacidad de atravesar la placenta. La IgA es producida principalmente por las células plasmáticas localizadas en las mucosas corporales y bajo la superficie de la piel. Su concentración por lo tanto en estas localizaciones y en las secreciones corporales tales como la leche y la saliva es muy alta, siendo más baja en el suero. Su estructura es monomérica en el suero y dimérica en las superficies mucosas y en la piel. Juega un papel fundamental en la inmunidad de mucosas, neutralizando toxinas, virus y bacterias y dificultando su adhesión al epitelio. Además, también cabe destacar su efecto potenciador de la respuesta inmunitaria, favoreciendo el reconocimiento antigénico por parte de las células dendríticas en el intestino y mediante su unión a su receptor específico presente en neutrófilos situados en estas localizaciones. Finalmente, la IgE es la inmunoglobulina con menor vida media y menor concentración en el suero. Está asociada con reacciones de hipersensibilidad y reacciones alérgicas y juega un papel crucial en la respuesta inmunitaria frente a parásitos.

Esta respuesta es llevada a cabo tras su unión a sus receptores de gran afinidad localizados en mastocitos, basófilos, células dendríticas y eosinófilos, provocando la degranulación de estas células y el inicio de sus funciones efectoras (Tizard, 2009b; Bonilla y Oettgen, 2010; Schroeder y Cavacini, 2010).

2.1.2.3. Componentes celulares de la inmunidad adaptativa

Los principales componentes celulares de la inmunidad adaptativa son los linfocitos. Sin embargo, la función de las células presentadoras de antígeno en el procesamiento y exposición de estos antígenos a los linfocitos para la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa es imprescindible.

Los linfocitos son células que generalmente se describen como pequeñas y redondeadas con un núcleo grande delimitado por una capa citoplasmática, si bien existen variaciones de tamaño y contenido citoplasmático. Se encuentran distribuidos por todo el organismo y existen tres tipos principales: las células NK y los linfocitos B y T. Las células NK son de forma general ligeramente más grandes que los linfocitos B y T y contienen gránulos citoplasmáticos. Salvo esta característica, la estructura de los linfocitos no permite distinguir las diferentes estirpes o poblaciones linfocitarias (Tizard, 2009d).

Su semejanza estructural hace que para poder identificar y estudiar las distintas poblaciones linfocitarias haya que recurrir a sus moléculas de superficie e intracelulares específicas. Así, al patrón de moléculas que expresa una célula en concreto se le denomina inmunofenotipo. Para detectar estas moléculas se han utilizado diferentes marcadores antigénicos, siendo actualmente los anticuerpos monoclonales específicos los más empleados. Cada una de estas moléculas o marcadores recibe el nombre de un grupo de diferenciación o CD (*Cluster of Differentiation*, de sus siglas en inglés) seguido de un número, y puede ser detectada por uno o varios anticuerpos monoclonales (Bleesing y Fleisher, 2001; Tizard, 2009d). Los anticuerpos empleados para su detección pueden ir marcados directamente con sondas fluorescentes que los hacen visibles mediante el uso de técnicas de fluorescencia o indirectamente mediante el uso de anti-anticuerpos específicos marcados del mismo modo. Dentro de las técnicas más empleadas para la detección del inmunofenotipo, la citometría de flujo es una de las más destacadas (Bleesing y Fleisher, 2001; Tizard, 2009a).

A continuación se abordarán en detalle las características fenotípicas y funcionales de los linfocitos B y T y de las subpoblaciones de mayor relevancia de los linfocitos T.

- *Linfocitos B*: son los principales responsables de las respuestas inmunitarias humores. Se originan a partir de los progenitores linfoides de la médula ósea. En la propia médula o mayoritariamente en las placas de Peyer en la especie canina, tiene lugar el llamado desarrollo de linfocitos B independiente de antígeno, donde se generarán los linfocitos B inmaduros o vírgenes dotados de su receptor de antígeno o BCR. Cada linfocito B está recubierto por 200.000-500.000 BCRs. Cada BCR está constituido por varias cadenas peptídicas que se dividen en el componente de unión al antígeno y el de transducción de la señal de activación. Los linfocitos B tienen la capacidad de liberar su BCR en forma soluble a los fluidos corporales conformando los anticuerpos que presentan la misma especificidad antigénica que el propio receptor (Tizard, 2009c; Bonilla y Oettgen, 2010; Kurosaki, 2010; Pieper *et al.*, 2013).

Posteriormente, los linfocitos B vírgenes migrarán a los órganos linfoides secundarios, donde continuarán su maduración y donde tendrá lugar la activación y la expansión clonal de los mismos tras el contacto con el antígeno. La activación de los linfocitos B tiene lugar en una segunda fase de maduración que se denomina desarrollo de linfocitos B dependiente de antígeno. Dependiendo de los contactos con otras células del sistema inmunitario, citocinas y otros estímulos que reciban estas células activadas, se diferenciarán en células plasmáticas o linfocitos B de memoria. La activación de los linfocitos B puede ocurrir de dos maneras: una dependiente de la coestimulación de los linfocitos T y otra independiente de esta. Algunas clases antigénicas, como ciertas lecitinas de plantas, algunos polisacáridos o proteínas polimerizadas, pueden interactuar directamente con el BCR de los linfocitos B y desencadenar su activación y producción de anticuerpos. También estos linfocitos son capaces de activarse interactuando directamente con células dendríticas portadoras de antígeno. Este tipo de activación ofrece una respuesta rápida y adecuada previa al reclutamiento de los linfocitos T efectores. Sin embargo, la gran mayoría de respuestas humores de los linfocitos B frente a antígenos requieren la participación de los linfocitos T. Los antígenos pueden unirse al BCR del linfocito B directamente o ser presentados por las CPA (entre las que se incluyen los propios linfocitos B) iniciando su activación. Una vez que el antígeno se une al BCR, este es interiorizado, degradado y presentado en la molécula del CMH de tipo II del propio linfocito B. El complejo antígeno-CMH de tipo II será reconocido por el linfocito Th previamente activado por una CPA y proporcionará las señales necesarias para finalizar la maduración del linfocito B y su diferenciación a células de memoria o a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Estas señales son fundamentalmente la producción de ciertas citocinas, entre las que destacan la IL-4, -5, -6 y -13 (Batista y Harwood, 2009; Tizard, 2009c; Bonilla y Oettgen, 2010). Los linfocitos B de memoria y las células plasmáticas se localizan

fundamentalmente en la corteza de los nódulos linfáticos, en la zona marginal del bazo, en las placas de Peyer y, minoritariamente, en la sangre periférica (Bonilla y Oettgen, 2010; Kurosaki, 2010; Pieper *et al.*, 2013).

Fenotípicamente, se caracterizan por ser linfocitos negativos a CD3 (proteínas que conforman el receptor de los linfocitos T) y ser positivos a ciertos marcadores, que se utilizan en la actualidad para la caracterización de las diferentes poblaciones linfocitarias caninas. Entre estos marcadores destacan el CD45, presente en todas las células de origen hematopoyético (Luckschander *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2014; Galler *et al.*, 2017), la IgM de superficie que forma parte del receptor de los linfocitos B inmaduros (Wilkerson *et al.*, 2005), el CD79 α que conforma el péptido transductor de señales del BCR y abarca las regiones transmembrana e intracitoplasmáticas de este receptor y se encuentra tanto en las formas inmaduras como maduras de estos linfocitos (Faldyna *et al.*, 2001; Wilkerson *et al.*, 2005; Haas *et al.*, 2014; Galler *et al.*, 2017) y el CD21, glucoproteína de superficie que se localiza únicamente en linfocitos B maduros y forma el receptor de estas células para el complemento, también llamado por ello “receptor del complemento tipo 2” o CR2 (Faldyna *et al.*, 2001; Villaescusa *et al.*, 2012c; Watabe *et al.*, 2012; Platt *et al.*, 2013; Haas *et al.*, 2014; Galler *et al.*, 2017). Este último, junto con las glucoproteínas de superficie CD19 y CD86, forma el “complejo del correceptor de los linfocitos B” cuya activación amplifica en gran medida la respuesta de los linfocitos B tras la estimulación antigénica (Tizard, 2009c).

Los linfocitos B son un linaje celular mucho más homogéneo que los linfocitos T. Sin embargo, existen varias poblaciones de linfocitos B, algunas de las cuales todavía no han sido del todo caracterizadas. Las más estudiadas y de mayor relevancia por el momento son los linfocitos B1, B2 y B reguladores (Breg). Los linfocitos B1, como se comentó en el apartado de inmunidad innata, son una población minoritaria caracterizada por la producción de anticuerpos naturales IgM (Riera Romo *et al.*, 2016). Por su parte, los linfocitos B2 son los linfocitos B convencionales que se encargan de las respuestas inmunitarias humorales y constituyen la población mayoritaria (Allman y Pillai, 2008; Bonilla y Oettgen, 2010). Por último, los Breg son células con propiedades inmunosupresoras que participan en la tolerancia inmunitaria mediante la producción de citocinas tales como la IL-10, IL-35 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β , de sus siglas en inglés) que suprimen o limitan la expansión de otros linfocitos con propiedades proinflamatorias. Esta población ha sido caracterizada por el momento en humanos y en roedores (Rosser y Mauri, 2015).

- *Linfocitos T*: son los responsables de la respuesta inmunitaria adaptativa de base celular. A pesar de que en esta revisión también se abordarán nuevas poblaciones que se escapan de la clasificación tradicional, estos linfocitos se han dividido clásicamente en dos poblaciones mayoritarias: los linfocitos T colaboradores o *helper* (Th) y los linfocitos T citotóxicos (Tc). Los linfocitos Th son los principales reguladores de la respuesta inmunitaria adaptativa, ya que se activan tras su unión específica al antígeno, produciendo diversas citocinas que mediarán la actuación de numerosas células inmunitarias. Cabe destacar la gran importancia de su interacción con los linfocitos Tc y B para el desarrollo de sus funciones efectoras (Tizard, 2009m; Brummelman *et al.*, 2018). Por su parte, los linfocitos Tc se encargan principalmente de la eliminación de células alteradas o infectadas por patógenos intracelulares (O'Rourke y Mescher, 1993; Brummelman *et al.*, 2018).

Como ya se ha descrito anteriormente en esta revisión, los progenitores linfoides de linfocitos T migran al timo desde la médula ósea, donde tendrá lugar el mismo proceso independiente de antígeno que sufren los linfocitos B para su desarrollo y maduración. Del timo, tras los procesos de generación de receptores de antígeno específicos y selección positiva y negativa, saldrán linfocitos Th o Tc vírgenes que migrarán por el organismo hasta los órganos linfoides secundarios. Allí tendrá lugar el contacto antigénico, su maduración final y el inicio de sus funciones efectoras (Bonilla y Oettgen, 2010; Thapa y Farber, 2019).

Cada linfocito T posee en su superficie unos 30.000 receptores antigénicos específicos o TCRs. El TCR está constituido por varias cadenas de glucoproteínas, dos de las cuales se encuentran emparejadas formando el componente de unión al antígeno, mientras que el resto constituyen el componente de transducción de señales. En función de las cadenas peptídicas que forman el complejo de unión al antígeno, encontramos dos tipos de TCR: uno de ellos es denominado TCR $\alpha\beta$ y el otro TCR $\gamma\delta$. En la mayoría de los mamíferos, incluido el perro, entre el 90-99% de los linfocitos T presentan el TCR $\alpha\beta$ (Tizard, 2009m; Chisolm y Weinmann, 2015). Como ya se comentó anteriormente, los linfocitos T $\gamma\delta$ participan principalmente en las respuestas inmunitarias de tipo innato (Zhao *et al.*, 2018).

Las cadenas de unión al antígeno del TCR están asociadas con un grupo de proteínas que forman el complejo CD3, que se encarga de la transducción de señales y es un marcador presente en todos los linfocitos T. La activación de estos linfocitos tiene lugar cuando su TCR interactúa con un antígeno unido a la molécula del CMH. Los linfocitos Tc solo pueden ser activados por partículas expresadas en el CMH de tipo I. Esta molécula, presente en prácticamente todas las células del organismo, expresa péptidos originados

intracelularmente a partir de proteínas propias o procedentes de agentes patógenos. Por el contrario, el TCR de los linfocitos Th se une a antígenos presentados en moléculas del CMH de tipo II presentes en las CPA y otras células inmunitarias. Esto se relaciona con la existencia de dos proteínas estrechamente asociadas al TCR que se denominan CD4 y CD8 y que forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La proteína CD4 se localiza únicamente en los linfocitos Th y se une al CMH de tipo II, mientras que la proteína CD8 se encuentra en los linfocitos Tc y se une al CMH de tipo I. La unión del TCR al complejo péptido-CMH no es suficiente por sí misma para desencadenar la activación del linfocito T, sino que requiere de señales coestimuladoras que serán diferentes para los linfocitos Th y los linfocitos Tc y se abordarán en detalle a continuación (Alam y Gorska, 2003; Tizard, 2009m; Bonilla y Oettgen, 2010; Chisolm y Weinmann, 2015).

- **Linfocitos Th:** fenotípicamente se definen como linfocitos CD45+CD3+CD4+CD8-. En su activación, el primer paso es la unión del TCR al complejo péptido-CMH de tipo II. Esta unión recibe el nombre de sinapsis inmunitaria o complejo de activación supramolecular (Bonilla y Oettgen, 2010). Además de la formación de este complejo, se requieren señales coestimuladoras para que el linfocito Th desempeñe sus funciones biológicas. En primer lugar, ciertos ligandos de las CPA, como el CD40, se unen a receptores del linfocito Th estimulando la producción de diversas citocinas por parte de las CPA. Estas citocinas, además de estimular al propio linfocito T y determinar su modo de actuación frente al antígeno, estimularán a otras células inmunitarias tales como linfocitos B, macrófagos o células dendríticas. Finalmente, moléculas de adhesión, como las integrinas, prolongan la duración de la sinapsis inmunitaria para permitir la correcta transducción de señales y la activación final de los linfocitos Th que desencadenará la activación de genes que codifican citocinas específicas en función de la naturaleza antigénica (Tizard, 2009m; Murphy, 2012a).

Los linfocitos Th pueden dividirse en múltiples subpoblaciones en función de su fenotipo, del patrón de citocinas que producen y con ello, de sus funciones biológicas, que pueden ser efectoras o reguladoras, principalmente (Murphy, 2012a; Brummelman *et al.*, 2018). A continuación se describirán las de mayor relevancia:

- Th1: estos linfocitos son activados principalmente por células dendríticas y linfocitos B en presencia de IL-12. Juegan un papel importante en la protección frente a patógenos intracelulares mediante respuestas de base celular. Producen mayoritariamente IL-2, IFN- γ , TNF- α y TNF- β (Fietta y Delsante, 2009; Szabo *et al.*, 2015). Estas citocinas participan en la activación de los fagocitos mononucleares,

favoreciendo su maduración y aumentando su capacidad fagocítica (Brummelman *et al.*, 2018).

- Th2: responden al antígeno presentado por células dendríticas, macrófagos y en menor medida por los linfocitos B en presencia de IL-4. También presentan receptores para la IL-1 sintetizada por macrófagos y células dendríticas. Una vez activados producen mayoritariamente IL-4, -5 y -13. Participan en la protección frente a patógenos extracelulares y en reacciones alérgicas, estimulando la proliferación de linfocitos B y la secreción de anticuerpos IgE por parte de estas células (Tizard, 2009m; Brummelman *et al.*, 2018).
- Th0: se trata de una población de linfocitos Th con capacidad de producir citocinas tanto Th1 como Th2, por lo que podrían ser considerados precursores de estas subpoblaciones o células en transición. La presencia de esta población linfocitaria suele estar asociada al inicio de la respuesta inmunitaria (Tizard, 2009m).
- Th9: se trata de una población de reciente descripción con capacidad de secretar grandes cantidades de IL-9 tras la estimulación por múltiples citocinas, como IL-1, -2, -4 y -33, entre otras. Su actuación se ha relacionado con la defensa tumoral y la defensa frente a parásitos intestinales principalmente, aunque también parece contribuir en la inmunopatogenia de alteraciones alérgicas y autoinmunes (Brummelman *et al.*, 2018). Se trata de una población con gran plasticidad y capacidad de modificar su fenotipo bajo la influencia de ciertas citocinas (Sakaguchi *et al.*, 2010; Olivry *et al.*, 2016).
- Th17: su diferenciación requiere la presencia de múltiples citocinas tales como TGF- β , IL-1 β , -6, -21 y -23, aunque los mecanismos de maduración de esta población no están del todo establecidos. Sintetizan interleucinas de la familia IL-17 e IL-21. Participan en la respuesta inmunitaria innata y adquirida frente a bacterias y hongos extracelulares y también se han relacionado con patologías autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas, aunque sus funciones en la especie canina todavía están por determinar (Tizard, 2009m; Brummelman *et al.*, 2018; Akiyama *et al.*, 2019).
- Th22: aunque no se conocen con exactitud las citocinas responsables de su diferenciación, esta población de linfocitos Th se caracteriza por la producción de IL-4, -17 y -22, encontrándose fundamentalmente en la piel (Olivry *et al.*, 2016; Brummelman *et al.*, 2018).

- **Linfocitos Treg:** fenotípicamente se caracterizan por ser linfocitos CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3+ (Biller *et al.*, 2007; Horiuchi *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2011; Hauck *et al.*, 2016). Estos linfocitos pueden originarse en el timo, denominándose linfocitos Treg naturales, o en otros tejidos, denominándose Treg inducidos. Para su diferenciación y supervivencia, los Treg requieren la presencia de IL-2; de ahí su elevada expresión de CD25, que actúa como receptor de esta citocina (Lu *et al.*, 2017; Brummelman *et al.*, 2018). El factor de transcripción FoxP3 participa en la regulación génica de estas células y por ello controla su desarrollo (Tizard, 2009e; Lu *et al.*, 2017). Estos linfocitos constituyen una población minoritaria de linfocitos T, suponiendo alrededor de un 5% de los linfocitos T en sangre periférica y un 10% en los nódulos linfáticos en la especie canina, y están ampliamente distribuidos por el organismo (Tizard, 2009e). Sus funciones son principalmente reguladoras: mantienen la homeostasis inmunitaria, estableciendo un equilibrio entre la tolerancia y las respuestas inmunitarias. Tienen la capacidad de suprimir la activación y las funciones efectoras de otros leucocitos, previniendo situaciones de autoinmunidad, enfermedades inmunomediadas o alergia (Sakaguchi *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2017; Brummelman *et al.*, 2018). Estos linfocitos actúan secretando IL-10 y TGF- β en grandes cantidades (citocinas con un potente efecto inmunosupresor) o por contacto directo celular, teniendo efectos citotóxicos mediante la liberación de perforinas y granzimas o siendo disruptores metabólicos (Tizard, 2009e; Sakaguchi *et al.*, 2010). Por lo tanto, por diversos mecanismos llevan a cabo la supresión de la proliferación de linfocitos T autorreactivos en ausencia de antígeno. Sin embargo, en presencia de un agente patógeno, la IL-6 producida por las células dendríticas supera y bloquea los efectos supresores de los Treg permitiendo la respuesta de los linfocitos efectores (Pasare y Medzhitov, 2003; Tizard, 2009e; Sakaguchi *et al.*, 2010). También se ha determinado la participación de esta subpoblación linfocitaria en funciones no inmunitarias tales como la angiogénesis, la reparación tisular y la regulación metabólica de muchas células del organismo, incluidos los linfocitos T (Lu *et al.*, 2017).
- **Linfocitos Tc:** los linfocitos T citotóxicos o citolíticos se caracterizan por presentar un fenotipo CD45+CD3+CD4-CD8+ y se encargan de la eliminación de células portadoras de patógenos intracelulares y de células alteradas (Bonilla y Oettgen, 2010; Murphy, 2012a). La mayor parte de las células del organismo procesan y presentan una muestra de las proteínas que sintetizan en el CMH de tipo I, de modo que cuando el TCR del linfocito Tc se une al CMH de tipo I reconociendo un antígeno, empieza su activación. Sin embargo, si esta unión no va acompañada de señales coestimuladoras producidas por las CPA, los linfocitos Tc se inactivan selectivamente desarrollándose

tolerancia. La secuencia de eventos para la activación efectiva de un linfocito Tc requiere inicialmente la presentación del antígeno por parte de la CPA inmadura al linfocito Th. El linfocito Th activará de este modo a la CPA, que aumentará la expresión de CMH de tipo I, la presentación del antígeno y la producción de citocinas tales como IL-12, con actividad quimiotáctica para linfocitos T. Además, también se requiere de las citocinas IL-2 e IFN- γ sintetizadas por los linfocitos Th para permitir que los linfocitos Tc reconozcan y ejerzan sus funciones biológicas frente a las células portadoras del antígeno previamente presentado por las CPA. Una vez activados, los linfocitos Tc desarrollan sus funciones rápidamente y presentan una gran capacidad de expansión clonal (Alam y Gorska, 2003; Tizard, 2009l; Murphy, 2012a). Cuando los linfocitos Tc reconocen la célula diana, llevan a cabo sus funciones de citotoxicidad. La destrucción de la célula diana puede desencadenarse mediante dos rutas: mediante la liberación de perforinas y granzimas o mediante la unión del ligando CD95L del linfocito Tc al receptor CD95 (Fas) o receptor de muerte de la célula diana. Cualquiera de los dos mecanismos desencadena la apoptosis celular mediada por la ruta de las caspasas (Tizard, 2009l; Bonilla y Oettgen, 2010). Los linfocitos Tc pueden dividirse en dos poblaciones principales diferenciadas fundamentalmente por el patrón de citocinas que producen: los Tc1 y los Tc2. Los Tc1 secretan principalmente IL-2 e IFN- γ , mientras que los Tc2 secretan IL-4 y -5 mayoritariamente. La población Tc1 es mucho más abundante debido a que para que se diferencie el fenotipo Tc2 se requieren concentraciones muy elevadas de IL-4 (Tizard, 2009l; Zhang y Bevan, 2011). Recientemente en medicina humana, se ha descrito una nueva población de linfocitos con fenotipo CD8 y funciones reguladoras, que han sido denominados linfocitos T reguladores CD8+ y se caracterizan por una expresión baja de FoxP3. Parece que juegan un papel relevante en la inmunosupresión y con ello en la tolerancia inmunitaria gracias a la producción de citocinas tales como IL-10. Sin embargo, su potencia reguladora parece ser menor que la de los linfocitos Treg propiamente dichos (Flippe *et al.*, 2019).

- **Linfocitos T dobles positivos (T DP):** estos linfocitos se caracterizan por presentar un fenotipo CD45+CD3+CD4+CD8+ y tener localizaciones extra-tímicas. Fueron descritos en sangre periférica de humanos y suidos hace tres décadas (Blue *et al.*, 1985; Saalmuller *et al.*, 1987) y desde entonces se han identificado en varias especies tales como roedores, monos, gallinas y perros y en otras localizaciones orgánicas (Zuckermann, 1999; von Buttlar *et al.*, 2015). En la especie canina constituyen el 2-3% de los linfocitos de sangre periférica (Bismarck *et al.*, 2012). Pueden originarse a partir tanto de linfocitos Tc como Th y se caracterizan por la elevada expresión de

marcador de activación CD25 (Bismarck *et al.*, 2012; Bismarck *et al.*, 2014). Sus funciones no están esclarecidas pero se cree que juegan un papel importante en enfermedades inmunomediadas y en la respuesta inmunitaria frente a virus, pudiendo ejercer efectos tanto citotóxicos como supresores (Parel y Chizzolini, 2004; Overgaard *et al.*, 2015).

- **Linfocitos T dobles negativos (T DN):** presentan un fenotipo CD45+CD3+CD4-CD8- y del mismo modo que los linfocitos T dobles positivos, se trata de una población de linfocitos T maduros con localizaciones extra-tímicas. Esta población también fue descrita hace varias décadas; sin embargo, no ha sido tan ampliamente estudiada debido a que inicialmente se relacionó su presencia con enfermedades linfoproliferativas exclusivamente (Hillhouse y Lesage, 2013; Martina *et al.*, 2015). Actualmente se sabe que esta población está presente en sangre periférica y múltiples tejidos tanto en humanos como en otras especies tales como roedores y perros, en ausencia de enfermedad (Thomson *et al.*, 2006; Hillhouse y Lesage, 2013). En el perro constituyen entre el 10-15% de los leucocitos sanguíneos (Luckschander *et al.*, 2009; Alexandre-Pires *et al.*, 2010; Platt *et al.*, 2013; Maina *et al.*, 2019; Rabiger *et al.*, 2019a). A pesar de que su papel tampoco está claro, algunos autores les atribuyen funciones inmunoreguladoras mediante la supresión de las funciones biológicas de los linfocitos T efectores dependiente de antígeno (Thomson *et al.*, 2006; Hillhouse y Lesage, 2013). Sin embargo, diversos trabajos sobre la caracterización de las células NK, tanto en medicina humana como en la especie canina, han determinado la existencia de ciertas poblaciones de células NK CD3+, por lo que dentro de la población de linfocitos T dobles negativos, también podrían estar incluidas algunas subpoblaciones de células NK candidatas que reciben el nombre de células NKT (Hillhouse y Lesage, 2013; Gingrich *et al.*, 2019).

2.2. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO AL INTESTINO (*GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE, GALT*)

Las superficies mucosas del organismo son aquellas recubiertas por un epitelio especializado secretor de moco y que incluyen el aparato respiratorio superior e inferior, el tracto gastrointestinal, el tracto urogenital y las glándulas exocrinas asociadas, tales como las glándulas lacrimales del ojo, las glándulas salivares y las glándulas mamarias (Brandtzaeg *et al.*, 2008; Murphy, 2012e).

Esta fina capa de epitelio secretor que recubre las superficies mucosas del organismo constituye la única barrera física frente a la invasión de patógenos y de microorganismos comensales presentes en gran número en estas localizaciones. Debido a la facilidad de los microorganismos de sobrepasar esta primera barrera, las superficies mucosas cuentan con un sistema inmunitario propio y especializado que recibe el nombre de sistema inmunitario de mucosas o tejido linfóide asociado a mucosas (MALT, de sus siglas en inglés) (Brandtzaeg *et al.*, 2008; Brandtzaeg, 2009; Murphy, 2012e).

El MALT está constituido por tejido linfóide tanto organizado como difuso y comprende una gran extensión, siendo considerado el órgano del sistema inmunitario de mayor tamaño. En él tienen lugar respuestas tanto innatas como adaptativas frente a los numerosos antígenos a los que se encuentra expuesto constantemente (Brandtzaeg, 2009; Murphy, 2012e).

Las funciones fisiológicas que tienen lugar en las superficies mucosas de intercambio gaseoso, absorción de nutrientes, actividades sensoriales y reproducción, hacen que inevitablemente sean barreras permeables al interior del organismo. Esta permeabilidad y fragilidad las hace muy vulnerables a las infecciones, tanto que la mayoría de los agentes infecciosos utilizan estas rutas para la invasión del organismo. Pero estas superficies no solo se enfrentan a patógenos, sino que son el lugar de contacto con numerosos agentes no patógenos. El mejor ejemplo lo constituye el tejido linfóide asociado al intestino (GALT, de sus siglas en inglés). El GALT está expuesto a múltiples antígenos alimentarios y a los microorganismos comensales o microbiota, que son reconocidos por los diferentes componentes inmunitarios. El GALT tiene la capacidad de discernir entre antígenos patógenos y no patógenos y reaccionar únicamente frente a los primeros (Murphy, 2012e; Penny *et al.*, 2018).

A continuación, dada su relevancia e interés en este proyecto de tesis doctoral, se detallará la estructura, el desarrollo de la respuesta inmunitaria frente a las agresiones y el desarrollo de tolerancia inmunológica, así como la migración de los diferentes componentes inmunitarios del GALT.

2.2.1. Compartimentación del GALT

El GALT se extiende por todo el tracto gastrointestinal y está constituido por linfocitos y otras células inmunitarias tales como células dendríticas y macrófagos. Estructuralmente, estas células pueden conformar un tejido inmunitario organizado, semejante al resto de órganos linfoides secundarios, o encontrarse dispersas a lo largo del epitelio de la mucosa o en la capa de tejido conectivo dispuesta bajo el epitelio, denominada lámina propia. Por otro lado, funcionalmente puede ser compartimentado en localizaciones aferentes o inductivas, donde tiene lugar la presentación antigénica y el inicio de la respuesta inmunitaria, y localizaciones eferentes o efectoras, donde tienen lugar las funciones de eliminación, tolerancia o inflamación en respuesta al antígeno detectado (Murphy, 2012e; Garden, 2013).

Las localizaciones aferentes o inductivas están integradas por las placas de Peyer, los folículos linfoides aislados y los complejos linfoglandulares. Las placas de Peyer en la especie canina se disponen a lo largo de todo el intestino delgado, variando en tamaño y composición linfocitaria en función de la localización y siendo las del íleon las de mayor tamaño (Garden, 2013). Por su parte, los folículos linfoides aislados pueden localizarse además en el estómago, colon y recto. Concretamente en el intestino ambas formaciones presentan una morfología de cúpula recubierta por epitelio intestinal que alberga, además, células M que, a diferencia de los enterocitos, presentan una superficie luminal carente de microvellosidades y no son productoras de enzimas digestivas ni moco, estando recubiertas por una fina capa de glicocálix. Estas células conducen los antígenos desde el lumen hasta la región subepitelial de la cúpula de estos tejidos linfoides mediante un proceso denominado transcitosis. La membrana basal de las células M presenta una morfología característica de bolsillo, que permite a las células inmunitarias subyacentes capturar los antígenos transportados. También destaca la gran cantidad de receptores de IgA presentes en su superficie apical, lo que facilita el reconocimiento y transporte de antígenos lumbinales unidos a esta inmunoglobulina (Mabbott *et al.*, 2013; Reboldi y Cyster, 2016). En la región subepitelial de la cúpula, encontramos gran cantidad de células dendríticas y linfocitos T y B vírgenes, siendo los linfocitos B mucho más abundantes en estas dos estructuras linfoides. Debajo de esa región, en algunas especies, incluido el perro, encontramos centros germinales de linfocitos B, como ya se ha detallado anteriormente (HogenEsch y Felsburg, 1992a; Tizard, 2009k; Reboldi y Cyster, 2016).

Por su parte, los complejos linfoglandulares se localizan principalmente en la submucosa del colon en la especie canina. El epitelio que los recubre también presenta células M y linfocitos intraepiteliales. Además, en la región subepitelial encontramos linfocitos B inmaduros y células plasmáticas (HogenEsch y Felsburg, 1992b, 1992a; Tizard, 2009k).

El brazo eferente o efector está constituido por un gran número de linfocitos y otros leucocitos distribuidos de manera dispersa en el tejido gastrointestinal. Los dos principales compartimentos son el epitelio y la lámina propia. La mayoría de estas células han sido activadas previamente por antígenos, siendo por ello los linfocitos T efectores y las células plasmáticas las células inmunitarias más abundantes en estas localizaciones. A pesar de que el epitelio y la lámina propia solo están separadas por una fina membrana basal, inmunitariamente presentan diferencias importantes. El epitelio contiene prácticamente solo linfocitos T, siendo la subpoblación Tc la mayoritaria. Por el contrario, la lámina propia es mucho más heterogénea, con un elevado número de linfocitos Th y Tc, macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Cabe destacar que el número de linfocitos que encontramos en estas localizaciones excede el que encontraríamos en cualquier otra localización del cuerpo (Murphy, 2012e; Garden, 2013; Ahluwalia *et al.*, 2017). La presencia de este elevado número de células inmunitarias efectoras no es habitual en otros tejidos no linfoides en ausencia de infección. Esto es debido a la continua respuesta local que tiene lugar en el tracto gastrointestinal frente a la multitud de antígenos inocuos a los que está expuesto. Se trata de un proceso fisiológico esencial para el mantenimiento de la simbiosis entre el hospedador y el contenido intestinal, basado en el proceso de tolerancia inmunológica y mediado por los Treg y las células dendríticas (Tezuka y Ohteki, 2010; Murphy, 2012e; Tanoue *et al.*, 2016).

En la especie canina encontramos unos 20 linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos, pudiendo variar este número en función del tramo intestinal (German *et al.*, 1999a; German *et al.*, 1999b). Estos linfocitos se encuentran en mayor concentración en el duodeno, disminuyendo su número distalmente (German *et al.*, 1999a; Sonea *et al.*, 2000). Existen dos poblaciones de linfocitos intraepiteliales: los naturales y los inducidos. Los linfocitos intraepiteliales naturales son una población de linfocitos con características especiales, ya que migran desde el timo al epitelio intestinal ya activados incluso antes del nacimiento y no tienen la capacidad para desplazarse a otras localizaciones. Esto es debido a que sufren un proceso de maduración peculiar en el timo, donde son expuestos a antígenos propios, de la microbiota y de los alimentos para el desarrollo de tolerancia, llegando al epitelio intestinal como células capaces de ejercer sus funciones efectoras de forma rápida. No obstante, también tienen cierta capacidad para reaccionar frente a antígenos de agentes patógenos. Por su parte, los linfocitos intraepiteliales inducidos son linfocitos activados tras el contacto antigénico en órganos linfoides secundarios, que migran al epitelio intestinal para ejercer sus funciones efectoras, las cuales dependerán como siempre de la naturaleza antigénica (Cheroutre *et al.*, 2011; Montalban-Arques *et al.*, 2018). Entre los linfocitos T intraepiteliales, el fenotipo de mayor relevancia es el citotóxico, habiéndose descrito porcentajes del 53-70% en función del tramo intestinal, aumentando su proporción distalmente. El porcentaje de linfocitos Th dentro de los linfocitos intraepiteliales caninos es menor, del 15%, y también parece aumentar distalmente en el intestino. Cabe destacar que, del

mismo modo que en otros tejidos linfoides y en sangre periférica, el fenotipo predominante de linfocitos T es $\alpha\beta$. Sin embargo, el número de linfocitos T $\gamma\delta$ es mayor aquí que en la mayoría de localizaciones orgánicas, llegando a describirse porcentajes del 25% (Luckschander *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2014). Las poblaciones de linfocitos T dobles positivos y dobles negativos han sido escasamente estudiadas en el compartimento intestinal en el perro. Tan solo dos trabajos estudian la población de linfocitos T dobles positivos en el compartimento intraepitelial canino, describiendo porcentajes muy bajos, inferiores al 3% (Sonea *et al.*, 2000; Rabiger *et al.*, 2019b) y únicamente Sonea y colaboradores describen la presencia de un elevado número de linfocitos T dobles negativos entre los linfocitos intraepiteliales, suponiendo para ellos la mitad de la población de linfocitos T del epitelio intestinal (Sonea *et al.*, 2000). Respecto a los linfocitos Treg, la bibliografía publicada hasta la fecha indica una presencia casi inexistente de dicha subpoblación en este compartimento intestinal (Junginger *et al.*, 2012; Maeda *et al.*, 2016).

La lámina propia intestinal del perro es más heterogénea en cuanto a células inmunitarias que el compartimento epitelial. En este compartimento se encuentra una gran cantidad de células plasmáticas con fenotipo IgA concentradas en las criptas del intestino delgado y en la lámina profunda del colon. También se localizan, aunque en menor proporción, en las vellosidades y en la lámina propia superficial del colon y su número decrece desde el duodeno hasta el íleon (German *et al.*, 1999a). Respecto a los linfocitos de la lámina propia, el fenotipo T también es considerado el mayoritario. Estos linfocitos se concentran en la parte apical de las vellosidades sin diferencias aparentes en su distribución longitudinal en el intestino delgado (Elwood *et al.*, 1997; German *et al.*, 1999a). El ratio de linfocitos Th:Tc en esta localización es 60:40, contrastando con el descrito para los linfocitos intraepiteliales, 15:85 (Elwood *et al.*, 1997). Respecto a los linfocitos Treg, esta población es más abundante en la lámina propia que en el compartimento epitelial, siendo su distribución mayor en las vellosidades y decreciente desde el duodeno al íleon (Junginger *et al.*, 2012; Maeda *et al.*, 2016).

Es interesante mencionar que en la lámina propia también encontramos una población de linfocitos T vírgenes íntimamente relacionados con el epitelio y cuya función es mantener la integridad del mismo favoreciendo la tolerancia frente a antígenos no patógenos, sin perder por ello su capacidad de desarrollo de respuestas inflamatorias ante la invasión patogénica. Esta población recibe el nombre de células linfoides epiteliales innatas (Montalban-Arques *et al.*, 2018; Penny *et al.*, 2018).

2.2.2. Respuesta inmunitaria en el GALT

Del mismo modo que ocurre en el resto del organismo, cuando un patógeno trata de invadir el tracto gastrointestinal tendrá que ir superando todas las barreras inmunitarias de menor a mayor especialización. La primera línea de defensa en este sistema está constituida por la barrera epitelial, con sus uniones estrechas y los mecanismos fisiológicos tales como el peristaltismo gastrointestinal, que dificultan la adhesión microbiana. Además, a esta primera defensa se suman las sustancias antimicrobianas presentes en el moco y en el glicocáliz producido por estas células, las enzimas digestivas y la microbiota que compite con los microorganismos patógenos por los nutrientes, produce metabolitos antimicrobianos y estimula la producción de AMPs por parte de las células epiteliales (Murphy, 2012e; Riera Romo *et al.*, 2016; Thaiss *et al.*, 2016).

Si los patógenos son capaces de atravesar esa primera barrera, a continuación se enfrentarán a los elementos de la inmunidad innata. En el tracto gastrointestinal encontramos macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células epiteliales con receptores PRR capaces de reconocer múltiples PAMPs. Los PRR más habituales en esta localización son los TLR. Cuando se produce la unión del PAMP al PRR se desencadena la respuesta inmunitaria innata, tal y como se ha detallado previamente en esta revisión. Uno de los mecanismos protectores que utiliza este sistema para evitar desencadenar una respuesta inflamatoria frente a PAMPs de la microbiota es la localización de los TLR en las células epiteliales. Por ejemplo, la expresión de TLR-2 y -4 se limita a los enterocitos de las criptas y a células inmunitarias presentes en la lámina propia, localizaciones que en condiciones normales no están colonizadas por microorganismos comensales. Del mismo modo, el TLR-5 está presente en las membranas basolaterales de las células epiteliales por lo que solo la interrupción de la continuidad del epitelio podrá activar este receptor (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004; Abreu, 2010; Garden, 2013).

Las células dendríticas del GALT son las grandes responsables de dirigir la respuesta inmunitaria adaptativa hacia la inflamación o la tolerancia en función del antígeno procesado. Se localizan tanto en los agregados linfoides como dispersas a lo largo del tejido gastrointestinal (Murphy, 2012e). En las placas de Peyer y en los folículos linfoides aislados se disponen en dos áreas principales. Una población de células dendríticas se localiza en la región subepitelial de la cúpula, adquiriendo los antígenos a través de las células M. Esta población expresa el receptor CCR6, cuyo ligando es la quimiocina CCL20 producida por las células epiteliales. En ausencia de esta quimiocina, las células dendríticas producen IL-10 en respuesta a los antígenos procesados, evitando la activación de los linfocitos T y con ello la respuesta proinflamatoria. Sin embargo, ante la presencia de un antígeno patógeno las células epiteliales secretarán esta quimiocina, que producirá a su vez la secreción por parte de las células dendríticas de los factores coestimulantes necesarios para la activación de los linfocitos y su maduración a células efectoras.

La segunda población de células dendríticas en las localizaciones aferentes se sitúa en la región de linfocitos T y tienden a producir la citocina proinflamatoria IL-12 ante la llegada de un patógeno (Mowat, 2003; Sato y Iwasaki, 2005; Tezuka y Ohteki, 2010; Bekiaris *et al.*, 2014).

Las células dendríticas también se localizan fuera de las placas de Peyer y de los folículos linfoides aislados, distribuidas por toda la pared intestinal, siendo más abundantes en la lámina propia. La forma de adquisición de los antígenos por parte de estas células dendríticas a través del epitelio intacto no se conoce con exactitud, pero se han propuesto algunas posibles vías. Algunos mecanismos descritos son el paso de antígenos alimentarios solubles a través o entre las células epiteliales, la presencia de células M en otras localizaciones epiteliales distintas del compartimento aferente, mediante la emisión de pedículos a través de las células epiteliales capturando antígenos directamente del lumen o mediante la fagocitosis de células epiteliales en apoptosis que contengan antígenos en su interior. Una vez capturado el antígeno, las células dendríticas de la lámina propia migran hasta el área de linfocitos T vírgenes de los nódulos linfáticos mesentéricos a través de los aferentes linfáticos que comunican y conectan todos los compartimentos inmunitarios del GALT. En función de la naturaleza del antígeno procesado, desencadenarán la maduración de linfocitos T efectores o de linfocitos Treg. Las células dendríticas de la lámina propia juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria gastrointestinal. Por ello, tienen poca capacidad para ligar antígenos patógenos y parece que están especializadas en la captación y transporte de antígenos no dañinos. Cuando un antígeno no es patógeno, se generan unas condiciones antiinflamatorias en la lámina propia que hacen que las células dendríticas promuevan la generación de linfocitos Treg a partir de linfocitos Th vírgenes en el nódulo linfático mesentérico (Mowat, 2003; Tanoue *et al.*, 2016). Además, estas células tienen la capacidad de producir ácido retinoico, que induce la expresión de moléculas de adhesión intestinal tales como CCR9 y $\alpha_4\beta_7$ en los linfocitos T y B, asegurando así su regreso al tracto gastrointestinal para llevar a cabo sus funciones en respuesta al antígeno (Johansson-Lindbom *et al.*, 2003; Sato y Iwasaki, 2005; Tezuka y Ohteki, 2010; Bekiaris *et al.*, 2014).

Los linfocitos vírgenes, bien de las localizaciones aferentes del GALT o de los nódulos linfáticos mesentéricos, tras la presentación antigénica por parte de las células dendríticas del GALT, expresan el receptor CCR9 y la integrina $\alpha_4\beta_7$ y comienzan su activación. Una vez activados, migran a través de los conductos linfáticos, pasando por los nódulos linfáticos mesentéricos y el conducto torácico hasta llegar a la circulación sanguínea. Durante su migración tiene lugar su maduración, volviendo a las localizaciones eferentes del GALT como linfocitos efectores preparados para desarrollar sus funciones. La recirculación hacia estas localizaciones depende de las moléculas de adhesión previamente descritas. Así, la integrina $\alpha_4\beta_7$ se une a la adhesina MAdCAM-1 presente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos intestinales.

Por otro lado, las células epiteliales gastrointestinales producen la quimiocina CCL25 que actúa como ligando del receptor CCR9, favoreciendo el retorno de los linfocitos efectores del GALT. Cabe destacar que, a pesar de que estos linfocitos tienen preferencia por el lugar donde han sido activados, pueden ejercer sus funciones efectoras en otras superficies mucosas debido a la expresión de la molécula de adhesión MAdCAM-1 en el endotelio vascular de otras superficies mucosas (Agace, 2008; Maynard y Weaver, 2009; Agace, 2010; Murphy, 2012e).

2.3. ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA INTESTINAL (EICI)

2.3.1. Definición

Las primeras descripciones de patologías gastrointestinales crónicas en medicina humana datan del año 1905, cuando el Dr. J.E. Summer Jr. describía la existencia de diversos tipos de colitis difíciles de clasificar. Fue en el año 1932 cuando el Dr. Burrill Crohn publicó el primer caso de “enteritis regional”. Posteriormente esta entidad fue denominada enfermedad de Crohn en su honor (Karp y Targan, 2010). Por su parte, en medicina veterinaria hace 50 años que se describieron las primeras enfermedades que se engloban en la denominada enfermedad inflamatoria crónica intestinal (EICI). Concretamente, en 1967 se describió por primera vez la gastroenteritis eosinofílica (Hall, 1967), mientras que la primera identificación del componente linfoplasmocitario intestinal como responsable de cuadros gastrointestinales en la especie canina fue en 1972 (Van Kruiningen y Hayden, 1972).

La EICI es una enfermedad crónica debilitante de carácter inmunomediado. Está representada por un conjunto de enfermedades caracterizadas por la persistencia y recurrencia de signos gastrointestinales típicos con una evidencia histológica de inflamación en la mucosa del intestino delgado, grueso o ambos (Cerquetella *et al.*, 2010; Jergens y Simpson, 2012). Este infiltrado inflamatorio de la lámina propia intestinal conduce a una pérdida de la permeabilidad y a una alteración de la absorción intestinal, que dará lugar a la aparición de signos clínicos gastrointestinales, entre los que destacan la presencia de diarrea, vómitos, pérdida de peso y desórdenes del apetito como anorexia o polifagia (Allenspach *et al.*, 2006c). La EICI es considerada una de las causas más frecuentes de vómito y diarrea crónica en el perro (Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a).

Su etiología es desconocida, aunque parece claro que en su aparición participan factores inmunitarios, dietéticos, genéticos y ambientales. Los últimos avances indican que en su mecanismo patogénico cobra una especial importancia la interacción entre los microorganismos comensales luminales y/o de la mucosa del intestino con el sistema inmunitario intestinal en individuos genéticamente predispuestos (Cerquetella *et al.*, 2010; Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a; Park *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017)

Para su diagnóstico es imprescindible realizar un correcto protocolo de exclusión de todas aquellas causas que puedan producir un proceso inflamatorio a nivel intestinal (Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a). Además, se deben cumplir las cinco premisas de la enfermedad propuestas por el grupo de expertos en gastroenterología de pequeños animales de la *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA): la persistencia o recurrencia de los signos clínicos

gastrointestinales debe ser mayor de tres semanas, debe haber una evidencia histológica de inflamación de la mucosa intestinal, no deben existir otras causas que puedan desencadenar el proceso inflamatorio intestinal, no debe haber respuesta a terapias dietéticas, antibióticas o antihelmínticas en solitario y debe haber respuesta clínica ante el empleo de tratamientos antiinflamatorios o inmunosupresores (Washabau *et al.*, 2010).

2.3.2. Clasificación

La EICI se clasifica generalmente en función del tipo celular predominante en el infiltrado inflamatorio, determinado mediante el estudio histopatológico de las biopsias intestinales. A pesar de que, como ya hemos comentado, esta patología puede afectar a cualquier tramo del tracto gastrointestinal, la zona más afectada en la especie canina es el intestino delgado, motivo por el cual hablaremos de enteritis para su clasificación (German *et al.*, 2001; Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017).

- *Enteritis linfoplasmocitaria*: se trata del tipo histológico más común en la especie canina y se caracteriza por la presencia de un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas.
- *Enteritis eosinofílica*: es la segunda forma más frecuente de EICI. Histológicamente se asocia con importantes alteraciones de la arquitectura de la mucosa intestinal tales como atrofia de las vellosidades unidas al infiltrado inflamatorio mixto, pero con predominio de eosinófilos.
- *Enteritis granulomatosa*: se caracteriza por el desarrollo de granulomas y un infiltrado con abundancia de macrófagos en la mucosa intestinal. Esta forma de presentación poco frecuente de la EICI tiene una pobre respuesta al tratamiento convencional de esta enfermedad, teniendo un pronóstico reservado.
- *Linfangiectasia intestinal*: se caracteriza por una marcada dilatación y disfunción de los conductos linfáticos intestinales que conduce a su rotura y pérdida de linfa al lumen intestinal, desencadenando una disminución de las proteínas totales en sangre periférica. Puede ser primaria o secundaria a la presencia de una EICI.

Cuando estas enfermedades afectan exclusivamente al intestino grueso reciben el nombre de colitis. Dentro de estas últimas, la colitis ulcerosa histiocítica ha sido clásicamente considerada una forma de EICI; no obstante, el empleo de técnicas de hibridación *in situ* y de secuenciación masiva ha permitido identificar el agente etiológico de esta enfermedad, *Escherichia coli*, por lo

que actualmente se considera un proceso inflamatorio intestinal de origen infeccioso con tratamiento curativo (Hostutler *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2006; Washabau, 2013b).

Además de los tipos de EICI en función de la clasificación histopatológica, se describen algunas otras formas específicas o asociadas a ciertas razas (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017):

- *Enteropatía del Basenji*: se trata de una forma grave y hereditaria de enteritis linfoplasmocitaria que afecta a la raza Basenji. Suele ir asociada a una hiperplasia intensa de la mucosa y a enteropatía perdedora de proteínas. A veces se han descrito perforaciones intestinales asociadas. En muchas ocasiones hay ausencia de respuesta al tratamiento y la esperanza de vida son pocos meses desde el diagnóstico (Breitschwerdt *et al.*, 1982; Breitschwerdt, 1992).
- *Enteropatía y nefropatía perdedora de proteínas del Soft-Coated Wheaten Terrier*: se trata de una forma hereditaria de ambas patologías, de base inmunomediada y relacionada con reacciones de hipersensibilidad al alimento. Los perros de esta raza que presentan dicha enfermedad además tienen un alto riesgo de desarrollar alteraciones tromboembólicas (Littman *et al.*, 2000; Melville-Walker *et al.*, 2004).
- *Enteropatía del Shar-Pei*: esta raza de perros tiene predisposición genética a desarrollar enteritis linfoplasmocitaria unida a una grave hipoproteinemia (Grützner *et al.*, 2015).
- *Síndrome diarreico del Luthund*: los perros de la raza Luthund presentan una predisposición genética a desarrollar linfangiectasia intestinal. Cabe destacar que, además de la pérdida de proteínas, también se ha descrito en esta raza la pérdida de linfocitos que conduce a una situación de inmunodeficiencia que se traduce en una mayor predisposición al desarrollo de patologías inflamatorias y neoplásicas tales como gastritis y carcinoma gástrico (Berghoff *et al.*, 2007; Qvigstad *et al.*, 2008).

Para algunos autores el uso del término EICI para referirse a este conjunto de enfermedades que cursan con un cuadro digestivo crónico en la especie canina es controvertido dada su gran diferencia en cuanto a tratamientos empleados para el control de esta enfermedad con respecto a lo que ocurre en medicina humana. El manejo de esta enfermedad en los pacientes humanos requiere el empleo de terapias inmunosupresoras en la gran mayoría de los casos y entre el 40-50% de los pacientes requerirán intervenciones quirúrgicas en los primeros 10 años desde el diagnóstico (Annese *et al.*, 2016). Sin embargo, en la especie canina la mayoría de los animales responden adecuadamente a tratamiento dietético y/o antibiótico y solo una minoría requiere tratamiento inmunosupresor para el control de la enfermedad. Además, muchos de estos animales

no llegan a ser diagnosticados histopatológicamente, ya que si responden a los ensayos dietéticos y médicos, en muchas ocasiones no se realiza endoscopia digestiva y análisis de las biopsias (Jergens y Simpson, 2012; Allenspach *et al.*, 2016). Por ello, estos autores proponen englobar estas patologías crónicas digestivas bajo el nombre de enteropatías crónicas y clasificarlas, en función de la respuesta a los diferentes tratamientos empleados para su manejo, en enteropatías que responden a: dieta, antibióticos, inmunosupresión o las que no responden a ninguno de los tratamientos anteriores (Allenspach *et al.*, 2007; Allenspach *et al.*, 2016; Dandrieux, 2016).

2.3.3. Prevalencia

La EICI es una de las causas más comunes de diarrea y vómito crónico en la especie canina; sin embargo, su incidencia es desconocida. Probablemente esta enfermedad está siendo sobrediagnosticada debido a la facilidad actual para obtener biopsias endoscópicas, la gran dificultad de interpretación histológica de este tipo de muestras y los incorrectos protocolos de exclusión de otras causas de inflamación de la mucosa intestinal (Willard *et al.*, 2002; Hall y Day, 2017).

No parece existir predisposición en cuanto al sexo (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Respecto a la edad, se trata de una enfermedad que aparece más frecuentemente en perros de edad media, algunos de los cuales muestran signos gastrointestinales desde edades tempranas (Allenspach *et al.*, 2007; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). La EICI puede presentarse en perros de cualquiera raza. Sin embargo, tal y como se ha descrito previamente, sí que se han observado predisposiciones raciales y patrones característicos de presentación de la enfermedad en algunas razas como el Basenji, el Soft-Coated Wheaten Terrier, el Shar-Pei o el Ludehund (Breitschwerdt *et al.*, 1982; Breitschwerdt, 1992; Littman *et al.*, 2000; Melville-Walker *et al.*, 2004; Berghoff *et al.*, 2007; Qvigstad *et al.*, 2008; Grützner *et al.*, 2015).

Además, un estudio realizado en el sureste de Reino Unido evaluó el riesgo racial en la presentación de EICI incluyendo 546 perros de 86 razas diagnosticados de esta enfermedad y utilizó como grupo control 27.463 perros de las mismas razas, tratando de asemejar la población canina general. Dicho estudio determinó que las razas puras tienen más riesgo que los perros mestizos y, dentro de las razas puras, los Weimaraner, Rottweiler, Pastor Alemán, Border Collie y Bóxer presentaron una mayor predisposición (Kathrani *et al.*, 2011a). La predisposición del Pastor Alemán ha sido ampliamente evaluada (Jergens *et al.*, 1992b; German *et al.*, 2000a; Hall, 2013a). Recientemente, también se han realizado estudios genéticos en esta raza, evaluando genes cuyos polimorfismos juegan un papel importante en la etiopatogenia de la EICI en medicina humana tales como el gen *CARD15* que codifica para la proteína NOD2 y otros genes

candidatos (Vermeire *et al.*, 2010; Strober *et al.*, 2014). Estos trabajos han descrito 16 genes candidatos potencialmente relacionados con el desarrollo de la EICI en el Pastor Alemán, así como un polimorfismo en el exón 3 del gen *CARD15* (Kathrani *et al.*, 2014; Peiravan *et al.*, 2018). Por su parte la raza Rottweiler también ha sido remarcada entre las que mayor riesgo presenta en la aparición de las formas graves de la EICI, especialmente en Europa. Sin embargo, estos datos deben analizarse con precaución, ya que en algunos de estos estudios dicha raza se encontraba sobreexpresada (Craven *et al.*, 2004b; Dijkstra *et al.*, 2010; Lecoindre *et al.*, 2010). Por otro lado, también se ha sugerido que algunas razas de pequeño tamaño tienden a presentar esta enfermedad en su forma más grave, la enteropatía con pérdida de proteínas. Estas razas son el Yorkshire Terrier, el West Highland White Terrier y el Dachshund (Kimmel *et al.*, 2000; Peterson y Willard, 2003; Allenspach *et al.*, 2007; Rudinsky *et al.*, 2017).

2.3.4. Etiopatogenia

Desde la descripción de esta enfermedad, los esfuerzos de la comunidad científica se han focalizado en determinar el mecanismo patogénico y la causa primaria de esta entidad. Sin embargo, en la actualidad, sigue siendo considerada una enfermedad de etiología desconocida. No obstante, se han descrito múltiples factores etiológicos que intervienen de un modo u otro en su desarrollo. La hipótesis más defendida hasta la fecha sostiene que en su mecanismo patogénico cobra una especial importancia la interacción entre los microorganismos comensales luminales y/o de la mucosa del intestino con el sistema inmunitario intestinal en individuos genéticamente predispuestos. El resultado de esta interacción daría lugar a una respuesta inmunitaria exacerbada e inapropiada que conduce a una serie de alteraciones fisiopatológicas responsables del cuadro clínico (Cerquetella *et al.*, 2010; Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a; de Souza, 2017; Park *et al.*, 2017).

El infiltrado inflamatorio y todos los productos proinflamatorios asociados tales como citocinas, quimiocinas y ciertas toxinas, son los responsables directos del daño tisular y del trastorno de las funciones del tracto gastrointestinal. Se producen modificaciones en la barrera epitelial debidas a procesos de fibrosis, atrofia de las vellosidades, pérdida de las uniones intercelulares y disminución del moco protector, entre otros, cuyo resultado final es un aumento de la permeabilidad intestinal. También se han descrito alteraciones de la motilidad. Esta disfunción de la motilidad, unida a un aumento de la permeabilidad, favorece la pérdida de fluidos, electrolitos, proteínas y células hacia la luz intestinal, la colonización de microorganismos y la mayor exposición de antígenos al sistema inmunitario de la mucosa, perpetuando el proceso. La consecuencia final es un síndrome de malabsorción que agrava el cuadro (Hall y Day, 2017).

A continuación, detallaremos los principales factores etiopatogénicos que han sido estudiados y su implicación en la enfermedad. El papel del sistema inmunitario en la EICI, dada su importancia en el presente trabajo de investigación, será desarrollado en profundidad en el último epígrafe de esta sección de “Revisión bibliográfica”.

2.3.4.1. Factores genéticos

En medicina humana el progreso de los últimos años en la determinación de genes implicados en la etiopatogenia de la EICI ha aportado mucha información de interés, gracias a los avances en secuenciación genómica que actualmente permiten la secuenciación rápida de genomas completos (Vermeire *et al.*, 2010). En las últimas dos décadas, se han descrito alrededor de 200 variables genéticas asociadas a las dos variantes de la EICI en medicina humana, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Sin embargo, esas variables solo explican el 20-25% de los casos de EICI, indicando que la genética por sí sola no es la responsable del desarrollo de esta entidad. Además, algunas de estas variantes no solo están presentes en pacientes enfermos sino también en individuos sanos, dando una gran peso en este sentido a la epigenética (de Souza *et al.*, 2017).

Los principales genes asociados a la EICI en personas han sido localizados en un gran número de cromosomas. A pesar de que sigue existiendo controversia en cuanto a su implicación en la patogenia de la EICI, parece que hay dos genes en concreto con un gran peso en el desarrollo de la enfermedad (Vermeire *et al.*, 2010; de Souza *et al.*, 2017). Uno de ellos es el gen *CARD15*, que codifica para la proteína NOD2 expresada en monocitos-macrófagos, células dendríticas, células epiteliales y en las células de Paneth (Lala *et al.*, 2003). Esta proteína NOD2 constituye un PRR que reconoce un peptidoglicano bacteriano denominado MDP, cuya unión estimula la producción de AMPs. En los pacientes con enfermedad de Crohn se ha identificado una mutación en el gen *CARD15* que se traduce en una menor producción de AMPs y con ello una mayor susceptibilidad a la infección bacteriana (Lesage *et al.*, 2002; Vermeire *et al.*, 2010; Strober *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2017). Otro de los genes relacionados con la EICI de gran relevancia es el gen *ATG16L1* implicado en procesos de autofagia. En pacientes con enfermedad de Crohn se ha descrito una mutación en el exón 8 de este gen que conduciría a una respuesta autofágica exacerbada (Vermeire *et al.*, 2010; Salem *et al.*, 2015).

En la especie canina, también se ha observado una cierta tendencia familiar a desarrollar esta enfermedad. Como ya se comentó anteriormente, los perros de las razas Basenji, Ludehund, Soft-coated Wheaten Terrier y Shar-pei presentan formas específicas de EICI. En medicina veterinaria, el empleo de las nuevas técnicas de secuenciación genética es más reciente, pero ya

ha arrojado resultados. El estudio del gen *CARD15* que codifica para la proteína NOD2 ha determinado la presencia de polimorfismos en dicho gen en perros de la raza Pastor Alemán con EICI, sugiriendo el mayor riesgo genético de esta raza a desarrollar la enfermedad frente al resto de razas estudiadas que no presentaron dichas mutaciones (Kathrani *et al.*, 2014). Además, gracias a la secuenciación completa de su genoma, en esta raza se han descrito otros 16 genes candidatos relacionados con la EICI localizados en los cromosomas 7, 9, 11 y 13, entre los que destacan polimorfismos en el gen que codifica para el TLR-4, para el TLR-5 y para el CMH de tipo II, entre otros (Kathrani *et al.*, 2010; Peiravan *et al.*, 2016; Peiravan *et al.*, 2018). Otro estudio determina la presencia de mutaciones o polimorfismos en el gen que codifica para el TLR-5 en otras 38 razas de perros con EICI, sugiriendo de este modo su implicación en la patogenia de esta enfermedad canina independientemente de la raza (Kathrani *et al.*, 2011b).

2.3.4.2. Microbiota

Como ya se ha comentado en el apartado de inmunidad de esta revisión, los microorganismos gastrointestinales, que conforman la microbiota, y el conjunto de sus genomas, que conforman el microbioma, juegan un papel crucial en el mantenimiento de la salud del individuo. Forman parte de la primera barrera de la inmunidad frente a la agresión de patógenos, participan en la digestión de los nutrientes, producen metabolitos que aportan energía a los enterocitos y estimulan el sistema inmunitario (Suchodolski, 2011; Cresci y Bawden, 2015; Thaïss *et al.*, 2016). Su cada vez más descrita implicación en la salud de los individuos ha fomentado el desarrollo de nuevas técnicas tales como la metagenómica, la metabolómica y la transcriptómica que no solo nos dan información de los microorganismos presentes, sino de los metabolitos que producen y sus efectos directos sobre el organismo.

A pesar de que los individuos de la misma especie presentan una microbiota semejante de acuerdo a los niveles filogenéticos superiores, a nivel de especies y cepas se puede decir que cada individuo posee un perfil microbiológico único, incluso entre hermanos gemelos (Dicksved *et al.*, 2008). Esto denota la influencia de otros factores tales como el ambiente y la dieta en la microbiota (Cresci y Bawden, 2015). Sin embargo, a pesar de esas diferencias entre los microorganismos, el contenido genético de la microbiota intestinal, denominado “microbioma central”, parece ser semejante entre individuos de la misma especie y por tanto presenta funciones parecidas (Tschöp *et al.*, 2009; Turnbaugh *et al.*, 2009). También cabe destacar que en la especie canina se ha demostrado que cada región gastrointestinal presenta un microbioma diferente dadas las diferencias anatómicas, fisiológicas y funcionales (Suchodolski *et al.*, 2008; Suchodolski, 2013).

La microbiota juega un papel fundamental en la patogenia de la EICI. Esta afirmación se apoya en el hecho de que en los modelos murinos de EICI el proceso inflamatorio solo se produce en presencia de bacterias (Imaoka *et al.*, 1996; Llewellyn *et al.*, 2018). No obstante, los animales libres de patógenos presentan alteraciones en la arquitectura gastrointestinal, menor regeneración del tejido epitelial y un escaso desarrollo del GALT, denotando la gran influencia de la microbiota residente en la salud del hospedador (Imaoka *et al.*, 1996; Falk *et al.*, 1998; Kanauchi *et al.*, 2005).

Existe un consenso general que asocia esta enfermedad con cambios tanto en la composición como en el metabolismo de la microbiota intestinal, lo que se denomina disbiosis. Sin embargo, la relación causa-efecto entre esta disbiosis y el proceso inflamatorio intestinal propio de la EICI no está claramente definida (Ni *et al.*, 2017; Tizard y Jones, 2018; Eissa *et al.*, 2019). Algunas hipótesis sostienen que, a pesar de que la microbiota activaría al sistema inmunitario, sería el propio proceso inflamatorio el que provocaría un cambio en la misma que perpetuaría la situación en individuos genéticamente susceptibles (Stecher y Hardt, 2008). Otros autores apoyan la teoría de que el proceso inflamatorio es el responsable de alterar el sistema inmunitario, lo que desencadena modificaciones en la estructura y fisiología gastrointestinal que favorecen la colonización de patógenos (Stecher y Hardt, 2008). Sin embargo, parece que la hipótesis más defendida por la comunidad científica es que se produce una interacción anormal entre las bacterias comensales y el sistema inmunitario gastrointestinal en individuos genéticamente predispuestos que conduce a una respuesta inmunitaria exacerbada mediada por linfocitos T efectores, generando el daño tisular (Packey y Sartor, 2009; Ni *et al.*, 2017; Tizard y Jones, 2018; Eissa *et al.*, 2019).

La microbiota ha sido ampliamente estudiada en individuos con EICI tanto en medicina humana como veterinaria, observándose a grandes rasgos un incremento del porcentaje total de bacterias y, entre ellas, de bacterias Gram-negativas (Suchodolski, 2013; Kostic *et al.*, 2014). Los perros con EICI, de forma similar a lo que ocurre en humanos, presentan un incremento del filo Proteobacteria y una disminución de Firmicutes, destacando la disminución de los *Clostridium* XIVa y IV (grandes productores de ácidos grasos de cadena corta) en el duodeno (Suchodolski, 2011; Suchodolski *et al.*, 2012; Ni *et al.*, 2017; Omori *et al.*, 2017). Aproximadamente un tercio de los pacientes con enfermedad de Crohn presenta un incremento de la abundancia de *Escherichia coli* adherente e invasiva (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). En el caso de la colitis ulcerosa histiocítica en la especie canina, este patógeno sí que ha sido directamente relacionado con el proceso inflamatorio debido a la adecuada respuesta al tratamiento con fluoroquinolonas (Simpson *et al.*, 2006). Además, también se han descrito alteraciones en el perfil de metabolitos bacterianos en perros con EICI, sugiriendo la presencia de estrés oxidativo y, por tanto, demostrando las alteraciones funcionales de la microbiota en estos individuos (Minamoto *et al.*, 2015; Kalenyak *et al.*, 2018).

La microbiota gastrointestinal no solo está constituida por bacterias, sino que los virus, las arqueas y los hongos también la conforman (Suchodolski, 2013; Sartor y Wu, 2017). Recientes estudios metagenómicos tanto en medicina humana como veterinaria han permitido comenzar a definir el viroma intestinal, detectando un predominio de virus bacteriófagos. Se han descrito cambios en el perfil de estos bacteriófagos en ambas especies en la EICI, sugiriendo su posible implicación en el curso de la enfermedad mediante la reducción de la diversidad bacteriana (Moreno *et al.*, 2018; Ungaro *et al.*, 2019). Respecto a las arqueas, parece que la clase *Methanobacteria* es la más abundante en intestino. Sin embargo, su papel en el tracto gastrointestinal continúa sin esclarecerse (Eckburg *et al.*, 2005; Suchodolski, 2013). Por su parte, los hongos también estarían incrementados en pacientes con enfermedad de Crohn, observándose una disbiosis con un incremento de la ratio *Basidiomycota:Ascomycota*, una disminución de la proporción de *Saccharomyces cerevisiae* y un incremento de la abundancia de *Candida albicans*. Estos trabajos proponen que el ambiente inflamatorio que envuelve a la enfermedad favorecería la expansión de estos microorganismos (Sartor y Wu, 2017; Sokol *et al.*, 2017). En la especie canina, por el momento se han descrito los filos predominantes tanto en el intestino como en muestras fecales, siendo *Ascomycota* y *Saccharomyceta* los más relevantes, pero no se han detallado diferencias en animales con EICI (Suchodolski, 2013).

Todos estos estudios parecen evidenciar que un único patógeno no es el responsable de la enfermedad, sino que la EICI va acompañada de una disbiosis intestinal que juega un papel clave en la etiopatogenia de la misma. Además, cabe destacar la buena respuesta a tratamientos dietéticos, antibióticos, prebióticos, probióticos y simbióticos, cuya función es la modulación de la microbiota intestinal (Kalenyak *et al.*, 2018; Atherly *et al.*, 2019).

2.3.4.3. Factores dietéticos

El sistema gastrointestinal está expuesto a una gran cantidad de antígenos, los cuales tienen efectos directos sobre su morfología, fisiología y respuesta inmunitaria. Dentro de estos antígenos, los alimentarios cobran una gran importancia en el curso y la expresión de patologías gastrointestinales, incluida la EICI.

En medicina humana, son numerosos los estudios que tratan de relacionar el efecto de los antígenos dietéticos con el riesgo de desarrollar EICI (Park *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017). La dieta y la microbiota juegan un papel fundamental interrelacionado, ya que la dieta tiene la capacidad de modificar la microbiota y los metabolitos derivados de la digestión de los nutrientes. Hay estudios que defienden que las diferencias geográficas en la incidencia de la EICI se deben a la dieta y la microbiota (Aniwan *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017). En varios trabajos han descrito

una mayor incidencia de EICI en individuos que no tomaron leche materna durante el periodo neonatal, relacionando este hallazgo con las grandes diferencias encontradas en la microbiota. Esto ha llevado a hipotetizar que la exposición temprana a ciertos antígenos dietéticos modifica la microbiota intestinal e influye en el desarrollo de la EICI (Barclay *et al.*, 2009; Azad *et al.*, 2013). También se ha asociado un mayor riesgo de padecer la enfermedad en individuos con dietas ricas en carne y grasas en comparación con un menor riesgo en personas con dietas con altas cantidades de fibra, fruta y vegetales (Hou *et al.*, 2011), por lo que parece que la dieta juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Lee *et al.*, 2015).

Los pacientes con EICI presentan una mayor absorción de macromoléculas antigénicas como consecuencia del aumento de la permeabilidad intestinal, lo cual contribuye a perpetuar y exacerbar el proceso inflamatorio (Park *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017). Existe mucha controversia sobre las dietas más adecuadas para pacientes con esta enfermedad y se han propuesto numerosos tratamientos dietéticos que favorezcan procesos inmunomoduladores, tales como los ácidos grasos Omega-3 (n3). En este contexto, algunos autores consideran que las dietas bajas en carbohidratos fermentables (dietas FODMAP) y en fibra no soluble evitan el sobrecrecimiento bacteriano intestinal como consecuencia de la escasa absorción de estos nutrientes y prolongan los periodos sin recaídas. También, se recomienda la monitorización de deficiencias nutricionales de ciertos factores como consecuencia de la alteración de la absorción, destacando las deficiencias de hierro, calcio, vitaminas D, B9, B12 y A, entre otras (Owczarek *et al.*, 2016).

En la especie canina no existen trabajos que evalúen la influencia de ciertos nutrientes en el desarrollo de la EICI. Sin embargo, el tratamiento dietético es uno de los pilares en el manejo de la enfermedad en el perro, destacando el papel de los antígenos dietéticos en el curso de la misma. La justificación de la terapia dietética en la EICI canina sugiere que la restricción de la exposición antigénica (sobre todo de las proteínas de la dieta) en una mucosa alterada reduce la respuesta inflamatoria exacerbada y favorece la atenuación de la inflamación intestinal (Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Las dietas utilizadas en medicina veterinaria para el tratamiento de esta enfermedad son dietas altamente digestibles para asegurar la asimilación de nutrientes en un tracto gastrointestinal alterado, con proteínas noveles o hidrolizadas con baja capacidad antigénica, carbohidratos de fácil digestión, bajas en lactosa y restringidas en grasa, nutricionalmente equilibradas y muy palatables (Marks *et al.*, 2002; Luckschander *et al.*, 2006; Hall, 2013a). La modificación del ratio de ácidos grasos n3:n6 también ha sido descrito como una buena estrategia en el tratamiento y mantenimiento de la remisión de la EICI canina al modular las respuestas inflamatorias, reduciendo la producción de metabolitos proinflamatorios (Bensignor *et al.*, 2008). Del mismo modo que en medicina humana, se recomienda la monitorización y suplementación de aquellos nutrientes esenciales cuya absorción

puede verse disminuida, destacando la disminución de la vitamina B12 durante la EICI canina (Toresson *et al.*, 2016). Además, recientemente se han identificado alteraciones en los perfiles fosfolipídicos y aminoácidos en estos perros relacionados con la gravedad clínica de la enfermedad (Kathrani *et al.*, 2018; Tamura *et al.*, 2019; Benvenuti *et al.*, 2020). Las buenas respuestas encontradas en modelos animales tras la corrección de esta clase de anomalías denota su importancia en la EICI (Kim *et al.*, 2010).

Hay estudios que demuestran el importante papel de la dieta en la etiopatogenia de la EICI canina al conseguir la remisión del cuadro clínico y de las alteraciones laboratoriales empleando únicamente tratamiento dietético (Rudinsky *et al.*, 2017; Törnqvist-Johnsen *et al.*, 2020).

2.3.4.4. Factores medioambientales

En medicina humana, las diferencias encontradas en la presentación de la EICI entre distintas áreas geográficas y el aumento de su incidencia en países con mayor desarrollo e industrialización (muy marcada en países de reciente desarrollo), sugieren una importante contribución de los factores ambientales en el curso de la enfermedad (Rogler *et al.*, 2016; de Souza, 2017).

La hipótesis de que una higiene excesiva en países desarrollados, basada en la mejora de las condiciones sanitarias y la disminución de la incidencia de enfermedades infecciosas, podría afectar al desarrollo del sistema inmunitario y a la microbiota intestinal, está empezando a cobrar un peso importante en los estudios de etiopatogenia de la EICI (Saidel-Odes y Odes, 2014; Rogler y Vavricka, 2015; de Souza *et al.*, 2017). Otra hipótesis sugiere que el empleo de productos artificiales y ciertos químicos tales como antibióticos, contaminantes, aditivos o conservantes alimentarios podría haber alterado la presencia de ciertos microorganismos que fuesen protectores frente a esta enfermedad (de Souza *et al.*, 2017).

Hay trabajos que han identificado que las alteraciones dietéticas e inmunológicas a edades tempranas son un factor de riesgo crítico en el desarrollo de EICI en edades adultas en personas asiáticas (Rehman *et al.*, 2016). En este sentido, se cree que la relación epigenética entre el ADN del paciente y los factores medioambientales puede determinar la expresión fenotípica de la enfermedad. El aumento de la incidencia de EICI en personas que migran de zonas de baja a alta incidencia parece apoyar la idea de que ciertos factores ambientales desencadenan modificaciones epigenéticas que influyen en la aparición y comportamiento de la enfermedad (Benchimol *et al.*, 2015). En función de estos estudios, algunos autores afirman que la detección de estos factores ambientales podría ayudar en la prevención de la EICI y al tratamiento de la misma (Rogler *et al.*, 2016; de Souza *et al.*, 2017).

Sin embargo, en medicina veterinaria la ausencia de estudios de incidencia y su relación con factores epigenéticos y ambientales no permite extrapolar estas afirmaciones a los perros que viven en ciudades.

2.3.4.5. Factores psicológicos

Numerosos estudios han tratado de determinar si existe relación o no entre el estrés y el inicio de la EICI o la aparición de recaídas de la enfermedad en medicina humana. Sin embargo, existe una gran dificultad para cuantificar o determinar situaciones estresantes y asociar cuándo una situación estresante dará lugar a una recaída y la relación directa que tendrá sobre la misma (Andrews y Holtmann, 2011). Hay estudios que describen una correlación positiva entre la actividad o gravedad de la enfermedad y el grado de estrés y ansiedad, y una correlación negativa con una buena calidad de vida (Graff *et al.*, 2006; Lix *et al.*, 2008). Un reciente estudio longitudinal en personas con EICI ha determinado que las recaídas pueden aparecer hasta en los tres meses consecutivos al momento en el que tuvo lugar el evento vital importante o la situación de estrés, resaltando la importancia de que monitorizar psicológicamente a los pacientes con EICI puede ayudar a prevenir recaídas (Wintjens *et al.*, 2019). No obstante, otros trabajos no han conseguido asociar estos eventos como posibles factores de riesgo para el inicio de la EICI (Lerebours *et al.*, 2007).

Cabe destacar que en trabajos con modelos experimentales de EICI se ha asociado el estrés con la aparición de recaídas, relacionando este factor con alteraciones de la permeabilidad intestinal y la activación de la respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T (Qiu *et al.*, 1999; Kiank *et al.*, 2010).

En la especie canina, hay trabajos que determinan que exposiciones intensas y prolongadas a un factor estresante pueden exacerbar patologías existentes o predisponer a la adquisición de nuevas alteraciones. Estos estudios han tratado de relacionar el estrés con parámetros endocrinos, comportamentales, inmunitarios y con el sistema nervioso autónomo. En este sentido, parece que el estrés en el perro tiene un efecto importante sobre el sistema nervioso entérico y el sistema neuroendocrino (Frank, 2013). Hay estudios que describen aumentos de cortisol sistémico unidos a disminución de la motilidad gastrointestinal en perros tras ser sometidos a estímulos acústicos estresantes (Gué y Bueno, 1986). En los perros de trineo se han observado incrementos de los niveles de cortisol sérico, un aumento de la permeabilidad intestinal y una alta prevalencia de lesiones gástricas (Radosevich *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2005).

Por el momento, la implicación de ciertos factores psicológicos como el estrés o la calidad de vida en el curso de la EICI continúa siendo controvertida tanto en medicina humana como veterinaria.

2.3.4.6. Otros factores etiopatogénicos

a. Reacciones a fármacos

En la EICI en el hombre se han relacionado ciertos fármacos tanto con el desarrollo de la enfermedad como con la aparición de recaídas. Los de mayor repercusión y los más investigados son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), llegando a ser considerados como uno de los posibles desencadenantes de la enfermedad en individuos predispuestos (Gleeson y Davis, 2003; Singh *et al.*, 2009). Además, su uso también se relaciona con la aparición de recaídas en pacientes con la enfermedad latente (Kvasnovsky *et al.*, 2015). Estos fármacos inhiben la producción de prostaglandinas que forman parte del moco protector, alteran la fosforilación oxidativa mitocondrial de los enterocitos, lo que se traduce en una disminución de las uniones estrechas intercelulares y un aumento de la permeabilidad de la mucosa, e interfieren en la actividad supresora de los linfocitos T. El resultado de sus efectos es un incremento de la susceptibilidad de la mucosa a toxinas lumenales, enzimas hidrolíticas y proteolíticas y a las bacterias (Scheiman y Fendrick, 2007).

En la especie canina, algunos AINEs, como la sulfasalazina, han sido utilizados para el tratamiento de la EICI moderada, dados sus efectos bacteriostáticos, antiinflamatorios e inmunosupresores, consecuencia de la inhibición de la síntesis de leucotrienos, prostaglandinas y citocinas. Sin embargo, la mayor efectividad de otros tratamientos y la controversia del efecto de dichos fármacos han hecho que su empleo sea muy limitado en la actualidad (Malewska *et al.*, 2011). A pesar de que no hay estudios que relacionen en la especie canina el uso de AINEs con el desarrollo de EICI y la aparición de recaídas, cabe destacar la gran incidencia de efectos adversos gastrointestinales derivados de su uso en esta especie (Monteiro-Steagall *et al.*, 2013; McLean y Khan, 2018).

b. Factores vasculares

La disfunción endotelial es considerada uno de los posibles factores etiopatogénicos de la EICI, si bien su alteración aparecería más bien como consecuencia del proceso inflamatorio asociado a esta patología y favorecería la perpetuación y agravamiento de la enfermedad (Cibor *et al.*, 2016). Entre las alteraciones endoteliales descritas en la EICI en el hombre destaca la activación del endotelio por mediadores inflamatorios tales como citocinas y quimiocinas,

teniendo una gran repercusión el TNF- α . Esto se traduce en un incremento de expresión de moléculas de adhesión por parte del endotelio que da lugar a un mayor reclutamiento y diapédesis leucocitaria y a un aumento del tono del músculo liso vascular, favoreciendo estados pro-coagulantes (D'Alessio *et al.*, 2013; Steyers y Miller, 2014).

Además, en pacientes con EICI se ha descrito un aumento de los procesos angiogénicos a nivel intestinal. Numerosas células inflamatorias, entre las que destacan macrófagos, linfocitos, mastocitos y fibroblastos, y la hipoxia presentada en estas zonas de inflamación, promueven la angiogénesis patológica mediante la liberación de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular endotelial, factor de crecimiento de fibroblastos y TNF- α (Koutroubakis *et al.*, 2006). En un estudio realizado en la especie canina, se ha asociado la isquemia intestinal con un incremento de los niveles sistémicos y de la circulación portal de citocinas proinflamatorias tales como la IL-6 y el TNF- α , asociando las alteraciones vasculares a este nivel con un estado proinflamatorio que podría extrapolarse a enfermedades inflamatorias tales como la EICI (Nezu *et al.*, 2002)

En otro trabajo empleando modelos animales se ha demostrado que la perpetuación del proceso agrava el daño endotelial y aumenta la permeabilidad vascular, lo que conduce a una situación de hipoxia cada vez más intensa que se traduce en la liberación de radicales libres de oxígeno, desencadenando la aparición de úlceras y lesiones a nivel intestinal (Tolstanova *et al.*, 2012). Estos radicales libres de oxígeno activan a su vez receptores TLR endoteliales, aumentando la permeabilidad microvascular (Tolstanova *et al.*, 2012; Murdaca *et al.*, 2013). En la especie canina, se han descrito aumentos de la dilatación vascular e hipervascularización a nivel del colon en perros con colitis ulcerosa histiocítica. La intensidad de estas lesiones presentaba una asociación positiva con la gravedad de la enfermedad (Lawson *et al.*, 1975).

Dos trabajos realizados en perros con EICI empleando la técnica Doppler para la valoración del flujo sanguíneo a nivel de las arterias mesentérica craneal y celiaca han descrito alteraciones hemodinámicas a nivel gastrointestinal. Han determinado que los perros con EICI presentan un menor incremento del flujo sanguíneo diastólico durante la digestión en comparación con animales sanos, lo que podría estar justificado por alteraciones del lecho vascular de la mucosa intestinal en perros con esta enfermedad (Gaschen *et al.*, 2005; Gaschen y Kircher, 2007).

Los vasos linfáticos intestinales se encargan de la eliminación del acúmulo de fluidos y de células y mediadores inflamatorios. Sin embargo, en pacientes con EICI el exceso de mediadores inflamatorios daña los vasos linfáticos, dando lugar a edema tisular y acumulación de bacterias y células muertas. En personas y perros con EICI se ha descrito la presencia de obstrucciones linfáticas, edema en la submucosa y una linfangiogénesis aberrante como resultado (Danese, 2011; D'Alessio *et al.*, 2013; Wennogle *et al.*, 2019b).

2.3.5. Signos clínicos

La EICI en la especie canina se caracteriza por la persistencia y recurrencia de signos gastrointestinales inespecíficos. Los signos clínicos más habituales son vómitos, diarrea, pérdida de peso y alteraciones del apetito. Sin embargo, también se han descrito otros signos asociados tales como dolor abdominal, aumento de flatulencias y borborismos, prurito o letargia, entre otros. La manifestación de unos signos u otros viene en muchas ocasiones determinado por el tramo gastrointestinal afectado y la duración del proceso (Jergens y Simpson, 2012; Hall y Day, 2017). Las manifestaciones extraintestinales son poco frecuentes en la especie canina, a diferencia de lo que ocurre en pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa (Ridgway *et al.*, 2001; Allenspach *et al.*, 2007; Greuter y Vavricka, 2019).

La aparición de los signos clínicos suele ser progresiva, comenzando con signos leves y poco frecuentes que van tornándose en habituales, llegando en ocasiones a hacerse continuos. Pueden presentarse de forma súbita o ser desencadenados por algún factor, como cambios dietéticos bruscos, situaciones de estrés o tratamientos farmacológicos, aunque no es lo habitual (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017).

2.3.5.1. Vómito

El vómito es, junto con la diarrea, el signo clínico más frecuente en la EICI canina que afecta al intestino delgado, siendo este tramo intestinal a su vez el más afectado habitualmente en esta enfermedad (Jergens *et al.*, 1992b; Craven *et al.*, 2004b; Hall, 2013a). Puede presentarse como único motivo de consulta o asociado a otros signos. Aunque es más frecuente su presentación en EICI linfoplasmocitaria (García-Sancho *et al.*, 2005b; García-Sancho *et al.*, 2007; Hall y Day, 2017), también se ha descrito en casos de enteritis eosinofílica (German *et al.*, 2002; McTavish, 2002; Hall y Day, 2017).

Los vómitos suelen aparecer de forma intermitente, si bien, a medida que avanza la enfermedad o la gravedad de la misma, puede aumentar su frecuencia. Habitualmente son vómitos sin contenido alimenticio, con bilis, líquido o espuma, fundamentalmente a primera hora del día. En ocasiones, pueden presentar contenido alimenticio, ya sea parcialmente digerido o sin digerir, incluso varias horas después de la ingesta, aunque no es lo más habitual (Tams, 2003).

En procesos inflamatorios como la EICI este signo clínico aparece como resultado de la estimulación del centro del vómito a partir de fibras viscerales aferentes y de los centros quimiorreceptores en respuesta a estímulos tales como toxinas absorbidas o retardo en el vaciado

gástrico (Washabau, 2013a). En el caso de los vómitos biliosos, tan frecuentes en esta enfermedad, estarían producidos por el reflujo duodenal hacia el antro pilórico que aparece como consecuencia de una incompetencia pilórica inducida por el proceso inflamatorio crónico presente en el intestino delgado. Este reflujo duodenal constituido por bilis, jugo pancreático y secreciones duodenales, debido a su efecto alcalinizante, disuelve la capa de moco protector del antro pilórico, produce una hipomotilidad antral y un retardo del vaciado gástrico, además de inducir una hipersecreción de gastrina que incrementa la producción de ácido clorhídrico por estímulo de los quimiorreceptores antrales. La unión de estos fenómenos da lugar a la aparición de una gastritis crónica antral y a los vómitos biliosos (Rodríguez-Franco *et al.*, 1997; García-Sancho *et al.*, 2005b).

2.3.5.2. Diarrea

La diarrea, entendida como un aumento en la frecuencia, contenido en agua y/o volumen de las heces, en la EICI se caracteriza por ser crónica (duración del proceso de más de tres semanas) y presentarse de forma continua o intermitente (Hall, 2013a; Marks, 2013).

Se trata del signo clínico más frecuente en la EICI que afecta al intestino grueso y en las enteritis o enterocolitis eosinofílicas (Washabau, 2013b; Hall y Day, 2017). En la EICI que afecta al intestino delgado es también el principal motivo de consulta, junto con el vómito (Jergens *et al.*, 1992b; Craven *et al.*, 2004b; García-Sancho *et al.*, 2007; Volkmann *et al.*, 2017).

Como ya se ha comentado, el tramo más habitualmente afectado en la EICI canina es el intestino delgado, por lo que las características de la diarrea son las típicas de este segmento intestinal, destacando: heces de color claro, con aumento de volumen debido a mayor concentración hídrica, número de deposiciones normal o ligeramente aumentado, presencia de esteatorrea, alimentos sin digerir en las deposiciones y aumento de borborigmos intestinales y flatulencias (Tams, 2003).

En algunos casos se describen diarreas de carácter mixto, es decir, con características de ambos tramos intestinales. Esto suele ocurrir cuando el proceso inflamatorio se extiende a todo el intestino o por la irritación y alteraciones que desencadena el proceso diarreico procedente del intestino delgado, mantenido en el tiempo sobre la mucosa del intestino grueso (Hall y Day, 2017).

En la EICI el proceso inflamatorio desencadena alteraciones de la motilidad y de la permeabilidad intestinal. El resultado es un síndrome de malabsorción que aumenta la cantidad de solutos en el lumen intestinal, dando lugar a la aparición de una diarrea osmótica por pérdida de agua hacia la luz. El aumento de grasas y ácidos biliares no absorbidos, de células y productos inflamatorios, así como las alteraciones en la microbiota que acompañan a la EICI, son

responsables también del desarrollo de diarrea secretora por el transporte iónico anormal en las células del epitelio (Marks, 2013).

2.3.5.3. Pérdida de peso y alteraciones del apetito

La mayoría de los perros con EICI presenta una pérdida de peso progresiva, siendo más evidente en los casos en los que la EICI afecta al intestino delgado (Jergens *et al.*, 1992b; Craven *et al.*, 2004b; García-Sancho *et al.*, 2007). El proceso inflamatorio intestinal y las alteraciones fisiopatológicas que este produce desencadenan un síndrome de malabsorción intestinal responsable de la pérdida de peso (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Tiene lugar un importante déficit de absorción de nutrientes, desarrollando muchas carencias nutricionales. alguna de ellas, como la hipocobalaminemia, está presente en un elevado número de perros con EICI y ha sido asociada con un peor pronóstico y un mayor riesgo de mortalidad debido a sus múltiples efectos sobre la salud (Allenspach *et al.*, 2007; Toresson *et al.*, 2016; Kather *et al.*, 2020).

Se ha descrito que tras la instauración de un tratamiento médico y dietético adecuado, se produce un incremento del peso en perros con EICI, consecuencia del probable control del proceso inflamatorio intestinal, la restauración de la permeabilidad intestinal y, con ello, la correcta absorción de nutrientes (García-Sancho *et al.*, 2007; Allenspach *et al.*, 2016; Rudinsky *et al.*, 2017).

Los perros con EICI presentan alteraciones del apetito de forma habitual. En algunas ocasiones presentan un aumento del apetito o polifagia como consecuencia del síndrome de malabsorción asociado. Esta polifagia a veces conlleva la ingesta de cuerpos extraños que agravan el proceso inflamatorio (Craven *et al.*, 2004b; García-Sancho *et al.*, 2006). Sin embargo, también se describe disminución del apetito o hiporexia asociada a la enfermedad, sobre todo en los casos más graves (García-Sancho *et al.*, 2006; García-Sancho *et al.*, 2007; Hall, 2013a).

2.3.5.4. Dolor abdominal

El dolor abdominal es un signo clínico muy común en procesos de enteritis (Hall, 2013b) y más concretamente en EICI (Hall y Day, 2017). En algunos estudios los cuadros de dolor abdominal fueron uno de los signos clínicos más habituales en EICI (Rodríguez-Franco y Palacios, 2002; García-Sancho *et al.*, 2006). El dolor abdominal en esta entidad suele aparecer de forma puntual y puede presentarse con dolor a la palpación abdominal, con la existencia de posturas antiálgicas o en forma de ataques de dolor abdominal que pueden llegar a confundirse con ataques convulsivos o de tipo epileptiforme (Rodríguez-Franco y Palacios, 2002).

La causa del dolor abdominal es probablemente multifactorial. La liberación de mediadores de la inflamación, la sobredistensión por acúmulo de gas, las alteraciones de la motilidad y la presencia en ocasiones de ulceraciones de la mucosa, entre otros, pueden ser los responsables de la activación de los receptores viscerales del dolor (Hall, 2013b).

2.3.5.5. Otros signos clínicos

Otros signos clínicos que se han descrito asociados a EICI, aunque en menor medida que los anteriormente detallados, son halitosis y cambios de actitud y actividad, como letargia y apatía (García-Sancho *et al.*, 2007; Hall y Day, 2017; Rudinsky *et al.*, 2017).

En los casos más graves de EICI con disminución de las proteínas totales séricas, es decir, en enteropatías perdedoras de proteínas, pueden aparecer otros signos clínicos como ascitis, edemas subcutáneos o derrame pleural. Estos signos suelen aparecer cuando la concentración de albúmina sérica desciende por debajo de 1,5 g/dL, siendo estos signos indicadores de mal pronóstico (Allenspach *et al.*, 2007; Hall, 2013a; Craven y Washabau, 2019).

En medicina humana son bien conocidas las manifestaciones extraintestinales asociadas a la EICI. Las más comúnmente descritas son: artropatías, como la artritis; orocutáneas, como el eritema nodoso o la pioderma gangrenosa; oftalmológicas, como episcleritis o uveítis; hepatobiliares; pulmonares; o renales. Estas manifestaciones llegan a estar presentes hasta en el 43% de los pacientes con EICI. Su patogenia no se conoce con exactitud, si bien algunos autores sugieren que puede deberse a la migración de linfocitos efectores desde el intestino a estas localizaciones gracias a la expresión de moléculas de adhesión epitelial presentes en todas las superficies mucosas (Levine y Burakoff, 2011; Greuter y Vavricka, 2019).

En la especie canina, existen muy pocos trabajos que asocien la EICI con manifestaciones extraintestinales, siendo estas de muy rara presentación (Hall, 2013a). Algunos autores han sugerido la relación de ciertas artropatías y prurito y lesiones dermatológicas con la EICI en el perro (Jergens *et al.*, 1992b; Jergens, 1999; Allenspach *et al.*, 2007).

En un trabajo se describe la posible asociación de la EICI canina con la aparición de polidipsia/poliuria, sin encontrar una causa que justifique esta alteración. Sus autores proponen que la polidipsia puede ser una respuesta comportamental frente al malestar digestivo consecuencia del proceso inflamatorio (Henderson y Elwood, 2003).

Se ha asociado también la aparición del síndrome de dilatación-torsión gástrica con la EICI canina, justificando su aparición con las alteraciones de la motilidad descritas en la EICI (Braun *et al.*, 1996).

Cabe mencionar el mayor riesgo de desarrollar trombosis, fundamentalmente venosa, en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. En general los individuos con EICI tienen un riesgo de dos a cuatro veces mayor de desarrollar tromboembolismos que los individuos sanos, con una incidencia global del 1 al 8% (Magro *et al.*, 2014). La causa exacta se desconoce; se sugiere que puede deberse a factores adquiridos como consecuencia de la enfermedad tales como el estado inflamatorio sistémico o la administración de glucocorticoides, o por la asociación de la EICI con múltiples anormalidades en la coagulación como el aumento del recuento de plaquetas, la mayor reactividad y disfunción del endotelio o la alteración de la fibrinólisis, entre otras (Srirajaskanthan *et al.*, 2005; Magro *et al.*, 2014). En la especie canina por su parte, el desarrollo de tromboembolismo está asociado con las formas más graves de la EICI, es decir, con la enteropatía con pérdida de proteínas. Según la literatura la incidencia es de 6% de los casos con enteropatía con pérdida de proteínas, aunque algunos autores consideran que su incidencia real se desconoce y que está subestimada (Craven y Washabau, 2019). Las causas de su aparición en perros con EICI también se desconocen, pero se han descrito estados hipercoagulativos en perros con enteropatía con pérdida de proteínas asociados a niveles bajos de antitrombina en sangre que se mantienen a pesar del tratamiento y de la mejoría clínica (Goodwin *et al.*, 2011; Hall, 2013a; Jacinto *et al.*, 2017).

2.3.6. Diagnóstico

Como ya se ha comentado, la EICI es una enfermedad idiopática. Por ello, su diagnóstico solo será correcto tras la realización de un completo protocolo de exclusión de todas aquellas causas que puedan dar lugar a un proceso inflamatorio en el intestino y desencadenar el cuadro clínico gastrointestinal característico. Esta premisa es de gran importancia para evitar sobrediagnósticos de la enfermedad, dada la gran facilidad actual de obtención de muestras endoscópicas gastrointestinales (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017).

Se deben valorar en conjunto los hallazgos clínicos, la imagen endoscópica del tracto digestivo y el examen histopatológico de las biopsias intestinales, con el fin de interpretar adecuadamente la enfermedad e instaurar el tratamiento más adecuado para cada animal.

2.3.6.1. **Hallazgos clínicos**

El primer paso en el protocolo diagnóstico de la EICI es la realización de una correcta y exhaustiva **anamnesis** que nos aporte la información necesaria para la graduación clínica de la enfermedad. En ella se deben valorar aspectos como la raza, la edad, los hábitos de alimentación,

el entorno del animal y las pautas de vacunación y desparasitación. En algunas ocasiones podremos encontrar un hecho desencadenante del inicio del cuadro clínico, como cambios de dieta, tratamientos médicos, estrés, etc. (Jergens y Simpson, 2012; Hall y Day, 2017). El objetivo central de la anamnesis es la descripción en detalle por parte del propietario de todos los signos clínicos descritos en el apartado anterior para la graduación clínica del proceso y la orientación del caso.

A continuación, se debe realizar una **exploración física** completa. En ella inicialmente deberemos valorar la existencia de otras alteraciones, además de las gastrointestinales. Los hallazgos que encontraremos en perros con EICI pueden ir desde exploraciones prácticamente normales hasta alteraciones más marcadas. Dentro de estas alteraciones podemos encontrar diferentes grados de deshidratación, baja condición corporal, pérdida de masa muscular, signos de anemia o mal pelaje, entre otras. La palpación abdominal es el punto de mayor importancia en la exploración de perros con EICI, donde podremos encontrar anomalías tales como dolor abdominal, aumento del grosor de las asas intestinales, linfadenopatías mesentéricas, etc. (Hall, 2013a). En casos de EICI grave con pérdida de proteínas podemos encontrar ascitis y edemas periféricos durante la exploración (Craven y Washabau, 2019). La palpación rectal no se considera necesaria en casos de EICI de intestino delgado, pero su realización puede darnos información sobre las características de las heces. En casos en los que el intestino grueso esté afectado, puede resultar dolorosa y puede permitir detectar anomalías en la superficie mucosa (Hall, 2013a; Washabau, 2013b).

La correcta graduación clínica de la enfermedad permite orientar el diagnóstico y las estrategias terapéuticas individualizando cada caso. En medicina humana, existen desde hace mucho tiempo índices numéricos que permiten graduar los signos clínicos asociados a la enfermedad y clasificarla según su gravedad clínica (Harvey y Bradshaw, 1980; Zittan *et al.*, 2017).

En medicina veterinaria, actualmente existen tres índices clínicos para la clasificación de la EICI. El primero fue propuesto por Jergens y colaboradores en el año 2003 y se denomina CIBDAI (*canine IBD activity index*). En este índice se valora la presencia de seis signos clínicos: actividad/actitud, apetito, vómitos, pérdida de peso, consistencia de las heces y frecuencia de la defecación en perros con EICI. Estos signos son puntuados como 0 (normal), 1 (leve), 2 (moderado) y 3 (grave), y la suma de todos ellos permite la clasificación de la enfermedad en insignificante (0-3), leve (4-5), moderada (6-8) y grave (9 o mayor) (Jergens *et al.*, 2003). El segundo índice, llamado CIBDAISI (*canine IBD activity index for the small intestine*), fue propuesto por nuestro grupo de trabajo para la valoración concreta de la EICI que afecta al intestino delgado. Se trata de una modificación del CIBDAI que, además de evaluar los seis signos

clínicos propuestos en este índice, incorpora la presencia de dolor abdominal, borborigmos y flatulencias, signos clínicos muy habituales cuando esta entidad afecta al intestino delgado (Rodríguez-Franco *et al.*, 2004). El último índice fue propuesto por Allenspach y colaboradores en 2007, denominado CCECAI (*canine chronic enteropathy clinical activity index*) y añade tres nuevos parámetros a los propuestos en el CIBDAI: presencia de prurito, presencia de ascitis o edemas periféricos y el valor laboratorial de la albúmina sérica. Este último índice parece tener mayor sensibilidad que el CIBDAI. Además, en este trabajo se demostró que la hipoproteinemia es un factor asociado a pronóstico desfavorable en la EICI (Allenspach *et al.*, 2007).

2.3.6.2. Hallazgos laboratoriales

Los hallazgos laboratoriales en perros con EICI son frecuentemente variables e inespecíficos. Sin embargo, son necesarios para determinar el estado de salud del animal y poder descartar otras enfermedades concurrentes (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017).

La mayoría de los autores coinciden en que la **evaluación hematológica** no suele presentar alteraciones remarcables (Tams, 2003; Hall, 2013a). Sin embargo, a pesar de no ser muy frecuente, se han descrito en la literatura cambios en el leucograma de perros con EICI tales como neutrofilia con o sin desviación a la izquierda, eosinofilia en algunos casos de enteritis eosinofílica o linfopenia en algunos casos de enteritis con pérdida de proteínas (Jergens *et al.*, 1992b; Tams, 2003; Craven *et al.*, 2004a; Hall y Day, 2017). Algunos autores han asociado la presencia de anemia con una pobre respuesta clínica al tratamiento y un mal pronóstico (Volkman *et al.*, 2017). La anemia también puede encontrarse como consecuencia del proceso inflamatorio crónico o por pérdida de sangre de origen digestivo, habiéndose identificado casos de anemia ferropénica microcítica e hipocrómica con trombocitosis asociada (Ristic y Stidworthy, 2002). En un reciente estudio se han relacionado recuentos más altos de plaquetas con la gravedad clínica de la enfermedad (Mehain *et al.*, 2019). Otro trabajo, por su parte, destaca la presencia de trombocitopenia en un 2,5% de los casos de su estudio (Ridgway *et al.*, 2001). Aunque con una baja incidencia (6%), se han descrito estados hipercoagulativos en perros con enteropatía con pérdida de proteínas caracterizados por bajos niveles séricos de antitrombina (Goodwin *et al.*, 2011).

De igual manera que en el hemograma, las alteraciones en el **perfil bioquímico** de perros con EICI son poco frecuentes, con la excepción de las alteraciones en las proteínas séricas en los casos de enteropatía perdedora de proteínas (Jergens *et al.*, 1992b; Craven *et al.*, 2004b; Hall y Day, 2017). En estos casos graves de la enfermedad, se produce una pérdida tanto de albúmina como de globulinas hacia la luz intestinal, manteniéndose el cociente albúmina/globulina en valores de normalidad. Sin embargo, la existencia de hipoproteinemia requiere determinar la

ausencia de problemas hepáticos, de hemorragia digestiva y de proteinuria en el urianálisis (Hall, 2013a; Craven y Washabau, 2019). La presencia de hipoalbuminemia es considerada un factor de mal pronóstico en perros con EICI (Allenspach *et al.*, 2007). En algunas ocasiones, asociado a la presencia de hipoalbuminemia aparece hipocalcemia, debido a la pérdida de calcio unido a la albúmina (Kimmel *et al.*, 2000; Volkmann *et al.*, 2017; Salavati Schmitz *et al.*, 2019). También se han descrito posibles asociaciones de la hipocalcemia con la presencia de hipovitaminosis D en perros con EICI, relacionándose la deficiencia de esta vitamina con un mayor riesgo de mortalidad (Gow *et al.*, 2011; Titmarsh *et al.*, 2015; Wennogle *et al.*, 2019a). Del mismo modo, recientemente se ha descrito la presencia de un descenso en los niveles séricos de zinc en un elevado porcentaje de perros con enteritis linfoplasmocitaria, asociándose también con una mayor gravedad clínica, histológica y un menor tiempo de supervivencia (Sakai *et al.*, 2020).

Otras alteraciones encontradas en el perfil bioquímico de perros con dicha enfermedad son hipocolesterolemia (pudiendo ser consecuencia del síndrome de malabsorción) o hipomagnesemia (Kimmel *et al.*, 2000; Bush *et al.*, 2001; Kathrani *et al.*, 2019; Salavati Schmitz *et al.*, 2019). En algunas ocasiones la inflamación intestinal puede dar lugar a una hepatopatía reactiva, pudiéndose llegar a encontrar incrementos de las enzimas hepáticas de leves a moderados (Jergens *et al.*, 1992b; Hall, 2013a). A pesar de no encontrarse habitualmente fuera de los rangos de referencia, un grupo de trabajo ha relacionado mayores valores de urea en el momento del diagnóstico con un mayor riesgo de mortalidad en perros con EICI con pérdida de proteínas, considerando la urea como un indicador del estado nutricional (Kathrani *et al.*, 2019).

Por otro lado, el síndrome de malabsorción que tiene lugar durante la EICI ocasiona deficiencias de folatos (vitamina B9) y cobalamina (vitamina B12). La hipocobalaminemia es considerada un factor de mal pronóstico y algunos autores consideran que su presencia en el momento del diagnóstico requerirá tratamientos más agresivos, además de su suplementación parenteral u oral para lograr una buena respuesta terapéutica, ya que esta deficiencia por sí misma tiene graves consecuencias metabólicas sistémicas y produce disfunción intestinal (Kather *et al.*, 2020). Su frecuencia de presentación en perros con EICI en la literatura es variable. Hay trabajos que describen porcentajes bajos, del 6,5% (Craven *et al.*, 2004b), mientras que en estudios más recientes el porcentaje llega hasta el 61%, destacando especialmente su presencia en perros con enteropatía perdedora de proteínas (Allenspach *et al.*, 2007; Volkmann *et al.*, 2017; Heilmann *et al.*, 2019; Kathrani *et al.*, 2019; Salavati Schmitz *et al.*, 2019).

Cabe subrayar la importancia de la realización de urianálisis, de análisis coprológico seriado o de pruebas de funcionalidad pancreática, como la TLI (de sus siglas en inglés, *Trypsin Like Immunoreactivity*), que deben ser absolutamente normales para realizar un correcto diagnóstico de exclusión previo y así poder diagnosticar una EICI (Hall, 2013a).

En las **muestras fecales** de perros con EICI se han identificado alteraciones de ciertos parámetros de creciente interés diagnóstico. Uno de ellos es el inhibidor de la proteinasa α_1 o α_1 antitripsina. Esta proteína está presente en el plasma, linfa o fluido intercelular y se pierde hacia la luz intestinal en casos de enteropatía con pérdida de proteínas. Se han descrito concentraciones de esta proteína significativamente mayores en heces de perros con EICI en comparación con heces de perros sanos. Además, su incremento se observa antes de que se detecten niveles bajos de proteínas en suero, por lo que es considerada una prueba útil para la detección precoz de los casos más graves de esta enfermedad (Murphy *et al.*, 2003; Grützner *et al.*, 2013). Por otro lado, dada la gran importancia de la microbiota y de sus alteraciones en la patogenia de la EICI, hay trabajos que proponen el empleo de técnicas moleculares que permiten la detección de la disbiosis que acompaña a este proceso y de los cambios en los metabolitos asociados con repercusión sobre la salud, tales como el lactato o los ácidos biliares. Estos autores proponen que su empleo puede dar valiosa información de cara al tratamiento de la enfermedad (Suchodolski, 2016; AlShawaqfeh *et al.*, 2017; Blake *et al.*, 2019).

Los últimos esfuerzos científicos se están focalizando en la búsqueda de **marcadores séricos** de la enfermedad que permitan su detección de forma menos invasiva o que permitan, como ya se ha comentado, detectar factores pronósticos y de respuesta al tratamiento (Berghoff y Steiner, 2011; Heilmann y Steiner, 2018). Algunas proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva podrían ser de utilidad en ese sentido, ya que diversos estudios han mostrado que dicha proteína se encuentra incrementada en perros con EICI y que disminuye significativamente en animales con buena respuesta al tratamiento, por lo que podría emplearse para la monitorización de la evolución de la enfermedad (Jergens *et al.*, 2003; Allenspach *et al.*, 2007; Jergens *et al.*, 2010; Heilmann *et al.*, 2019; Wennogle *et al.*, 2019a). Sin embargo, dada su escasa correlación en algunos casos con los índices clínicos, endoscópicos, histopatológicos y la evolución del caso, su utilidad parece controvertida (Allenspach *et al.*, 2007; McCann *et al.*, 2007).

Los anticuerpos perinucleares anti-citoplasma de los neutrófilos o p-ANCA (del inglés, *perinuclear anti-neutrophilic cytoplasmic antibodies*) y anti-*Saccharomyces cerevisiae* o ASCA (del inglés, *anti Saccharomyces cerevisiae antibodies*) son autoanticuerpos frente a componentes de los gránulos de los neutrófilos o frente a componentes de la pared del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*. Las pruebas de detección de estos anticuerpos poseen buena especificidad, pero baja sensibilidad. En el caso de la determinación de p-ANCA, la elevada seropositividad y los elevados títulos en perros con buena respuesta al tratamiento dietético y con enteropatía perdedora de proteínas, sustentan su posible utilización para el diagnóstico precoz de ambas entidades (Allenspach *et al.*, 2008; Mancho *et al.*, 2011; Florey *et al.*, 2017; Otoni *et al.*, 2018). Recientemente se han identificado otros autoanticuerpos frente a diferentes componentes celulares o estructuras microbianas con elevadas seroprevalencias en perros con EICI, destacando

los anticuerpos frente a leucocitos polimorfonucleares (APMNA) y el anticuerpo frente a la porina C de la membrana externa bacteriana (OmpC). Además, la detección de OmpC presenta una elevada sensibilidad (95%) y especificidad (85%) pudiendo convertirse en un buen biomarcador para la EICI canina (Estruch *et al.*, 2020).

La calprotectina S100A8/A9 y la calgranulina C S100A12 son potentes biomarcadores séricos y fecales de inflamación cuyos valores se ven ampliamente aumentados en perros con EICI. Además, presentan una buena correlación con los índices clínicos y endoscópicos de la enfermedad, siendo también buenos predictores de la respuesta al tratamiento. Sin embargo, también se ven incrementados en otros procesos inflamatorios gastrointestinales, por lo que por el momento no pueden emplearse para el diagnóstico de la EICI (Heilmann *et al.*, 2016; Heilmann *et al.*, 2018; Otoni *et al.*, 2018; Heilmann *et al.*, 2019).

Otro marcador sérico estudiado en perros con EICI es la 3-bromotirosina, un marcador de inflamación eosinofílica que aumenta en perros con EICI que requieren tratamiento inmunosupresor en comparación con aquellos que responden a tratamiento dietético (Bastan *et al.*, 2017; Sattasathuchana *et al.*, 2017). La N-metilhistamina (marcador sérico, fecal o urinario), un metabolito proinflamatorio producto del metabolismo de la histamina, también se ha visto aumentado en perros con EICI y, además, ha sido correlacionado con la gravedad histológica del proceso (Berghoff *et al.*, 2014). Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de ambos marcadores aún no ha sido determinada.

Recientemente se están describiendo alteraciones en los perfiles aminoacídicos y fosfolipídicos en perros con EICI; así, en dos recientes estudios se ha observado que los perros con las formas más graves de la enfermedad, es decir, con enteropatía perdedora de proteínas o aquellos que no responden a la terapia inmunosupresora, tienen valores séricos de triptófano, fenilalanina e histidina significativamente disminuidos (Kathrani *et al.*, 2018; Benvenuti *et al.*, 2020). Además, también se han determinado correlaciones negativas entre los valores séricos o plasmáticos de algunos de estos aminoácidos como la serina y la gravedad clínica de la enfermedad (Tamura *et al.*, 2019; Benvenuti *et al.*, 2020). Otro trabajo ha descrito la existencia de grandes diferencias en el perfil de fosfolípidos en perros con EICI que responden a dieta o que responden a inmunosupresión, describiéndose un cambio claro de dicho perfil después del tratamiento (Kalenyak *et al.*, 2019). La corrección de estas anomalías tiene resultados beneficiosos en modelos animales de EICI (Kim *et al.*, 2010).

2.3.6.3. Hallazgos radiográficos y ecográficos

Estas técnicas de diagnóstico por imagen se emplean fundamentalmente para descartar otras posibles enfermedades concurrentes, ya que no permiten alcanzar el diagnóstico de la EICI (Hall, 2013a). Las radiografías simples pueden ser normales o mostrar asas intestinales distendidas por acúmulo de gas y/o líquido. Por su parte, las radiografías de contraste también son habitualmente normales, aunque pueden mostrar alteraciones en la velocidad del tránsito gastrointestinal, tanto aumentos como disminuciones del mismo, irregularidades del contorno de la mucosa y sugerir engrosamientos de la pared intestinal (Kealy *et al.*, 2011).

Por su parte, el uso de la ecografía en casos de EICI tiene el valor añadido de que cuando se utiliza en conjunto con los datos clínicos y laboratoriales, puede ayudar a la elección de la técnica más adecuada para la toma de biopsias (endoscopia digestiva superior o inferior o laparotomía exploratoria). Además, también permite determinar la presencia de linfadenopatías mesentéricas (Hall, 2013a). A lo largo de los años múltiples autores han tratado de describir parámetros ecográficos que permitan el diagnóstico de la EICI. Uno de estos parámetros es el grosor de la pared intestinal, el cual suele encontrarse desde leve a moderadamente aumentado en perros con EICI, afectando inicialmente a la mucosa y, en casos de mayor gravedad, a la submucosa y a la capa muscular (Penninck, 2008). Sin embargo, se han descrito grandes diferencias de grosor entre los diferentes segmentos intestinales y entre perros de distintos pesos (Delaney *et al.*, 2003). Posteriormente, se han comparado los datos obtenidos en dicho estudio con los encontrados en perros con EICI, sin encontrar diferencias significativas entre perros sanos y enfermos, además de no mostrar correlación positiva entre el grosor de la pared intestinal y el diagnóstico histopatológico, concluyendo que este parámetro ecográfico no permite diagnosticar la EICI canina (Rudorf *et al.*, 2005).

Otros de los parámetros estudiados han sido alteraciones en la ecogenicidad de la mucosa intestinal. Sutherland-Smith y colaboradores describieron en 2007 una asociación entre la descripción ecográfica de estrías hiperecogénicas en la mucosa intestinal y la presencia histológica de dilataciones linfáticas en perros con EICI, presentándose ambos hallazgos en el 96% de los animales del estudio. Además, estas estriaciones en la mucosa estaban presentes en el 87% de los perros que mostraban líquido libre abdominal, relacionándose, por tanto, con los casos más graves de la enfermedad que conducen a una enteropatía con pérdida de proteínas y ascitis (Sutherland-Smith *et al.*, 2007). Otro estudio también relaciona la presencia de estas estriaciones hiperecogénicas y de punteado hiperecogénico en la mucosa intestinal con enteropatías crónicas de distinta etiología, encontrando una buena sensibilidad y especificidad para la presencia de estriaciones hiperecogénicas, pero no para la presencia de punteado hiperecogénico. Este trabajo concluye que la ecogenicidad de la mucosa es un mejor parámetro que el grosor de la pared

intestinal para el diagnóstico ecográfico de EICI. Sin embargo, dado el elevado número de animales con EICI que presentan estudios ecográficos normales, su ausencia no permite descartar la enfermedad (Gaschen *et al.*, 2008).

Finalmente, otro de los parámetros ecográficos a tener en cuenta en el estudio del intestino es la pérdida de la arquitectura en capas. En un trabajo en el que evaluaron ecográficamente perros diagnosticados con neoplasias intestinales y EICI, el 99% de los animales con neoplasia presentaron una pérdida de la estratificación en capas intestinales frente al 11% de los perros con EICI que también la presentaron. Por tanto, se puede concluir que este parámetro es de gran utilidad, pero tampoco permite diferenciar entre ambos diagnósticos con total eficacia (Penninck *et al.*, 2003).

Recientemente, un estudio ha empleado ecografía de contraste en perros con EICI para la descripción de parámetros que puedan ayudar en el diagnóstico. Dos de ellos, el pico de intensidad y el área bajo la curva, parecen ser de gran utilidad en la detección de inflamación a nivel intestinal y podrían ser de utilidad para excluir dicha patología (Nisa *et al.*, 2019).

Otra técnica de imagen empleada recientemente ha sido la escintigrafía para la detección de pérdida de proteínas a nivel digestivo en perros con EICI. Sin embargo, a pesar de que los resultados parecen prometedores, se trata de una técnica de alto coste cuyo uso en la práctica tendrá que ser definido con más trabajos (Engelmann *et al.*, 2017).

2.3.6.4. Hallazgos endoscópicos

A pesar de los esfuerzos investigadores en el descubrimiento de biomarcadores y otras técnicas que persiguen conseguir un diagnóstico menos invasivo de la EICI, el estudio histopatológico de las biopsias intestinales sigue siendo la técnica de elección para alcanzar el diagnóstico.

La obtención de las muestras puede llevarse a cabo de dos maneras: mediante el empleo de endoscopia digestiva o mediante laparotomía exploratoria. La endoscopia digestiva es una técnica mínimamente invasiva y ambulatoria, que permite la observación directa de la mucosa del tracto digestivo y la detección y localización de lesiones. Además, posibilita la obtención de gran número de biopsias. Entre sus inconvenientes destaca la imposibilidad de alcanzar todas las porciones intestinales, pudiendo pasar algunas alteraciones inadvertidas, sobre todo, las localizadas en yeyuno y en porciones distales del duodeno en perros de gran tamaño. Otro inconveniente es la gran importancia de una adecuada toma de biopsias para lograr un correcto diagnóstico. Las biopsias endoscópicas son muestras de pequeño tamaño y de difícil interpretación histológica en sí mismas; por ello, debe tomarse un elevado número de biopsias de

cada región, correctamente orientadas y con la mayor profundidad posible, evitando alcanzar solo el estrato mucoso. Las pinzas de biopsia empleadas tienen una importante influencia sobre la calidad de las muestras, por lo que es un factor a tener en cuenta (Goutal-Landry *et al.*, 2013; Cartwright *et al.*, 2016). La laparotomía exploratoria, por su parte, tiene la ventaja de que las biopsias obtenidas mediante el empleo de esta técnica son de una gran calidad y presentan todas las capas intestinales, además de poder acceder a cualquier segmento del tracto digestivo. Sin embargo, tiene inconvenientes importantes tales como la imposibilidad de visualización de la mucosa, cuando muchas lesiones derivadas de la EICI se localizan en dicha capa intestinal, y el riesgo quirúrgico *per se* que incluye la posible dehiscencia de la sutura en una mucosa intestinal con un proceso inflamatorio asociado de base (Willard *et al.*, 2001; Moore, 2003; Kleinschmidt *et al.*, 2006; Hall, 2013a; Jergens *et al.*, 2016; Hall y Day, 2017).

Durante muchos años, diversos grupos de trabajo describieron en sus estudios las lesiones endoscópicas que encontraban en el tracto gastrointestinal de perros con EICI estableciendo sus propias clasificaciones (Jergens *et al.*, 2003; García-Sancho *et al.*, 2005a; Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007). En el año 2010, el grupo de expertos en gastroenterología de la WSAVA publicó las guías de estandarización endoscópica e histológica para la evaluación de las patologías inflamatorias gastrointestinales en animales de compañía. En ellas se recogen todas las recomendaciones para la correcta realización de un estudio endoscópico y para la correcta toma de biopsias, indicando la necesidad de tomar de 6 a 7 biopsias adecuadas o de 10 a 15 biopsias si se observa una peor calidad, de cada localización explorada. Además, recomiendan la toma de biopsias en distintas localizaciones, a pesar de no observar lesiones, en todos los animales que presenten clínica compatible con la EICI, dadas las grandes variaciones observadas en los diferentes estudios en cuanto a frecuencia de presentación de las mismas y correlación con los hallazgos clínicos y endoscópicos (Jergens *et al.*, 1992b; Jergens *et al.*, 2003; Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007). Finalmente, detallan los parámetros que deben ser evaluados en cada región y que deberán ser evaluados como 0 (normal), 1 (leve), 2 (moderado) y 3 (grave). El resultado final aportará un dato numérico que podrá ser correlacionado con los datos clínicos e histopatológicos. Así, en el esófago indican la evaluación y graduación de hiperemia, alteraciones en la coloración de la mucosa, friabilidad, hemorragia, erosiones o úlceras, presencia de contenido (moco, bilis, alimento), dilatación de la luz, evaluación del cardias y otros hallazgos relevantes. En el estómago añaden, además de los indicados en el esófago, la capacidad de distensión, la presencia de edema y el paso del endoscopio a través del píloro. En el duodeno/yeyuno incorporan, además de los anteriores, la irregularidad de la mucosa y la presencia de dilataciones linfáticas. Finalmente, si se requiere endoscopia digestiva inferior, proponen la evaluación de los siguientes parámetros en el colon: hiperemia, alteraciones en la coloración de

la mucosa, erosiones o úlceras, invaginaciones, estenosis y presencia de artefactos (Washabau *et al.*, 2010).

Dadas las posibles diferencias existentes en la valoración endoscópica en función de la experiencia de los profesionales, Slovak y colaboradores desarrollaron un índice de actividad endoscópica para la evaluación de perros con EICI válido para endoscopistas con diferentes grados de conocimiento de la técnica. En este índice proponen valorar la presencia de erosiones, friabilidad e irregularidad de la mucosa en estómago, añadiendo la presencia de dilataciones linfáticas en duodeno y de masas en colon. Además, estos autores estudiaron el índice de forma cualitativa y cuantitativa, encontrando resultados idénticos con ambas metodologías. Basándose en sus resultados, proponen su índice cualitativo simplificado como un buen método de evaluación endoscópica del tracto gastrointestinal de perros con EICI, evitando las posibles discrepancias derivadas del endoscopista (Slovak *et al.*, 2015).

A pesar de que el grupo de estandarización de la WSAVA no aporta guías para la evaluación endoscópica del íleon, anotan la importancia de la evaluación de este tramo intestinal (Washabau *et al.*, 2010). Son muchos los autores que destacan la importancia de la exploración y la toma de biopsias de esta región intestinal, debido a la observación en sus trabajos de importantes lesiones y grandes diferencias histopatológicas entre el duodeno y el íleon que pueden afectar al manejo terapéutico y al pronóstico. Sin embargo, se trata de una zona de difícil acceso, incluso para endoscopistas experimentados, siendo este aspecto el principal factor limitante de la toma de biopsias en esta localización (Willard *et al.*, 2008; Casamian-Sorrosal *et al.*, 2010; Procoli *et al.*, 2013; Jergens *et al.*, 2016).

2.3.6.5. Hallazgos histopatológicos

Como se ha comentado previamente, el diagnóstico definitivo de la EICI en la especie canina se alcanza mediante la evidencia histológica de un infiltrado inflamatorio en la lámina propia intestinal unido a las alteraciones estructurales asociadas que se detallarán a continuación, tras la realización de un correcto protocolo de exclusión (Hall y Day, 2017).

Para alcanzar el correcto diagnóstico histológico, es de vital importancia una correcta toma de biopsias y procesamiento de las mismas que permita optimizar la interpretación histopatológica (Willard *et al.*, 2001; Mansell y Willard, 2003; Willard *et al.*, 2008; Willard *et al.*, 2010). Se trata de muestras de tan pequeño tamaño y fragilidad que incluso, a pesar de realizar buenas prácticas de manejo, su estudio no es sencillo y puede dar lugar a divergencias diagnósticas entre distintos patólogos cuando se analiza una misma muestra (Willard *et al.*, 2002). Por ello, se considera un punto crítico, ya que una mala interpretación de las mismas puede llevar

a errores diagnósticos y de tratamiento que comprometan la salud de los animales (Jergens *et al.*, 2016).

Del mismo modo que en el caso de la evaluación endoscópica, diversos grupos de investigación han diseñado sistemas de clasificación numérica para caracterizar la naturaleza y la gravedad de la inflamación intestinal en perros con EICI (Jergens *et al.*, 1992b; Wilcock, 1992; German *et al.*, 2001; Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007). En 2008 y 2010 el grupo de expertos de la WSAVA publicó las guías de estandarización para el diagnóstico histopatológico de procesos inflamatorios gastrointestinales en pequeños animales, para intentar disminuir la subjetividad de los estudios histopatológicos y consensuar la evaluación de una serie de parámetros (Day *et al.*, 2008; Washabau *et al.*, 2010). Este grupo de estandarización decidió incorporar en estas guías la evaluación de parámetros estructurales, debido a la escasa modificación de los parámetros inflamatorios tras el tratamiento, a pesar de la buena respuesta al mismo. Estos parámetros estructurales también se han correlacionado con marcadores de inflamación y gravedad clínica (García-Sancho *et al.*, 2007). Los parámetros evaluados reciben una puntuación de 0 (normal), 1 (leve), 2 (moderado) y 3 (grave) en función de las alteraciones encontradas en los mismos, obteniendo una puntuación histológica general para cada tejido de interés. Así, en el cuerpo gástrico recomiendan evaluar la lesión epitelial superficial y de las criptas, la fibrosis glandular y atrofia de la mucosa como parámetros estructurales, y los linfocitos intraepiteliales, el infiltrado en la lámina propia de linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos, neutrófilos y la hiperplasia de folículos linfoides como parámetros inflamatorios. En el antro pilórico, valoran la lesión e hiperplasia epitelial, la fibrosis de la mucosa y la atrofia glandular como parámetros estructurales, y los mismos parámetros inflamatorios que en el cuerpo gástrico. Por su parte, en el duodeno evalúan la atrofia de las vellosidades y su lesión epitelial, la fibrosis de la mucosa, la dilatación de las criptas y las dilataciones linfáticas como parámetros estructurales, sin variar los parámetros inflamatorios evaluados en el duodeno respecto a los del estómago. Finalmente, en el colon valoran la lesión epitelial, la hiperplasia, dilatación y fibrosis de las criptas y la atrofia de la mucosa estructuralmente, sustituyendo la evaluación de los linfocitos intraepiteliales por la valoración de los macrófagos presentes en la lámina propia, respecto a los parámetros inflamatorios en esta localización (Day *et al.*, 2008; Washabau *et al.*, 2010).

Diversos trabajos han descrito la escasa correlación existente entre los hallazgos clínicos, endoscópicos e histopatológicos en perros con EICI (Craven *et al.*, 2004b; Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007; McCann *et al.*, 2007; Schreiner *et al.*, 2008), lo que dificulta aún más la interpretación de la enfermedad y la instauración de un correcto tratamiento. A pesar de los esfuerzos del grupo de expertos de la WSAVA en estandarizar los criterios de evaluación histológica, continúan describiéndose diferencias debidas al observador (Willard *et al.*, 2010;

Willard y Mansell, 2011). Debido a esto, del mismo modo que Slovak y colaboradores hicieron con el índice endoscópico (Slovak *et al.*, 2015), algunos autores han desarrollado un índice histológico simplificado basado en la eliminación de aquellos parámetros del índice de la WSAVA que generaban discrepancias entre los distintos anatomopatólogos. Uno de ellos fue descrito por Jergens y colaboradores, incluyendo en el estudio del colon la evaluación de las células caliciformes, debido a las grandes alteraciones descritas en perros con EICI para este tipo celular (Simpson *et al.*, 2006; Mansfield *et al.*, 2009). Sin embargo, no incluyeron el estudio de biopsias del íleon, cuya importancia ha sido ampliamente descrita (Jergens *et al.*, 2014b). Por ello, recientemente su grupo de trabajo ha publicado una nueva modificación de ese índice simplificado que incluye la evaluación histopatológica del íleon, destacando la buena correlación encontrada con los hallazgos clínicos de la enfermedad. En este índice proponen la evaluación de la fibrosis, los linfocitos intraepiteliales y el infiltrado inflamatorio de la lámina propia en el estómago, la valoración de la atrofia de las vellosidades, la lesión epitelial, la dilatación de las criptas, las dilataciones linfáticas y el infiltrado inflamatorio de la lámina propia en el duodeno y en el íleon, y, finalmente, los mismos parámetros en el colon, sustituyendo la valoración de la atrofia de las vellosidades por la de las células caliciformes (Allenspach *et al.*, 2019).

Además, cabe destacar el cada vez más habitual empleo de otras técnicas sobre las biopsias endoscópicas que permiten incrementar la sensibilidad y especificidad diagnóstica, tales como la inmunohistoquímica o la hibridación *in situ* de ARN, entre otras muchas (Schreiner *et al.*, 2008; Carrasco *et al.*, 2015; Jergens *et al.*, 2016).

Por otro lado, un grupo de trabajo ha descrito una elevada sensibilidad (98,6%) y especificidad (73,5%) en el empleo de la citología digestiva para la diferenciación entre procesos inflamatorios y neoplásicos en el intestino de perros. Estos autores proponen el uso de esta técnica cuando el estado clínico del animal no permita la realización de una endoscopia. Sin embargo, se requieren más estudios para poder establecer los criterios citológicos específicos (Maeda *et al.*, 2017). En esta línea, es importante mencionar el reciente empleo de la espectrometría de masas guiada por histología en la distinción entre la enteritis linfoplasmocitaria y el linfoma de células pequeñas en la especie felina. Esta novedosa técnica que combina el análisis óptico y la información química de las muestras ha mostrado una buena sensibilidad (86,7%) y especificidad (91,7%) en la diferenciación entre ambas enfermedades en el gato, lo cual sigue constituyendo un desafío diagnóstico para la comunidad científica (Marsilio *et al.*, 2020).

2.3.6.6. Diagnóstico diferencial

Como ya se ha ido comentando, el diagnóstico de la EICI debe ser un diagnóstico de exclusión, ya que el cuadro clínico que la acompaña incluye signos gastrointestinales inespecíficos que pueden ser causados por múltiples patologías. De igual manera, el diagnóstico histológico solo será correcto cuando todas las posibles causas que puedan dar lugar a un proceso inflamatorio intestinal y al consecuente infiltrado en la lámina propia sean descartadas. El protocolo diagnóstico debe ser completo, ordenado y sistemático y deben descartarse (Tams, 2003; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017):

- Errores dietéticos, como la ingesta de huesos, de hierba, restos de comida de los propietarios, administración de comida una sola vez al día, entre otros. La realización de una anamnesis exhaustiva descarta este problema.
- Enfermedades sistémicas, como la insuficiencia renal crónica, el hipoadrenocorticism o síndrome de Addison, alteraciones hepáticas o el hipertiroidismo. Por ello, una exploración física completa y un buen análisis laboratorial son necesarios para descartar o confirmar estas patologías.
- Enfermedades parasitarias, producidas por protozoos, cestodos o nematodos. Para ello, se realizará una extensión en fresco de las heces junto con un análisis coprológico seriado de tres días consecutivos.
- Síndromes de maldigestión, como la insuficiencia pancreática exocrina. Se tendrán en cuenta datos como la edad o la raza, pero tendrán que realizarse pruebas específicas como la TLI.
- Neoplasias digestivas, siendo el adenocarcinoma o el linfoma intestinal las neoplasias digestivas más frecuentes. El estudio histopatológico de las biopsias intestinales es el único medio para llegar a su diagnóstico y diferenciarlo de la EICI.

2.3.7. Tratamiento

Debido a la ausencia de correlación entre los hallazgos clínicos, endoscópicos e histológicos, con el fin de obtener los mejores resultados terapéuticos, la aproximación siempre debe de ser individualizada, primando el estado clínico y de salud de los animales. El tratamiento de la EICI canina conjuga una terapia dietética y médica cuya intensidad dependerá de la gravedad de la enfermedad (Hall y Day, 2017).

2.3.7.1. Tratamiento dietético

Dada la gran influencia de los antígenos dietéticos en la etiopatogenia de la EICI, es de esperar la gran importancia del tratamiento dietético en el manejo de la enfermedad en la especie canina, llegando a ser en muchas ocasiones el único tratamiento necesario para el control de los signos clínicos (Tams, 2003; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Diversos estudios han destacado el elevado número de animales con EICI que responden únicamente a tratamiento dietético, describiéndose porcentajes de respuesta del 60 al 100% (Luckschander *et al.*, 2006; Allenspach *et al.*, 2007; Mandigers *et al.*, 2010; Rudinsky *et al.*, 2017; Volkmann *et al.*, 2017; Tørnqvist-Johnsen *et al.*, 2020). Algunos autores proponen denominar a esta entidad enteropatía crónica que responde a dieta, ya que, en muchas ocasiones, la terapia dietética se instaura durante el protocolo diagnóstico de la EICI y, ante una buena respuesta, no se lleva a cabo la confirmación histológica de la enfermedad (Dandrieux, 2016).

Como se ha detallado en el apartado de etiopatogenia de la EICI, durante la enfermedad se produce una reacción adversa al alimento de base inmunológica en la que no está esclarecido si los antígenos de la dieta son la causa directa o indirecta o la consecuencia del desarrollo del proceso inflamatorio (Hall y Day, 2017; Torres *et al.*, 2017). Dentro de las reacciones adversas al alimento encontramos las que tienen base inmunológica, consideradas alergias alimentarias, y las que no tienen base inmunológica, denominadas intolerancias alimentarias. A pesar de ser entidades fisiopatológicamente diferentes, sus manifestaciones clínicas, su aproximación terapéutica y su respuesta al tratamiento son muy similares, por lo que en muchas ocasiones no llegan a ser diferenciadas (Gaschen y Merchant, 2011; Cave, 2013).

Por todo ello, las estrategias dietéticas para el tratamiento de la EICI canina tienen como base la reducción de la carga y la presentación antigénica al GALT, disminuyendo así las posibles reacciones de hipersensibilidad y los procesos inflamatorios asociados (Jergens y Simpson, 2012; Cave, 2013; Hall, 2013a; Jugan, 2020). A grandes rasgos, la dieta ideal para perros con EICI debe ser administrada 2-3 veces al día como mínimo, para evitar sobrecargas digestivas y facilitar la asimilación de los nutrientes, y debe reunir las siguientes características (Marks *et al.*, 2002; Tams, 2003; Hall, 2013a; Sanderson, 2013; Hall y Day, 2017):

- Alta digestibilidad
- Bajo contenido en lactosa
- Restringida en grasa

- Adecuada en fibra
- Con proteínas noveles o hidrolizadas
- Nutricionalmente equilibrada
- Elevada palatabilidad
- Con el mínimo número de nutrientes posibles

Es de gran importancia que todos los nutrientes de la dieta tengan una elevada digestibilidad para asegurar la asimilación de los mismos en un tracto gastrointestinal alterado, disminuyendo también así la presión osmótica de la luz intestinal (Hall, 2013a; Sanderson, 2013). Actualmente, existen múltiples opciones de dietas comerciales que cumplen tales requisitos y que han sido formuladas para el tratamiento de estas enfermedades. La opción de dietas de formulación casera también es plausible; sin embargo, deben ser formuladas por expertos en nutrición para evitar carencias nutricionales (Hall, 2013a; Sanderson, 2013). A pesar de que en la EICI no hay ningún trabajo que compare la eficacia de ambas opciones dietéticas, un trabajo en dermatitis atópica canina sí que demuestra una mayor eficacia de las dietas comerciales frente a las caseras (Puigdemont *et al.*, 2006). Otro punto importante es la introducción gradual de la nueva dieta para permitir la adaptación de la microbiota y evitar la exacerbación de los signos clínicos (Cave, 2013). Cuando hay buena respuesta al tratamiento dietético, habitualmente los efectos suelen verse rápidamente, en las primeras dos semanas (Gaschen y Merchant, 2011).

Las **proteínas** son consideradas los principales antígenos de la dieta, tanto por su tamaño como por su reactividad inmunológica; de ahí que las dos principales estrategias dietéticas para la EICI en la especie canina se basen en la modificación de este nutriente (Cave, 2013; Hall, 2013a; Rudinsky *et al.*, 2018). La primera estrategia se basa en la utilización de proteínas noveles, es decir, aquellas que no hayan formado parte de la dieta del animal previamente, siendo muy importante tener en cuenta el área geográfica, ya que las dietas comerciales emplearán las fuentes proteicas de mayor disponibilidad en la región (Jugan, 2020). La segunda estrategia consiste en la administración de proteínas hidrolizadas, basada en que la disminución del tamaño de la proteína disminuye la capacidad alergénica de la misma, además de incrementar su digestibilidad (Marks *et al.*, 2002; Puigdemont *et al.*, 2006; Mandigers *et al.*, 2010). Algunas empresas emplean ambas estrategias simultáneamente, ya que se ha mostrado que animales que estaban previamente sensibilizados frente a una fuente proteica seguían mostrando reactividad frente a la misma a pesar de su hidrólisis (Jackson *et al.*, 2003). Además, otra característica que deben cumplir las proteínas en las dietas de animales con EICI, es tener una elevada calidad biológica, dadas las

alteraciones fisiopatológicas que reducen su absorción y el deficiente estado nutricional que acompaña a esta enfermedad (Sanderson, 2013).

Se ha documentado la existencia de potenciales antígenos de origen no proteico en la dieta; sin embargo, se piensa que estos antígenos se combinan con las proteínas (glucoproteínas o lipoproteínas). En cualquier caso, se debe prestar también atención a las fuentes de hidratos de carbono y grasas elegidas (Gaschen y Merchant, 2011; Jagan, 2020). Respecto a los **hidratos de carbono**, la mayoría de empresas de alimentación de pequeños animales tienden a evitar el gluten en las dietas de prescripción digestiva debido a la descripción de enteropatías por gluten en el Setter Irlandés (Hall y Batt, 1990a, 1990b) y a que es responsable de algunas reacciones adversas a los alimentos (Cave, 2013). Sin embargo, no hay evidencias de que el gluten sea más alergénico que otras proteínas de la dieta (Hall, 2013a). Las fuentes de hidratos de carbono más utilizadas en estas dietas son el arroz, el maíz, la patata o la pulpa de remolacha, que presentan una relativamente buena digestibilidad si están bien procesadas, evitando de este modo alteraciones de la microbiota (Hall, 2013a; Sanderson, 2013). La lactosa debe evitarse ya que, debido a las alteraciones fisiopatológicas del intestino en la EICI, las disacaridasas que se encargan de su digestión se encuentran aún más reducidas que en condiciones normales (Sanderson, 2013). Por su parte, la **fibra**, entendida como carbohidratos de compleja estructura y no digestibles, es fermentada por la microbiota intestinal. La fibra puede ser soluble (como los oligosacáridos), de fermentación rápida por la microbiota, resultando en la producción de ácidos grasos volátiles beneficiosos para los enterocitos y que sirven de prebióticos para el mantenimiento y desarrollo de la microbiota. Sin embargo, la fibra no soluble es menos fermentable, reduce la digestibilidad de otros nutrientes, aumenta la presión osmótica intestinal e incrementa el peristaltismo y el volumen y frecuencia de defecación. Por estos motivos, las dietas para perros con EICI deben tener un contenido reducido en fibra, primando la utilización de fibra soluble (de Godoy *et al.*, 2013; Sanderson, 2013; Rudinsky *et al.*, 2018).

Las **grasas** presentan una asimilación deficiente en el intestino delgado de perros con EICI debido al proceso inflamatorio. Este hecho empeora el cuadro clínico ya que, al llegar al colon, la microbiota las hidroliza, produciendo metabolitos tóxicos que aumentan la permeabilidad, alteran la motilidad y generan una diarrea secretora. Esto se traduce en una rápida deshidratación, alteraciones electrolíticas y pérdidas de peso. Por ello, se recomiendan dietas restringidas en grasas para animales con EICI (Sanderson, 2013; Rudinsky *et al.*, 2018). En perros con enteropatía perdedora de proteínas, se ha visto que el empleo de dietas con restricciones en la cantidad de grasa es incluso capaz en sí mismo de controlar el cuadro clínico (Okanishi *et al.*, 2014). Esta estrategia incorpora ácidos grasos de cadena media (entre seis y doce carbonos) como fuente de grasa, los cuales se absorben directamente en el intestino y pasan a circulación portal sin necesidad de ser conducidos a través de los vasos linfáticos, disminuyendo así la presión

linfática y la pérdida de proteínas y lípidos a la luz intestinal. No obstante, el uso de este tipo de ácidos grasos reduce mucho la palatabilidad del pienso (Okanishi *et al.*, 2014; Rudinsky *et al.*, 2017). Debe tenerse en cuenta que las grasas aportan muchas calorías y palatabilidad, siendo esto de gran necesidad en perros con EICI, que habitualmente presentan un balance energético inadecuado, por lo que hay algunos autores que no recomiendan grandes restricciones de grasas si no hay enteropatía perdedora de proteínas asociada (Hall, 2013a). Por otro lado, se ha descrito que la modificación de la ratio de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, de sus siglas en inglés) tiene efectos beneficiosos en procesos inflamatorios. Su metabolismo da lugar a la formación de eicosanoides y, en función del tipo de PUFA del que procedan, generarán metabolitos pro- o antiinflamatorios. Así, los eicosanoides derivados de los ácidos grasos omega-6 (tromboxanos y prostaglandinas) tienen propiedades proinflamatorias y los derivados de los PUFA omega-3 (leucotrienos y lipoxinas, entre otros) son fundamentalmente antiinflamatorios (Sanderson, 2013). Sin embargo, el ácido linoleico (omega-6) forma parte de los ácidos grasos esenciales que deben ser suplementados con la ración, pues tiene una función importante en el mantenimiento de las membranas celulares (Westermarck y Wiberg, 2006). La suplementación con PUFAs omega-3, presentes en aceites de pescado, ha demostrado tener efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios en perros con dermatitis atópica y en perros con EICI. Estos PUFA omega-3 parecen también tener efectos beneficiosos al modificar el metabolismo del colesterol y modular la expresión de genes que afectan a la absorción intestinal de los ácidos grasos (Mueller *et al.*, 2004; Bensignor *et al.*, 2008; Ontsouka *et al.*, 2010).

El síndrome de malabsorción presente en la EICI da lugar en muchos casos a alteraciones electrolíticas y de vitaminas. Como ya se ha comentado, las más frecuentes son los déficits de folatos (vitamina B9) y cobalamina (vitamina B12) y, dados sus importantes efectos sistémicos, se recomienda su evaluación y suplementación siempre que sea necesario (Toresson *et al.*, 2019; Kather *et al.*, 2020).

El punto más importante del éxito de la terapia dietética es la correcta comunicación con el propietario. Es de vital importancia contar con el compromiso del propietario para evitar fallos en el tratamiento y, por tanto, en el diagnóstico. Ante el empleo de este tipo de dietas de eliminación, hay que asegurarse de que el animal no ingiera absolutamente nada más que su dieta de prescripción (Gaschen y Merchant, 2011).

2.3.7.2. Tratamiento antibiótico

Ciertos antibióticos se han utilizado empíricamente en el manejo terapéutico de la EICI canina con el objetivo de tratar enteropatógenos no diagnosticados. En muchas ocasiones, del

mismo modo que ocurre con el tratamiento dietético, la antibioterapia se ha incluido como un paso más en el protocolo de diagnósticos diferenciales en perros con signos digestivos crónicos, sin llegar a una confirmación histológica de la enfermedad. Algunos autores han denominado a esta presentación de la EICI, enteropatía crónica que responde a antibióticos (Hall, 2011, 2013a; Dandrieux, 2016). Los más utilizados son la tilosina (macrólido con efectos sobre bacterias Gram positivas y negativas, *Mycoplasma* spp. y espiroquetas), el metronidazol (imidazol con gran efecto sobre bacterias anaerobias) y la oxitetraciclina (tetraciclina de amplio espectro) (Westermarck *et al.*, 2005; Jergens *et al.*, 2010; Hall, 2011; Allenspach *et al.*, 2016). Otro de los fundamentos de su utilización en el tratamiento de la EICI son sus potenciales efectos inmunomoduladores o antiinflamatorios (Menozzi *et al.*, 2005; Shakir *et al.*, 2011). Sin embargo, hay estudios que ponen en controversia estas afirmaciones y desaconsejan el uso de estos fármacos con fines no antimicrobianos (Weese *et al.*, 2015).

Ciertos trabajos detallan una muy buena respuesta al tratamiento con antibióticos, concretamente con tilosina, e incluso un posible efecto prebiótico del mismo. Su administración da lugar a un incremento de ciertos *Enterococcus* spp., de bacterias ácido lácticas, pero también de enterococos resistentes a tilosina (Westermarck *et al.*, 2005; Kilpinen *et al.*, 2015). No obstante, en las series de casos de la literatura, la frecuencia de presentación de EICI que responde a tratamiento antibiótico es muy baja, del 8 al 16,2%, y en muchos de ellos se producen recidivas de los signos clínicos tras finalizar la terapia antibiótica (Allenspach *et al.*, 2016; Volkmann *et al.*, 2017; Kathrani *et al.*, 2019). Además, un estudio demostró que la eficacia del tratamiento con prednisona en solitario era igual de efectivo que el tratamiento con prednisona y metronidazol, poniendo en duda la necesidad del empleo de los antibióticos para el manejo terapéutico de la EICI (Jergens *et al.*, 2010).

Por el contrario, múltiples autores han descrito las grandes alteraciones en la microbiota gastrointestinal, y con ello en el estado de salud de los animales, tras el empleo de tratamientos antibióticos con metronidazol y tilosina, tanto en perros sanos como en perros con EICI, destacando que dichas alteraciones tardan mucho tiempo en ser restituidas tras la finalización del tratamiento y que incluso, en ocasiones, no llegan a volver a la normalidad (Suchodolski *et al.*, 2009; Igarashi *et al.*, 2014; Minamoto *et al.*, 2015; Suchodolski, 2016; Manchester *et al.*, 2019; Chaitman *et al.*, 2020).

Debido a todos estos factores y al creciente problema de salud pública que las resistencias microbianas suponen, recientemente un grupo de expertos en gastroenterología de pequeños animales ha desaconsejado el uso del tratamiento empírico con antibióticos para el manejo de patologías gastrointestinales tales como la EICI. Solo recomiendan su empleo cuando haya signos de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (pirexia, leucocitosis con desviación a la

izquierda o leucopenia), cuando el resto de tratamientos hayan fracasado y siempre con un adecuado estudio de los microorganismos y sus paneles de resistencia antibiótica (Cerquetella *et al.*, 2020).

En estos casos las dosis empleadas de cada antibiótico son: oxitetraciclina, 10 mg/kg por vía oral (PO) cada 8 horas (Hall, 2011), metronidazol, 10 mg/kg PO cada 12 horas (Jergens *et al.*, 2010) y tilosina, 20 mg/kg PO cada 8 o 12 horas (Westermarck *et al.*, 2005), siendo los periodos de administración descritos muy variables, de entre dos a seis semanas en función de la evolución clínica.

2.3.7.3. Tratamiento inmunosupresor

Dada la base inmunomediada y la respuesta inflamatoria exacerbada que tiene lugar durante la EICI, el tratamiento de mayor importancia es la inmunosupresión. Sin embargo, debido a sus posibles efectos adversos, se emplea cuando el ensayo dietético ha fracasado o cuando el estado clínico del animal lo requiere y siempre tras la confirmación histológica de la enfermedad. Además, debe instaurarse teniendo en cuenta que la EICI no tiene cura y que el objetivo del tratamiento es lograr la remisión de los signos clínicos y prolongar el periodo de recaídas (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017).

A continuación se revisan los fármacos inmunosupresores más utilizados en el tratamiento de la EICI canina:

➤ Glucocorticoides

Los glucocorticoides son los fármacos inmunosupresores de primera elección en el tratamiento de la EICI canina (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Estos fármacos tienen fundamentalmente efectos antiinflamatorios e inmunosupresores dosis-dependientes. Su efecto se produce al unirse a su receptor en el citosol celular. El complejo formado posteriormente es trasladado al núcleo, donde se une a secuencias de ADN específicas afectando a la transcripción génica. Los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides (con dosis de hasta 0,5 mg/kg cada 12 horas) se relacionan con la estabilización de las membranas de granulocitos, mastocitos y monocitos-macrófagos, así como con la inhibición de la fosfolipasa A, evitando la liberación de metabolitos proinflamatorios del ácido araquidónico tales como tromboxanos y prostaglandinas. También inhiben la síntesis y liberación de las citocinas proinflamatorias IL-1 e IL-6 y reducen la expresión de receptores Fc en los macrófagos. Sus efectos inmunosupresores en la especie canina (con dosis superiores a los 0,5 mg/kg cada 12 horas) no están del todo elucidados, pero parecen reducir el procesado y la presentación antigénica en macrófagos y células dendríticas,

suprimir de forma directa la respuesta mediada por linfocitos T (y con ello sobre los linfocitos B) así como disminuir la afinidad de los anticuerpos por sus receptores. La amplia distribución de los receptores de glucocorticoides en el organismo y la gran cantidad de genes afectados por su acción explican la amplia gama de efectos secundarios derivados de la administración sistémica de estos compuestos (Whitley y Day, 2011).

Dentro de los glucocorticoides, la **prednisona** y la **prednisolona** son los fármacos inmunosupresores más utilizados para el tratamiento de la EICI en la especie canina (Craven *et al.*, 2004b; García-Sancho *et al.*, 2007; Jergens *et al.*, 2010; Allenspach *et al.*, 2016; Volkmann *et al.*, 2017; Heilmann *et al.*, 2018; Kathrani *et al.*, 2019). La dosis inicial debe ser 1-2 mg/kg PO cada 12 horas y se mantiene durante 2-4 semanas. Posteriormente, la dosis se va bajando progresivamente cada 3-4 semanas hasta completar el tratamiento. La duración del tratamiento y las reducciones del mismo se establecen en función de la respuesta clínica, la tolerancia al tratamiento y la aparición de efectos adversos. En algunos perros, la retirada completa del tratamiento no es posible y se establecen dosis mínimas de respuesta que pueden mantenerse durante meses o incluso años (Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017).

Con las primeras dosis del tratamiento, algunos animales presentan síndrome de polidipsia-poliuria, polifagia y, en algunas ocasiones, episodios de letargia, temblores y depresión. Estos signos clínicos suelen desaparecer a medida que disminuyen las dosis de prednisona o prednisolona. Los efectos secundarios que pueden aparecer por la administración prolongada de estos fármacos son principalmente síndrome de Cushing iatrogénico, predisposición a ulceración y perforaciones gastrointestinales, pancreatitis, infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias y hepatopatía esteroidea. De todas ellas, la hepatopatía esteroidea es la más frecuente, con elevación de las enzimas hepáticas que suelen volver a la normalidad tras la finalización del tratamiento (Tams, 2003; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017).

A pesar de que hay autores que describen bajos porcentajes de presentación de efectos secundarios asociados al tratamiento de la EICI con estos fármacos, en concreto del 9% (Jergens *et al.*, 2010), en aquellos casos en los que no se toleren altas dosis de los mismos o aparezcan efectos secundarios, se recomienda combinarlos con otros fármacos inmunosupresores para poder disminuir sus dosis y, por tanto, dichos efectos adversos (Tams, 2003; Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a).

Los porcentajes de respuesta al tratamiento de la EICI canina con prednisona y prednisolona son muy altos, habiéndose observado importantes descensos del valor de los índices de actividad clínica de la enfermedad (Jergens *et al.*, 2003; Craven *et al.*, 2004b; García-Sancho *et al.*, 2007; Jergens *et al.*, 2010). Sin embargo, hay trabajos que reflejan un elevado número de animales resistentes o refractarios al tratamiento con corticoides (Allenspach *et al.*, 2007). Un

trabajo describió valores significativamente elevados de glucoproteína P en el intestino de perros con EICI que no respondieron al tratamiento con corticoides, además de describir una elevación aún mayor de dicha proteína tras el tratamiento inmunosupresor con estos fármacos. La glucoproteína P es una proteína transmembrana presente en el epitelio intestinal que actúa como bomba de flujo de fármacos. La alteración en la regulación de esta proteína puede ser la causa de la mala respuesta al tratamiento con corticoides (Allenspach *et al.*, 2006a). Otro aspecto a tener en cuenta es el hecho de que el síndrome de malabsorción que acompaña a esta enfermedad puede ser la causa de la ausencia de respuesta al tratamiento cuando se administra por vía oral, por lo que en esas ocasiones se recomienda su administración parenteral hasta la resolución del problema (Hall, 2013a).

La **budesonida** es un glucocorticoide muy utilizado en el mantenimiento de las remisiones en la enfermedad de Crohn en medicina humana, ya que su presentación en enterocápsulas hace que se libere en la porción distal del intestino delgado y además tiene un gran metabolismo de primer paso. A pesar de que del mismo modo que otros corticoides inhibe el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y desencadena el desarrollo de hepatopatía esteroidea, sus efectos secundarios sistémicos son mínimos. Su uso en el tratamiento de la EICI canina ha mostrado resultados prometedores. Sin embargo, algunos autores no detectan beneficios en el uso de budesonida frente a prednisona en términos de efectos secundarios o tasas de remisión (Dye *et al.*, 2013). Las dosis propuestas son muy variables, pero se recomienda una dosis inicial de 1, 2 o 3 mg cada 12 horas PO en perros pequeños, medianos y grandes, respectivamente (Dye *et al.*, 2013; Pietra *et al.*, 2013).

➤ *Azatioprina*

La azatioprina es un análogo sintético de la purina, que se metaboliza a 6-mercaptopurina, actuando este último en el bloqueo de la incorporación de purina al ADN, interfiriendo por tanto en la síntesis proteica y consecuentemente en el metabolismo celular. Inhibe la replicación de células de rápida división, habiéndosele atribuido funciones tales como la reducción del número de linfocitos y la síntesis de anticuerpos dependiente de linfocitos T (Whitley y Day, 2011).

En la EICI canina se utiliza en combinación con glucocorticoides cuando la respuesta al tratamiento con estos es insuficiente o los efectos secundarios son muy importantes y hay que reducir su dosis (Allenspach *et al.*, 2016; Heilmann *et al.*, 2018; Kathrani *et al.*, 2019). La dosis recomendada de azatioprina para la EICI en el perro es 2 mg/kg PO cada 24 horas durante al menos cuatro semanas, para después bajar al 50% de la dosis en función de la respuesta clínica, hasta completar el tratamiento, que puede prolongarse varios meses. Se trata de un fármaco de acción retardada y sus efectos tardan en evidenciarse unas tres semanas. Su efecto secundario más

importante es el riesgo de mielosupresión, por lo que se requiere una monitorización hematológica regular en estos animales (Tams, 2003; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017).

➤ *Ciclosporina*

Este potente fármaco inmunosupresor, utilizado de forma habitual en personas trasplantadas, actúa mediante su unión a la molécula de ciclofilina. Esta molécula está presente en altas concentraciones en el citoplasma de linfocitos T inmunocompetentes, formando un complejo que inhibe la activación de la calcineurina, molécula responsable de la transcripción de la IL-2. La inhibición de la transcripción de la IL-2 reduce la activación y las funciones efectoras de los linfocitos T, destacando la expansión clonal, la producción de un gran número de citocinas y la activación de linfocitos B, entre otras muchas (Whitley y Day, 2011; Hall, 2013a).

En la EICI canina se utiliza como tratamiento de rescate en aquellos casos que no responden al resto de combinaciones farmacológicas disponibles y en casos muy graves de la enfermedad, habitualmente en perros con hipoproteinemias muy marcadas (Allenspach *et al.*, 2007; Allenspach *et al.*, 2016; Volkmann *et al.*, 2017; Salavati Schmitz *et al.*, 2019). Se han descrito muy buenas respuestas al tratamiento con ciclosporina en perros con EICI, observándose disminuciones significativas de los índices clínicos de la enfermedad y del número de linfocitos T en la lámina propia intestinal, a pesar de no modificarse la imagen histopatológica. La dosis recomendada es de 5 mg/kg PO cada 24 horas durante 10 semanas (Allenspach *et al.*, 2006b). Sus efectos secundarios llegan a afectar hasta a la mitad de los animales, siendo los más habituales los signos digestivos (vómitos y diarrea), infecciones oportunistas, hiperplasia gingival e hipertrichosis seguida de alopecia. También se ha descrito, aunque de manera menos frecuente, el desarrollo de neutropenia, por lo que la monitorización hematológica durante su empleo es importante (Whitley y Day, 2011; Hall, 2013a).

➤ *Otros fármacos inmunosupresores*

El **clorambucilo** se ha descrito para el tratamiento de la EICI canina a dosis de 2-6 mg/m² PO cada 24 horas en combinación con glucocorticoides hasta la remisión de los signos clínicos, mostrando mejores resultados que la azatioprina. Sin embargo, su difícil manejo y la mejor respuesta a la ciclosporina en casos refractarios hace que su uso sea muy limitado en esta enfermedad (Dandrieux *et al.*, 2013; Salavati Schmitz *et al.*, 2019).

La **ciclofosfamida** y el **metotrexato** parecen tener efectividad en el tratamiento de la EICI. Sin embargo, la ciclofosfamida apenas tiene ventajas sobre la azatioprina y en el caso del metotrexato solo hay un caso clínico descrito en la literatura en el que se consiguió la remisión clínica en un perro refractario al tratamiento con prednisona y ciclosporina (Yuki *et al.*, 2006).

Por ello, se necesitan más series de casos para determinar la efectividad y seguridad de su empleo (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017).

Los **derivados del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)**, como la sulfasalazina, son fármacos con efecto antiinflamatorio e inmunosupresor utilizados tradicionalmente en el tratamiento de la EICI que afecta fundamentalmente al intestino grueso. Estos compuestos administrados por vía oral llegan intactos a la región distal del intestino delgado o al intestino grueso donde las bacterias de la microbiota los procesan permitiendo sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, consecuencia de la inhibición de la síntesis de leucotrienos, prostaglandinas y citocinas, sobre la mucosa del colon (Washabau, 2013b). No obstante, la mayor efectividad de otros tratamientos y la controversia del efecto de dichos fármacos han hecho que su empleo sea muy limitado en la actualidad (Malewska *et al.*, 2011). La dosis recomendada para el tratamiento de la EICI canina que afecta al intestino grueso es de 10-30mg/kg PO cada 12 horas en dosis decrecientes durante cuatro a seis semanas (Washabau, 2013b).

2.3.7.4. Nuevos agentes terapéuticos

La EICI tanto humana como canina, como ya se ha comentado, parece ser el resultado de una inadecuada respuesta inmunitaria de la mucosa intestinal frente a antígenos inocuos. Basándose en esta hipótesis, las nuevas estrategias de tratamiento están dirigidas a la identificación de los componentes del sistema inmunitario sobreexpresados en estos individuos para el desarrollo de terapias biológicas dirigidas frente a esas dianas (Torres *et al.*, 2017).

En esta línea, el descubrimiento de las **células madre mesenquimales** y sus propiedades inmunomoduladoras, consecuencia de su capacidad para interactuar con todas las células de la inmunidad, controlando así la inflamación y favoreciendo la regeneración tisular, ha impulsado su empleo en la EICI. Estudios *in vitro* han demostrado que estas células en un ambiente proinflamatorio desarrollan un fenotipo inmunosupresor. Además, los diferentes estudios realizados en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa han mostrado elevados porcentajes de mejoría clínica y, con ello, la posibilidad de interrupción del tratamiento inmunosupresor tras la administración de células madre mesenquimales autólogas o alogénicas, tanto de forma sistémica como local, describiéndose largos periodos sin recaídas (Algeri *et al.*, 2015). Sin embargo, recientes estudios ponen en duda su seguridad a largo plazo, ya que se ha descrito su presencia en múltiples localizaciones tras su infusión, detectándose gran número de interacciones con diferentes células del organismo y numerosos productos tales como citocinas, consecuencia de esa interacción (da Costa Gonçalves y Paz, 2019).

En la especie canina, un grupo de trabajo ha publicado la evolución a corto plazo de once casos de perros diagnosticados de EICI refractarios al tratamiento con la terapia convencional, a los que se administraron por vía intravenosa células madre mesenquimales alogénicas procedentes del tejido adiposo. Estos perros mostraron una disminución significativa de los índices clínicos de la enfermedad, con una remisión completa de los signos clínicos en nueve de los once perros a las seis semanas de haber finalizado el tratamiento. Además, también describen una gran mejoría de los parámetros laboratoriales alterados (albúmina, cobalamina y folatos), así como de la imagen endoscópica. Sin embargo, no observaron modificaciones de los hallazgos histopatológicos (Pérez-Merino *et al.*, 2015b; Pérez-Merino *et al.*, 2015a).

En medicina humana, los esfuerzos de investigación de las últimas décadas en la inmunopatogenia de la EICI han permitido el descubrimiento de múltiples alteraciones en la respuesta inmunitaria de estos pacientes y el desarrollo de un gran número de **fármacos biológicos** cuyas dianas de acción son directamente las células, productos inflamatorios o moléculas alteradas (de Mattos *et al.*, 2015).

Los fármacos biológicos más empleados hasta la fecha en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa son los destinados a bloquear la citocina proinflamatoria TNF- α , altamente sobreexpresada en estos individuos y, con ello, todas sus interacciones celulares. El uso de estos fármacos ha permitido la remisión de los signos clínicos en un 60% de los pacientes con EICI refractarios a la terapia convencional y la existencia de largos periodos sin recaídas. Los más utilizados son infliximab, adalimumab, golimumab, certrolizumab pegol y etanercept (de Mattos *et al.*, 2015; Billmeier *et al.*, 2016).

Otra de las grandes dianas de acción de los fármacos biológicos en la EICI es impedir la migración y reclutamiento leucocitario intestinal. Para ello, en la actualidad también hay un gran número de compuestos biológicos que bloquean las moléculas de adhesión impidiendo este fenómeno, entre ellos el vedolizumab y el natalizumab (de Mattos *et al.*, 2015; Binder *et al.*, 2018).

Estos fármacos constituyen el futuro del tratamiento de la EICI y del resto de enfermedades inmunomediadas, destacando el gran número de estudios y ensayos clínicos que se están desarrollando actualmente, permitiendo la aparición constante de nuevas terapias inmunológicas (Reinglas *et al.*, 2018). Todos estos fármacos biológicos están constituidos por anticuerpos especie-específicos, por lo que su empleo en el tratamiento de la EICI canina no es posible.

En medicina veterinaria, recientemente se ha desarrollado un fármaco biológico destinado al tratamiento de la dermatitis atópica en el perro, el lokivetmab, un anticuerpo monoclonal canino destinado a bloquear la IL-31, que está mostrando grandes resultados tanto en

seguridad como en el control del prurito en estos animales (Souza *et al.*, 2018; Tamamoto-Mochizuki *et al.*, 2019). Por ello, el desarrollo y empleo de este tipo de terapias en la EICI canina podría tener resultados satisfactorios, si bien se requieren aún más estudios sobre la inmunopatogenia de esta enfermedad en el perro.

2.3.7.5. Moduladores de la microbiota

La influencia de la microbiota en la etiopatogenia de la EICI y las alteraciones descritas en la misma en perros diagnosticados de la enfermedad, unido a los efectos indeseados de los tratamientos antibióticos, han hecho que exista un creciente interés en el estudio de alternativas para modular los microorganismos intestinales. En esta línea los prebióticos, probióticos y simbióticos están suscitando una gran atención.

Los **prebióticos** son definidos como ingredientes de la dieta no digestibles por el hospedador, pero sí por la microbiota, favoreciendo el crecimiento y la actividad de microorganismos beneficiosos. Los más utilizados en pequeños animales son los fructooligosacáridos y los mananooligosacáridos que forman parte de la fibra de la dieta. La mayoría de las dietas comerciales de prescripción para problemas gastrointestinales en perros están suplementados con prebióticos (Sanderson, 2013; Schmitz y Suchodolski, 2016). Además, un trabajo realizado en perros con EICI a los que se administró un suplemento prebiótico mostró una mejoría de los marcadores bioquímicos de la enfermedad y una reducción de los índices de actividad clínica (Segarra *et al.*, 2016).

Los **probióticos** son microorganismos vivos que, administrados oralmente en determinadas cantidades, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador regulando la microbiota intestinal (Sanderson, 2013; Schmitz y Suchodolski, 2016). Los efectos exactos de los probióticos no están completamente esclarecidos, pero se les han atribuido propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias a través de la modificación del pH intestinal, la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas mediante la producción de sustancias antimicrobianas y la competición con patógenos por los nutrientes y los lugares de adhesión a la mucosa. Un probiótico debe cumplir una serie de características: debe contener microorganismos viables, debe ser seguro, y debe ser administrado en la cantidad suficiente para ejercer sus acciones y producir efectos beneficiosos en la salud del hospedador. Por todo ello, el probiótico ideal debe ser especie-específico (Sanderson, 2013; Schmitz y Suchodolski, 2016). Hasta el momento, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha aprobado el uso y la comercialización de las siguientes cepas bacterianas como probióticos para perros: dos cepas de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus*

plantarum, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium sp. animalis*. En la última década se han realizado numerosos estudios evaluando el efecto de diversos probióticos en el curso de la EICI canina. Algunos han descrito la ausencia de respuesta al tratamiento con *Enterococcus faecium* (Schmitz *et al.*, 2015), mientras que otros detallan una mayor mejoría clínica en perros con EICI con respuesta a tratamiento dietético tras la administración de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus johnsonii* (Sauter *et al.*, 2006). También se ha evaluado en perros con EICI con tratamiento inmunosupresor una combinación de probióticos (*Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, y *Bifidobacterium infantis*). Aunque los resultados obtenidos son contradictorios con respecto al grado de mejoría de los animales, el grupo que recibió probióticos mostró un mayor número de uniones intercelulares entre los enterocitos, sugiriendo que su empleo puede tener efectos beneficiosos sobre la homeostasis de la mucosa intestinal (Rossi *et al.*, 2014; White *et al.*, 2017). Estos hechos hacen de los probióticos una posible herramienta terapéutica en el tratamiento de la EICI canina, si bien se requieren más estudios al respecto (Schmitz y Suchodolski, 2016).

La administración de una sola cepa o incluso de múltiples cepas bacterianas como probióticos, puede tener una capacidad limitada a la hora de influir en la composición de la microbiota intestinal de forma permanente, dado que la microbiota está compuesta por cientos de especies bacterianas. Por ello, se han valorado otras opciones, entre las que destaca el **trasplante fecal**, que permite restablecer la microbiota. El trasplante fecal, entendido como bacterioterapia, consiste en restablecer la microbiota de un individuo enfermo con la de un donante sano. Estudios en medicina humana en pacientes con infecciones recurrentes por *Clostridium difficile* muestran la seguridad y efectividad de este tratamiento (Chen *et al.*, 2018), logrando una resolución completa de los signos clínicos en el 83-92% de los casos (Gough *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2012). En la especie canina, son aún pocos los estudios publicados al respecto. Uno de ellos muestra una recuperación más rápida en cachorros infectados por parvovirus tras la administración rectal de un trasplante fecal procedente de un donante sano (Pereira *et al.*, 2018). Además, se han descrito dos casos clínicos de un perro con diarrea asociada a *C. difficile* y de otro con EICI, con evolución favorable tras la administración oral y rectal, respectivamente, de un trasplante fecal de un donante sano (Niina *et al.*, 2019; Sugita *et al.*, 2019). En un reciente trabajo administraron a perros con diarrea aguda tratamiento antibiótico o trasplante fecal comparando entre ambos grupos la consistencia fecal, la microbiota y la metabolómica, observando que en los animales que recibieron trasplante fecal, la microbiota y la metabolómica al día 28 tras la finalización del tratamiento se habían restablecido usando como control perros sanos, frente al grupo tratado con antibioterapia, que seguía mostrando alteraciones en estos parámetros (Chaitman *et al.*, 2020). Los resultados en medicina humana y los resultados preliminares en medicina veterinaria sugieren

que el trasplante fecal puede ser una opción muy efectiva para el tratamiento de patologías gastrointestinales diversas, incluida la EICI.

2.3.8. Pronóstico

El pronóstico de la EICI canina es variable y depende en gran medida de la respuesta al tratamiento (Tams, 2003; Hall, 2013a). En el perro no se produce una mejoría de los parámetros histológicos de inflamación tras la finalización del tratamiento inmunosupresor (Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007; Hall, 2013a). Por ello, es considerada una enfermedad crónica en la que la aparición de recaídas es frecuente (Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a).

Muchos casos, especialmente los clasificados como leves en función de los índices clínicos, responden inicialmente al tratamiento. Sin embargo, solo un cuarto de los perros enfermos experimentan una remisión completa de los signos clínicos y de las alteraciones laboratoriales, mientras que la reaparición de signos clínicos de forma intermitente, aunque habitualmente de menor gravedad, es lo más frecuente (Hall, 2013a).

A lo largo de los años se han ido describiendo múltiples parámetros asociados a una peor respuesta al tratamiento, al pronóstico y, con ello, a la supervivencia en perros con EICI. El de mayor relevancia es la presencia de hipoproteïnemia, que se suele detectar en la forma más grave de la enfermedad y la de peor pronóstico (Allenspach *et al.*, 2007; Craven y Washabau, 2019). Una reciente revisión de toda la literatura sobre enteropatía perdedora de proteínas en la especie canina detalla que el 54,2% de los perros con esta presentación de la enfermedad mueren o son eutanasiados como consecuencia de la misma, describiéndose periodos de supervivencia bajos, desde uno a veintiocho meses como máximo (Craven y Washabau, 2019). La presencia de hipocobalaminemia en el momento del diagnóstico también ha sido correlacionada con una peor respuesta al tratamiento y, con ello, con un peor pronóstico. Este hallazgo también es más frecuente en perros con enteropatía perdedora de proteínas (Allenspach *et al.*, 2007; Volkmann *et al.*, 2017; Heilmann *et al.*, 2019; Kathrani *et al.*, 2019; Salavati Schmitz *et al.*, 2019). Otros parámetros relacionados con una peor evolución y pronóstico son: baja condición corporal, altos índices de actividad clínica y endoscópica, hipovitaminosis D, niveles bajos de zinc, triptófano, fenilalanina e histidina séricos y elevación de la glucoproteína P en la mucosa intestinal (Allenspach *et al.*, 2006a; Allenspach *et al.*, 2007; Titmarsh *et al.*, 2015; Kathrani *et al.*, 2018; Wennogle *et al.*, 2019a; Benvenuti *et al.*, 2020; Sakai *et al.*, 2020). De forma general, se puede decir que los perros con bajos índices clínicos de la enfermedad y que responden a tratamiento dietético tienen un buen pronóstico. Sin embargo, en el resto de situaciones se requiere evaluar

todos los parámetros a disposición del clínico para poder predecir la respuesta al tratamiento y establecer un pronóstico correcto (Allenspach *et al.*, 2016).

En todos los casos, es de vital importancia la correcta comunicación con el propietario que favorezca el estricto cumplimiento del tratamiento, lo cual, en muchos casos, determinará el éxito del mismo y la ausencia de recaídas.

Algunos autores han descrito la progresión de la EICI hacia el linfosarcoma intestinal (Tams, 2003). Sin embargo, se trata de un hecho muy infrecuente y algunos estudios consideran que puede deberse a un incorrecto diagnóstico histopatológico inicial, dada la complejidad del mismo (Willard *et al.*, 2002). Por ello, ante situaciones tales como una edad avanzada del animal, presencia de lesiones histológicas de gravedad o ausencia de respuesta al tratamiento, se recomienda la reevaluación endoscópica e histológica del animal empleando otras técnicas más precisas como inmunohistoquímica o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de clonalidad linfocítica (Carrasco *et al.*, 2015).

2.4. IMMUNOPATOGENIA DE LA EICI

La EICI es considerada una enfermedad de base inmunomediada, ya que, independientemente de la causa que desencadene su inicio, el resultado final es una respuesta inmunitaria excesiva y anormal frente a antígenos de cualquier tipo que conduce a un proceso inflamatorio crónico responsable de los signos clínicos. Esta afirmación se apoya en el hecho de que la base del tratamiento de esta enfermedad es la inmunosupresión o inmunomodulación (Wallace *et al.*, 2014).

La implicación concreta de la inmunidad en el desarrollo de la EICI sigue siendo un interrogante. No está claro si un sistema inmunitario alterado de base desencadena todo el proceso o si son el resto de factores etiológicos los que desencadenan la alteración del sistema inmunitario. Parece que todas las investigaciones en este campo sostienen la idea de que la EICI es el resultado de una compleja interacción entre la genética, el ambiente y el sistema inmunitario (Park *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017).

Lo que está claro es que los individuos con EICI presentan una alteración de la respuesta inmunitaria en todos los niveles de la inmunidad gastrointestinal, incluidas las barreras físicas, químicas y microbiológicas, la inmunidad innata y la adquirida. Parece ser que el punto crítico que conduce a esa respuesta inmunitaria descontrolada es la pérdida de tolerancia frente a antígenos habituales (Wallace *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017).

A continuación, se irán detallando las anomalías encontradas en el sistema inmunitario innato y adaptativo intestinal y sus contribuciones a la patogenia de la enfermedad.

2.4.1. Alteraciones del sistema inmunitario innato en la EICI

Los pacientes con EICI presentan un aumento de la permeabilidad intestinal, lo que favorece la exposición del GALT a múltiples antígenos. Esta afirmación ha sido demostrada en medicina humana mediante el empleo de pruebas de absorción de azúcares o de endoscopia con láser confocal, técnica que permite obtener imágenes histológicas a tiempo real (Michielan y D'Incà, 2015). En la especie canina, por el contrario, las pruebas de absorción de azúcares no han aportado resultados esclarecedores por el momento en perros enfermos (Allenspach *et al.*, 2006c).

En medicina humana, a nivel del **epitelio intestinal**, se han encontrado ciertos defectos en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa que contribuyen al incremento de la permeabilidad. La mutación en el gen *MUC2*, presente en estos individuos, conlleva una disminución en la producción del moco protector intestinal y favorece la translocación bacteriana.

Por otro lado, como ya se comentó en el epígrafe de etiopatogenia de la enfermedad por causas genéticas, las mutaciones en ciertos genes relacionados con la autofagia, como el gen *ATG16L1*, disminuyen la capacidad de los enterocitos para desarrollar esta función (Torres *et al.*, 2017). Una de las características más estudiadas de la barrera epitelial de los pacientes con EICI ha sido el estudio de los defectos en las uniones intercelulares. Se han descrito un gran número de anomalías en estas proteínas de unión, tanto disminuciones en su expresión como redistribuciones aberrantes (Lee, 2015). No obstante, hay trabajos que postulan que el TNF- α , altamente sobreexpresado en la EICI, interviene en la transcripción y redistribución de estas proteínas de unión e induce una mayor apoptosis de enterocitos. En cualquier caso, aún no se conoce totalmente si este aumento de la permeabilidad se debe a la presencia de alteraciones primarias en la barrera epitelial, es el resultado de la respuesta inflamatoria o es una combinación de ambos factores (Michielan y D'Incà, 2015).

En la especie canina, por el contrario, no existen muchos trabajos en la literatura que evalúen posibles alteraciones a nivel de la barrera epitelial en EICI. Un estudio realizado en perros enfermos evaluó la expresión de un elevado número de proteínas de unión en los enterocitos, encontrando únicamente un descenso en la expresión de E-cadherina en el duodeno de estos animales (Ohta *et al.*, 2014a). En cualquier caso, son necesarios más estudios para determinar la implicación de los defectos en la barrera epitelial en la etiopatogenia de la EICI canina.

Los **receptores PRR**, presentes en la mayoría de células de la inmunidad innata, tras la unión con un PAMP comienzan una cascada de señalización, mediada en muchas ocasiones por el factor nuclear κ B (NF- κ B), que desencadena la producción de moléculas proinflamatorias y coestimuladoras en respuesta a la invasión microbiana. Tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, se han descrito múltiples anomalías en la regulación y expresión de estos receptores en la EICI, que conducen a una hiperactivación de la respuesta inmunitaria (Park *et al.*, 2017; Eissa *et al.*, 2019). Se postula que esta hiperactivación conlleva una incorrecta eliminación de patógenos, una disfunción en los mecanismos de tolerancia y un defecto en el control de microorganismos simbioses oportunistas que desemboca en disbiosis (Eissa *et al.*, 2019). Concretamente en la especie canina, los trabajos que avalan estas hipótesis han determinado en biopsias intestinales de perros con EICI la presencia de mutaciones en el PRR NOD-2 (Kathrani *et al.*, 2014), polimorfismos en los genes que codifican para los PRRs TLR-4 y TLR-5 (Kathrani *et al.*, 2010; Kathrani *et al.*, 2011b), incremento en los niveles de TLR-4, TLR-9 y TLR-2, este último correlacionado con el grado de actividad clínica de la enfermedad (Burgener *et al.*, 2008; Allenspach *et al.*, 2010; McMahon *et al.*, 2010), e incrementos en los niveles de NF- κ B en macrófagos, células epiteliales y ciertas moléculas de adhesión (Luckschander *et al.*, 2010; Okanishi *et al.*, 2013). Algunos autores, además, han descrito consecuencias directas de estas alteraciones, como una respuesta excesiva a la flagelina bacteriana

en perros con EICI portadores de polimorfismos en el TLR-5, la cual conduce a un incremento en la producción de IL-8 o CXCL8, quimiocina aparentemente asociada con daño epitelial (Kathrani *et al.*, 2012). Otro grupo de investigación, por su parte, ha publicado recientemente un estudio sobre los niveles de siete AMPs concretos en biopsias intestinales de perros con EICI, encontrando niveles más elevados de tres de ellos, en comparación con el grupo de animales sanos (Nakazawa *et al.*, 2019).

Las **quimiocinas** son pequeñas proteínas producidas por las células de inmunidad innata con capacidad para reclutar y activar leucocitos. El estudio de estas sustancias en medicina humana ha demostrado el aumento de expresión de muchas de ellas en el intestino de pacientes con EICI (Lee *et al.*, 2018). Su rol en el curso de esta enfermedad tiene una gran importancia, ya que estudios en modelos animales en los que se aplicó un anticuerpo frente a la proteína inflamatoria macrofágica-3 alpha (anti-CCL20) mostraron una reducción del infiltrado linfocítico intestinal (Teramoto *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2017). Maeda y colaboradores también han observado incrementos de ciertas quimiocinas en la mucosa duodenal de perros con EICI. Concretamente se han encontrado aumentos de: la proteína quimiotáctica de monocitos (CCL2), que recluta monocitos, células dendríticas, células NK y linfocitos T, además de inducir fibrosis; la CCL20, producida fundamentalmente por enterocitos y cuya función es activar células dendríticas, linfocitos de memoria y linfocitos B, contribuyendo a una excesiva presentación antigénica; las CCL25 y CCL28, sintetizadas en gran cantidad por los enterocitos y responsables del retorno de linfocitos activados al intestino; la CXCL8, responsable del reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares, sobre todo neutrófilos; y la fractalina o CX(3)CR1, que parece tener un rol importante en la migración de linfocitos intraepiteliales al epitelio intestinal. Además, estos autores han correlacionado la CCL2 y la CXCL8 con la gravedad clínica de la enfermedad (Maeda *et al.*, 2011; Maeda *et al.*, 2012c). Al mismo tiempo han planteado que, del mismo modo que parece ocurrir en medicina humana, la activación de los PRR puede inducir la síntesis de quimiocinas y la causa de su elevación puede ser consecuencia de las anomalías en la expresión de estos receptores en pacientes con EICI (Ungaro *et al.*, 2009). Por ello, se requieren estudios que correlacionen ambos factores en la especie canina.

Las **citocinas**, mediadores humorales de la respuesta inmunitaria, son sintetizadas por casi todas las células de la inmunidad. En concreto, la IL-1 β juega un papel de gran importancia en la respuesta inmunitaria innata en la EICI. Se trata de una interleucina con gran actividad proinflamatoria producida mayoritariamente por macrófagos activados. Esta citocina ha sido encontrada en elevadas concentraciones en el tejido intestinal tanto de humanos como de perros con EICI y, además, sus niveles se correlacionan con la gravedad clínica de la enfermedad en ambas especies (Maeda *et al.*, 2012b; Park *et al.*, 2017; Hawes *et al.*, 2018). Su antagonista endógeno es la IL-1RA, encontrándose el ratio IL-1RA:IL-1 β significativamente disminuido en

perros con EICI (Maeda *et al.*, 2012b). Investigaciones en modelos animales han demostrado este antagonismo al observar la atenuación de la inflamación intestinal tras la administración exógena de IL-1RA (Cominelli *et al.*, 1992). La IL-1 β tiene la peculiaridad de que, para poder ejercer sus funciones una vez sintetizada, tiene que ser activada por un complejo multiproteico denominado inflamasoma, que también está sobreexpresado en pacientes con enfermedad de Crohn (Park *et al.*, 2017). Se considera que esta cascada proinflamatoria mediada por la IL-1 β en la EICI es consecuencia de la aberrante activación de los receptores TLR que tiene lugar en el curso de esta enfermedad, ya que se ha demostrado que la activación de los TLR induce la transcripción de esta interleucina (Netea *et al.*, 2008).

El papel de los **neutrófilos** en la patogenia de la EICI no está claro. Algunos autores consideran que tienen un efecto protector, ya que al llegar a la mucosa intestinal producen IL-22, interleucina con propiedades bactericidas y antiinflamatorias sobre la barrera epitelial (Zhou y Liu, 2017; Zhou *et al.*, 2018). Sin embargo, el aumento de IL-8 descrito puede dar lugar a un incremento excesivo de estas células, como se observa en las fases iniciales de la enfermedad en el tejido intestinal e incluso a veces en sangre periférica de pacientes con EICI (Zhou y Liu, 2017). Estas células en exceso pueden contribuir a la perpetuación del proceso inflamatorio y al daño del epitelio intestinal de forma colateral. Otro hecho que determina la influencia de los neutrófilos en el curso de la enfermedad es el incremento de ANCAs en sangre periférica en estos individuos (Mancho *et al.*, 2011; Zhou y Liu, 2017). En la especie canina, además del incremento de IL-8 en el intestino de perros con EICI (Maeda *et al.*, 2011), un reciente estudio ha asociado la presencia de neutrófilos en la lámina propia con las formas más graves de la enfermedad, es decir, estas células están más presentes en perros con enteropatía perdedora de proteínas (Wennogle *et al.*, 2017). No obstante, se requieren más estudios para determinar su implicación en el curso de la EICI canina.

Las **células dendríticas**, por su parte, han sido ampliamente estudiadas en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Lo que parece ocurrir a grandes rasgos es un incremento de esta población celular en la mucosa de los pacientes enfermos. Estas células parecen presentar un fenotipo aberrante, con una polarización hacia una forma más madura y reactiva, incluyendo un incremento de PRR en su superficie y la pérdida de otras moléculas de superficie como el CD 103. Este hecho les provee de una mayor capacidad para el reconocimiento antigénico, lo que se traduce en una pérdida de tolerancia inmunológica y una exacerbación de las respuestas inmunitarias (Bernardo *et al.*, 2018). En la especie canina, los estudios realizados en células dendríticas en la EICI muestran una disminución de estas células en la mucosa del duodeno, íleon y colon, en comparación con animales sanos. Esta situación se justifica por el hecho de que la población estudiada fue el fenotipo latente, habitual de estas células en el intestino. Estos autores, basándose en sus hallazgos, destacan la implicación de este tipo celular en la patogenia de la EICI

canina, ya que la disminución de estas células puede ser la causa de la pérdida de tolerancia inmunológica. Además, proponen la realización de más estudios con un mayor número de marcadores que permita la caracterización de otros fenotipos de células dendríticas, del mismo modo que se ha realizado en medicina humana (Kathrani *et al.*, 2011c; Junginger *et al.*, 2014).

De forma parecida a las células dendríticas, los **macrófagos** intestinales en condiciones normales presentan un fenotipo latente, no siendo capaces de activarse mediante PRRs como en otros tejidos y manteniendo la homeostasis inmunitaria intestinal mediante la producción de IL-10. En caso de agresión intestinal, los macrófagos serán reclutados desde la médula ósea y llegarán al intestino, donde madurarán hacia un fenotipo proinflamatorio. En pacientes con enfermedad de Crohn, este fenotipo proinflamatorio es el que domina en la mucosa intestinal, mostrando una elevada producción de múltiples sustancias proinflamatorias, entre las que destacan la IL-23, el TNF- α y la IL-6 (Kamada *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2017). En la EICI canina, los estudios son aún limitados, si bien un reciente trabajo ha descrito la presencia de macrófagos con fenotipo antiinflamatorio en la mucosa gastrointestinal de perros sanos y una reducción significativa de dicho fenotipo en el estómago, duodeno y colon de perros con EICI. Además, también se ha observado un ligero aumento de macrófagos portadores de CD64 con actividad proinflamatoria en dichas localizaciones en perros enfermos. Cabe destacar la ausencia de correlación entre estos hallazgos y la gravedad clínica de la enfermedad (Wagner *et al.*, 2018). Otro trabajo destaca el incremento tras el tratamiento del fenotipo macrofágico antiinflamatorio (macrófagos CD163+) en el duodeno de perros con EICI (Dandrieux *et al.*, 2018). Estos estudios reflejan la potencial participación de estas células en el curso de la EICI canina.

Los **eosinófilos** en ocasiones también se encuentran en elevado número en el tejido intestinal de pacientes con EICI (Filippone *et al.*, 2019). Por su parte, en el perro el incremento de su número en el intestino constituye un subtipo de EICI que parece asociarse a una mayor gravedad clínica y una peor respuesta al tratamiento (Hall, 2013a). Su papel en la EICI tanto humana como canina no se conoce con exactitud, pero se postula que la degranulación de sus gránulos citoplasmáticos incrementa el daño tisular y que esta situación podría afectar directamente al plexo mioentérico, interfiriendo en sus funciones (Filippone *et al.*, 2019).

Del mismo modo que ocurre con la mayoría de células inmunitarias, los **mastocitos** también se encuentran en un número superior en el tejido intestinal de pacientes con EICI, contribuyendo al proceso inflamatorio mediante la producción de múltiples mediadores inflamatorios, entre los que destaca la elevada síntesis y secreción de IL-3. Además, también juegan un importante papel en la activación de linfocitos Th efectoras (Park *et al.*, 2017). En la especie canina, la elevación del número de mastocitos y células IgE+ también ha sido descrita, sugiriendo su posible participación en la EICI mediante el desarrollo de hipersensibilidad de tipo

I frente a antígenos bacterianos o de la dieta presentes en el lumen intestinal (Locher *et al.*, 2001; Kleinschmidt *et al.*, 2007).

Finalmente, cabe destacar, el elevado número de **células linfoides innatas** y **células NK** en el tejido intestinal de enfermos de Crohn y colitis ulcerosa, participando en el proceso inflamatorio mediante la producción de las citocinas IL-22 e IL-17 (de Souza y Fiocchi, 2016; Torres *et al.*, 2017). Sin embargo, estos tipos celulares no han sido estudiados en la EICI canina.

2.4.2. Alteraciones del sistema inmunitario adaptativo en la EICI

Las interacciones entre los factores etiopatogénicos previamente descritos y las alteraciones en la inmunidad innata durante el curso de la EICI, conducen a un estado proinflamatorio con una disrupción del balance entre citocinas pro- y antiinflamatorias que se refleja en el inmunofenotipo linfocitario intestinal y periférico. La importancia de los linfocitos y de sus productos en la EICI es tal que la mayoría de los fármacos biológicos empleados en medicina humana para el tratamiento de esta enfermedad van dirigidos a neutralizar estas moléculas proinflamatorias y a evitar el retorno de los linfocitos al intestino. Además, es preciso mencionar que la mejoría clínica e histológica de estos pacientes se fundamenta en muchas ocasiones en la disminución del infiltrado linfocitario intestinal (de Souza y Fiocchi, 2016; de Souza, 2017; Park *et al.*, 2017).

Como ya se ha descrito en el apartado del GALT de esta revisión, los linfocitos de las localizaciones efectoras son mayoritariamente **linfocitos T** (Murphy, 2012e) y en la EICI tanto humana como canina, el número total de estas células parece estar incrementado en el tejido intestinal (German *et al.*, 2001; Smids *et al.*, 2018). Dentro de ellos, los linfocitos Th juegan un papel fundamental en el curso de la EICI, ya que se trata de una población muy plástica y con gran capacidad de adaptación al ambiente, contribuyendo en condiciones de inflamación de manera muy importante a la perpetuación del proceso (de Souza y Fiocchi, 2016). En la EICI en medicina humana, el porcentaje de **linfocitos Th** de la lámina propia intestinal se encuentra incrementado (Li *et al.*, 2016; Smids *et al.*, 2018). La comunidad científica, a pesar de las discrepancias aún existentes, parece apoyar la hipótesis de que la IL-23 producida por las células dendríticas y los macrófagos intestinales conduce a una polarización de los linfocitos Th hacia el fenotipo proinflamatorio Th1 y Th17 en la enfermedad de Crohn, asociado a elevados niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-17. Por el contrario, en la colitis ulcerosa predomina el fenotipo Th2 y Th17, con el consecuente incremento de TNF- α , IL-5, IL-13, IL-4, IL-6 e IL-17 (de Souza y Fiocchi, 2016; Park *et al.*, 2017).

Respecto a los linfocitos intraepiteliales, como ya se detalló, constituyen una población muy heterogénea de linfocitos con características muy peculiares. Pueden ser divididos en naturales e inducidos. Los linfocitos intraepiteliales Th forman parte de los inducidos con funciones efectoras y se encuentran en proporciones muy bajas en esta localización en comparación con el fenotipo Tc. Los linfocitos intraepiteliales Th durante la EICI parecen sufrir la misma polarización que los presentes en la lámina propia, pero, dada su localización, se postula que sus efectos van dirigidos directamente frente a la microbiota intestinal (Cheroutre *et al.*, 2011).

Por su parte, en la especie canina también se han descrito incrementos del número de linfocitos Th en el intestino de perros con EICI (German *et al.*, 2001). No obstante, un estudio en el que se evaluó el inmunofenotipo de los linfocitos intraepiteliales en perros enfermos, mediante el empleo de citometría de flujo, mostró un descenso del porcentaje de los linfocitos Th en este compartimento intestinal (Haas *et al.*, 2014). A diferencia de los estudios en medicina humana, en los que la técnica de elección para la caracterización linfocitaria intestinal es la citometría de flujo, en medicina veterinaria el empleo de esta técnica en este tipo de trabajos es anecdótico. Por el contrario, existe un gran número de aportaciones en la literatura, en las que se ha empleado PCR-RT para el estudio de las citocinas producidas por los linfocitos Th y así poder determinar si, del mismo modo que en la EICI en medicina humana, existe una polarización hacia algún fenotipo concreto. A pesar de que se han descrito aumentos de la expresión de citocinas en perros con EICI, tales como la IL-2, IL-5, IL-12, TNF- α , TGF- β , entre otras, ninguno de los estudios ha podido demostrar una clara polarización Th1/Th2/Th17 (German *et al.*, 2000b; Peters *et al.*, 2005b; Jergens *et al.*, 2009; Ohta *et al.*, 2014b; Tamura *et al.*, 2014; Heilmann y Suchodolski, 2015). Algunos autores consideran que la heterogeneidad de los resultados puede deberse al propio método de cuantificación, a los diferentes estados de enfermedad de los animales o a diferencias demográficas, entre otros factores (Jergens *et al.*, 2009; Heilmann y Suchodolski, 2015).

Respecto a los **linfocitos Tc**, se puede decir que ha sido una población menos estudiada en la EICI en el hombre, a pesar de que algunos autores los consideran un punto clave de la patogenia de esta enfermedad (Cheroutre, 2006). En la lámina propia intestinal, su número parece no tener variaciones entre individuos sanos y enfermos, aunque hay algunos autores que describen un menor porcentaje de este tipo celular durante la enfermedad (Tom *et al.*, 2016; Smids *et al.*, 2018). Recientemente, un trabajo realizado en medicina humana ha determinado por primera vez la presencia del fenotipo Tc con funciones reguladoras en tejido intestinal, describiendo un incremento de su número en pacientes con enfermedad de Crohn. Estos autores hipotetizan que este aumento puede ser semejante al que ocurre con los linfocitos Treg durante la EICI y que su incremento trate de contrarrestar los efectos proinflamatorios de la IL-17

producida por los Th17 (Tom *et al.*, 2016). Sin embargo, la población de linfocitos Tc de mayor importancia en la EICI es la intraepitelial. En este compartimento inmunitario, los linfocitos Tc constituyen el fenotipo mayoritario y hay corrientes investigadoras que los consideran los principales responsables del daño de la barrera epitelial y, con ello, de la pérdida de la tolerancia inmunitaria (Cheroutre, 2006). Los linfocitos intraepiteliales Tc naturales son los mayoritarios y están constituidos por el fenotipo TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$, CD8 $\alpha\alpha$, mientras que los inducidos se encuentran en menor número y presentan el fenotipo TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ o CD8 $\alpha\beta$. Los linfocitos intraepiteliales naturales son autorreactivos, pero no autodestructivos, ya que en condiciones de latencia llevan a cabo funciones reguladoras junto con los Tc inducidos. Sin embargo, en condiciones de inflamación o frente al reconocimiento de un antígeno muy semejante a los propios, podrían activarse y actuar directamente frente a antígenos propios con el consecuente daño de la barrera epitelial (Cheroutre, 2006; Cheroutre *et al.*, 2011). Los escasos estudios en medicina veterinaria tampoco muestran grandes variaciones en el número de linfocitos Tc en el intestino de perros con EICI respecto a perros sanos (German *et al.*, 2001). Sin embargo, en el caso de los linfocitos intraepiteliales, un trabajo muestra un incremento del fenotipo TCR $\gamma\delta$ en perros con EICI y un porcentaje de Tc TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\beta$ del 43% frente al 6% de Tc TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ (Haas *et al.*, 2014).

A pesar de los múltiples estudios que han tratado de determinar el papel de los **linfocitos Treg** en el curso de la EICI, en la actualidad siguen existiendo muchas controversias al respecto. Esta subpoblación linfocitaria tiene una función muy importante en el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria intestinal mediante la producción de citocinas antiinflamatorias y la inhibición de la activación de linfocitos efectores. Algunos autores relacionan directamente su número con el de linfocitos Th17, alegando que en situación de latencia se produciría una polarización Treg, mientras que en un ambiente inflamatorio se produciría una diferenciación Th17 (Gagliani *et al.*, 2015; de Souza y Fiocchi, 2016). Muchos trabajos han descrito una disminución del número de linfocitos Treg en el intestino de pacientes con EICI, acompañado de un aumento de los Th17 (Eastaff-Leung *et al.*, 2010). Sin embargo, existe también una gran cantidad de estudios que, por el contrario, han encontrado un elevado número de ambas poblaciones en estos pacientes. En este caso, consideran que el aumento de los Treg puede ser justificado por el intento de restablecer la normalidad o bien porque presenten un deterioro de base de sus funciones reguladoras (Ban *et al.*, 2008; Globig *et al.*, 2014; de Souza y Fiocchi, 2016). En la especie canina solo hay dos trabajos en los que se evaluó la existencia de cambios en la expresión de linfocitos FoxP3⁺ en la mucosa intestinal de perros con EICI mediante el empleo de inmunohistoquímica, encontrando una reducción de los mismos, así como de uno de sus productos, el TGF- β , sugiriendo con este hallazgo una disminución de la tolerancia inmunológica en estos animales (Junginger *et al.*, 2012; Maeda *et al.*, 2016).

Respecto a los linfocitos T de memoria, parece presentarse un importante descenso de aquellos residentes en tejidos durante el curso de la EICI en el hombre, los cuales desarrollan funciones reguladoras en la inmunidad de mucosas, pudiendo contribuir su descenso en la patogenia de la enfermedad (Smids *et al.*, 2018; Noble *et al.*, 2020). En la especie canina, estas poblaciones linfocitarias todavía no han sido descritas.

Es importante mencionar que Smids y colaboradores han correlacionado positivamente el porcentaje de linfocitos T, Th, Treg en el intestino de pacientes tanto con enfermedad de Crohn como con colitis ulcerosa con una peor evolución de la enfermedad, proponiendo el uso de estos parámetros como nuevos marcadores de la EICI e indicadores de pronóstico (Smids *et al.*, 2018).

Recientes trabajos están focalizando su atención en el estudio de una población de **linfocitos T dobles positivos** en el intestino, la población CD4+CD8 $\alpha\alpha$ +. Esta población parece tener características inmunoreguladoras ya que se les ha atribuido la producción de IL-10. Hay que subrayar que este subtipo de linfocitos T parece estar íntimamente relacionado con el reconocimiento de antígenos de bacterias pertenecientes al grupo IV del género *Clostridium*, consideradas saprofitas, sufriendo una expansión en su número en presencia de estos microorganismos. Esta población linfocitaria se encuentra en menores porcentajes en la lámina propia del colon de pacientes con EICI, sugiriendo su implicación en la enfermedad (Sarrabayrouse *et al.*, 2014; Sarrabayrouse *et al.*, 2015).

Respecto a la población de **linfocitos T dobles negativos**, a pesar de que hay trabajos que consideran que esta población constituye aproximadamente un tercio de los linfocitos intraepiteliales, su contribución al sistema inmunitario intestinal se desconoce (Mayans *et al.*, 2014). En la especie canina, solo hay dos trabajos en la literatura que describan estas poblaciones en el epitelio intestinal de perros sanos, por lo que su contribución al sistema inmunitario intestinal aún debe ser evaluada (Sonea *et al.*, 2000; Rabiger *et al.*, 2019b).

La **inmunidad adaptativa humoral** también presenta alteraciones en la EICI tanto humana como canina, destacando el incremento de células plasmáticas a nivel de la lámina propia (German *et al.*, 2001; Brandtzaeg *et al.*, 2006). Respecto a los linfocitos B, si bien estas células son una población minoritaria en las localizaciones efectoras intestinales (Garden, 2013), en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa su número también parece estar incrementado a este nivel (Brandtzaeg *et al.*, 2006), mientras que en la especie canina no se han observado diferencias en el número total de estas células en perros con EICI (German *et al.*, 2001; Haas *et al.*, 2014). Por otro lado, en medicina humana un elevado porcentaje de pacientes con colitis ulcerosa presenta un autoanticuerpo IgG frente a un componente del epitelio del colon, presente además en la piel, ojos y articulaciones. Se cree que este autoanticuerpo es responsable de la mayoría de las manifestaciones extraintestinales de la enfermedad en el hombre. En la

enfermedad de Crohn, por su parte, se han descrito numerosos anticuerpos frente a microorganismos de la microbiota, relacionándose el título de estos anticuerpos con la gravedad clínica de la enfermedad (de Souza y Fiocchi, 2016). Recientemente en la especie canina también se ha identificado este tipo de autoanticuerpos frente a componentes de la microbiota en perros enfermos, destacando la elevada prevalencia en el suero de estos animales (76%) del anticuerpo frente a la porina C de la membrana externa bacteriana (Estruch *et al.*, 2020). De igual manera, el elevado número de ANCAs y otros tipos de anticuerpos frente a componentes celulares propios, como el anticuerpo frente a leucocitos polimorfonucleares presentes en el suero de pacientes con enfermedad de Crohn y de perros con EICI, refleja la implicación de la inmunidad adaptiva humoral en la enfermedad (Mancho *et al.*, 2011; de Souza y Fiocchi, 2016; Estruch *et al.*, 2020).

Por otro lado, estos individuos también presentan una desregulación del patrón de inmunoglobulinas. Estos pacientes presentan un desproporcionado aumento de células plasmáticas productoras de IgG y un cambio del isotipo IgA habitual y competente hacia una isoforma monomérica e inestable, incapaz de realizar sus funciones adecuadamente (Brandtzaeg, 2010). En la EICI canina se han descrito del mismo modo incrementos tanto en el número de células plasmáticas como de células productoras de IgG e incrementos de los niveles de IgG que opsonizan bacterias patógenas (Gunawardana *et al.*, 1997; German *et al.*, 2001; Soontarak *et al.*, 2019). Por el contrario, el número de células productoras de IgA intestinal y los niveles de IgA, tanto en la mucosa como en las heces, parecen encontrarse reducidos en perros con EICI (Maeda *et al.*, 2013).

Los linfocitos T activados, tras llevar a cabo sus funciones, mueren por apoptosis para evitar un efecto prolongado e innecesario que pueda dar lugar a una respuesta inmunitaria dañina. En la EICI en el hombre tiene lugar una serie de fenómenos que evitan la apoptosis linfocitaria, lo que contribuye al mantenimiento del proceso inflamatorio. Esta resistencia a la apoptosis ha sido asociada con una regulación anormal de la ratio Bcl2/caspasa 3. De forma general se puede decir que la caspasa 3 favorece la apoptosis, mientras que las proteínas de la familia Bcl2 ejercen funciones antiapoptóticas (de Souza y Fiocchi, 2016). En la especie canina, también se ha detectado un defecto en la regulación de dicho ratio, habiéndose encontrado una disminución de la expresión de caspasa 3 en los linfocitos de la lámina propia del colon y del duodeno de perros con EICI y un incremento de la expresión de Bcl2 en el duodeno de estos perros, además de asociarse este último hallazgo con la gravedad clínica de la enfermedad (Dandrieux *et al.*, 2008; Jergens *et al.*, 2014a). Estos hechos sugieren que los linfocitos intestinales de los perros con EICI también desarrollan mecanismos de resistencia a la apoptosis. En medicina humana, además de la alteración de esta ratio, se han descrito otros mecanismos antiapoptóticos en la mucosa intestinal de pacientes con EICI, tales como la supresión de la expresión del gen supresor de

tumores TP53, que previene la expansión de linfocitos T, el incremento de la expresión del gen survivina, que pertenece a la familia de los genes inhibidores de la apoptosis, y el incremento de producción de IL-6 que también regula el proceso de apoptosis confiriendo resistencia a los linfocitos (de Souza y Fiocchi, 2016).

2.4.3. Alteraciones del inmunofenotipo periférico en la EICI

Desde un punto de vista clínico, uno de los objetivos tanto en medicina humana como veterinaria es el descubrimiento de biomarcadores de utilidad que permitan un abordaje diagnóstico y una monitorización del tratamiento menos invasivo en pacientes con EICI, ya que hasta el momento esto solo se consigue mediante la toma de biopsias. No obstante, en algunas ocasiones la toma de biopsias supone un riesgo para estos individuos debido a su estado clínico. Es por ello que en medicina humana se están llevando a cabo múltiples estudios evaluando el inmunofenotipo linfocitario en sangre periférica de pacientes con EICI en busca de estos biomarcadores, determinando además la existencia de correlaciones con la situación presente en la mucosa intestinal.

En este sentido, en medicina humana se han descrito múltiples diferencias en el fenotipo linfocitario periférico entre pacientes con EICI e individuos sanos. En concreto, se ha observado un incremento en el estado de activación de linfocitos Th y Tc, así como un aumento de los niveles plasmáticos de ciertas citocinas tales como IL-6, IL-2 e IFN- γ (Funderburg *et al.*, 2013). También se han evidenciado niveles superiores de una subpoblación de linfocitos Th de memoria portadores de marcadores de resistencia a la apoptosis junto con incrementos de TNF- α , IL-6, IL-2 e IL-10. Además, estos autores encontraron una correlación entre los valores de esta población linfocitaria y la gravedad clínica de la enfermedad (García de Tena *et al.*, 2004, 2006). Otras de las alteraciones del inmunofenotipo periférico que deben ser mencionadas son: la presencia en sangre periférica de linfocitos Th con fenotipo Th17 y CD161+ (receptor que promueve la expansión de linfocitos T) y portadores de moléculas de adhesión intestinal (Kleinschek *et al.*, 2009); el aumento del número de linfocitos Th17 y Treg, estos últimos con coexpresión de los marcadores FoxP3+ y ROR γ t+, indicando una conversión de sus funciones hacia Th17 y una disminución de sus funciones supresoras (Ueno *et al.*, 2013); y la alteración del balance sanguíneo de linfocitos Tc CD28+, indicativas del estado de activación, siendo considerado el ratio CD8+CD28+:CD8+CD28- un marcador inmunitario con gran sensibilidad y especificidad en la detección del estado activo de la enfermedad y en la predicción de la eficacia del tratamiento (Dai *et al.*, 2017).

En la especie canina, también son muchos los estudios que evalúan las modificaciones del inmunofenotipo linfocitario en el curso de diversas enfermedades. Sin embargo, respecto a la EICI en perro, solo hay cuatro trabajos en la literatura que aborden esta cuestión. En uno de ellos, se describió la presencia de un menor número de linfocitos B IgA⁺ en el conjunto de linfocitos de sangre periférica (PBLs, de sus siglas en inglés) de un grupo de perros con EICI, sugiriendo que durante el curso de esta enfermedad puede tener lugar un defecto en la maduración de esta población linfocitaria con implicación en la patogenia (Maeda *et al.*, 2013). En otro, en el que se compararon las distintas subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica entre perros sanos, perros con patologías neoplásicas y perros con enfermedades inflamatorias, entre los que se incluyó la EICI, no se encontraron diferencias significativas en el inmunofenotipo (García-Sancho *et al.*, 2014). Por su parte, Volkmann y colaboradores evaluaron la población de linfocitos Treg periféricos en 10 perros con enteropatía crónica, encontrando una disminución de esta población linfocitaria circulante en dichos animales y proponiendo su posible implicación en el inicio o en la progresión de la enfermedad (Volkmann *et al.*, 2014). Finalmente, en el más reciente, se incluyó un mayor número de animales y un panel de anticuerpos más amplio con el fin de evaluar un mayor número de poblaciones linfocitarias. En este trabajo se detectó una disminución significativa del porcentaje de linfocitos TCR $\gamma\delta$ ⁺ y linfocitos B. Sin embargo, no se observó ninguna modificación linfocitaria tras la finalización del tratamiento inmunosupresor (Galler *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Tal y como se ha indicado en el apartado de “Revisión bibliográfica” de esta memoria de tesis doctoral, la EICI es una enfermedad de base inmunomediada (Hall, 2013a; Torres *et al.*, 2017). Los grandes avances científicos en la inmunopatogenia de esta enfermedad en el hombre han permitido la caracterización de los componentes del sistema inmunitario alterados y que repercuten de una forma directa en el proceso inflamatorio intestinal asociado (Park *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2018). Uno de los resultados directos de estos avances ha sido el desarrollo de una nueva alternativa de tratamiento para estos individuos, la inmunoterapia (Reinglas *et al.*, 2018). Además, estos avances han permitido la descripción de biomarcadores inmunitarios de utilidad para la predicción de la respuesta al tratamiento y la evolución de la enfermedad (Smids *et al.*, 2018).

Por el contrario, el estudio de la inmunopatogenia en la EICI canina es limitado y no permite establecer conclusiones claras acerca de la alteración del inmunofenotipo, ni sobre el efecto del tratamiento en el mismo ni, como consecuencia, sobre su potencial utilidad como biomarcador. Como se ha descrito previamente, a pesar de que la mayoría de los componentes de la inmunidad tienen un papel en la EICI, los linfocitos T de las localizaciones efectoras intestinales y sus productos parecen tener una mayor repercusión en la alteración de la respuesta inmunitaria (Park *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2018; Eissa *et al.*, 2019). No obstante, las distintas subpoblaciones de linfocitos T de los dos compartimentos efectores intestinales, el epitelio y la lámina propia, siendo muy diferentes tanto fenotípica como funcionalmente, no han sido bien caracterizados por separado en la especie canina. Además, tampoco se han establecido las diferencias existentes entre inmunofenotipo intestinal y periférico en animales sanos que permitan posteriormente explicar las posibles modificaciones en situaciones de enfermedad.

Por otro lado, la técnica más empleada en el estudio del inmunofenotipo es la citometría de flujo, ya que posee cualidades relevantes, tales como la especificidad de los anticuerpos empleados, el hecho de que permite estudiar múltiples antígenos y un elevado número de células simultáneamente, además de que no depende tanto del observador como, por ejemplo, la inmunohistoquímica (Adan *et al.*, 2017). El desarrollo de esta técnica en medicina veterinaria ha permitido su empleo sobre todo en el estudio del sistema inmunitario en sangre periférica (Villaescusa *et al.*, 2012c; Galler *et al.*, 2017), pero su uso para el inmunofenotipaje intestinal es todavía limitado.

Todos estos hechos, sumados a que la EICI linfoplasmocitaria que afecta al intestino delgado es considerada la causa más frecuente de vómito y diarrea crónica en el perro, motivaron el desarrollo de este trabajo de investigación. En él, se planteó como objetivo principal la

evaluación de las alteraciones que pueden producirse en el curso de la EICI canina en el inmunofenotipo en sangre periférica y en el duodeno.

Para el desarrollo de este objetivo principal se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de las alteraciones clínicas, endoscópicas e histopatológicas existentes en la EICI canina. Para ello se debe subdividir este objetivo específico en diferentes objetivos concretos:
 - a. Caracterización clínica, endoscópica e histopatológica de perros clínicamente sanos.
 - b. Caracterización clínica, endoscópica e histopatológica de la EICI canina.
 - c. Comparación de los datos clínicos, endoscópicos e histopatológicos entre perros sanos y perros con EICI.
2. Puesta a punto de los protocolos de aislamiento de linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia intestinal en la especie canina para su estudio por citometría de flujo.
3. Caracterización de las alteraciones existentes en el curso de la EICI canina en las poblaciones de linfocitos T presentes en los compartimentos inmunitarios: sangre periférica, epitelio duodenal y lámina propia duodenal. Para ello, se debe subdividir este objetivo específico en diferentes objetivos concretos:
 - a. Evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T, T citotóxicos, T colaboradores, y el estado de activación de estas dos últimas, T dobles positivos, T dobles negativos, T reguladores, T productores de IFN- γ y de IL-4, tanto en sangre periférica como en biopsias intestinales, así como la distribución de los linfocitos Th1 y Th2 sanguíneos en perros sanos.
 - b. Evaluación de las subpoblaciones de linfocitos previamente mencionadas en perros con EICI.
 - c. Comparación de la distribución de estas subpoblaciones linfocitarias entre perros sanos y perros con EICI.
4. Evaluación de la evolución clínica, endoscópica, histopatológica y de la distribución de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica y en biopsias intestinales en los perros con EICI tras recibir el tratamiento específico para la enfermedad.

5. Evaluación de las posibles asociaciones entre la distribución de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica y los parámetros clínicos, endoscópicos e histopatológicos en los perros con EICI.

4. MATERIALES Y MÉTODOS



4.1. PLAN DE TRABAJO

Con la finalidad de alcanzar los objetivos descritos previamente, se estableció el plan de trabajo que se detalla a continuación.

Inicialmente, se llevó a cabo la puesta a punto de los protocolos de preparación de las muestras duodenales para la realización del inmunofenotipaje de linfocitos T mediante citometría de flujo. Para ello, fue preciso validar los protocolos de aislamiento de los linfocitos presentes en los dos compartimentos inmunitarios efectores intestinales, el epitelio y la lámina propia. A continuación, se adaptaron los protocolos descritos en la bibliografía para el aislamiento y enriquecimiento de los linfocitos de sangre periférica y para la activación celular precisa para la detección de las poblaciones de linfocitos T productores de IFN- γ e IL-4 en los tres compartimentos inmunitarios y se titularon todos los anticuerpos empleados en la caracterización celular, validándose a su vez la técnica de permeabilización celular y de marcaje intracelular en nuestro laboratorio.

Por otro lado, se establecieron los criterios de inclusión y de exclusión para la conformación de los grupos de animales que integran este trabajo: el grupo de animales sanos y el de perros diagnosticados de EICI. En todos los animales integrantes del estudio se realizaron una anamnesis y exploración física completas, extracción de muestras de sangre para la realización de hematología y bioquímica sanguíneas, citometría de flujo e inmunofluorescencia indirecta (IFI) frente a *Ehrlichia canis* y *Leishmania infantum*, además de una endoscopia digestiva superior con toma de biopsias para su estudio histopatológico e inmunofenotipaje por citometría de flujo.

En el grupo de perros enfermos se llevó a cabo un protocolo de exclusión completo que permitió llegar al diagnóstico definitivo de EICI y que se detallará posteriormente. Además, se recogieron los datos necesarios para la elaboración de índices de actividad clínica, endoscópica e histopatológica de la enfermedad. Tras el diagnóstico, se estableció un protocolo de tratamiento y se llevó a cabo un seguimiento clínico que permitió la repetición de la toma de muestras y de datos en un grupo de los animales con EICI.

El periodo de recogida de muestras y de datos de todos los animales integrantes del estudio se prolongó longitudinalmente durante dos años.

Los resultados obtenidos permitieron caracterizar y comparar las poblaciones de linfocitos T entre los perros sanos y los perros con EICI antes y después del tratamiento específico

Materiales y métodos

para esta enfermedad y entre los tres compartimentos inmunitarios analizados (sangre, epitelio intestinal y lámina propia).

Finalmente, se valoró la evolución de los parámetros clínicos, endoscópicos, histopatológicos y del inmunofenotipo sanguíneo e intestinal en los perros enfermos tras el tratamiento y la existencia de relaciones entre los índices de la enfermedad y el inmunofenotipo sanguíneo.

4.2. ANIMALES

Para la realización de este trabajo se han empleado un total de 52 perros. De ellos, 45 acudieron al Hospital Clínico Veterinario Complutense (HCVC) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y siete al Hospital Veterinario Vetersalud Indra (Fuenlabrada, Madrid) entre marzo de 2017 y julio de 2019. Este proyecto de investigación fue aprobado por los Comités de Experimentación Animal del HCVC, de la UCM y de la Comunidad de Madrid (referencia PROEX 175/18). De esta forma se garantiza el cumplimiento de los requisitos deontológicos y éticos del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, que traspone al ordenamiento jurídico nacional la directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, de 22 de septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Para la inclusión de los animales en el estudio se contó con el consentimiento informado de los propietarios.

Los perros integrantes del estudio se incluyeron en dos grupos, como se indica a continuación:

- Grupo de perros sanos o grupo control (Grupo 1)
- Grupo de perros con EICI (Grupo 2)

Los animales del Grupo 1, o grupo de perros sanos, acudieron al HCVC o al Hospital Veterinario Vetersalud Indra para someterse a intervenciones quirúrgicas rutinarias programadas no relacionadas con este estudio, tales como ovariectomía, orquiectomía o técnicas de salud dental. Los criterios para la inclusión de estos animales en el trabajo fueron: no haber presentado ningún signo gastrointestinal en los seis meses previos a la toma de muestras, no haber recibido ningún tratamiento médico en el mes previo a la toma de muestras y la obtención de resultados dentro de la normalidad en la anamnesis, la exploración física y la analítica sanguínea. Además, su dieta, manejo, evaluación corporal, actividad y protocolos sanitarios rutinarios podían ser variados, con el fin de obtener unos resultados más extrapolables a la población canina general.

Por su parte, los perros del Grupo 2, o grupo de perros con EICI, acudieron a la Consulta de Gastroenterología y Endoscopia del HCVC o al Hospital Veterinario Vetersalud Indra, debido a la presencia de un cuadro clínico gastrointestinal crónico. Los criterios de inclusión en este grupo se basaron en la presencia de signos clínicos compatibles con la enfermedad, la realización de un completo protocolo diagnóstico de exclusión, como se detalla a continuación en el siguiente apartado de “Materiales y métodos”, y la evidencia histológica de un infiltrado inflamatorio de

linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia duodenal que concluyó el diagnóstico de EICI linfoplasmocitaria en todos ellos.

Todos los animales con EICI incluidos en este estudio fueron sometidos al tratamiento específico para la enfermedad descrito en el apartado 4.4. de esta sección. Sin embargo, se estableció que solo serían incluidos en la evaluación de la evolución de la enfermedad aquellos perros de los que se dispuso al final del estudio de todos los datos de evolución clínica, laboratorial, endoscópica, histopatológica e inmunofenotípica. En este sentido, en estos animales se llevó a cabo un control de dichos parámetros en torno a dos meses después de la finalización del protocolo terapéutico.

4.3. PROTOCOLO DIAGNÓSTICO DE LA EICI

En todos los animales con EICI se llevó a cabo el siguiente protocolo diagnóstico para descartar cualquier otra causa que pudiese desencadenar la presencia de los signos clínicos gastrointestinales y el proceso inflamatorio intestinal y asegurar el diagnóstico de la enfermedad. En el caso del grupo de animales sanos, la anamnesis, la exploración física, la analítica de sangre, la evaluación endoscópica y la valoración histopatológica de las biopsias que se detallan en este apartado se emplearon para corroborar su condición de libres de enfermedad.

4.3.1. Anamnesis

En todos los animales se realizó una completa anamnesis con el fin de obtener la máxima información sobre los signos clínicos existentes. La información recogida de cada uno de los animales fue la siguiente:

- Reseña del animal: edad, sexo, raza, estado fértil, hábitat, convivencia con otros animales.
- Historial clínico previo.
- Protocolos de vacunación y desparasitación.
- Duración y evolución del proceso.
- Cuadro clínico continuo o discontinuo (combinado con periodos de normalidad o sin signos clínicos).
- Características de las heces: color, volumen, consistencia, presencia de sangre, moco, esteatorrea o alimentos sin digerir.
- Características de la defecación: número de deposiciones diarias, presencia de urgencia, disquecia o tenesmo.
- Presencia de aumento de borborismos intestinales o flatulencias.
- Presencia de vómitos: frecuencia, contenido y momento de aparición.
- Pérdida de peso.
- Presencia de dolor abdominal: frecuencia, posturas antiálgicas, ataques de dolor, asociación con otros signos gastrointestinales, duración y tiempo de recuperación.

- Características de la ingesta: tipo de alimentación, número de raciones diarias, alteraciones del apetito, ingesta de cuerpos extraños y/o hierba.
- Grado de actividad o actitud.
- Tratamientos recibidos y respuesta a los mismos.

4.3.2. Exploración física

La exploración física de todos los animales fue completa y sistemática, incluyendo:

- Valoración de la condición corporal.
- Medida del peso.
- Valoración del estado general y de la piel.
- Exploración de mucosas y del tiempo de relleno capilar.
- Valoración del grado de hidratación.
- Exploración de linfonódulos superficiales.
- Pulso.
- Palpación mamaria en hembras y testicular en machos.
- Auscultación cardíaca y pulmonar.
- Toma de temperatura.
- Palpación abdominal.

En aquellos casos en los que los hallazgos de la exploración física lo recomendaban, se llevaron a cabo técnicas de diagnóstico por imagen como la radiografía o la ecografía abdominal.

4.3.3. Analítica sanguínea

La extracción de sangre se realizó mediante punción de la vena cefálica o de la vena yugular, según el tamaño y el carácter del animal. De cada animal, se tomaron de 2 a 5 mL de sangre y se introdujeron en tubos con el anticoagulante tetra-acetato de etilendiamida (EDTA) para el estudio de la hematología y en tubos con el anticoagulante heparina para el estudio de la

bioquímica sanguínea y la realización de IFI frente a *E. canis* y *L. infantum*. El estudio de la hematología y de la bioquímica sanguínea se realizó en el Laboratorio de Biopatología Clínica del HCVC, mientras que la IFI frente a los dos patógenos mencionados fue realizada por el Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis y Leishmaniosis Canina de la Facultad de Veterinaria de la UCM. Los parámetros evaluados en cada uno de los casos del estudio fueron los siguientes:

- Parámetros hematológicos: hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos y de glóbulos blancos, fórmula leucocitaria y recuento plaquetario. En la realización de la hematología se empleó el citómetro de flujo ADVIA® 120 (Siemens Healthcare Diagnosis, Barcelona, España).
- Parámetros bioquímicos: glucosa, urea, creatinina, alanina aminotransferasa (ALT), proteínas totales y albúmina. La medición de valores plasmáticos de glucosa, urea, creatinina y ALT se realizó mediante técnicas de espectrofotometría de reflexión (Refrovet® Plus, Scil animal care Company, Viernhheim, Alemania). Para la determinación de las proteínas totales plasmáticas se utilizó una técnica colorimétrica basada en el principio de Biuret (Bradford Diagnostics, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), mientras que la determinación de la albúmina se llevó a cabo mediante el empleo de técnicas de química líquida (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Reino Unido).
- IFI frente a *E. canis* y *L. infantum*, para cuya lectura se empleó un microscopio de epifluorescencia Olympus BH-2® (Olympus Imaging America Inc., Center Valley, Pennsylvania, Estados Unidos) con filtro azul.

Los valores de referencia para la especie canina de la hematología, análisis bioquímico y los puntos de corte de IFI frente a *E. canis* y *L. infantum* empleados en este estudio se han reflejado en la tabla 1.

Tabla 1. Valores hematológicos y bioquímicos de referencia para la especie canina y puntos de corte de IFI frente a *E. canis* y *L. infantum*.

Parámetros Hematológicos	Valores de referencia para la especie canina
Hematocrito (%)	40,00-63,00
Hemoglobina (g/dL)	13,00-21,00
Glóbulos rojos x 10 ⁶ /μL	5,70-8,90
Plaquetas x 10 ³ /μL	150,00-337,00
Leucocitos x 10 ³ /μL	4,60-17,40
Neutrófilos/μL (%)	3000-11500 (45,00-76,00)
Linfocitos/μL (%)	1000-4800 (16,00-45,00)
Monocitos/μL (%)	150-1350 (1,00-8,00)
Eosinófilos/μL (%)	100-1250 (1,00-10,00)
Basófilos/μL (%)	0-100 (0,00-2,00)
Parámetros Bioquímicos	
Glucosa (mg/dL)	77,00-120,00
Urea (mg/dL)	15,00-53,00
Creatinina (mg/dL)	0,50-1,60
ALT/GPT (U/L)	15,00-58,00
Proteínas Totales (g/dL)	5,50-7,10
Albumina (g/dL)	2,30-4,00
IFI	Puntos de corte para la especie canina
<i>Ehrlichia canis</i>	1:80
<i>Leishmania infantum</i>	1:100

4.3.4. Análisis parasitológico de las heces

Para la determinación de la presencia de parásitos en las heces se emplearon tres técnicas diferentes: la observación directa de las mismas (método directo) y los métodos de Telemann y Mertiolo-Iodo-Formaldehído (MIF) (métodos indirectos).

El método directo, o extensión en fresco de las heces, se llevó a cabo en la consulta de Gastroenterología y Endoscopia del HCVC o en la consulta del Hospital Veterinario Vetersalud Indra. Después de la exploración física de cada animal, se tomó una muestra rectal y se puso sobre un portaobjetos junto con unas gotas de solución salina fisiológica, se cubrió con un cubreobjetos y se procedió a su observación directa empleando un microscopio óptico con un aumento 40x.

Para los métodos indirectos, se solicitó a los propietarios de los animales la recogida de tres muestras de heces de tres días consecutivos. Estas muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Parasitología del HCVC. El método Telemann conjuga técnicas de sedimentación y flotación, mientras que el método MIF consiste en la fijación y tinción de la muestra mediante el empleo de mertiolato, iodo y formaldehído para la visualización de estructuras protozoarias con mayor facilidad.

4.3.5. Pruebas de funcionalidad pancreática

Con el fin de descartar una insuficiencia pancreática exocrina, se llevó a cabo la medición en suero de los niveles de tripsinógeno y tripsina, mediante el empleo de la técnica de quimioluminiscencia llamada TLI (*Trypsin-Like Immunoreactivity*, Immulite 1, Siemens, Barcelona, España) en los laboratorios IDEXX (Madrid, España). Para ello, se tomaron 5 mL de sangre en un tubo estéril sin anticoagulante para la obtención del suero, tras un periodo de 12 horas de ayuno de los animales.

4.3.6. Índices de actividad clínica de la EICI

Con todos los datos de las pruebas iniciales, en el grupo de perros con EICI, o Grupo 2, de forma previa a la realización de la endoscopia digestiva se procedió a la valoración de la actividad clínica de la enfermedad. Asimismo, en el grupo de perros con EICI con control postratamiento, se llevó a cabo una reevaluación de estos índices clínicos tras la finalización del tratamiento y de forma previa a la realización de la endoscopia digestiva de control.

La actividad clínica de la enfermedad se evaluó mediante el empleo de tres índices de actividad clínica propuestos por diferentes grupos de trabajo para poder determinar las semejanzas o diferencias existentes entre ellos. Para el cálculo de estos índices se valoraron los parámetros descritos en la tabla 2, asignándoles los valores que se detallan a continuación en función de sus características.

Tabla 2. Índices de actividad clínica de la EICI empleados en el Grupo 2, tanto antes como después del tratamiento.

Índices de actividad clínica para perros con EICI		
CIBDAI (Jergens <i>et al.</i> , 2003)	CIBDAISI (Rodríguez-Franco <i>et al.</i> , 2004)	CCECAI (Allenspach <i>et al.</i> , 2007)
Actividad/actitud	Actividad/actitud	Actividad/actitud
- 0 = normal	- 0 = normal	- 0 = normal
- 1 = ligeramente disminuido	- 1 = ligeramente disminuido	- 1 = ligeramente disminuido
- 2 = moderadamente disminuido	- 2 = moderadamente disminuido	- 2 = moderadamente disminuido
- 3 = gravemente disminuido	- 3 = gravemente disminuido	- 3 = gravemente disminuido

Apetito - 0 = normal - 1 = ligeramente disminuido - 2 = moderadamente disminuido - 3 = gravemente disminuido	Apetito - 0 = normal - 1 = ligeramente disminuido o aumentado - 2 = moderadamente disminuido o aumentado - 3 = gravemente disminuido o aumentado	Apetito - 0 = normal - 1 = ligeramente disminuido - 2 = moderadamente disminuido - 3 = gravemente disminuido
Vómitos - 0 = ninguno - 1 = 1 por semana - 2 = 2-3 por semana - 3 = más de 3 por semana	Vómitos - 0 = ninguno - 1 = 1 por semana - 2 = 2-3 por semana - 3 = más de 3 por semana	Vómitos - 0 = ninguno - 1 = 1 por semana - 2 = 2-3 por semana - 3 = más de 3 por semana
Consistencia de las heces - 0 = normal - 1 = blandas, pastosas o presencia de sangre o moco - 2 = muy blandas - 3 = diarrea líquida	Consistencia de las heces - 0 = normal - 1 = blandas, pastosas o presencia de sangre o moco - 2 = muy blandas - 3 = diarrea líquida	Consistencia de las heces - 0 = normal - 1 = blandas, pastosas o presencia de sangre o moco - 2 = muy blandas - 3 = diarrea líquida
Frecuencia de la defecación - 0 = normal - 1 = ligeramente aumentada (2-3 veces al día) - 2 = moderadamente aumentada (4-5 veces al día) - 3 = gravemente aumentada (más de 5 veces al día)	Frecuencia de la defecación - 0 = normal - 1 = ligeramente aumentada (2-3 veces al día) - 2 = moderadamente aumentada (4-5 veces al día) - 3 = gravemente aumentada (más de 5 veces al día)	Frecuencia de la defecación - 0 = normal - 1 = ligeramente aumentada (2-3 veces al día) - 2 = moderadamente aumentada (4-5 veces al día) - 3 = gravemente aumentada (más de 5 veces al día)
Pérdida de peso - 0 = no - 1 = ligera (<5%) - 2 = moderada (5-10%) - 3 = grave (>10%)	Pérdida de peso - 0 = no - 1 = ligera (<5%) - 2 = moderada (5-10%) - 3 = grave (>10%)	Pérdida de peso - 0 = no - 1 = ligera (<5%) - 2 = moderada (5-10%) - 3 = grave (>10%)
	Dolor abdominal - 0 = no - 1 = ligero - 2 = moderado (posiciones antiálgicas poco frecuentes) - 3 = grave (posiciones antiálgicas frecuentes o ataques de dolor)	Niveles de albúmina - 0 = >20g/L o >2,0g/dL - 1 = 15-19,9g/L o 1,5-1,99g/dL - 2 = 12-14,9g/L o 1,2-1,49g/dL - 3 = <12g/L o <1,2g/dL
	Flatulencias/borborismos intestinales - 0 = ausencia - 1 = ligeramente aumentados - 2 = aumentados - 3 = muy aumentados	Ascitis y edema periférico - 0 = no - 1 = leve ascitis o edema periférico - 2 = moderada ascitis o edema periférico - 3 = gran cantidad de ascitis, efusión pleural o edema periférico
		Prurito - 0 = no - 1 = episodios ocasionales - 2 = episodios regulares - 3 = se despierta por el prurito

Las puntuaciones para cada uno de los signos clínicos anteriores de cada índice se sumaron, obteniéndose de esta manera el índice de actividad clínica de la EICI de los perros del Grupo 2. En función de la puntuación obtenida en cada índice, se clasificó la enfermedad como insignificante, leve, moderada o grave, tal y como se indica a continuación en la tabla 3. Como puede observarse en dicha tabla, el índice CCECAI incluye en su clasificación, además, la categoría “Enfermedad muy grave”.

Tabla 3. Clasificación de la EICI en función de la puntuación de los índices de actividad clínica.

Índice	Enfermedad insignificante	Enfermedad leve	Enfermedad moderada	Enfermedad grave	Enfermedad muy grave
CIBDAI	0-3	4-5	6-8	>9	--
CIBDAISI	0-3	4-6	7-9	>10	--
CCECAI	0-3	4-5	6-8	9-11	>12

4.3.7. Exploración endoscópica

A todos los animales incluidos en el estudio, una vez realizadas todas las pruebas anteriormente señaladas para cada grupo, se les realizó una endoscopia digestiva superior que permitió la exploración del esófago, estómago y duodeno, así como la toma de biopsias de todas estas localizaciones para su posterior estudio histopatológico y por citometría de flujo. En el grupo de animales sanos, las pruebas previas realizadas antes de la endoscopia estaban dentro de la normalidad, mientras que en el grupo de perros con EICI, las pruebas realizadas descartaron cualquier otra causa que pudiese dar lugar a los signos clínicos gastrointestinales presentados. En aquellos perros con EICI de los que se tuvo control postratamiento, se repitió una segunda endoscopia digestiva tras la finalización del protocolo de tratamiento específico para la enfermedad.

4.3.7.1. Preparación del animal

A todos los animales incluidos en el estudio se les suprimió la alimentación 24 horas antes del procedimiento y el agua de bebida 12 horas antes del mismo, para asegurar una correcta observación de la mucosa sin restos de alimento o de líquido.

4.3.7.2. Procedimiento anestésico

El protocolo anestésico consistió en una premedicación con butorfanol (Torbugesic® Vet inyectable, Pfizer). En algunos casos, también se requirió el empleo de otros sedantes, como la medetomidina clorhidrato (Domtor® inyectable) o el hidrocloreuro de dexmedetomidina (Dexmopet® inyectable, Fatro). Aproximadamente 30 minutos después de la premedicación, se procedió a la inducción anestésica mediante propofol (Propofol-Lipuro®, B. Braun Medical S.A.). Tras la intubación endotraqueal empleando tubos de diferentes diámetros según el tamaño del animal, el mantenimiento anestésico se llevó a cabo con isoflurano (IsoFlo®, Abbott S.A.), el cual se mantuvo hasta el final de la exploración endoscópica.

4.3.7.3. Exploración endoscópica

Para la realización de las endoscopias digestivas se emplearon tres videoendoscopios, en función del tamaño del animal:

- Modelo Fujinon EG-270N5, de 110 centímetros de longitud y 5,9 milímetros de diámetro.
- Modelo Fujinon EG-200FP, de 110 centímetros de longitud y 9,8 milímetros de diámetro.
- Modelo Fujinon EC-200LR, de 180 centímetros de longitud y 14 milímetros de diámetro.

Las fotografías y videos tomados durante la exploración endoscópica se obtuvieron mediante el empleo de la grabadora médica de vídeo digital MediCap® USB200 (MediCapture Inc., Pensilvania, Estados Unidos), incluida en la columna de videoendoscopia.

Las endoscopias se realizaron con el animal situado en decúbito lateral izquierdo. En todos los animales del estudio se emplearon los índices de evaluación endoscópica para perros con EICI propuestos por el grupo de estandarización de la WSAVA y por Slovak y colaboradores en función de las lesiones macroscópicas observadas en cada tramo gastrointestinal explorado, para, del mismo modo que en los índices clínicos de la enfermedad, valorar las semejanzas y diferencias entre ellos (Washabau *et al.*, 2010; Slovak *et al.*, 2015).

El índice endoscópico propuesto por la WSAVA valora una serie de parámetros en el esófago, estómago y duodeno de perros con EICI, a cada uno de los cuales les otorga una puntuación de 0 si no se observa la lesión, 1 si se trata de una presentación leve, 2 si es moderada o 3 si la presentación es grave. La suma de estas puntuaciones aporta un dato numérico que da información sobre la alteración de la imagen macroscópica gastrointestinal en perros con EICI (Washabau *et al.*, 2010). Los parámetros evaluados con este índice se han reflejado en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros macroscópicos evaluados en el índice endoscópico de perros con EICI de la WSAVA.

Esófago	Estómago	Duodeno
Hiperemia/vascularización	Imposibilidad de dilatación	Imposibilidad de dilatación
Alteraciones en la coloración de la mucosa	Hiperemia/vascularización	Hiperemia/vascularización
Friabilidad	Edema	Edema
Hemorragia	Alteraciones en la coloración de la mucosa	Alteraciones en la coloración de la mucosa
Erosiones/úlceras	Friabilidad	Friabilidad
Contenido (moco/bilis/alimento)	Hemorragia	Irregularidad de la mucosa (textura)
Dilatación	Erosiones/úlceras	Hemorragia
Esfínter gastroesofágico	Contenido (moco/bilis/alimento)	Erosiones/úlceras
Otros	Esfínter gastroesofágico	Dilataciones linfáticas
	Paso del endoscopio a través del píloro	Contenido (moco/bilis/alimento)
	Otros	Otros

El otro índice endoscópico empleado fue el índice simplificado propuesto por Slovak y colaboradores en el cual se valoran de manera cualitativa y cuantitativa una serie de parámetros en la mucosa del estómago y duodeno cuyas características se detallan en la tabla 5 (Slovak *et al.*, 2015). El resultado también es un valor numérico que puntúa la alteración de la imagen macroscópica gastrointestinal en perros con EICI.

Tabla 5. Índice para la valoración endoscópica de perros con EICI propuesto por Slovak y colaboradores.

*El parámetro “dilataciones linfáticas” solo se evalúa en el duodeno.

Parámetro	Índice Cuantitativo		Índice Cualitativo	
	Puntuación	Descripción	Puntuación	Descripción
Friabilidad	0	Ausencia	0	Ausencia
	1	Leve sangrado al tomar biopsia		
	2	Marcado sangrado al tomar biopsia	1	Presencia
Irregularidad	0	Normal	0	Ausencia
	1	Moderada		
	2	Grave	1	Presencia
Erosiones	0	Ausencia	0	Ausencia
	1	Pocas erosiones		
	2	Erosiones de forma difusa	1	Presencia

*Dilataciones linfáticas	0	Ausencia	0	Ausencia
	1	Puntos blancos (focal- multifocal)		
	2	Puntos blancos difusos	1	Presencia

4.3.7.4. Obtención de las biopsias

Tras la valoración de las características macroscópicas de la mucosa del esófago, estómago y duodeno, se procedió a la toma de biopsias de cada localización. Para ello, se utilizaron pinzas de biopsia de tipo cazoleta sin aguja central. En función del endoscopio utilizado, las características de las pinzas eran las siguientes:

- 160 centímetros de longitud y 1,8 milímetros de diámetro (para el videoendoscopio Fujinon EG-270N5).
- 160 centímetros de longitud y 2,2 milímetros de diámetro (para el videoendoscopio Fujinon EG-200FP).
- 200 centímetros de longitud y 2,2 milímetros de diámetro (para el videoendoscopio Fujinon EC-200LR).

Durante la toma de biopsias, la pinza se orientaba perpendicular a la mucosa, con el fin de obtener muestras de la mayor profundidad posible (Washabau *et al.*, 2010). Las primeras biopsias tomadas fueron de duodeno. Inicialmente se tomaron 7 biopsias y se introdujeron en medio completo para el inmunofenotipaje mediante citometría de flujo y posteriormente se tomaron otras 6-8 de esta misma localización para su estudio histopatológico. A continuación, se tomaron otras 3-4 biopsias tanto de antro pilórico como de cuerpo gástrico para su evaluación histológica. Todas las biopsias destinadas al estudio histopatológico se introdujeron en solución de formol tamponado al 10%.

4.3.8. Estudio histopatológico de las biopsias

Las biopsias tomadas durante el procedimiento endoscópico para su evaluación histopatológica fueron procesadas por el Servicio de Histología y Anatomía Patológica del HCVC.

4.3.8.1. Procesado de las biopsias endoscópicas

Una vez tomadas las biopsias en formol tamponado comercial al 10% estabilizado con metanol a pH 7 (Panreac[®], Barcelona, España), estas fueron procesadas siguiendo el protocolo rutinario del laboratorio de diagnóstico anatomopatológico. Tras fijarse en formol durante 24 horas, se incluyeron en medio de inclusión de parafina (Histo-Comp[®], Casa Álvarez, Madrid, España) con un punto de fusión entre los 56°C y 57°C mediante un procesador automático de tejidos (Leica ASP300, Wetzlar, Alemania) y se elaboraron finalmente bloques empleando una unidad formadora de los mismos (Consola Tissue-Tek[®], Flemingweg, Países Bajos, dotada de un dispensador de parafina, consola térmica y crioconsola de Miles Scientific[®], Newark, Estados Unidos). Una vez obtenidos los bloques con las muestras, se realizaron cortes de las mismas de 4-5 µm de grosor utilizando para ello un micrótomos de rotación (LEICA RM 2155, Wetzlar, Alemania).

Posteriormente, las secciones de las muestras de cuerpo gástrico, antro pilórico y duodeno, se desparafinaron en xilol y se hidrataron en una serie decreciente de alcoholes para llevar a cabo su tinción. La tinción empleada fue hematoxilina-eosina, siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio de diagnóstico anatomopatológico, ya que esta tinción permite una buena identificación de los componentes generales que integran la mucosa del tracto gastrointestinal. Finalmente, tras la tinción, las muestras fueron deshidratadas en alcoholes de grados decrecientes y montadas para su observación empleando DPX[®] (Casa Álvarez, Madrid, España).

4.3.8.2. Valoración histopatológica

Para la evaluación y diagnóstico de las muestras se empleó un microscopio óptico Leica DM200. Asimismo, la obtención de la iconografía histológica se realizó mediante la utilización de la cámara digital Leica ICC50W y el programa cellSens Entry[®].

En la valoración de las lesiones histológicas de las biopsias endoscópicas de todos los perros del estudio se emplearon el índice de clasificación propuesto por la WSAVA y el índice simplificado de Allenspach y colaboradores para perros con EICI (Day *et al.*, 2008; Allenspach *et al.*, 2019) y así poder establecer semejanzas y diferencias entre ambos. Cada uno de estos índices evalúa una serie de parámetros tanto morfológicos como inflamatorios en estómago y duodeno, como se detalla en la tabla 6, otorgando una puntuación de 0 a 3 en función de la gravedad de la lesión observada, siendo 0 normal, 1 leve, 2 moderado y 3 grave. El resultado de la suma de estos parámetros es un valor numérico que informa de la gravedad histológica de la

enfermedad. Además, estos valores también se agruparon por separado para conocer la gravedad en cuanto a la morfología y el proceso inflamatorio de cada localización.

Tabla 6. Índices empleados para la valoración histopatológica de las biopsias endoscópicas.

	Índice WSAVA (Day <i>et al.</i> , 2008)	Índice simplificado Allenspach y col. (Allenspach <i>et al.</i> , 2019)
Estómago		
Parámetros morfológicos	Lesión epitelial	Fibrosis
	Lesión en fosas gástricas	
	Fibrosis y atrofia de mucosa y/o glandular	
Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	Linfocitos intraepiteliales
	Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia
	Eosinófilos en la lámina propia	
	Neutrófilos en la lámina propia	Eosinófilos en la lámina propia
	Hiperplasia de folículos linfoides	Neutrófilos en la lámina propia
Duodeno		
Parámetros morfológicos	Atrofia de las vellosidades	Atrofia de las vellosidades
	Lesión epitelial	Lesión epitelial
	Dilatación de las criptas	Dilatación de las criptas
	Dilataciones linfáticas	Dilataciones linfáticas
	Fibrosis de la mucosa	
Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia
	Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	
	Eosinófilos en la lámina propia	Eosinófilos en la lámina propia
	Neutrófilos en la lámina propia	Neutrófilos en la lámina propia

4.4. PROTOCOLO DE TRATAMIENTO PARA LA EICI

A todos los perros con EICI se les aplicó un protocolo de tratamiento dietético y farmacológico, tal y como se detalla en los siguientes apartados.

4.4.1. Tratamiento dietético

El tratamiento dietético consistió en un cambio de alimentación progresivo, a lo largo de una semana aproximadamente, hacia una dieta comercial a base de hidrolizados proteicos. Las dietas empleadas fueron Royal Canin Hypoallergenic® (Royal Canin®, Aimargues, Francia) o Canine z/d de Hill's® (Hill's™ Pet Nutrition®/TM, Therwil, Suiza). Una vez instaurada la nueva dieta, se recomendó una administración racionada en tres tomas diarias y se insistió a los propietarios sobre la importancia de la exclusividad de la dieta prescrita y de la necesidad de evitar cualquier otro tipo de suplementación alimentaria. En todos los perros con EICI del estudio, la dieta se instauró como mínimo tres semanas antes de la realización de la endoscopia, y solo en aquellos casos en los que no hubo respuesta completa al ensayo dietético se continuó con el protocolo diagnóstico. Además, este tratamiento dietético se administró de forma indefinida en todos los perros con EICI.

4.4.2. Tratamiento farmacológico

El protocolo de tratamiento farmacológico se instauró en todos los perros con EICI linfoplasmocitaria una vez conocido el diagnóstico histopatológico. El tratamiento tuvo una duración de 90 días y estuvo constituido por:

- Metronidazol en forma de comprimidos orales de 250 mg, a dosis de 10 mg/kg/12 horas, vía oral, durante 21 días.
- Prednisona o prednisolona en forma de comprimidos de 2,5, 5, 10 o 30 mg, a dosis de:
 - 1 mg/kg/12 horas, vía oral, durante 10 días.
 - 0,5 mg/kg/12 horas, vía oral, durante 10 días.
 - 0,5 mg/kg/24 horas, vía oral, durante 10 días.
 - 0,5 mg/kg/48 horas, vía oral, durante 60 días.

4.5. PUESTA A PUNTO DE LOS PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA CITOMETRÍA DE FLUJO

Tras una revisión de la literatura en este sentido, se seleccionaron un conjunto de protocolos para el aislamiento de los linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia del intestino delgado, que permitiesen su posterior estudio independiente mediante el empleo de citometría de flujo.

4.5.1. Aislamiento de los linfocitos intraepiteliales duodenales

Para el aislamiento de los linfocitos intraepiteliales (LIE) del intestino delgado se compararon tres protocolos propuestos por varios grupos de trabajo para su aplicación en muestras intestinales de varias especies, incluidas la especie canina (Howard *et al.*, 2005; Carrasco *et al.*, 2013; Haas *et al.*, 2014). Estos protocolos se basan en el empleo de dos quelantes iónicos, 1,4-dithiothreitol (DTT) y EDTA, utilizados a una concentración determinada, pero a diferentes temperaturas y velocidades de agitación, para lograr el desprendimiento del epitelio sin afectar a la lámina propia intestinal.

Para la puesta a punto de los protocolos, inicialmente se emplearon muestras intestinales de animales eutanasiados por otros fines ajenos al estudio, procedentes del Centro de Protección Animal de Madrid Salud. Finalmente, la comprobación de su utilidad fue analizada con biopsias de perros vivos recogidas durante la realización de endoscopias digestivas con fines diagnósticos en la consulta de Gastroenterología y Endoscopia del HCVC previo consentimiento informado de los propietarios.

Para cada protocolo se emplearon siete biopsias, con un peso medio de 35 mg cada una, tomadas con pinzas de biopsia con copa ovalada de borde liso de 2,2 mm. Las muestras se introdujeron en una solución de digestión con solución balanceada HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*, Biowest, Nuaille, Francia) más 1mM de DTT y 1 mM de EDTA (ambos de Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) y se agitaron mediante la utilización de un baño de agitación. Los protocolos y sus características se indican en la tabla 7.

Tabla 7. Protocolos de aislamiento para LIE.

Protocolo	Tiempo	Temperatura	Velocidad de agitación
Suave	25 minutos	24°	75 rpm*
Intenso	15 minutos (DTT)	24°	75 rpm
	90 minutos (EDTA)	37°	
Muy intenso	90 minutos	37°	120 rpm

*rpm: revoluciones por minuto.

Posteriormente, se filtró el sobrenadante (donde se encontraban los LIE) a través de malla de nylon de 40 μm (Biowest, Nuaille, Francia) y se centrifugó a 1300 rpm a 4°C durante 10 minutos. Finalmente, se realizó un lavado con tampón fosfato salino (PBS, Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) con 2% de suero fetal bovino (SFB, Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) y se resuspendió la muestra en medio completo a base de RPMI-1640, suplementado con 2% de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de anfotericina B (todos de Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), para su posterior análisis mediante citometría de flujo.

El protocolo a emplear en este proyecto de tesis doctoral para la obtención de LIE se seleccionó de entre los tres anteriores basándonos en la viabilidad celular, la observación histológica de la capacidad para eliminar la capa epitelial y el rendimiento de las muestras en el análisis por citometría de flujo, como se detallará en la sección de resultados. La viabilidad celular fue calculada mediante el empleo de 7-aminoactinomicina D (7-AAD, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y citometría de flujo. El 7-AAD se une al ADN, pudiendo solo penetrar en aquellas células con la membrana celular dañada e indicándonos el porcentaje de células muertas.

4.5.2. Aislamiento de los linfocitos de la lámina propia duodenal

Tras la obtención de los LIE, las biopsias se siguieron procesando para la obtención de los linfocitos de la lámina propia duodenal (LLP). Inicialmente, las biopsias se introdujeron en una solución de lavado con HBSS, 5% de SFB y 0,36% de glucosa (Biowest, Nuaille, Francia) y se agitaron en un baño a 37°C durante 10 minutos a 120 rpm para la eliminación de los restos de DTT y EDTA.

En el caso de los LLP, se probaron seis protocolos diferentes para su obtención. Se empleó un protocolo de cultivo, cuatro enzimáticos mediante la utilización de colagenasa II y un protocolo

basado en métodos mecánicos. El método de cultivo, propuesto por Carrasco y colaboradores, consiste en la introducción de las biopsias en medio completo durante 24 horas y una atmósfera de 37°C y 5% de CO₂, produciéndose bajo estas condiciones la salida espontánea de los LLP al medio (Carrasco *et al.*, 2013). Los métodos enzimáticos, por su parte, consisten en el empleo de colagenasa II para la rotura del colágeno de la lámina propia y la liberación de los LLP al medio. Las biopsias se introdujeron en una solución de digestión con diferentes concentraciones de colagenasa II y se incubaron en el baño de agitación a 37°C durante diferentes tiempos y velocidades siguiendo los protocolos propuestos por diferentes grupos de investigación con ciertas modificaciones (Howard *et al.*, 2005; Barbosa, 2011; Carrasco *et al.*, 2013). Por último, el método mecánico consiste en la liberación de los LLP al medio como consecuencia de la rotura del colágeno de la lámina propia debida únicamente a la agitación y golpeo de las biopsias con el recipiente que las contiene (Carrasco *et al.*, 2013). Las especificaciones concretas de cada protocolo se han reflejado en la tabla 8.

Tabla 8. Protocolos de aislamiento para LLP.

Protocolo	Solución	Tiempo	Condiciones	Velocidad de agitación
Cultivo (Carrasco <i>et al.</i> , 2013)	Medio completo	24 horas	37°C y 5% CO ₂	--
Enzimático 1 (Barbosa, 2011)	PBS+0,11 mg/mL de colagenasa II	45 minutos (x4)	37°C	120 rpm
Enzimático 2 (Barbosa, 2011) modificado	PBS+0,11 mg/mL de colagenasa II	3 horas	37°C	120 rpm
Enzimático 3 (Howard <i>et al.</i> , 2005) modificado	PBS+0,11 mg/mL de colagenasa II	90 minutos	37°C	200 rpm
Enzimático 4 (Carrasco <i>et al.</i> , 2013) modificado	PBS+0,5 µg/mL de colagenasa II+1% penicilina-estreptomicina+1% anfotericina B+ 0,5% ASB*	16 horas y 30 minutos	37°C	120 rpm
Mecánico (Carrasco <i>et al.</i> , 2013)	PBS +1% penicilina-estreptomicina+1% anfotericina B+ 0,5% ASB*	16 horas y 30 minutos	37°C	120 rpm

*ABS: albúmina sérica bovina (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos)

Para la elección del protocolo más adecuado en este caso, nos basamos en la viabilidad celular y en el rendimiento del análisis por citometría de flujo, poniendo especial atención al marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-CD4, ya que los métodos enzimáticos dañan este marcador celular (Carrasco *et al.*, 2013).

4.6. CITOMETRÍA DE FLUJO

Los estudios de citometría de flujo consistieron en el inmunofenotipaje de las poblaciones de linfocitos T, T citotóxicos, T colaboradores, T dobles positivos, T dobles negativos, T reguladores, T productores de IFN- γ e IL-4 y el estado de activación de estas células tanto de sangre periférica como de las biopsias intestinales obtenidas por endoscopia, y de los linfocitos Th1 y Th2 de sangre periférica de todos los perros del estudio. Cabe mencionar en este punto que el daño del marcador celular CD4 por los productos de activación celular empleados, que ha sido descrito con anterioridad (Palatucci *et al.*, 2018), nos impidió llevar a cabo la correcta caracterización de las poblaciones Th1 y Th2 a nivel intestinal. Por ello, se decidió evaluar la producción de IFN- γ e IL-4 de forma global por parte de los linfocitos T, ya que tanto los linfocitos Th, Tc, T dobles positivos y T dobles negativos son capaces de producir dichas citocinas (Schroder *et al.*, 2004; Young y Bream, 2007; Billiau y Matthys, 2009; Paul, 2015; Ho y Miaw, 2016)

Además, en los perros con EICI linfoplasmocitaria en los que se pudo llevar a cabo una reevaluación después del tratamiento, el inmunofenotipaje de las poblaciones linfocitarias mencionadas también se repitió tras la finalización de la terapia farmacológica específica detallada en el apartado 4.4. de esta sección. Las muestras, tanto de sangre periférica como intestinales, fueron procesadas en las primeras 2 horas tras su extracción.

La lectura de estas muestras fue llevada a cabo en el Centro de Ayuda a la Investigación de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la UCM, empleando para ello un citómetro de flujo FACSCalibur[®] (Becton-Dickinson, San José, California, Estados Unidos).

4.6.1. Anticuerpos monoclonales empleados

Los anticuerpos monoclonales empleados en este estudio fueron específicos frente a grupos de diferenciación (CD) y otras moléculas linfocitarias caninas o frente a CD u otras moléculas linfocitarias humanas o bovinas, pero con reacción cruzada para su empleo en la especie canina (Pedersen *et al.*, 2002). Para poder determinar las diferentes poblaciones linfocitarias planteadas, se emplearon ciertas combinaciones de anticuerpos conjugados con varios fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), Alexa Fluor[®] 647, el tándem ficoeritrina-cianina 7 (PECy7) y alofococianina (APC). Estas combinaciones de anticuerpos y fluorocromos se detallarán más adelante, pero el objetivo fue seleccionar el panel más adecuado que evitase interferencias de la fluorescencia durante la lectura en el citómetro.

Todos los anticuerpos monoclonales utilizados fueron suministrados por Bio-Rad (Oxford, Reino Unido), salvo el anticuerpo frente a FoxP3, que fue adquirido a Thermo Fisher (Massachusetts, Estados Unidos). Sus especificaciones se detallan en la tabla 9.

Tabla 9. Anticuerpos monoclonales empleados en el estudio de citometría de flujo.

Especificidad	Descripción	Clon	Fenotipo reconocido	Conjugado con el fluorocromo	Concentración del anticuerpo
CD45	IgG2b de rata anti CD45 canino	YKIX716.13	Leucocitos	APC	1 mg/mL
CD3	IgG1 de ratón anti CD3 canino	CA17.2A12	Linfocitos T	FITC	0,1 mg/mL
CD4	IgG2a de rata anti CD4 canino	YKIX302.9	Linfocitos Th	PECy7	1 mg/mL
CD8	IgG1 de rata anti CD8 canino	YCATE55.9	Linfocitos Tc	Alexa Fluor® 647	0,05 mg/mL
CD25	IgG1 de ratón anti CD25 canino	P4A10	Linfocitos activados	PE	1 mg/mL
FoxP3	IgG2a de rata y ratón anti FoxP3 humano	FJK-16s	Linfocitos reguladores	APC	0,2 mg/mL
IL-4	IgG2a de ratón anti IL-4 bovino	CC303	Linfocitos productores de IL-4	PE	1 mg/mL
IFN- γ	IgG1 anti IFN- γ bovino	CC302	Linfocitos productores de IFN- γ	Alexa Fluor® 647	0,05 mg/mL

4.6.2. Aislamiento linfocitario en sangre periférica

La obtención de la muestra de sangre para su inmunofenotipaje se llevó a cabo durante la realización del procedimiento endoscópico. Se tomaron 6 mL de sangre mediante punción yugular y se introdujeron en tubos con el anticoagulante EDTA. A continuación, se procedió al aislamiento de los linfocitos sanguíneos para su posterior marcaje y análisis por citometría de flujo. Todo el proceso se realizó en cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones.

Inicialmente, los 6 mL de sangre periférica fueron homogeneizados en otros 6 mL de solución PBS suplementada con 2% de SFB. A continuación, esta mezcla fue centrifugada en un gradiente de densidad (Histopaque 1077®, Merck, St. Louis, Misuri, Estados Unidos) en proporción 1:2 a 1900 rpm y temperatura ambiente durante 45 minutos, para la obtención de las células mononucleares sanguíneas (PBMCs, de sus siglas en inglés). Una vez aislados los PBMCs, se realizaron dos lavados con la misma solución de PBS anterior, incorporando en el

segundo lavado bicarbonato 4,1 mM para lisar los posibles eritrocitos presentes. Para enriquecer la muestra y eliminar la mayor cantidad de monocitos posibles, los PBMCs fueron resuspendidos en medio completo y sometidos a cultivo en una atmósfera con 5% de CO₂ y 37°C durante 90 minutos, ya que en estas condiciones los monocitos tienden a adherirse a la superficie, mientras que los linfocitos se mantienen en suspensión (Horiuchi *et al.*, 2007; Martínez-Rodrigo *et al.*, 2019). Posteriormente, se recogió el sobrenadante, se centrifugó a 1300 rpm a 4°C durante 10 minutos y se resuspendió nuevamente en 950 µL de medio completo, obteniendo de esta manera los linfocitos de sangre periférica para su estudio por citometría de flujo.

4.6.3. Aislamiento de linfocitos intraepiteliales duodenales

Del mismo modo que para el procesamiento de la sangre, el manejo de las muestras endoscópicas también se realizó en cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones.

Tras los ensayos descritos previamente que fueron llevados a cabo para la puesta a punto del protocolo de aislamiento de LIE, se seleccionó el protocolo denominado “muy intenso”, tal y como se detallará en el apartado de resultados de esta memoria, mostrando los datos que llevaron a seleccionar dicho método.

Con este método, las siete biopsias endoscópicas recogidas en medio completo fueron sometidas inicialmente a un proceso para la eliminación del epitelio de la mucosa intestinal y la obtención de los LIE. Para ello, fueron introducidas en 13 mL de solución de HBSS junto con 13 µL de DTT y 26 µL de EDTA e incubadas en un baño de agitación a 120 rpm y 37°C durante 90 minutos. Tras la incubación, el sobrenadante (con los LIE) fue filtrado a través de una malla de nylon de 40 µm y centrifugado a 1300 rpm a 4°C durante 10 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado de la muestra con solución PBS suplementada con 2% de SFB. Finalmente, los LIE aislados se resuspendieron en 950 µL de medio completo para su análisis por citometría de flujo.

4.6.4. Aislamiento de linfocitos de la lámina propia duodenal

Como ya se comentó en el apartado de puesta a punto de los protocolos de aislamiento y de citometría de flujo, las biopsias recuperadas del paso anterior se siguieron procesando para la obtención de los LLP. En este caso el protocolo seleccionado para su obtención fue el mecánico, describiéndose los motivos de su selección en el apartado de resultados de esta tesis doctoral.

Con dicho método, inicialmente, las biopsias se introdujeron en 5,5 mL de una solución de lavado con HBSS suplementado con 5% de SFB y 0,36% de glucosa y se agitaron en el baño de agitación durante 10 minutos a 37°C y 120 rpm para eliminar los restos de los quelantes iónicos empleados para la eliminación de la capa epitelial.

A continuación, se traspasaron a otros 5,5 mL de solución de PBS suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de anfotericina B y un 0,5% de ASB y se incubaron durante 16 horas y media en el baño de agitación, empleando las mismas condiciones que en la fase de lavado. Una vez transcurrido este periodo, el sobrenadante con los LLP fue filtrado a través de una malla de nylon de 40 µm, centrifugado y lavado como se ha descrito previamente para los LIE y finalmente la muestra se resuspendió también en 950 µL de medio completo para su posterior inmunofenotipaje.

4.6.5. Protocolo de marcaje de los linfocitos para su análisis por citometría de flujo

La metodología empleada para el marcaje linfocitario consistió en una modificación de varias técnicas descritas previamente para el marcaje de linfocitos de sangre periférica y del epitelio duodenal caninos (Biller *et al.*, 2007; Villaescusa *et al.*, 2012c; Haas *et al.*, 2014). Todos los anticuerpos incluidos en el trabajo fueron titulados de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes, en cada uno de los tres diferentes aislados linfocitarios.

4.6.5.1. Protocolo de marcaje para la determinación de las poblaciones de linfocitos objeto de estudio

Para el inmunofenotipaje y la determinación de las poblaciones de linfocitos T propuestas, se enfrentaron las células problema tanto sanguíneas como intestinales a cuatro combinaciones diferentes de anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos destinados al marcaje de ciertas moléculas tanto de superficie como intracelulares. Así, la caracterización de las poblaciones linfocitarias de interés se basó en la presencia o ausencia de las siguientes moléculas:

- Linfocitos T: CD45+CD3+
- Linfocitos Th: CD3+CD4+
- Linfocitos Tc: CD3+CD8+

- Linfocitos Th activados: CD3+CD4+CD25+
- Linfocitos Tc activados: CD3+CD8+CD25+
- Linfocitos T dobles positivos: CD3+CD4+CD8+
- Linfocitos T dobles negativos: CD3+CD4-CD8-
- Linfocitos Treg: CD3+CD4+CD25+FoxP3+
- Linfocitos T productores de IFN- γ : CD3+ IFN- γ +
- Linfocitos T productores de IL-4: CD3+IL-4+
- Linfocitos Th1: CD3+CD4+ IFN- γ + (en sangre periférica)
- Linfocitos Th2: CD3+CD4+IL-4+ (en sangre periférica)

Los tubos de citometría empleados tanto para los linfocitos de sangre periférica como para los LIE y los LPP, con las combinaciones y cantidades de anticuerpos añadidos en las distintas incubaciones realizadas, así como las moléculas tanto de superficie como intracelulares detectadas, se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Panel de anticuerpos empleados en cada tubo para el estudio de citometría de flujo.

Tubo	Anticuerpos añadidos en la primera incubación	Anticuerpos añadidos en la segunda incubación	Moléculas de superficie detectadas	Moléculas intracelulares detectadas
1	---	---	---	---
2	3 μ L de anti-CD45 y 3 μ L de anti-CD3	---	CD45,CD3	---
3	3 μ L de anti-CD3, 3 μ L de anti-CD4, 3 μ L de anti-CD8 y 5 μ L de anti-CD25	---	CD3, CD4, CD8 y CD25	---
4	3 μ L de anti-CD3, 3 μ L de anti-CD4 y 5 μ L de anti-CD25	5 μ L de anti-FoxP3	CD3,CD4 y CD25	FoxP3
5	3 μ L de anti-CD3 y 3 μ L de anti-CD4	5 μ L de anti-IL-4 y 5 μ L de anti-IFN- γ	CD3 y CD4	IL-4 e IFN- γ

El protocolo de marcaje linfocitario se llevó a cabo en los siguientes pasos:

- Para cada aislado linfocitario, bien de los linfocitos de sangre periférica, de los LIE o de los LPP, se añadieron 100 μ L de muestra en los tubos 1, 2, 3 y 4.
- A continuación, en los tubos 2, 3 y 4, se añadieron 2 μ L de suero de rata y de ratón (Bio-Rad, Oxford, Reino Unido) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad para luego incorporar los anticuerpos de la primera incubación detallados en la tabla 10. Tras incubar nuevamente la muestra en presencia de los anticuerpos 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz, se realizó un lavado de cada tubo con 2 mL

de solución de lavado constituida por PBS, 1% de ASB y 0,36% de glucosa (PBS/ASB) y se centrifugaron a 1300 rpm y 4°C durante 10 minutos. El paso de lavado también se realizó en el tubo 1.

- Tras eliminar el sobrenadante, las muestras de los tubos 1, 2 y 3 se resuspendieron en 200 µL de un fijador celular especial para citometría de flujo (BD CellFic™, de Beckton Dickinson, Bélgica) para su posterior lectura en el citómetro de flujo.
- En el caso del tubo 4, se llevó a cabo un proceso de permeabilización para poder realizar el marcaje intracelular indicado en la tabla 10, empleando un kit de fijación/permeabilización celular (Leucoperm®, Bio-Rad, Oxford, Reino Unido). Para ello, a continuación del lavado de la primera incubación, la muestra se resuspendió en 100 µL del reactivo de fijación y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se realizó un nuevo lavado para añadir otros 100 µL del reactivo de permeabilización e incorporar el anticuerpo anti-FoxP3 a la muestra. Tras una nueva incubación en las mismas condiciones que las previamente detalladas con este anticuerpo, se realizó un lavado final para resuspender la muestra en 200 µL del fijador celular para citometría de flujo y llevar a cabo su análisis.
- En el caso del tubo 5, de forma previa a la realización de ningún marcaje, las muestras se sometieron a un protocolo de activación celular que permitiese la detección de las citocinas IFN-γ e IL-4. Para ello, 400 µL de cada uno de los tres aislados linfocitarios se introdujeron en una placa de cultivo con 600 µL de medio completo y se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ y 37°C durante 24 horas añadiendo los productos para la activación celular (forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), Enzo®, Nueva York, Estados Unidos; ionomicina, StressMarq Bioscience INC. Victoria, Canadá; y Brefeldin A, Enzo®, Nueva York, Estados Unidos), tal y como se indica en la tabla 11. Tras la activación, se recogió el sobrenadante y se realizó un lavado con solución PBS/ASB, para llevar a cabo posteriormente el marcaje tanto superficial como intracelular detallado previamente para el resto de tubos, empleando los anticuerpos indicados en la tabla 10 para este tubo de citometría.

Tabla 11. Protocolo de activación para la detección de las poblaciones linfocitarias productoras de IFN-γ e IL-4.

Compuesto	Concentración	Volumen solución madre	Volumen disolvente (PBS)	Volumen dilución añadido	Tiempo de actuación
PMA	10 ng/mL	0,5 µL	6,25 mL	5 µL	24 horas
Ionomicina	0,284 µg/mL	0,5 µL	71 µL	5,7 µL	24 horas
Brefeldin A	1 µg/mL	0,5 µL	10 µL	1 µL	10 horas

4.6.5.2. Análisis de las poblaciones linfocitarias e inmunofenotipaje

Una vez procesadas las muestras, el análisis de las poblaciones leucocitarias planteadas en este estudio se realizó con un citómetro de flujo FACSCalibur®, que cuenta con dos fuentes de excitación: un láser de argón de 15mW que emite a 488 nm y un diodo láser rojo que emite a 635 nm.

Los parámetros analizados para cada célula fueron:

- Dispersión frontal de luz (FSC), que aporta información sobre el tamaño de la célula.
- Dispersión lateral de luz (SSC), que proporciona información sobre la complejidad celular.
- Fluorescencia verde (detector FL1): la cantidad de fluorescencia verde emitida por las células de nuestro trabajo estaba directamente relacionada con la cantidad de anticuerpos monoclonales conjugados con FITC que se unieron a ella (anti-CD3). El citómetro detectó la fluorescencia resultante, de color verde, en el detector FL1, que recoge la emisión de fluorescencia a 530/30 nm.
- Fluorescencia amarilla-anaranjada (detector FL2): en este estudio, la cantidad de fluorescencia naranja emitida por las células fue proporcional a la cantidad de anticuerpos conjugados con PE que se unieron a su superficie (anti-CD14, anti-CD25 y anti-IL-4). El detector FL2 recoge la emisión de fluorescencia a 582/42 nm.
- Fluorescencia roja (detector FL3): la cantidad de fluorescencia roja emitida por las células de nuestro estudio era proporcional a la cantidad de anticuerpos conjugados con el tándem PE-Cy7 que se unieron a su superficie (anti-CD4). El detector FL3 recoge la fluorescencia emitida por las células a 650LP nm.
- Fluorescencia de color rojo lejano (detector FL4): en este estudio, la cantidad de fluorescencia de color rojo lejano emitida por las células fue proporcional a la cantidad de anticuerpos conjugados con Alexa Fluor® 647 o con APC que se unieron a su superficie (anti-CD8, anti-FoxP3 y anti-IFN- γ) y fue recogida por el detector FL4, a 661/16 nm.

Los parámetros fueron adquiridos en forma de histogramas mono y biparamétricos y en modo lista. Posteriormente, los resultados se analizaron mediante el empleo de los programas informáticos CellQuest® versión 3.3 o FlowJo V10®.

Como se observa en la imagen 1, para el análisis de las muestras objeto de estudio, se delimitó la región de linfocitos empleando para ello las características de dispersión de la luz (SSC

y FSC) y la emisión de fluorescencia en FL4 del tubo 2, consecuencia de la unión del anti-CD45 conjugado con el fluorocromo APC, ya que la molécula CD45 está presente en todos los leucocitos.

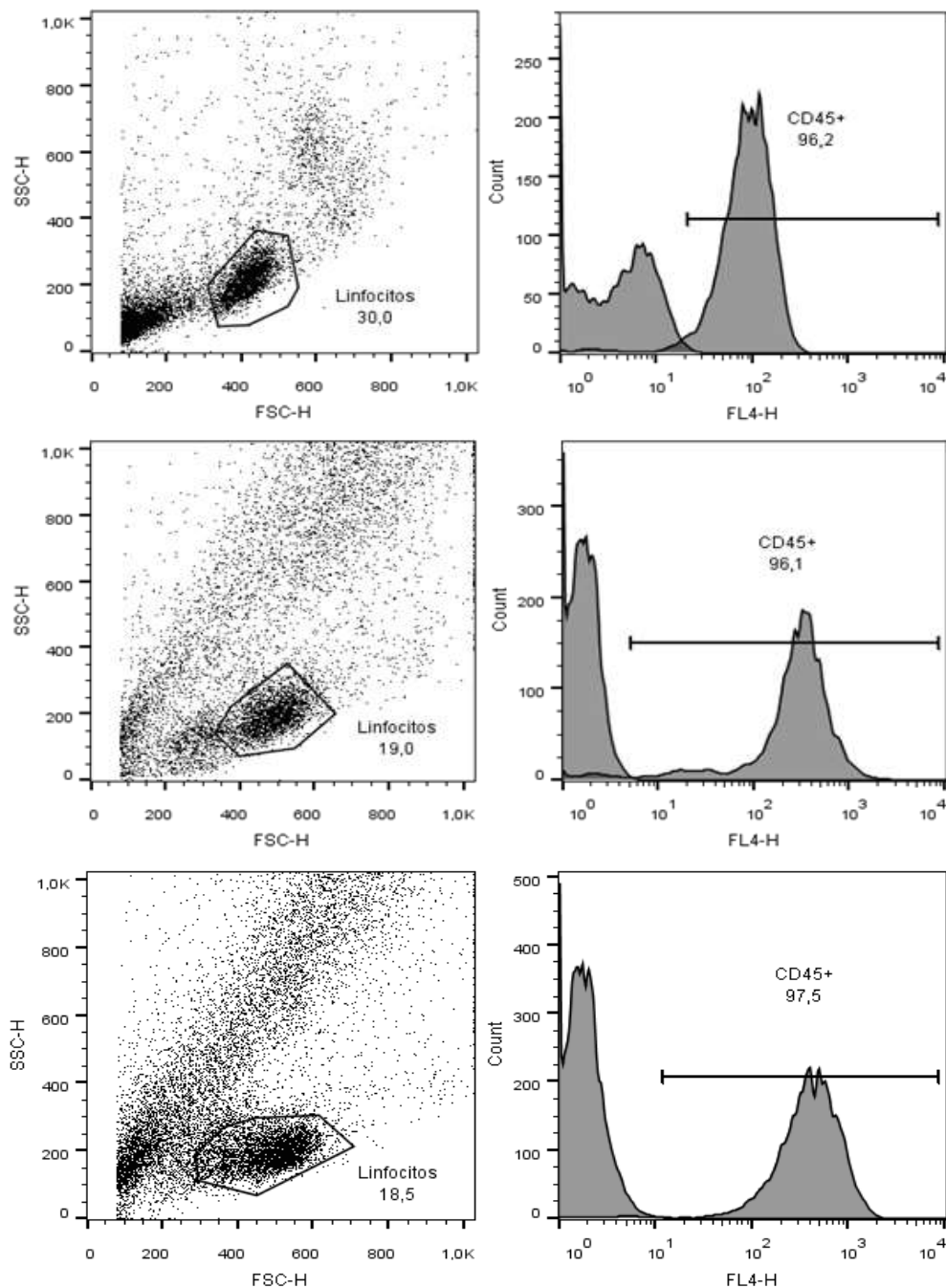


Imagen 1. A: Representación gráfica del tubo 2 de los linfocitos de sangre periférica. **A1:** Citograma de dispersión con la región de linfocitos sanguíneos acotada. **A2:** Histograma de la población de linfocitos sanguíneos positivos a CD45+. **B:** Representación gráfica del tubo 2 de los LIE. **B1:** Citograma de dispersión con la región de LIE acotada. **B2:** Histograma de la población de LIE positivos a CD45+. **C:** Representación gráfica del tubo 2 de los LLP. **C1:** Citograma de dispersión con la región de LLP acotada. **C2:** Histograma de la población de LLP positivos a CD45+.

Posteriormente, las poblaciones de linfocitos T de interés se determinaron empleando las características de fluorescencia a partir de la región linfocitaria previamente acotada. Para el análisis se adquirieron, al menos, 10.000 eventos de la región de linfocitos y se emplearon como controles el tubo 1 o sin marcaje, los isotipos correspondientes a cada anticuerpo utilizado y la fluorescencia menos uno (FMO, de sus siglas en inglés), que permite analizar los anticuerpos de un tubo problema de forma individual. Así, por ejemplo, en el tubo 2 en el que añadimos anti-CD45 y anti-CD3, se emplearon otros dos tubos en los que la muestra solo se marcó con anti-CD45 o anti-CD3, respectivamente, de modo que posteriormente se pudieron delimitar correctamente los puntos de fluorescencia del tubo problema.

Los análisis de fluorescencia empleados para la caracterización de cada una de las poblaciones de linfocitos de interés fueron los siguientes:

- *Linfocitos T*: el porcentaje de esta población se determinó a partir del análisis del tubo 2. Se consideraron linfocitos T aquellos positivos tanto a CD45 como a CD3 (imagen 2).

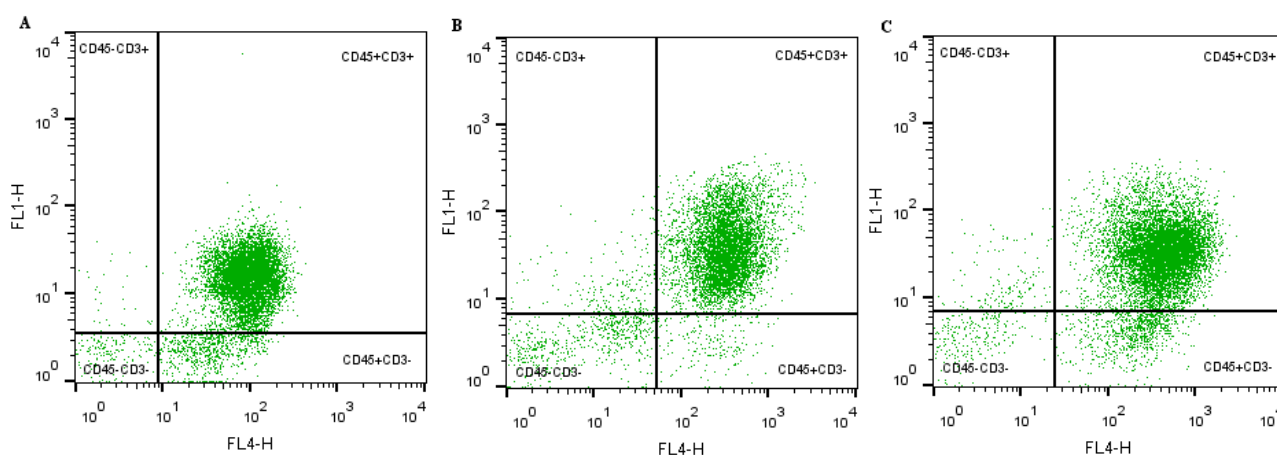


Imagen 2. Citogramas de fluorescencia del tubo 2 con cuadrantes para el análisis de linfocitos T (CD45+CD3+) en sangre periférica (A), LIE (B) y LLP (C).

- *Linfocitos Th, Tc, T dobles positivos y T dobles negativos*: el porcentaje de estas poblaciones se calculó a partir del análisis del tubo 3. Inicialmente, se acotó la región de linfocitos positivos a CD3, definidos como linfocitos T, y, a continuación, en esa población se enfrentaron en un citograma de fluorescencia biparamétrico las moléculas CD4 y CD8, determinando así las poblaciones citadas (imagen 3)

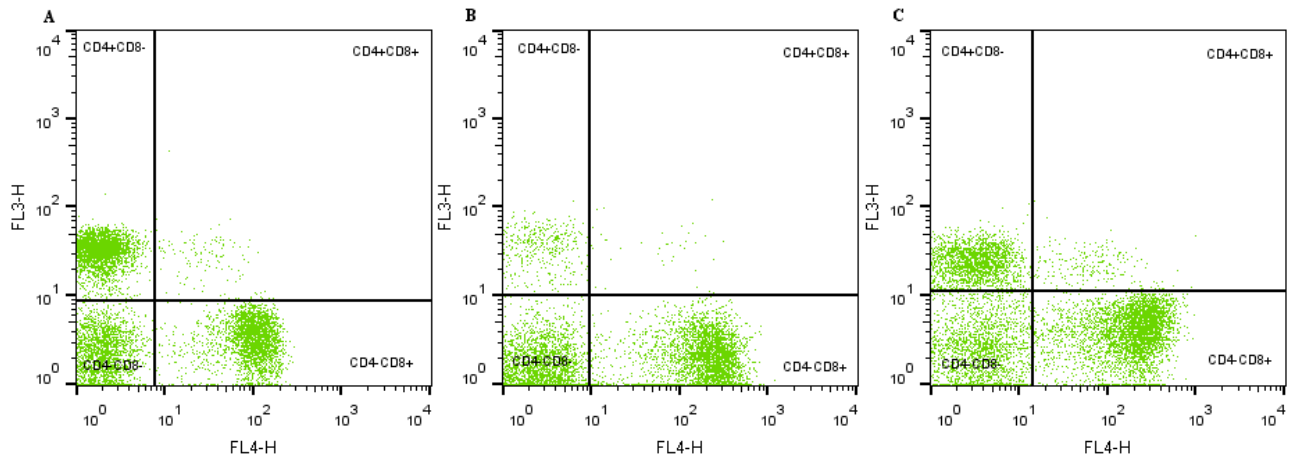


Imagen 3. Citogramas de fluorescencia del tubo 3 con cuadrantes para el análisis de linfocitos Th ($CD4+CD8^-$), Tc ($CD4-CD8^+$), T dobles positivos ($CD4+CD8^+$) y T dobles negativos ($CD4-CD8^-$) en sangre periférica (A), LIE (B) y LLP (C).

- *Linfocitos Th y Tc activados:* el cálculo de estas poblaciones se llevó a cabo a partir de la selección de las poblaciones de linfocitos Th y Tc del tubo 3, para después realizar un histograma y determinar el porcentaje de linfocitos Th y Tc positivos a CD25 y, por lo tanto, activados (imagen 4).

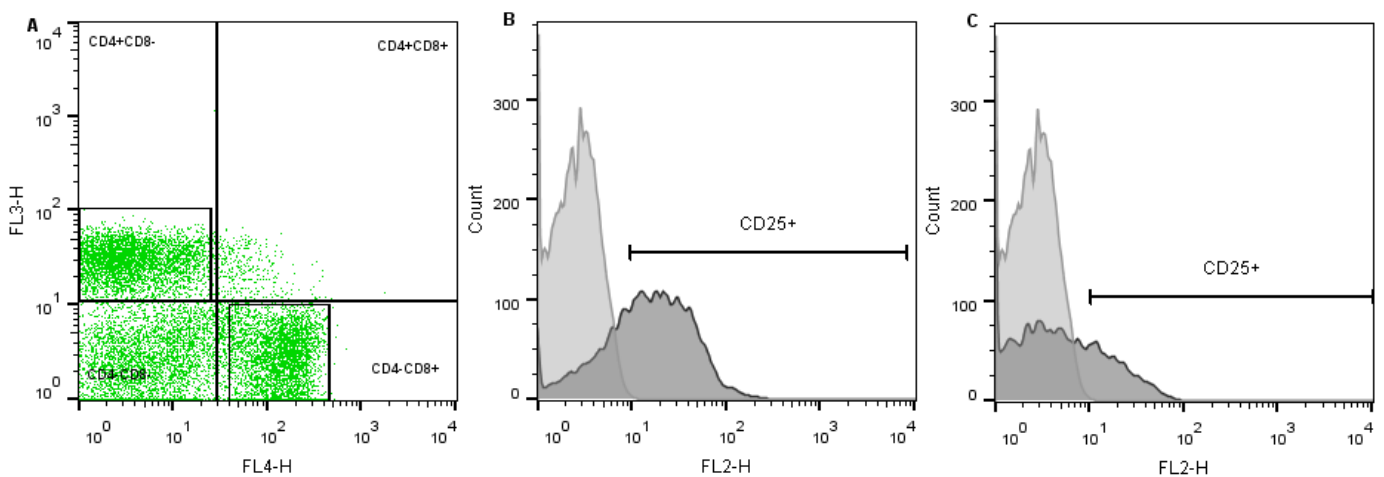


Imagen 4. A: Citograma de fluorescencia del tubo 3 con acotamiento de las poblaciones Th ($CD4+CD8^-$) y Tc ($CD4-CD8^+$) en los LLP. **B:** Histograma para determinar el porcentaje de linfocitos Th activados ($CD25^+$) en los LLP. **C:** Histograma para determinar el porcentaje de linfocitos Tc activados ($CD25^+$) en los LLP.

- *Linfocitos Treg*: el porcentaje de linfocitos Treg se calculó a partir del análisis del tubo 4. Inicialmente dentro de la población de linfocitos, se realizó un citograma de fluorescencia enfrentando las moléculas CD3 y CD4 para seleccionar la población CD3+CD4+ y, dentro de ellas, seleccionar aquellas positivas a CD25 y FoxP3 mediante otro citograma de fluorescencia biparamétrico, como se observa en la imagen 5. El porcentaje de linfocitos Treg se calculó respecto al número total de linfocitos de la muestra.

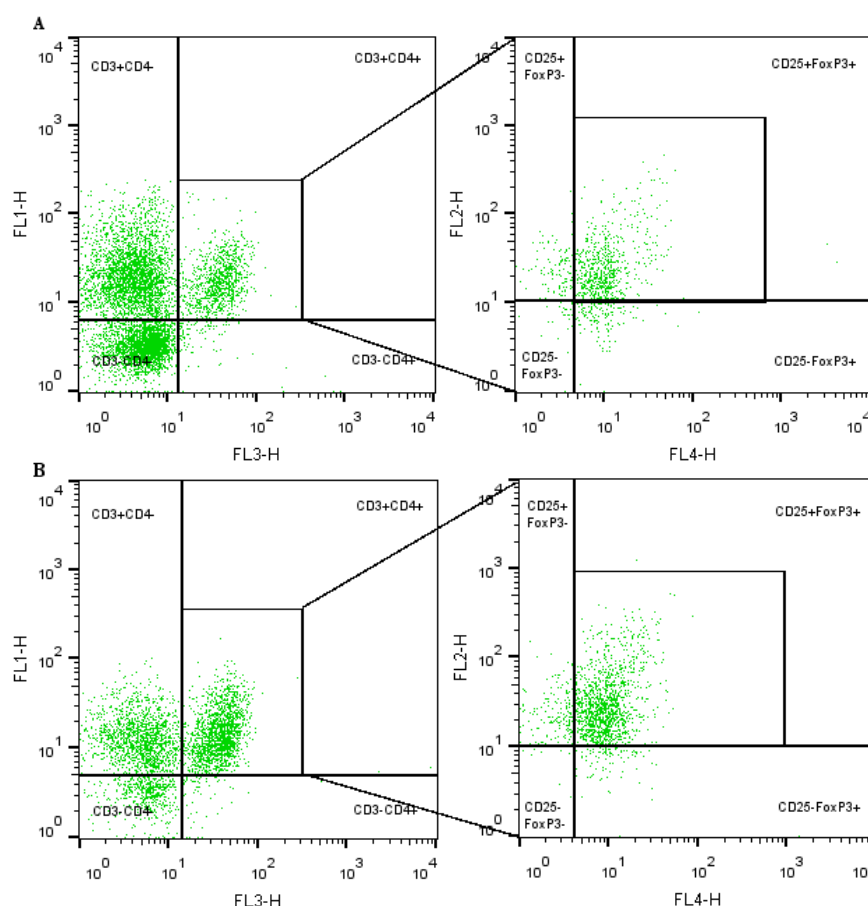


Imagen 5. Citogramas de fluorescencia del tubo 4 para la determinación de las poblaciones de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+) en LIE (A) y LLP (B).

- *Linfocitos T productores de IFN- γ o IL-4*: estas dos poblaciones linfocitarias se calcularon mediante el análisis del tubo 5. Para ello, se emplearon dos citogramas de fluorescencia enfrentando la molécula CD3 a la molécula IFN- γ o IL-4 respectivamente, y seleccionando la población doble positiva (imagen 6).

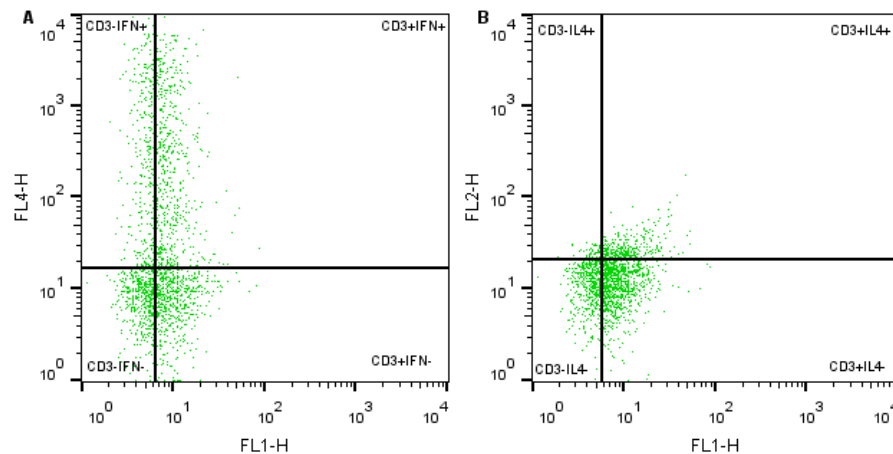


Imagen 6. Citogramas de fluorescencia del tubo 5 para la determinación de las poblaciones de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +) (A) y T productores de IL-4 (CD3+IL-4+) (B) en el epitelio duodenal.

- *Linfocitos Th1 y Th2:* estas dos poblaciones linfocitarias se calcularon a partir del análisis del tubo 5, exclusivamente en las muestras de sangre periférica. Para ello, se seleccionaron inicialmente los linfocitos Th y posteriormente, mediante el empleo de un nuevo citograma de fluorescencia, los porcentajes de linfocitos Th positivos a IFN- γ , o Th1, y los positivos a IL-4, o Th2 (imagen 7).

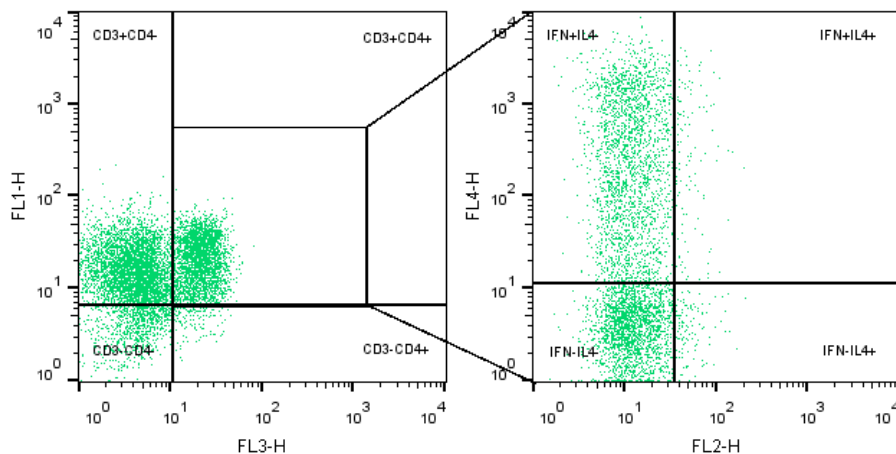


Imagen 7. Citogramas de fluorescencia del tubo 5 para la determinación de las poblaciones de linfocitos Th1 (CD3+CD4+IFN- γ +) y Th2 (CD3+CD4+IL-4+) en sangre periférica.

En el caso de los linfocitos de sangre periférica, una vez calculado el porcentaje de cada una de las poblaciones linfocitarias de interés, se calculó el valor absoluto de dichas poblaciones en relación al número total de los linfocitos presentes en cada mililitro de la muestra de sangre. Por lo tanto, en este estudio inmunofenotípico se obtuvieron los valores relativos de las poblaciones de linfocitos de interés presentes en sangre periférica y en el epitelio y la lámina propia intestinal, expresados en porcentaje, y además el valor absoluto de los linfocitos de sangre periférica.

4.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos en este trabajo fueron analizados estadísticamente por el Departamento de Apoyo a la Investigación de Servicios Informáticos de la UCM, empleando para ello el programa informático SAS, versión 9.4 (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos).

4.7.1. Estadística descriptiva

Inicialmente se llevó a cabo un estudio estadístico descriptivo de todos los datos del trabajo, tanto de las características de la población como de la enfermedad y del inmunofenotipaje. Para ello, la descripción de los datos cualitativos se realizó en forma de frecuencias absolutas y porcentajes, mientras que para los datos cuantitativos se emplearon la media, la desviación estándar, el valor máximo y mínimo, la mediana y el rango intercuartílico.

4.7.2. Estadística analítica

Posteriormente, la estadística analítica permitió evaluar la posible existencia de relaciones estadísticamente significativas entre diferentes características de la población en estudio y las variables analizadas, así como evaluar la evolución de algunas de estas variables en el tiempo tras la finalización del tratamiento específico para la EICI en el grupo de perros enfermos de los que se dispuso de control postratamiento.

Dados los requerimientos de nuestros objetivos y la naturaleza y el comportamiento con respecto a la normalidad de la mayoría de las variables de nuestro estudio, evaluada con el test de Kolmogorv-Smirnov, se optó por el empleo de diferentes test estadísticos no paramétricos tal y como se detalla a continuación:

- Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, para comparar el rango medio de dos muestras relacionadas. Esta prueba se ha empleado:
 - como alternativa a la T de Student en la comparación entre las variables cuantitativas del grupo de perros sanos y del grupo de perros con EICI, del grupo de perros sanos con el grupo de perros con EICI con control postratamiento y entre las variables cuantitativas del inmunofenotipo comparadas dentro del grupo de perros con EICI.

- en la comparación de variables cualitativas ordinales entre los distintos grupos.
 - en los estudios de evolución de las variables cualitativas y cuantitativas en el grupo de perros con EICI tras el tratamiento farmacológico.
 - en la valoración de las diferencias del inmunofenotipo entre los tres compartimentos inmunitarios en los tres grupos de animales, corrigiendo su valor con el test de Bonferroni al tratarse de una comparación múltiple.
- Prueba exacta de Fisher, empleada en el análisis de las tablas de contingencia para la comparación de las variables cualitativas no ordinales entre los distintos grupos.
- Coeficiente de correlación de Spearman, empleado en los estudios de correlación entre variables cuantitativas o en el estudio de la asociación entre una variable cuantitativa y una variable cualitativa ordinal. En nuestro estudio se empleó en la valoración de asociaciones entre el inmunofenotipo en sangre, los parámetros clínicos, endoscópicos e histológicos.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% con un valor p menor a 0,05. Este valor de p se ajustó cuando se aplicó el test de Bonferroni en las comparaciones múltiples.

5. RESULTADOS

5.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES

Como se ha descrito previamente en la sección de “Materiales y métodos”, en este estudio se incluyeron un total de 52 perros, de los cuales 16 constituyen el grupo de perros sanos o Grupo 1 y 36 el grupo de perros con EICI o Grupo 2. Además, en 10 de los perros del Grupo 2 se llevó a cabo un control postratamiento de todos los parámetros incluidos en este trabajo que permitió conocer la evolución de la enfermedad.

➤ Grupo 1 o grupo de perros sanos

Está constituido por 16 perros sanos que cumplieron los criterios de inclusión para este grupo descritos en el apartado 4.2. de la sección de “Materiales y métodos” de la presente tesis doctoral. En la tabla 12 se han reflejado las características de estos animales, que han sido identificados con los números de registro 1 a 16.

Tabla 12. Relación de los perros incluidos en el grupo de perros sanos (Grupo1).

Caso n°	Raza	Edad (años)	Sexo	Peso (kg)	Condición corporal (1-9)
1	Mestizo	1,5	Hembra	12	4
2	American Staffordshire Terrier	2	Macho	42	5
3	Mestizo	1,4	Macho	8,1	4
4	Dogo Alemán	4	Hembra	64,6	6
5	Jack Russell Terrier	5	Hembra	7,5	6
6	Mestizo	1,5	Hembra	11,7	5
7	Galgo	2	Macho	25	6
8	Mestizo	2,7	Hembra	14	5
9	Mestizo	3	Macho	13,7	6
10	Bichón Maltés	5	Macho	4,5	5
11	West Highland White Terrier	11	Macho	8,2	7
12	Mestizo	7	Hembra	4,9	6
13	Galgo	4	Macho	22	5
14	Beagle	9	Macho	16,1	5
15	Setter Inglés	5,7	Hembra	15,7	5
16	Mestizo	8	Macho	32,8	6

➤ Grupo 2 o grupo de perros con EICI linfoplasmocitaria

El Grupo 2 está constituido por 36 perros diagnosticados de EICI linfoplasmocitaria tras la realización del protocolo diagnóstico para la enfermedad detallado en el apartado 4.3. de la

Resultados

sección de “Materiales y métodos” de esta tesis doctoral. En 10 de los perros de este grupo pudo llevarse a cabo una reevaluación de todos los parámetros analizados en este trabajo, una vez finalizado el tratamiento específico para la enfermedad. En la tabla 13 se ha reflejado la relación de perros incluidos en el Grupo 2 de este estudio, identificados con los números de registro 17 a 52. Los perros de este grupo de los que se dispuso de reevaluación de los parámetros tras la finalización del tratamiento se han sombreado de color verde en la tabla 13.

Tabla 13. Relación de perros incluidos en el grupo de perros con EICI (Grupo 2).

Caso n°	Raza	Edad (años)	Sexo	Peso (kg)	Condición corporal (1-9)
17	Bulldog Francés	8	Macho	11,4	6
*18	Bulldog Inglés	5	Hembra	18,2	4
19	Chihuahua	8	Hembra	3,9	4
*20	Bulldog Francés	4	Macho	12,1	7
*21	Golden Retriever	3	Hembra	20,8	3
22	Labrador Retriever	3,5	Macho	33,5	4
*23	West Highland White Terrier	6	Hembra	7	3
*24	Yorkshire Terrier	8	Macho	4,61	6
25	Mestizo	7	Macho	34,4	5
26	Chihuahua	8	Macho	2,2	4
*27	West Highland White Terrier	6	Macho	8,7	5
28	Mestizo	12	Macho	12,7	4
*29	Mestizo	3	Macho	22,6	5
*30	Carlino	4	Hembra	5	4
*31	Mestizo	10	Macho	20,6	4
32	Golden Retriever	9	Macho	31,4	6
33	Jack Russell Terrier	6	Macho	7,4	4
34	Bichón Maltés	10,6	Hembra	5,1	3
*35	Yorkshire Terrier	8	Macho	8,1	6
36	Montaña del Pirineo	2	Macho	44	3
37	Mestizo	6	Macho	11,8	5
38	Schnauzer Miniatura	3,8	Macho	8,4	7
39	Boston Terrier	4	Macho	10,5	4
40	Mestizo	12	Hembra	6,4	4
41	Labrador Retriever	3,4	Macho	24,8	6
42	Mestizo	7	Macho	47,5	6
43	Border Collie	1,8	Hembra	14,6	4
44	Bichón Maltés	12	Macho	4,4	4
45	Pastor Alemán	4,4	Hembra	29	3
46	Mestizo	10,6	Hembra	6,8	5
47	Bichón Maltés	5,8	Hembra	4,6	4
48	Mestizo	3,9	Hembra	21,4	4
49	Golden Retriever	4,3	Hembra	23,5	6
50	Golden Retriever	2	Hembra	36,6	6
51	Mestizo	3,8	Macho	33	5
52	Labrador Retriever	11	Hembra	5	6

Por otra parte, la gravedad clínica de 10 de los perros durante la realización del protocolo diagnóstico requirió la instauración de tratamiento inmunosupresor previo a la realización de la

endoscopia. Este tratamiento permitió la estabilización de estos animales, pudiéndose llevar a cabo en ellos el procedimiento endoscópico diagnóstico. Estos 10 animales se han señalado con un asterisco en la tabla 13. Se ha decidido incluir estos resultados en la tesis doctoral por el interés que puede tener desde el punto de vista clínico. En los apartados correspondientes de esta sección de “Resultados” se hará hincapié en aquellos parámetros en los que había diferencias con los perros no tratados de este grupo de forma previa a la endoscopia.

5.2. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, ENDOSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS

Como se ha descrito previamente, la muestra de perros sanos de este estudio está constituida por 16 animales, que han sido incluidos en el Grupo 1. A continuación se realizará la descripción estadística de los datos de la reseña de estos animales, así como de los resultados de la analítica sanguínea, la exploración endoscópica y de la histopatología de las biopsias endoscópicas.

5.2.1. Descripción estadística de los datos de la reseña del grupo de perros sanos

Las variables cuantitativas recogidas durante la anamnesis y la exploración física fueron la edad y el peso, mientras que las variables cualitativas de la reseña de dichos animales fueron el sexo, la raza, el estado fértil y la condición corporal.

Como puede observarse en la tabla 14, la edad media de los perros del Grupo 1 fue $4,55 \pm 2,93$ años, siendo el mínimo de 1,40 años y el máximo de 11 años. Respecto al peso, la media fue de $18,92 \pm 15,91$ kilogramos.

Tabla 14. Valores de la edad y del peso de los perros del Grupo 1.

	Media	Desviación estándar	Mediana	Rango intercuartílico (IQR)	Mínimo (Mín)	Máximo (Máx)
Edad (años)	4,55	2,93	4,00	4,35	1,40	11,00
Peso (kg)	18,92	15,91	13,85	15,38	4,50	64,60

En cuanto al sexo y al estado fértil de dichos animales, un 56,25% eran machos y un 43,75% eran hembras, con un 56,25% de animales castrados frente al 43,75% que no lo estaban. La distribución de los perros del Grupo 1 en base a estas variables se ha reflejado en la tabla 15.

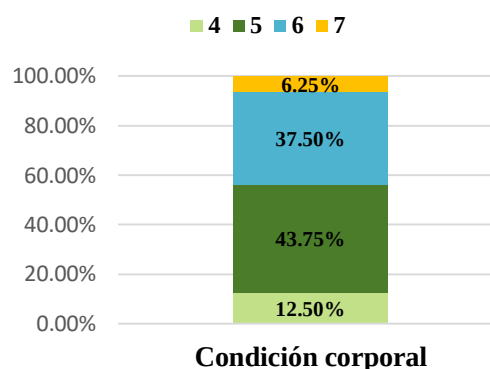
Tabla 15. Distribución de los perros del Grupo 1 en función del sexo y el estado fértil.

		Número de animales	Porcentaje
Sexo y estado fértil	Macho castrado	4	25,00
	Macho entero	5	31,25
	Hembra castrada	5	31,25
	Hembra entera	2	12,50

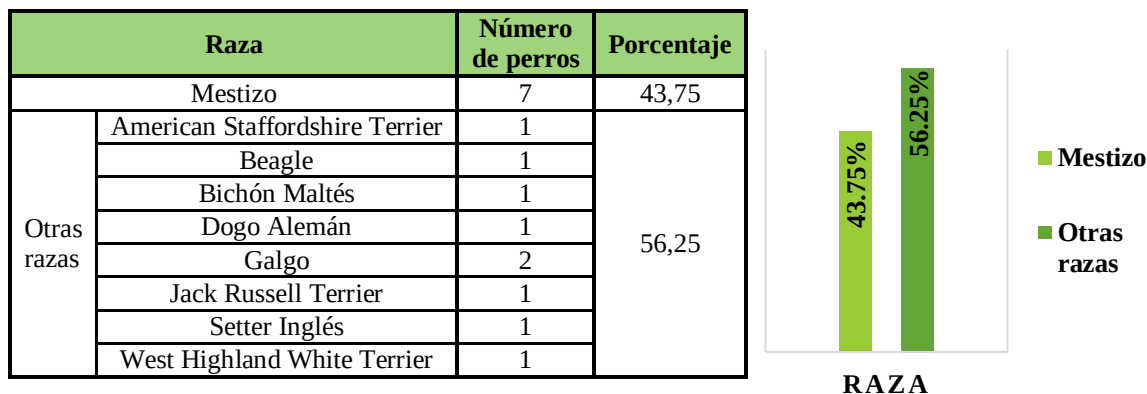
Por otro lado, la distribución de los perros sanos en función de la condición corporal expresada en una escala del 1 al 9 puede observarse en la tabla 16 y en el gráfico 1.

Tabla 16 y gráfico 1. Distribución de los perros del Grupo 1 en función de la condición corporal (escala 1-9).

Condición corporal	Número de animales	Porcentaje
4	2	12,50
5	7	43,75
6	6	37,50
7	1	6,25



La distribución de los 16 perros sanos incluidos en este estudio en función de su raza se ha detallado en la tabla 17 y en el gráfico 2. Como puede observarse, los animales se agruparon en mestizos u otras razas, dada la elevada variación existente en el grupo de otras razas.

Tabla 17 y gráfico 2. Distribución del Grupo 1 en función de la raza.

5.2.2. Descripción de los signos clínicos en el grupo de perros sanos

Los animales integrantes del Grupo 1 no presentaron ningún signo clínico gastrointestinal ni ningún otro signo clínico que hiciese dudar de su condición de clínicamente sano, cumpliendo así este criterio de inclusión detallado en el apartado 4.2. de la sección de “Materiales y métodos” de esta tesis doctoral.

5.2.3. Descripción estadística de los parámetros de la analítica sanguínea del grupo de perros sanos

De forma previa a la realización de la endoscopia se llevó a cabo una analítica sanguínea en los animales del Grupo 1, que incluyó la realización de un estudio hematológico básico, medición de la glucemia, valoración de la urea y la creatinina y determinación de la ALT, de las proteínas totales plasmáticas y de la albúmina. Los resultados obtenidos muestran valores medios dentro de la normalidad para la especie canina, y se han reflejado en las tablas 18 y 19.

Tabla 18. Valores de la hematología de los perros sanos del estudio. **A:** Series eritroide y plaquetaria. **B:** Recuento y fórmula leucocitarios.

A:	Media	Desviación estándar	Mediana	Rango intercuartílico	Mínimo	Máximo
Glóbulos rojos x $10^6/\mu\text{L}$	6,65	0,89	6,60	0,94	5,27	8,75
Hemoglobina (g/dL)	15,57	1,78	15,60	2,70	12,80	18,80
Hematocrito (%)	44,70	11,86	47,40	9,75	37,80	58,00
Plaquetas x $10^3/\mu\text{L}$	207,75	84,49	200,50	78,00	82,00	409,00

B:	Media	Desviación estándar	Mediana	Rango intercuartílico	Mínimo	Máximo
Leucocitos x $10^3/\mu\text{L}$	6,56	2,25	6,22	2,84	4,64	12,29
Neutrófilos/μL	4281	1855	3575	2517	2037	9200
Neutrófilos (%)	63,76	7,80	63,30	14,60	53,20	75,10
Linfocitos/μL	1602	428	1418	628	1100	2454
Linfocitos (%)	26,14	7,96	26,90	14,85	12,70	36,30
Monocitos/μL	351	194	270	293	100	728
Monocitos (%)	5,08	1,42	5,35	1,85	1,90	7,50
Eosinófilos/μL	221	180	157	257	0	700
Eosinófilos (%)	3,31	1,95	3,20	3,50	0,50	6,80
Basófilos/μL	10	8	8	7	0	28
Basófilos (%)	0,16	0,17	0,10	0,10	0,00	0,70

Tabla 19. Valores de la bioquímica sanguínea de los perros sanos del estudio.

	Media	Desviación estándar	Mediana	Rango intercuartílico	Mínimo	Máximo
Glucosa (mg/dL)	121,94	53,42	114,00	37,00	75,00	248,00
Urea (mg/dL)	40,20	7,46	39,72	11,57	25,71	49,50
Creatinina (mg/dL)	1,03	0,26	1,05	0,30	0,70	1,60
ALT (U/L)	53,81	51,20	40,00	31,00	18,00	87,00
Proteínas totales (g/dL)	6,22	0,70	6,05	1,00	5,00	7,50
Albumina (g/dL)	3,11	0,35	3,03	0,50	2,50	3,75

5.2.4. Descripción de los parámetros del estudio endoscópico en el grupo de perros sanos

Para la valoración de la imagen macroscópica del tracto gastrointestinal durante la exploración endoscópica en el grupo de perros sanos, como se detalló en el apartado 4.3.7.3. de la sección de “Materiales y métodos” de esta tesis doctoral, se emplearon los índices de evaluación endoscópica para perros con EICI propuestos por la WSAVA y por Slovak y colaboradores (Washabau *et al.*, 2010; Slovak *et al.*, 2015). Los resultados de dichas valoraciones en el Grupo 1 se han reflejado en las tablas 20 y 21. Cabe mencionar que la valoración de la mucosa del estómago no pudo realizarse en dos animales de este grupo debido a la presencia de restos alimenticios que impidieron su correcta observación.

Tabla 20. Valores del índice endoscópico de la WSAVA de 2010 en el grupo de perros sanos.

	Parámetro	Graduación	Número de animales	Porcentaje
Esófago	Hiperemia/ vascularización	0	16	100,00
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	0	16	100,00
	Friabilidad	0	16	100,00
	Hemorragia	0	16	100,00
	Erosiones/úlceras	0	16	100,00
	Contenido (moco/bilis/alimento)	0	13	81,25
		1	1	6,25
		2	1	6,25
		3	1	6,25
	Dilatación	0	16	100,00
	Esfínter gastroesofágico	0	16	100,00
	Otros	0	16	100,00
Estómago	Imposibilidad de dilatación	0	14	100,00
	Hiperemia/vascularización	0	6	42,86
		1	6	42,86
		2	2	14,29
	Edema	0	14	100,00
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	0	5	35,71
		1	6	42,86
		2	3	21,43
	Friabilidad	0	14	100,00
	Hemorragia	0	14	100,00
	Erosiones/úlceras	0	14	100,00

Duodeno	Contenido (moco/bilis/alimento)	0	5	35,71
		1	1	7,14
		2	7	50,00
		3	1	7,14
	Esfínter gastroesofágico	0	14	100,00
	Paso del endoscopio a través del píloro	0	14	100,00
	Otros	0	13	92,86
		1	1	7,14
	Imposibilidad de dilatación	0	16	100,00
	Hiperemia/vascularización	0	8	50,00
		1	7	43,75
		2	1	6,25
	Edema	0	13	81,25
		1	2	12,50
		2	1	6,25
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	0	5	31,25
		1	7	43,75
		2	3	18,75
		3	1	6,25
	Friabilidad	0	8	50,00
		1	7	43,75
		2	1	6,25
	Irregularidad de la mucosa (textura)	0	2	12,50
		1	6	37,50
		2	7	43,75
		3	1	6,25
	Hemorragia	0	15	93,75
		1	1	6,25
	Erosiones/úlceras	0	16	100,00
	Dilataciones linfáticas	0	11	68,75
		1	5	31,25

Tabla 21. Valores de la evaluación endoscópica del grupo de perros sanos del estudio según el índice endoscópico de Slovak y colaboradores de 2015.

	Parámetro	Índice cuantitativo			Índice cualitativo		
		Graduación	Número de animales	Porcentaje	Graduación	Número de animales	Porcentaje
Estómago	Friabilidad	0	14	100,00	0	14	100,00
	Irregularidad	0	8	57,14	0	8	57,14
		1	6	42,86	1	6	42,86
	Erosiones	0	13	92,86	0	13	92,86
		1	1	7,14	1	1	7,14

Duodeno	Friabilidad	0	8	50,00	0	11	68,75
		1	7	43,75	1	5	31,25
		2	1	6,25			
	Irregularidad	0	2	12,50	0	4	25,00
		1	7	43,75	1	12	75,00
		2	7	43,75			
	Erosiones	0	16	100,00	0	16	100,00
	Dilataciones linfáticas	0	11	68,75	0	11	68,75
		1	5	31,25	1	5	31,25

Una vez obtenidos los valores de cada parámetro evaluado en las distintas localizaciones estudiadas se procedió a su suma para la obtención de los índices endoscópicos correspondientes. Los resultados de los dos índices endoscópicos para el grupo de perros sanos se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Sumatorios de los parámetros evaluados en cada localización gastrointestinal con los índices endoscópicos de la WSAVA de 2010 y de Slovak y colaboradores de 2015 en el Grupo 1.

	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
Esófago WSAVA	0,38	0,89	0,00	0,00	0,00	3,00
Estómago WSAVA	2,93	2,02	2,00	2,00	0,00	7,00
Duodeno WSAVA	4,69	2,91	5,00	4,50	0,00	9,00
Estómago cuantitativo Slovak y col.	0,50	0,65	0,00	1,00	0,00	2,00
Estómago cualitativo Slovak y col.	0,50	0,65	0,00	1,00	0,00	2,00
Duodeno cuantitativo Slovak y col.	2,19	1,11	2,00	1,50	0,00	4,00
Duodeno cualitativo Slovak y col.	1,38	0,89	1,50	1,00	0,00	3,00

5.2.5. Descripción de los parámetros del estudio histopatológico en el grupo de perros sanos

En la valoración histológica de las biopsias tomadas durante el estudio endoscópico, como se detalló en el apartado 4.3.8.2. de la sección de “Materiales y métodos” de esta tesis doctoral, se emplearon los índices de clasificación propuestos por la WSAVA y el índice simplificado de Allenspach y colaboradores para perros con EICI (Day *et al.*, 2008; Allenspach *et al.*, 2019). Los resultados de estos índices en el grupo de perros sanos o grupo control se detallan en las tablas 23 y 24. En cinco animales de este grupo la calidad de las biopsias gástricas no

permitió su evaluación histopatológica, del mismo modo que en uno de ellos tampoco pudo evaluarse en el duodeno por dicho motivo.

Tabla 23. Valores de los parámetros histopatológicos evaluados en el grupo de perros sanos mediante el empleo del índice de clasificación de la WSAVA de 2008.

			Graduación	Número de animales	Porcentaje
Estómago	Parámetros morfológicos	Lesión epitelial	0	10	90,91
			1	1	9,09
		Lesión de/en las fosas gástricas	0	10	90,91
			1	1	9,09
		Fibrosis y atrofia mucosa y/o glandular	1	7	63,64
			2	4	36,36
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	0	10	90,91
			1	1	9,09
		Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	1	8	72,73
			2	3	27,27
		Eosinófilos en la lámina propia	0	11	100,00
		Neutrófilos en la lámina propia	0	11	100,00
		Hiperplasia de folículos linfoides	0	7	63,64
			1	2	18,18
			2	1	9,09
			3	1	9,09
Duodeno	Parámetros morfológicos	Atrofia de las vellosidades	0	1	6,67
			1	10	66,67
			2	4	26,67
		Lesión epitelial	0	14	93,33
			1	1	6,67
		Dilatación de las criptas	0	9	60,00
			1	6	40,00
		Dilataciones linfáticas	0	9	60,00
			1	5	33,33
			2	1	6,67
		Fibrosis de la mucosa	0	5	33,33
			1	8	53,33
			2	2	13,33

Resultados

	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	0	13	86,67
			1	2	13,33
		Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	1	9	60,00
			2	5	33,33
			3	1	6,67
		Eosinófilos en la lámina propia	0	15	100,00
		Neutrófilos en la lámina propia	0	13	86,67
			1	2	13,33

Tabla 24. Valores de los parámetros histopatológicos evaluados en el grupo de perros sanos del estudio mediante el empleo del índice de clasificación simplificado de Allenspach y colaboradores de 2019.

			Graduación	Número de animales	Porcentaje
Estómago	Parámetros morfológicos	Fibrosis	1	7	63,64
			2	4	36,36
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	0	10	90,91
			1	1	9,09
		Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	1	8	72,73
			2	3	27,27
		Neutrófilos en la lámina propia	0	11	100,00
		Eosinófilos en la lámina propia	0	11	100,00
Duodeno	Parámetros morfológicos	Atrofia de las vellosidades	0	1	6,67
			1	10	66,67
			2	4	26,67
		Lesión epitelial	0	14	93,33
			1	1	6,67
		Dilatación de las criptas	0	9	60,00
			1	6	40,00
		Dilataciones linfáticas	0	9	60,00
			1	5	33,33
			2	1	6,67
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	1	9	60,00
			2	5	33,33
			3	1	6,67
		Neutrófilos en la lámina propia	0	13	86,67
			1	2	13,33
		Eosinófilos en la lámina propia	0	15	100,00

Del mismo modo que en la valoración endoscópica, para la graduación de las alteraciones histopatológicas observadas en el grupo de perros sanos se llevaron a cabo sumatorios de los

valores de los diferentes parámetros en cada localización. En el caso del índice propuesto por la WSAVA tales sumatorios no solo se realizaron por localización gastrointestinal, sino también diferenciando entre los parámetros morfológicos e inflamatorios evaluados tanto en el estómago como en el duodeno. Estos resultados se han detallado en la tabla 25.

Tabla 25. Sumatorios de los parámetros evaluados en cada localización gastrointestinal con los índices histopatológicos de la WSAVA de 2008 y de Allenspach y colaboradores de 2019 en el grupo de perros sanos del estudio.

	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
Estómago WSAVA	3,55	1,97	3,00	3,00	2,00	7,00
Duodeno WSAVA	4,67	2,16	4,00	3,00	2,00	9,00
Estómago parámetros morfológicos WSAVA	1,55	0,69	1,00	1,00	1,00	3,00
Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	2,00	1,55	1,00	1,00	1,00	5,00
Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	2,93	1,62	2,00	2,00	1,00	6,00
Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	1,73	0,88	1,00	2,00	1,00	3,00
Estómago Allenspach y col.	2,73	1,10	2,00	2,00	2,00	5,00
Duodeno Allenspach y col.	3,73	1,71	3,00	2,00	2,00	7,00

5.3. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, ENDOSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON EICI

La población de perros con EICI incluidos en este estudio está constituida por un total de 36 animales que se han clasificado como Grupo 2. Estos perros fueron incluidos tras la obtención del diagnóstico definitivo de la enfermedad mediante la realización del protocolo diagnóstico descrito en el apartado 4.3. de la sección de “Materiales y métodos” de esta tesis doctoral.

5.3.1. Descripción estadística de los datos de la reseña del grupo de perros con EICI

Respecto a las variables cuantitativas analizadas de la reseña, como puede observarse en la tabla 26, la edad media de los perros del Grupo 2 fue $6,30 \pm 3,08$ años, siendo el mínimo 1,80 años y la edad máxima de los animales de este grupo 12 años. En cuanto al peso, la media de los perros con EICI fue $16,72 \pm 12,50$ kilogramos.

Tabla 26. Valores de la edad y el peso de los perros con EICI del estudio.

	Media	Desviación estándar	Mediana	Rango intercuartílico	Mínimo	Máximo
Edad (años)	6,30	3,08	6,00	4,15	1,80	12,00
Peso (kg)	16,72	12,50	11,95	17,55	2,20	47,50

En cuanto al sexo, 21 perros de este grupo eran machos y 15 hembras, de los cuales 26 estaban castrados mientras que 10 no lo estaban, como puede observarse en la tabla 27.

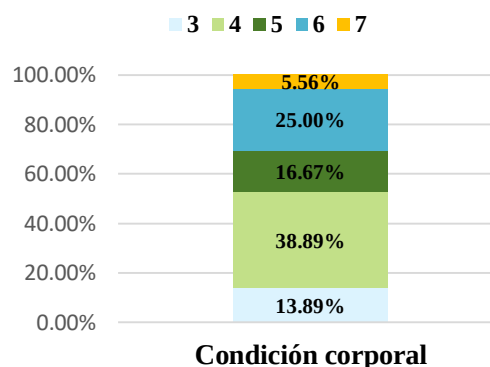
Tabla 27. Distribución de los perros del Grupo 2 en función del sexo y el estado fértil.

		Número de animales	Porcentaje
Sexo y estado fértil	Macho castrado	15	41,67
	Macho entero	6	16,67
	Hembra castrada	11	30,56
	Hembra entera	4	11,11

Otra de las variables cualitativas evaluadas en los perros con EICI fue la condición corporal, empleando una escala de clasificación del 1 a 9. Los resultados se han detallado en la tabla 28 y en el gráfico 3.

Tabla 28 y gráfico 3. Distribución de los perros con EICI en función de la condición corporal (escala 1-9).

Condición Corporal	Número de animales	Porcentaje
3	5	13,89
4	14	38,89
5	6	16,67
6	9	25,00
7	2	5,56

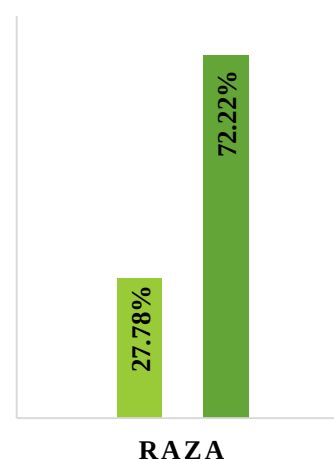


Los perros del Grupo 2 también se agruparon respecto a la raza en: mestizo y otras razas (tabla 29 y gráfico 4).

Tabla 29 y gráfico 4. Distribución del Grupo 2 en función de la raza.

Raza		Número de perros	Porcentaje
Mestizo		10	27,78
Otras razas	Bichón Maltés	3	72,22
	Border Collie	1	
	Boston Terrier	1	
	Bulldog Francés	2	
	Bulldog Inglés	1	
	Carlino	1	
	Chihuahua	2	
	Golden Retriever	4	
	Jack Russell Terrier	1	
	Labrador Retriever	3	
	Montaña del Pirineo	1	
	Pastor Alemán	1	
	Schnauzer Miniatura	1	
	West Highland White Terrier	2	
	Yorkshire Terrier	2	

■ Mestizo ■ Otras razas



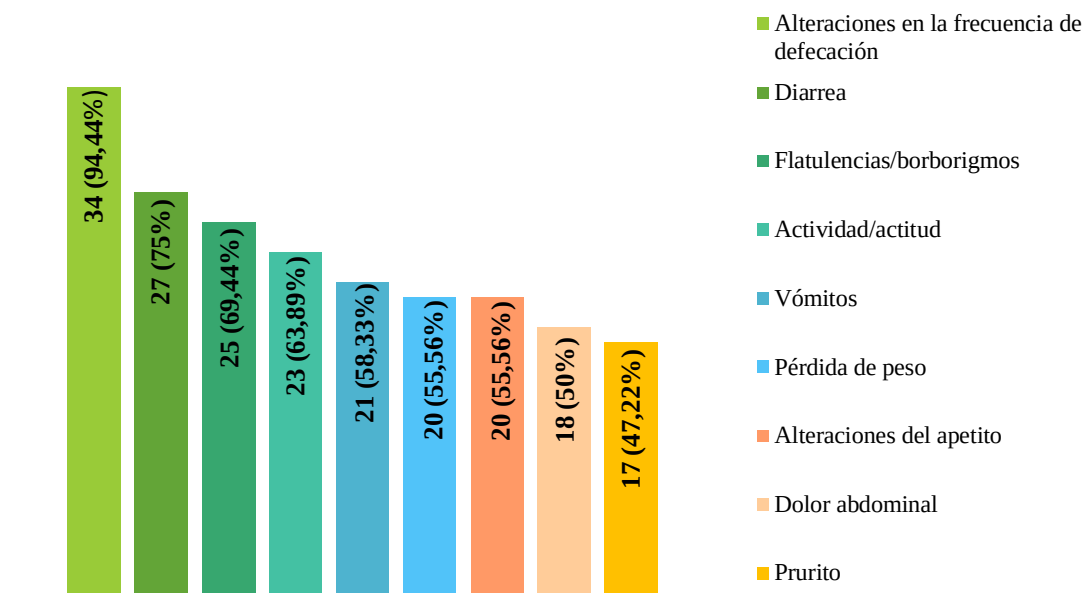
Como se detalló en el apartado 5.1. de esta sección de “Resultados”, 10 animales del Grupo 2 recibieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la realización de la endoscopia. Estos perros, como puede consultarse en la tabla 13, eran de diferentes edades, sexos y razas, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables estudiadas de la reseña en comparación con el resto de animales del Grupo 2 que no recibieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la endoscopia diagnóstica.

5.3.2. Descripción de los signos clínicos en el grupo de perros con EICI

Como comentamos en la sección de “Revisión bibliográfica” de esta tesis doctoral, los signos clínicos más frecuentemente observados en perros con EICI son la diarrea y las alteraciones en la frecuencia de la defecación, el vómito, la pérdida de peso, el dolor abdominal, las alteraciones del apetito, el aumento en las flatulencias y los borborismos intestinales, las alteraciones en la actitud o en el grado de actividad de los animales y el prurito (Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a). En los perros con EICI de nuestro estudio, todos ellos presentaron una combinación de tres o más de los signos clínicos mencionados. La duración media del proceso en nuestro grupo de perros enfermos en el momento que acudieron a consulta era de $24,33 \pm 26,42$ meses. En 20 de ellos (55,56%) el proceso llevaba presente menos de 12 meses mientras que en los 16 restantes (44,44%) su duración era mayor de un año.

Dentro de estos signos clínicos, la alteración en la frecuencia de defecación estuvo presente en un 94,44% de los perros, la diarrea en un 75%, el aumento en las flatulencias y los borborismos en un 69,44%, las alteraciones en la actividad o actitud de los animales en un 63,89%, los vómitos en un 58,33%, la pérdida de peso y la alteración del apetito en un 55,56%, el dolor abdominal en un 50% y finalmente, el prurito en un 47,22% de los casos (gráfico 5).

Gráfico 5. Frecuencia de presentación de los signos clínicos expresado en número de animales y porcentaje en los perros con EICI.



Dada la variabilidad de los signos clínicos, a continuación se detallan para cada uno de los animales del grupo de perros con EICI o Grupo 2 de manera individual (tabla 30).

Tabla 30. Signos clínicos en el grupo de perros con EICI.

Caso n°	Diarrea	Alteración frecuencia defecación	Vómitos	Pérdida de peso	Dolor abdominal	Alteración del apetito	Flatulencias/ borborigmos	Alteración de la actividad/ actitud	Prurito
17	Si	Si	Si	Si	Si	-	Si	-	Si
18	Si	Si	Si	Si	-	Si	Si	Si	-
19	-	Si	-	-	-	Si	-	Si	-
20	-	Si	Si	-	-	-	-	-	Si
21	Si	Si	-	Si	-	Si	Si	Si	-
22	-	Si	-	-	-	-	Si	Si	-
23	Si	Si	Si	Si	-	Si	Si	Si	-
24	Si	Si	Si	Si	Si	-	Si	Si	Si
25	Si	Si	Si	Si	Si	-	Si	-	-
26	-	Si	-	-	Si	Si	Si	Si	-
27	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	-
28	Si	Si	-	Si	-	-	Si	Si	Si
29	Si	Si	Si	Si	-	-	-	-	Si
30	-	Si	Si	-	-	-	Si	-	-
31	Si	Si	-	Si	-	Si	Si	Si	-
32	Si	Si	-	Si	Si	-	Si	-	Si
33	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	-
34	Si	Si	-	-	-	Si	Si	Si	Si
35	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
36	Si	Si	-	-	-	Si	Si	Si	Si
37	Si	Si	Si	Si	-	-	-	Si	-
38	-	Si	Si	-	Si	Si	Si	-	Si
39	-	Si	Si	Si	-	-	-	-	-
40	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	-	Si

Caso n°	Diarrea	Alteración frecuencia defecación	Vómitos	Pérdida de peso	Dolor abdominal	Alteración del apetito	Flatulencias/ borborigmos	Alteración de la actividad/ actitud	Prurito
41	Si	Si	Si	-	Si	Si	-	Si	-
42	Si	Si	Si	Si	-	Si	Si	Si	Si
43	Si	Si	-	Si	Si	Si	Si	-	Si
44	-	Si	Si	-	-	-	-	Si	Si
45	Si	Si	-	Si	-	-	Si	-	-
46	Si	-	Si	Si	Si	Si	-	-	Si
47	Si	Si	-	-	Si	Si	Si	Si	-
48	Si	Si	Si	-	Si	Si	-	-	Si
49	-	-	-	-	Si	-	-	Si	-
50	Si	Si	Si	-	-	Si	-	Si	Si
51	Si	Si	-	-	Si	-	Si	Si	-
52	Si	Si	-	-	Si	-	Si	Si	

De los 10 perros con EICI que requirieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la endoscopia la duración del proceso fue menor que en los animales no tratados ($14,20 \pm 21,21$ meses), pero esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p=0,156$). En el 80% la duración de los signos clínicos era menor de 12 meses. Además, es importante mencionar que cuatro de estos perros presentaron ascitis o edemas periféricos, siendo los únicos animales del estudio que mostraron dichos signos clínicos.

5.3.3. Descripción estadística de los parámetros de la analítica sanguínea del grupo de perros con EICI

De la misma forma ya descrita para los perros sanos del estudio, para los 36 perros incluidos en el grupo de perros con EICI se han analizado las variables de la analítica sanguínea básica: hematología y bioquímica. Todos los valores medios analizados se encontraron dentro de los rangos de referencia para la especie canina, como puede observarse en las tablas 31 y 32. No obstante, 12 perros (33,33%) presentaron trombocitosis, 9 (25%) hipoproteïnemia, otros 9 (25%) un descenso del hematocrito (nunca menor de 36,90%), 8 (22,22%) un descenso leve del recuento de glóbulos rojos, otros 8 (22,22%) un incremento de los valores de la ALT plasmática, 6 (16,67%) linfopenia, 6 (16,67%) hipoalbuminemia, 5 (13,89%) eosinopenia, 4 (11,11%) un aumento de los valores de urea, 4 (11,11%) un aumento de las proteínas totales plasmáticas, 3 (8,33%) trombocitopenia, 3 (8,33%) un descenso de la ALT plasmática, 2 (5,56%) un descenso de los niveles de hemoglobina sanguínea, 2 (5,56%) neutrofilia, 2 (5,56%) monocitopenia, 1 (2,78%) un incremento de la concentración de hemoglobina en sangre, 1 (2,78%) un incremento leve del recuento de glóbulos rojos, 1 (2,78%) leucocitosis, 1 (2,78%) leucopenia, 1 (2,78%) monocitosis, 1 (2,78%) un incremento de los niveles de albúmina, 1 (2,78%) un aumento de la glucosa, así como 1 (2,78%) un descenso de la misma.

Tabla 31. Valores de la hematología de los perros con EICI del estudio. **A:** Series eritroide y plaquetaria. **B:** Recuento y fórmula leucocitarias.

A:	Media	Desviación estándar	Mediana	Rango intercuartílico	Mínimo	Máximo
Glóbulos rojos x $10^6/\mu\text{L}$	6,65	1,03	6,67	1,66	4,85	9,06
Hemoglobina (g/dL)	15,71	2,48	15,65	3,15	12,20	22,40
Hematocrito (%)	46,41	6,88	46,25	10,80	36,90	60,00
Plaquetas x $10^3/\mu\text{L}$	347,29	161,77	302,00	150,00	104,00	847,00

B:	Media	Desviación estándar	Mediana	Rango intercuartílico	Mínimo	Máximo
Leucocitos x $10^3/\mu\text{L}$	8,57	3,94	8,05	2,89	3,93	27,10
Neutrófilos/μL	6201	3587	5216	2804	2378	2305
Neutrófilos (%)	70,63	9,21	69,80	13,95	54,10	90,00
Linfocitos/μL	1648	640	1654	1047	539	2951
Linfocitos (%)	20,60	8,32	21,00	14,35	3,00	36,00
Monocitos/μL	388	283	339	239	0	1636
Monocitos (%)	4,55	2,31	4,70	2,45	0,00	10,40
Eosinófilos/μL	248	229	237	225	0	926
Eosinófilos (%)	3,21	2,66	3,00	3,95	0,00	9,50
Basófilos/μL	7	10	3	13	0	39
Basófilos (%)	0,10	0,12	0,05	0,20	0,00	0,40

Tabla 32. Valores de la bioquímica sanguínea de los perros con EICI del estudio.

	Media	Desviación estándar	Mediana	Rango intercuartílico	Mínimo	Máximo
Glucosa (mg/dL)	102,33	24,03	98,50	19,50	50,00	208,00
Urea (mg/dL)	36,01	22,30	29,85	19,50	0,00	120,00
Creatinina (mg/dL)	0,91	0,26	0,90	0,40	0,43	1,50
ALT (U/L)	44,39	36,01	33,00	35,50	13,00	159,00
Proteínas totales (g/dL)	6,00	1,28	6,40	1,39	3,60	8,40
Albúmina (g/dL)	2,97	0,63	3,10	0,76	1,60	4,20

Resultados

En relación a los 10 perros del Grupo 2 a los cuales tuvo que administrarse tratamiento inmunosupresor de forma previa a la endoscopia, los valores medios de proteínas totales plasmáticas ($5,36 \pm 1,75$ g/dL) se encontraron por debajo de los rangos de referencia para la especie canina. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa para este valor de proteínas totales entre los perros del Grupo 2 que recibieron tratamiento previo a la endoscopia en comparación con los que no lo recibieron ($p=0,220$). Por otro lado, el valor medio de plaquetas en estos perros se encontró por encima de los rangos de referencia para la especie canina ($500 \pm 188 \times 10^3/\mu\text{L}$), y, además, este valor fue significativamente mayor en comparación con los perros del Grupo 2 que no recibieron tratamiento ($p=0,003$). Los valores medios del resto de variables de la analítica sanguínea se encontraron dentro de la normalidad en estos 10 perros y no mostraron diferencias estadísticas con los perros del Grupo 2 que no recibieron tratamiento de forma previa a la endoscopia.

5.3.4. Descripción de los índices clínicos de la enfermedad en el grupo de perros con EICI

Con todos los datos recogidos durante la anamnesis, la exploración física y los valores de la analítica sanguínea se procedió a la elaboración de los índices de actividad clínica de la enfermedad en el grupo de perros con EICI o Grupo 2 de forma previa a la realización de la endoscopia. Como se detalló en el apartado de “Materiales y métodos”, en este estudio se han empleado tres índices de actividad clínica para la EICI canina, el CIBDAI (Jergens *et al.*, 2003), el CIBDAISI (Rodríguez-Franco *et al.*, 2004) y el CCECAI (Allenspach *et al.*, 2007), cuyos resultados se describen a continuación en las tablas 33, 34 y 35 respectivamente.

Tabla 33. Valores del índice de actividad clínica CIBDAI en el Grupo 2.

Índice CIBDAI			
Parámetro	Graduación	Número de animales	Porcentaje
Actividad/actitud	0	13	36,11
	1	7	19,44
	2	10	27,78
	3	6	16,67
Apetito	0	18	50,00
	1	4	11,11
	2	7	19,44
	3	7	19,44

Vómitos	0	15	41,67
	1	9	25,00
	2	6	16,67
	3	6	16,67
Consistencia de las heces	0	9	25,00
	1	7	19,44
	2	15	41,67
	3	5	13,89
Frecuencia de la defecación	0	2	5,56
	1	17	47,22
	2	9	25,00
	3	8	22,22
Pérdida de peso	0	16	44,44
	1	6	16,67
	2	5	13,89
	3	9	25,00

Tabla 34. Valores del índice de actividad clínica CIBDAISI en el Grupo 2.

Índice CIBDAISI			
Parámetro	Graduación	Número de animales	Porcentaje
Actividad/actitud	0	13	36,11
	1	7	19,44
	2	10	27,78
	3	6	16,67
Apetito	0	16	44,44
	1	5	13,89
	2	7	19,44
	3	8	22,22
Vómitos	0	15	41,67
	1	9	25,00
	2	6	16,67
	3	6	16,67
Consistencia de las heces	0	9	25,00
	1	7	19,44
	2	15	41,67
	3	5	13,89
Frecuencia de la defecación	0	2	5,56
	1	17	47,22
	2	9	25,00
	3	8	22,22
Pérdida de peso	0	16	44,44
	1	6	16,67
	2	5	13,89
	3	9	25,00
Dolor abdominal	0	18	50,00
	1	5	13,89
	2	8	22,22
	3	5	13,89

Resultados

Flatulencias/borborismos	0	11	30,56
	1	8	22,22
	2	7	19,44
	3	10	27,78

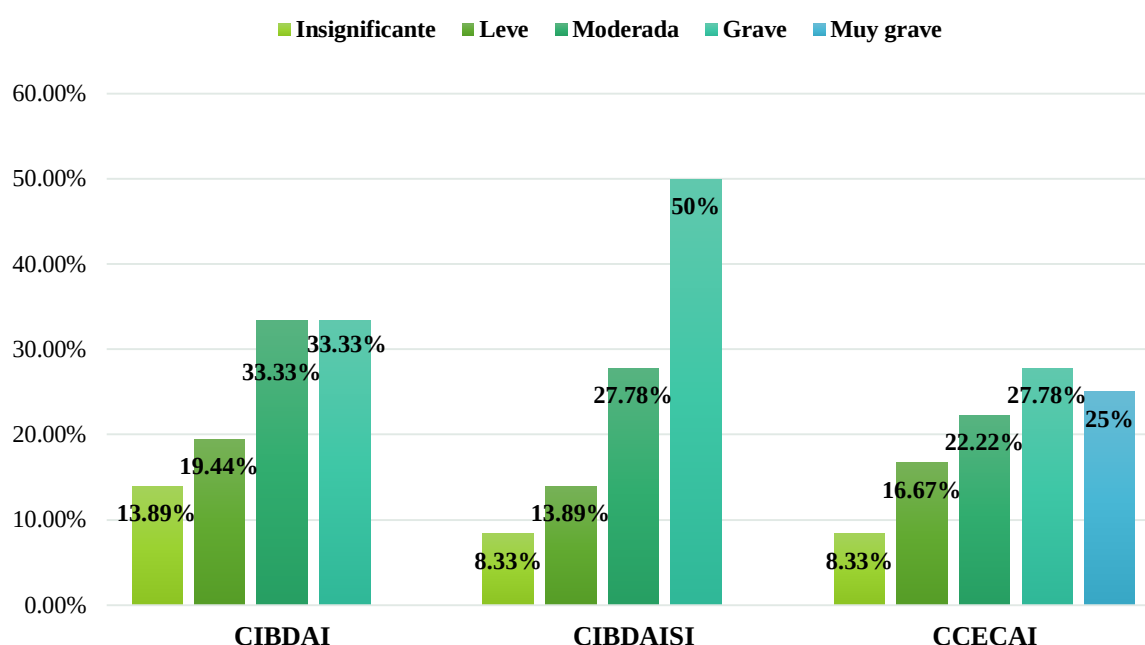
Tabla 35. Valores del índice de actividad clínica CCECAI en el Grupo 2.

Índice CCECAI			
Parámetro	Graduación	Número de animales	Porcentaje
Actividad/actitud	0	13	36,11
	1	7	19,44
	2	10	27,78
	3	6	16,67
Apetito	0	18	50,00
	1	4	11,11
	2	7	19,44
	3	7	19,44
Vómitos	0	15	41,67
	1	9	25,00
	2	6	16,67
	3	6	16,67
Consistencia de las heces	0	9	25,00
	1	7	19,44
	2	15	41,67
	3	5	13,89
Frecuencia de la defecación	0	2	5,56
	1	17	47,22
	2	9	25,00
	3	8	22,22
Pérdida de peso	0	16	44,44
	1	6	16,67
	2	5	13,89
	3	9	25,00
Niveles de albúmina	0	32	88,89
	1	4	11,11
Ascitis y edema periférico	0	32	88,89
	1	3	8,33
	2	1	2,78
Prurito	0	19	52,78
	1	5	13,89
	2	8	22,22
	3	4	11,11

Tras sumar las puntuaciones de los diferentes parámetros de cada índice, en cada perro se obtuvo un valor numérico total, siendo la media en los perros con EICI para el índice CIBDAI $7,61 \pm 3,83$ (rango 1,00-15,00), para el índice CIBDAISI $10,17 \pm 4,84$ (rango 1,00-19,00) y $8,83 \pm 4,21$ (rango 3,00-18,00) para el índice CCECAI.

En función del valor del índice, la gravedad de la enfermedad se clasificó en insignificante, leve, moderada y grave. Además, como ya se describió, el índice CCECAI también incluye la categoría muy grave. Los resultados en nuestro grupo de perros con EICI para cada índice se detallan en el gráfico 6.

Gráfico 6. Distribución de los perros con EICI en función del grado de enfermedad clínica aplicando los índices CIBDAI, CIBDAISI y CCECAI.



En los 10 perros del Grupo 2 con tratamiento inmunosupresor de forma previa a la endoscopia, los índices de actividad clínica de la enfermedad se calcularon de forma independiente obteniendo los siguientes resultados: índice CIBDAI $9,90 \pm 5,11$ (rango 1,00-15,00); índice CIBDAISI $12,50 \pm 6,84$ (rango 1,00-19,00); e índice CCECAI $11,80 \pm 5,12$ (rango 4,00-18,00). Los tres índices tuvieron una mayor puntuación en estos perros frente a los que no tomaban tratamiento, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el caso del índice CCECAI ($p=0,032$).

5.3.5. Descripción de los parámetros del estudio endoscópico en el grupo de perros con EICI

Del mismo modo que para el grupo de perros sanos o grupo control, para la valoración de la imagen macroscópica del tracto gastrointestinal durante la exploración endoscópica en el grupo de perros con EICI, se emplearon los índices de evaluación endoscópica propuestos por la WSAVA (Washabau *et al.*, 2010) y por Slovak y colaboradores (Slovak *et al.*, 2015). Los resultados de dichas valoraciones en el Grupo 2 se han detallado en las tablas 36 y 37.

Tabla 36. Valores del índice endoscópico de la WSAVA de 2010 en el grupo de perros con EICI.

	Parámetro	Graduación	Número de animales	Porcentaje
Esófago	Hiperemia/vascularización	0	31	86,11
		1	3	8,33
		2	2	5,56
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	0	29	80,56
		1	5	13,89
		2	2	5,56
	Friabilidad	0	36	100,00
	Hemorragia	0	36	100,00
	Erosiones/úlceras	0	33	91,67
		1	2	5,56
		2	1	2,78
	Contenido (moco/bilis/alimento)	0	33	91,67
		1	2	5,56
		2	1	2,78
	Dilatación	0	32	88,89
		1	3	8,33
		2	1	2,78
	Esfínter gastroesofágico	0	28	77,78
		1	2	5,56
		2	4	11,11
		3	2	5,56
	Otros	0	32	88,89
		1	3	8,33
		2	1	2,78

Estómago	Imposibilidad de dilatación	0	35	97,22
		1	1	2,78
	Hiperemia/vascularización	0	1	2,78
		1	16	44,44
		2	16	44,44
		3	3	8,33
	Edema	0	24	66,67
		1	7	19,44
		2	5	13,89
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	1	13	36,11
		2	20	55,56
		3	3	8,33
	Friabilidad	0	32	88,89
		1	2	5,56
		2	2	5,56
	Hemorragia	0	33	91,67
		1	2	5,56
		2	1	2,78
	Erosiones/úlceras	0	22	61,11
		1	8	22,22
		2	6	16,67
	Contenido (moco/bilis/alimento)	0	13	36,11
		1	8	22,22
		2	14	38,89
		3	1	2,78
	Esfínter gastroesofágico	0	24	66,67
		1	5	13,89
		2	5	13,89
		3	2	5,56
	Paso del endoscopio a través del píloro	0	32	88,89
		1	3	8,33
		2	1	2,78
	Otros	0	27	75,00
		1	7	19,44
		2	2	5,56
Duodeno	Imposibilidad de dilatación	0	35	97,22
		1	1	2,78
	Hiperemia/vascularización	0	5	13,89
		1	11	30,56
		2	11	30,56
		3	9	25,00
	Edema	0	12	33,33
		1	14	38,89
		2	4	11,11
		3	6	16,67
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	0	1	2,78
		1	7	19,44
		2	20	55,56
		3	8	22,22

Resultados

	Friabilidad	0	12	33,33
		1	6	16,67
		2	16	44,44
		3	2	5,56
	Irregularidad de la mucosa (textura)	0	2	5,56
		1	11	30,56
		2	15	41,67
		3	8	22,22
	Hemorragia	0	30	83,33
		1	4	11,11
		2	2	5,56
	Erosiones/úlceras	0	32	88,89
		1	2	5,56
		2	2	5,56
	Dilataciones linfáticas	0	19	52,78
		1	10	27,78
		2	3	8,33
		3	4	11,11

Tabla 37. Valores de la evaluación endoscópica del grupo de perros con EICI del estudio según el índice endoscópico de Slovak y colaboradores de 2015.

	Parámetro	Índice cuantitativo			Índice cualitativo		
		Graduación	Número de animales	Porcentaje	Graduación	Número de animales	Porcentaje
Estómago	Friabilidad	0	33	91,67	0	33	91,67
		1	3	8,33	1	3	8,33
	Irregularidad	0	4	11,11	0	4	11,11
		1	30	83,33	1	32	88,89
		2	2	5,56			
	Erosiones	0	24	66,67	0	24	66,67
		1	8	22,22	1	12	33,33
		2	4	11,11			
Duodeno	Friabilidad	0	15	41,67	0	16	44,44
		1	14	38,89	1	20	55,56
		2	7	19,44			
	Irregularidad	1	15	41,67	1	36	100,00
		2	21	58,33			
	Erosiones	0	34	94,44	0	34	94,44
		1	2	5,56	1	2	5,56
	Dilataciones linfáticas	0	19	52,78	0	20	55,56
		1	12	33,33	1	16	44,44
2		5	13,89				

Una vez obtenidos los valores de cada parámetro evaluado en las distintas localizaciones estudiadas, del mismo modo que se realizó en el grupo de perros sanos, se procedió a su sumatorio

para la obtención de los índices endoscópicos empleados. Los resultados de los dos índices endoscópicos para el grupo de perros con EICI se muestran en la tabla 38.

Tabla 38. Sumatorios de los parámetros evaluados en cada localización gastrointestinal con los índices endoscópicos de la WSAVA de 2010 y de Slovak y colaboradores de 2015 en el Grupo 2.

	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
Esófago WSAVA	1,39	2,16	0,00	2,00	0,00	9,00
Estómago WSAVA	6,75	2,94	6,00	4,00	2,00	15,00
Duodeno WSAVA	9,28	3,97	8,50	7,00	2,00	18,00
Estómago cuantitativo Slovak y col.	1,47	0,81	1,00	1,00	0,00	4,00
Estómago cualitativo Slovak y col.	1,31	0,58	1,00	1,00	0,00	2,00
Duodeno cuantitativo Slovak y col.	3,03	1,25	3,00	2,00	1,00	5,00
Duodeno cualitativo Slovak y col.	2,06	0,71	2,00	1,00	1,00	3,00

En los 10 perros del Grupo 2 que requirieron tratamiento inmunosupresor de forma previa al diagnóstico, los índices de evaluación de las lesiones endoscópicas también se calcularon de forma independiente, obteniéndose los resultados que se describen en la tabla 39.

Tabla 39. Sumatorios de los parámetros evaluados en cada localización gastrointestinal con los índices endoscópicos de la WSAVA de 2010 y de Slovak y colaboradores de 2015 en los perros del Grupo 2 con tratamiento inmunosupresor en el momento de la evaluación endoscópica.

	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
Esófago WSAVA	2,20	3,36	0,00	4,00	0,00	9,00
Estómago WSAVA	8,60	3,41	7,50	4,00	4,00	15,00
Duodeno WSAVA	11,10	5,02	13,00	8,00	2,00	18,00
Estómago cuantitativo Slovak y col.	1,70	1,06	1,00	1,00	1,00	4,00
Estómago cualitativo Slovak y col.	1,30	0,48	1,00	1,00	1,00	2,00
Duodeno cuantitativo Slovak y col.	3,30	1,16	3,00	2,00	2,00	5,00
Duodeno cualitativo Slovak y col.	2,30	0,48	2,00	1,00	2,00	3,00

Estos 10 perros mostraron unas puntuaciones endoscópicas mayores que los perros que no recibieron tratamiento de forma previa a la endoscopia en todos los sumatorios analizados,

resultando esta puntuación estadísticamente superior en el caso del sumatorio de los parámetros gástricos evaluados con el índice endoscópico de la WSAVA ($p=0,037$).

5.3.6. Descripción de los parámetros del estudio histopatológico en los perros con EICI

Finalmente y del mismo modo que en el grupo de animales sanos de este estudio, se emplearon los índices de clasificación histopatológica propuestos por la WSAVA (Day *et al.*, 2008) y el índice simplificado de Allenspach y colaboradores (Allenspach *et al.*, 2019) para la evaluación de las lesiones de las biopsias endoscópicas en el grupo de perros con EICI. Los resultados se han recogido en las tablas 40 y 41 como se observa a continuación.

Tabla 40. Valores de los parámetros histopatológicos evaluados en el grupo de perros con EICI mediante el empleo del índice de clasificación de la WSAVA de 2008.

			Graduación	Número de animales	Porcentaje
Estómago	Parámetros morfológicos	Lesión epitelial	0	28	77,78
			1	8	22,22
		Lesión de/en las fosas gástricas	0	28	77,78
			1	8	22,22
		Fibrosis y atrofia mucosa y/o glandular	0	3	8,33
			1	26	72,22
			2	7	19,44
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	0	36	100,00
			1	12	33,33
			2	24	66,67
		Eosinófilos en la lámina propia	0	31	86,11
			1	5	13,89
		Neutrófilos en la lámina propia	0	25	69,44
			1	11	30,56
		Hiperplasia de folículos linfoides	0	23	63,89
			1	7	19,44
			2	5	13,89
			3	1	2,78

Duodeno	Parámetros morfológicos	Atrofia de las vellosidades	0	2	5,56
			2	27	75,00
			3	7	19,44
		Lesión epitelial	0	16	44,44
			1	18	50,00
			2	2	5,56
		Dilatación de las criptas	0	1	2,78
			1	16	44,44
			2	13	36,11
			3	6	16,67
		Dilataciones linfáticas	0	1	2,78
			1	11	30,56
			2	17	47,22
			3	7	19,44
		Fibrosis de la mucosa	0	2	5,56
			1	24	66,67
			2	9	25,00
			3	1	2,78
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	0	4	11,11
			1	14	38,89
			2	16	44,44
			3	2	5,56
		Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	2	23	63,89
			3	13	36,11
		Eosinófilos en la lámina propia	0	14	38,89
			1	19	52,78
			2	3	8,33
		Neutrófilos en la lámina propia	0	12	33,33
			1	24	66,67

Tabla 41. Valores de los parámetros histopatológicos evaluados en el grupo de perros con EICI del estudio mediante el empleo del índice de clasificación simplificado de Allenspach y colaboradores de 2019.

			Graduación	Número de animales	Porcentaje
Estómago	Parámetros morfológicos	Fibrosis	0	3	8,33
			1	26	72,22
			2	7	19,44
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	0	36	100,00
		Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	1	12	33,33
			2	24	66,67
		Neutrófilos en la lámina propia	0	25	69,44
			1	11	30,56
		Eosinófilos en la lámina propia	0	31	86,11
			1	5	13,89

Duodeno	Parámetros morfológicos	Atrofia de las vellosidades	0	2	5,56
			2	27	75,00
			3	7	19,44
		Lesión epitelial	0	16	44,44
			1	18	50,00
			2	2	5,56
		Dilatación de las criptas	0	1	2,78
			1	16	30,56
			2	13	47,22
			3	6	19,44
		Dilataciones linfáticas	0	1	2,78
			1	11	30,56
			2	17	47,22
			3	7	19,44
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	2	23	63,89
			3	13	36,11
		Neutrófilos en la lámina propia	0	12	33,33
			1	24	66,67
		Eosinófilos en la lámina propia	0	14	38,89
			1	19	52,78
			2	3	8,33

Los sumatorios de los distintos parámetros evaluados con cada índice histopatológico en el grupo de perros con EICI se han detallado en la tabla 42.

Tabla 42. Sumatorios de los parámetros evaluados en cada localización gastrointestinal con los índices histopatológicos de la WSAVA y de Allenspach y colaboradores en el grupo de perros con EICI del estudio.

	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
Estómago WSAVA	4,22	2,07	4,00	3,00	1,00	10,00
Duodeno WSAVA	12,61	3,26	13,00	3,00	5,00	20,00
Estómago parámetros morfológicos WSAVA	1,56	1,00	1,00	1,00	0,00	4,00
Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	2,67	1,43	3,00	2,50	1,00	7,00
Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	7,44	2,16	7,00	2,50	3,00	12,00
Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	5,17	1,42	6,00	2,00	2,00	8,00
Estómago Allenspach y col.	3,22	1,12	3,00	2,00	1,00	5,00
Duodeno Allenspach y col.	9,92	2,48	10,00	3,00	5,00	15,00

Como se ha ido detallando previamente, en el grupo de 10 perros con EICI pertenecientes al Grupo 2 del estudio con tratamiento inmunosupresor en el momento de la toma de las biopsias endoscópicas y de la evaluación histológica de las mismas, el cálculo de los sumatorios de los índices histopatológicos empleados también se realizó de forma independiente. Los resultados se han reflejado en la tabla 43. A nivel histopatológico, las lesiones encontradas en estos 10 perros recibieron puntuaciones mayores respecto a los perros del Grupo 2 que no recibieron tratamiento previo a la endoscopia. Estas diferencias fueron significativamente mayores en el caso del sumatorio de los parámetros inflamatorios ($p=0,011$) y globales ($p=0,020$) duodenales evaluados con el índice de la WSAVA y de los parámetros duodenales evaluados con el índice de Allenspach y colaboradores ($p=0,011$).

Tabla 43. Sumatorios de los parámetros evaluados en cada localización gastrointestinal con los índices histopatológicos de la WSAVA y de Allenspach y colaboradores en los perros del Grupo 2 con tratamiento inmunosupresor en el momento de la evaluación histopatológica.

	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
Estómago WSAVA	4,60	2,37	4,00	2,00	2,00	10,00
Duodeno WSAVA	14,70	2,67	14,00	3,00	11,00	20,00
Estómago parámetros morfológicos WSAVA	1,60	1,07	1,00	1,00	1,00	4,00
Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	3,00	1,76	3,00	2,00	1,00	7,00
Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	8,90	1,60	8,50	2,00	7,00	12,00
Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	5,80	1,55	6,00	1,00	3,00	8,00
Estómago Allenspach y col.	3,60	1,07	3,00	2,00	2,00	5,00
Duodeno Allenspach y col.	11,70	2,16	11,00	2,00	8,00	15,00

5.3.7. Estudio de las asociaciones entre los sumatorios de los índices clínicos, endoscópicos e histopatológicos en los perros con EICI

Con el objetivo de determinar la existencia de posibles relaciones entre la gravedad clínica, endoscópica e histopatológica en los perros con EICI se llevó a cabo un estudio de la posible asociación entre el sumatorio de los índices clínicos empleados y los sumatorios de los índices endoscópicos e histopatológicos, así como entre los sumatorios de los índices endoscópicos e histopatológicos. Estos resultados se han detallado en la tabla 44. En los casos en

Resultados

los que se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre las variables analizadas, el valor de p se ha remarcado en color rojo. Así, se ha determinado la presencia de una asociación directamente proporcional entre el sumatorio de los índices clínicos CIBDAI y CIBDAISI y el sumatorio de las lesiones endoscópicas duodenales evaluadas con el índice cuantitativo de Slovak y colaboradores ($p=0,046$ y $p=0,031$, respectivamente). Por otro lado, se ha observado una relación inversamente proporcional entre el sumatorio de las lesiones endoscópicas gástricas evaluadas con el índice cuantitativo de Slovak y colaboradores y las lesiones histopatológicas morfológicas y globales duodenales evaluadas con el índice de la WSAVA ($p=0,041$ y $p=0,027$, respectivamente) y las lesiones histopatológicas duodenales evaluadas con el índice de Allenspach y colaboradores ($p=0,025$).

Tabla 44. Asociaciones encontradas entre el sumatorio de los índices clínicos, endoscópicos e histopatológicos en los perros con EICI. **A:** Asociaciones entre los índices clínicos y endoscópicos. **B:** Asociaciones entre los índices clínicos e histopatológicos. **C:** Asociaciones entre los índices endoscópicos e histopatológicos.

A:

Asociación			
Sumatorio índices clínicos	Sumatorio índices endoscópicos	r_s	Valor de p
CIBDAI	Esófago WSAVA	-0,105	0,541
	Estómago WSAVA	0,070	0,687
	Duodeno WSAVA	0,181	0,291
	Estómago cuantitativo Slovak y col.	0,100	0,560
	Estómago cualitativo Slovak y col.	0,058	0,739
	Duodeno cuantitativo Slovak y col.	0,334	0,046
	Duodeno cualitativo Slovak y col.	0,176	0,305
CIBDAISI	Esófago WSAVA	-0,125	0,468
	Estómago WSAVA	0,128	0,458
	Duodeno WSAVA	0,218	0,202
	Estómago cuantitativo Slovak y col.	0,137	0,426
	Estómago cualitativo Slovak y col.	0,051	0,766
	Duodeno cuantitativo Slovak y col.	0,359	0,031
	Duodeno cualitativo Slovak y col.	0,223	0,192
CCECAI	Esófago WSAVA	-0,182	0,289
	Estómago WSAVA	0,073	0,671
	Duodeno WSAVA	0,115	0,506
	Estómago cuantitativo Slovak y col.	0,059	0,732
	Estómago cualitativo Slovak y col.	0,040	0,818
	Duodeno cuantitativo Slovak y col.	0,262	0,123
	Duodeno cualitativo Slovak y col.	0,144	0,402

B:

Asociación			
Sumatorio índices clínicos	Sumatorio índices histopatológicos	r_s	Valor de p
CIBDAI	Estómago WSAVA	-0,062	0,722
	Duodeno WSAVA	0,239	0,160
	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	-0,110	0,521
	Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	-0,041	0,815
	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	0,209	0,221
	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	0,198	0,247
	Estómago Allenspach y col.	0,038	0,827
	Duodeno Allenspach y col.	0,268	0,114
CIBDAISI	Estómago WSAVA	0,026	0,882
	Duodeno WSAVA	0,232	0,174
	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	0,022	0,899
	Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	0,011	0,949
	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	0,213	0,212
	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	0,180	0,294
	Estómago Allenspach y col.	0,053	0,760
	Duodeno Allenspach y col.	0,231	0,176
CCECAI	Estómago WSAVA	-0,121	0,481
	Duodeno WSAVA	0,251	0,141
	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	-0,169	0,325
	Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	-0,092	0,595
	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	0,249	0,143
	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	0,165	0,337
	Estómago Allenspach y col.	-0,040	0,813
	Duodeno Allenspach y col.	0,291	0,085

C:

Asociación			
Sumatorio índices endoscópicos	Sumatorio índices histológicos	r_s	Valor de p
Esófago WSAVA	Estómago WSAVA	0,153	0,375
	Duodeno WSAVA	-0,279	0,099
	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	0,105	0,541
	Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	0,140	0,413
	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	-0,276	0,103
	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	-0,191	0,265
	Estómago Allenspach y col.	0,078	0,651
	Duodeno Allenspach y col.	-0,288	0,088

Estómago WSAVA	Estómago WSAVA	0,054	0,756
	Duodeno WSAVA	-0,228	0,181
	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	-0,030	0,864
	Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	0,087	0,615
	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	-0,182	0,286
	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	-0,183	0,286
	Estómago Allenspach y col.	-0,038	0,826
	Duodeno Allenspach y col.	-0,227	0,183
Duodeno WSAVA	Estómago WSAVA	-0,018	0,916
	Duodeno WSAVA	0,055	0,749
	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	0,143	0,404
	Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	-0,097	0,574
	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	0,099	0,565
	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	-0,038	0,827
	Estómago Allenspach y col.	-0,008	0,962
	Duodeno Allenspach y col.	-0,010	0,956
Estómago cuantitativo Slovak y col.	Estómago WSAVA	0,079	0,645
	Duodeno WSAVA	-0,163	0,343
	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	0,062	0,718
	Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	0,074	0,668
	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	-0,159	0,355
	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	-0,067	0,697
	Estómago Allenspach y col.	0,052	0,763
	Duodeno Allenspach y col.	-0,165	0,335
Estómago cualitativo Slovak y col.	Estómago WSAVA	0,039	0,820
	Duodeno WSAVA	-0,368	0,027
	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	0,071	0,680
	Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	0,001	0,996
	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	-0,342	0,041
	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	-0,278	0,100
	Estómago Allenspach y col.	-0,038	0,824
	Duodeno Allenspach y col.	-0,374	0,025
Duodeno cuantitativo Slovak y col.	Estómago WSAVA	-0,051	0,769
	Duodeno WSAVA	-0,045	0,796
	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	-0,048	0,778
	Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	-0,005	0,977
	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	-0,013	0,939
	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	-0,166	0,333
	Estómago Allenspach y col.	0,004	0,982
	Duodeno Allenspach y col.	-0,084	0,626
Duodeno cuantitativo Slovak y col.	Estómago WSAVA	-0,043	0,802
	Duodeno WSAVA	-0,018	0,917
	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	0,048	0,781
	Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	-0,067	0,698
	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	0,034	0,846
	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	-0,117	0,495
	Estómago Allenspach y col.	0,073	0,671
	Duodeno Allenspach y col.	-0,056	0,746

5.4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS ENTRE EL GRUPO DE PERROS SANOS Y EL GRUPO DE PERROS CON EICI

Con el fin de conocer la posible existencia de diferencias en los resultados encontrados para las variables analizadas entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI de este estudio, se realizó un estudio comparativo de los mismos. En las tablas de este apartado pueden observarse los resultados de cada variable en ambos grupos, así como el valor de p obtenido en la comparación de las mismas. En los casos en los que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$), el valor de p se ha remarcado en color rojo.

Cabe destacar que, para facilitar la comprensión de los resultados, se ha considerado al grupo de perros con EICI como un único grupo para llevar a cabo la comparativa con los perros sanos que se expone en este apartado. No obstante, en aquellos parámetros en los que se había observado la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los perros del Grupo 2 que habían recibido tratamiento previo a la endoscopia y los que no lo habían recibido, se ha llevado a cabo la comparativa específica entre los perros sanos y ambos subgrupos de perros con EICI.

5.4.1. Estudio comparativo de los datos de la reseña

Como puede observarse en las tablas 45-48, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las variables edad, peso, sexo, estado fértil, condición corporal y raza entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI del estudio.

Tabla 45. Comparación de los valores de la edad y del peso entre los Grupos 1 y 2.

		Media	Desviación estándar	Mediana	Rango intercuartílico	Mínimo	Máximo	Valor de p
Edad	Sanos	4,55	2,93	4,00	4,35	1,40	11,00	0,057
	EICI	6,30	3,08	6,00	4,15	1,80	12,00	
Peso	Sanos	18,92	15,91	13,85	15,38	4,50	64,60	0,595
	EICI	16,72	12,50	11,95	17,55	2,20	47,50	

Resultados

Tabla 46. Comparación en función del sexo y del estado fértil entre los perros de los Grupos 1 y 2.

			Número de animales	Porcentaje	Valor de p
Sexo	Sanos	Macho	9	43,75	1,000
		Hembra	7	56,25	
	EICI	Macho	21	58,33	
		Hembra	15	41,67	
Estado fértil	Sanos	Castrado	9	43,75	0,340
		No castrado	7	56,25	
	EICI	Castrado	26	56,25	
		No castrado	10	27,78	

Tabla 47. Comparación de los perros de los Grupos 1 y 2 en función de la condición corporal (escala 1-9).

	Condición corporal	Número de animales	Porcentaje	Valor de p
Sanos	4	2	12,50	0,063
	5	7	43,75	
	6	6	37,50	
	7	1	6,25	
EICI	3	5	13,89	
	4	14	38,89	
	5	6	16,67	
	6	9	25,00	
	7	2	5,56	

Tabla 48. Comparación de los perros de los Grupos 1 y 2 en función de la raza.

Raza	Sanos		EICI		Valor de p
	Número de perros	Porcentaje	Número de perros	Porcentaje	
Mestizo	7	43,75	10	27,78	0,340
Otras razas	9	56,25	26	72,22	

5.4.2. Estudio comparativo de los parámetros de la analítica sanguínea

En cuanto a la comparación de los parámetros de la hematología entre los perros sanos y los perros con EICI del estudio, se observó que los perros con EICI presentaron un recuento de plaquetas significativamente mayor que los perros sanos ($p=0,001$). En cuanto al recuento y la

fórmula leucocitaria se evidenció un mayor número de leucocitos totales ($p=0,018$) y de neutrófilos tanto en valor absoluto ($p=0,015$) como relativo ($p=0,023$) en el grupo de perros enfermos. Por el contrario, los animales sanos mostraron unos valores de urea significativamente mayores que los perros con EICI ($p=0,027$) en referencia a la bioquímica sanguínea. Los valores de dichas comparaciones se han reflejado en las tablas 49 y 50.

Tabla 49. Comparación de los valores de la hematología entre los Grupos 1 y 2. **A:** Series eritroide y plaquetaria. **B:** Recuento y fórmula leucocitarios.

A:		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
Glóbulos rojos x $10^6/\mu\text{L}$	Sanos	6,65	0,89	6,60	0,94	5,27	8,75	0,945
	EICI	6,65	1,03	6,67	1,66	4,85	9,06	
Hemoglobina (g/dL)	Sanos	15,57	1,78	15,60	2,70	12,80	18,80	0,953
	EICI	15,71	2,48	15,65	3,15	12,20	22,40	
Hematocrito (%)	Sanos	44,70	11,86	47,40	9,75	37,80	58,00	0,969
	EICI	46,41	6,88	46,25	10,80	36,90	60,00	
Plaquetas x $10^3/\mu\text{L}$	Sanos	207,75	84,49	200,50	78,00	82,00	409,00	0,001
	EICI	347,29	161,77	302,00	150,00	104,00	847,00	

B:		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
Leucocitos x $10^3/\mu\text{L}$	Sanos	6,56	2,25	6,22	2,84	3,50	12,29	0,018
	EICI	8,57	3,94	8,05	2,89	3,93	27,10	
Neutrófilos/ μL	Sanos	4281	1855	3575	2517	2037	9200	0,015
	EICI	6203	3587	5216	2804	2378	2305	
Neutrófilos (%)	Sanos	63,76	7,80	63,30	14,60	53,20	75,10	0,023
	EICI	70,63	9,21	69,80	13,95	54,10	90,00	
Linfocitos/ μL	Sanos	1602	428	1418	628	1100	2454	0,790
	EICI	1648	640	1654	1047	539	2951	
Linfocitos (%)	Sanos	26,14	7,96	26,90	14,85	12,70	36,30	0,054
	EICI	20,60	8,32	21,00	14,35	3,00	36,00	
Monocitos/ μL	Sanos	351	194	270	293	100	728	0,629
	EICI	388	283	339	239	0	1636	
Monocitos (%)	Sanos	5,08	1,42	5,35	1,85	1,90	7,50	0,243
	EICI	4,55	2,31	4,70	2,45	0,00	10,40	
Eosinófilos/ μL	Sanos	221	180	157	257	0	700	0,826
	EICI	248	229	237	225	0	926	
Eosinófilos (%)	Sanos	3,31	1,95	3,20	3,50	0,50	6,80	0,622
	EICI	3,21	2,66	3,00	3,95	0,00	9,50	

Resultados

Basófilos/ μ L	Sanos	10	8	8	7	0	28	0,160
	EICI	7	10	3	13	0	39	
Basófilos (%)	Sanos	0,16	0,17	0,10	0,10	0,00	0,70	0,172
	EICI	0,10	0,12	0,05	0,20	0,00	0,40	

Tabla 50. Valores de la bioquímica sanguínea de los perros de los Grupos 1 y 2.

		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de <i>p</i>
Glucosa (mg/dL)	Sanos	121,94	53,42	114,00	37,00	31,00	248,00	0,091
	EICI	102,33	24,03	98,50	19,50	50,00	208,00	
Urea (mg/dL)	Sanos	40,20	7,46	39,72	11,57	25,71	49,50	0,027
	EICI	36,01	22,30	29,85	19,50	0,00	120,00	
Creatinina (mg/dL)	Sanos	1,03	0,26	1,05	0,30	0,70	1,60	0,190
	EICI	0,91	0,26	0,90	0,40	0,43	1,50	
GPT/ALT (U/L)	Sanos	53,81	51,20	40,00	31,00	18,00	229,00	0,316
	EICI	44,39	36,01	33,00	35,50	13,00	159,00	
Proteínas totales (g/dL)	Sanos	6,22	0,70	6,05	1,00	5,00	7,50	0,992
	EICI	6,00	1,28	6,40	1,39	3,60	8,40	
Albumina (g/dL)	Sanos	3,11	0,35	3,03	0,50	2,50	3,75	0,737
	EICI	2,97	0,63	3,10	0,76	1,60	4,20	

Como describimos en el apartado 5.3.3. de esta sección de “Resultados”, los perros con EICI que recibieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la primera endoscopia presentaron un recuento de plaquetas significativamente mayor que los perros de dicho grupo que no lo recibieron ($p=0,003$). En este sentido se ha llevado a cabo la comparación para el valor de plaquetas entre los perros sanos y los perros del Grupo 2 que recibieron tratamiento previo y los que no lo recibieron, siendo el valor de plaquetas significativamente superior tanto en los perros con EICI tratados ($p=0,001$) como en los no tratados ($p=0,008$) en comparación con el grupo control.

5.4.3. Estudio comparativo de los parámetros endoscópicos

Al comparar las lesiones macroscópicas observadas durante el estudio endoscópico entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI, se evidenció que el grupo de perros con EICI presentaba puntuaciones estadísticamente mayores que el grupo de perros sanos en los parámetros: hiperemia/vascularización ($p=0,002$), edema ($p=0,047$), alteraciones en la coloración de la mucosa ($p=0,001$) y presencia de erosiones y/o úlceras ($p=0,017$) a nivel gástrico; y en los parámetros hiperemia/vascularización ($p=0,003$), edema ($p=0,012$), alteraciones en la coloración de la mucosa ($p=0,001$) y friabilidad ($p=0,012$) a nivel duodenal según el índice endoscópico de

la WSAVA (Washabau *et al.*, 2010). Sin embargo, con el índice de Slovak y colaboradores (Slovak *et al.*, 2015) tan solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el parámetro irregularidad a nivel gástrico tanto con el índice cualitativo como cuantitativo ($p=0,002$ en ambos índices) y a nivel duodenal con el índice cualitativo ($p=0,007$), habiendo recibido estas lesiones también una mayor puntuación en el grupo de animales enfermos. Los detalles de dichas comparaciones se han reflejado en las tablas 51 y 52.

Tabla 51. Comparación del índice endoscópico de la WSAVA de 2010 entre los Grupos 1 y 2.

	Parámetro	Graduación	Sanos		EICI		Valor de p
			Número de animales	Porcentaje	Número de animales	Porcentaje	
Esófago	Hiperemia/vascularización	0	16	100,00	31	86,11	0,585
		1	-	-	3	8,33	
		2	-	-	2	5,56	
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	0	16	100,00	29	80,56	0,234
		1	-	-	5	13,89	
		2	-	-	2	5,56	
	Friabilidad	0	16	100,00	36	100,00	1,000
	Hemorragia	0	16	100,00	36	100,00	1,000
	Erosiones/úlceras	0	16	100,00	33	91,67	1,00
		1	-	-	2	5,56	
		2	-	-	1	2,78	
	Contenido (moco/bilis/alimento)	0	13	81,25	33	91,67	0,380
		1	1	6,25	2	5,56	
		2	1	6,25	1	2,78	
		3	1	6,25	-	-	
	Dilatación	0	16	100,00	32	88,89	0,683
		1	-	-	3	8,33	
		2	-	-	1	2,78	
	Esfínter gastroesofágico	0	16	100,00	28	77,78	0,285
		1	-	-	2	5,56	
		2	-	-	4	11,11	
		3	-	-	2	5,56	
	Otros	0	16	100,00	32	88,89	0,684
		1	-	-	3	8,33	
		2	-	-	1	2,78	

Resultados

Estómago	Imposibilidad de dilatación	0	14	100,00	35	97,22	1,000
		1	-	-	1	2,78	
	Hiperemia/vascularización	0	6	42,86	1	2,78	0,002
		1	6	42,86	16	44,44	
		2	2	14,29	16	44,44	
		3	-	-	3	8,33	
	Edema	0	14	100,00	24	66,67	0,047
		1	-	-	7	19,44	
		2	-	-	5	13,89	
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	0	5	35,71	-	-	0,001
		1	6	42,86	13	36,11	
		2	3	21,43	20	55,56	
		3	-	-	3	8,33	
	Friabilidad	0	14	100,00	32	88,89	1,000
		1	-	-	2	5,56	
		2	-	-	2	5,56	
	Hemorragia	0	14	100,00	33	91,67	1,000
		1	-	-	2	5,56	
		2	-	-	1	2,78	
	Erosiones/úlceras	0	14	100,00	22	61,11	0,017
		1	-	-	8	22,22	
		2	-	-	6	16,67	
	Contenido (moco/bilis/alimento)	0	5	35,71	13	36,11	0,508
		1	1	7,14	8	22,22	
		2	7	50,00	4	38,89	
		3	1	7,14	1	2,78	
	Esfínter gastroesofágico	0	14	100,00	24	66,67	0,134
		1	-	-	5	13,89	
		2	-	-	5	13,89	
		3	-	-	2	5,56	
	Paso del endoscopio a través del píloro	0	14	100,00	32	88,89	0,675
		1	-	-	3	8,33	
		2	-	-	1	2,78	
	Otros	0	13	92,86	27	75,00	0,557
		1	1	7,14	7	19,44	
		2	-	-	2	5,56	
Duodeno	Imposibilidad de dilatación	0	16	100,00	35	97,22	1,000
		1	-	-	1	2,78	
	Hiperemia/vascularización	0	8	50,00	5	13,89	0,003
		1	7	43,75	11	30,56	
		2	1	6,25	11	30,56	
		3	-	-	9	25,00	
	Edema	0	13	81,25	12	33,33	0,012
		1	2	12,50	14	38,89	
		2	1	6,25	4	11,11	
		3	-	-	6	16,67	

Duodeno	Alteraciones en la coloración de la mucosa	0	5	31,25	1	2,78	0,001
		1	7	43,75	7	19,44	
		2	3	18,75	20	55,56	
		3	1	6,25	8	22,22	
	Friabilidad	0	8	50,00	12	33,33	0,012
		1	7	43,75	6	16,67	
		2	1	6,25	16	44,44	
		3	-	-	2	5,56	
	Irregularidad de la mucosa (textura)	0	2	12,50	2	5,56	0,484
		1	6	37,50	11	30,56	
		2	7	43,75	15	41,67	
		3	1	6,25	8	22,22	
	Hemorragia	0	15	93,75	30	83,33	1,000
		1	1	6,25	4	11,11	
		2	-	-	2	5,56	
	Erosiones/úlceras	0	16	100,00	32	88,89	1,000
		1	-	-	2	5,56	
		2	-	-	2	5,56	
	Dilataciones linfáticas	0	11	68,75	19	52,78	0,466
		1	5	31,25	10	27,78	
		2	-	-	3	8,33	
		3	-	-	4	11,11	
	Contenido (moco/bilis/alimento)	0	10	62,50	27	75,00	0,612
		1	4	25,00	7	19,44	
		2	2	12,50	2	5,56	
	Otros	0	16	100,00	36	100,00	1,000

Tabla 52. Comparación de los valores de la evaluación endoscópica entre los Grupos de perros 1 y 2 según el índice endoscópico de Slovak y colaboradores de 2015.

	Parámetro	Índice Cuantitativo					Valor de <i>p</i>
		Graduación	Sanos		EICI		
			Número de animales	Porcentaje	Número de animales	Porcentaje	
Estómago	Friabilidad	0	14	100,00	33	91,67	0,550
		1	-	-	3	8,33	
	Irregularidad	0	8	57,14	4	11,11	0,002
		1	6	42,86	30	83,33	
		2	-	-	2	5,56	
	Erosiones	0	13	92,86	24	66,67	0,215
		1	1	7,14	8	22,22	
		2	-	-	4	11,11	

Resultados

Duodeno	Friabilidad	0	8	50,00	15	41,67	0,561
		1	7	43,75	14	38,89	
		2	1	6,25	7	19,44	
	Irregularidad	0	2	12,50	-	-	0,110
		1	7	43,75	15	41,67	
		2	7	43,75	21	58,33	
	Erosiones	0	16	100,00	34	94,44	1,000
		1	-	-	2	5,56	
	Dilataciones linfáticas	0	11	68,75	19	52,78	0,305
		1	5	31,25	12	33,33	
		2	-	-	5	13,89	
	Índice Cualitativo						
Estómago	Friabilidad	0	14	100,00	33	91,67	0,550
		1	-	-	3	8,33	
	Irregularidad	0	8	57,14	4	11,11	0,002
		1	6	42,86	32	88,89	
	Erosiones	0	13	92,86	24	66,67	0,078
1	1	7,14	12	33,33			
Duodeno	Friabilidad	0	11	68,75	16	44,44	0,138
		1	5	31,25	20	55,56	
	Irregularidad	0	4	25,00	-	-	0,007
		1	12	75,00	36	100,00	
	Erosiones	0	16	100,00	34	94,44	1,000
		1	-	-	2	5,56	
	Dilataciones linfáticas	0	11	68,75	20	55,56	0,542
1	5	31,25	16	44,44			

Respecto a la comparativa de los sumatorios de los índices de evaluación endoscópica entre ambos grupos, como se observa en la tabla 53, todos los sumatorios, salvo el de las lesiones a nivel esofágico mediante el índice de la WSAVA, fueron significativamente mayores en el grupo de perros con EICI en comparación con el grupo de perros sanos o grupo control.

Tabla 53. Comparativa de los sumatorios de los parámetros evaluados con los índices endoscópicos entre los perros de los Grupos 1 y 2.

		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
Esófago WSAVA	Sanos	0,38	0,89	0,00	0,00	0,00	3,00	0,057
	EICI	1,39	2,16	0,00	2,00	0,00	9,00	
Estómago WSAVA	Sanos	2,93	2,02	2,00	2,00	0,00	7,00	0,001
	EICI	6,75	2,94	6,00	4,00	2,00	15,00	
Duodeno WSAVA	Sanos	4,69	2,91	5,00	4,50	0,00	9,00	0,001
	EICI	9,28	3,97	8,50	7,00	2,00	18,00	

Estómago cuantitativo Slovak y col.	Sanos	0,50	0,65	0,00	1,00	0,00	2,00	0,001
	EICI	1,47	0,81	1,00	1,00	0,00	4,00	
Estómago cualitativo Slovak y col.	Sanos	0,50	0,65	0,00	1,00	0,00	2,00	0,001
	EICI	1,31	0,58	1,00	1,00	0,00	2,00	
Duodeno cuantitativo Slovak y col.	Sanos	2,19	1,11	2,00	1,50	0,00	4,00	0,042
	EICI	3,03	1,25	3,00	2,00	1,00	5,00	
Duodeno cualitativo Slovak y col.	Sanos	1,38	0,89	1,50	1,00	0,00	3,00	0,015
	EICI	2,06	0,71	2,00	1,00	1,00	3,00	

A nivel endoscópico, como describimos en el apartado 5.3.4. de esta sección de “Resultados”, los perros con EICI que recibieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la endoscopia, presentaron un valor para el sumatorio de los parámetros gástricos de índice de WSAVA estadísticamente superior a los perros con EICI que no recibieron tratamiento ($p=0,037$). En este sentido, comparamos ambas subpoblaciones del Grupo 2 con los perros sanos para esta variable, encontrando unos valores estadísticamente superiores en comparación con el grupo de perros sanos tanto en el caso de los perros con EICI que recibieron tratamiento ($p=0,001$), como en el caso de los que no lo recibieron ($p=0,001$).

5.4.4. Estudio comparativo de los parámetros histopatológicos

En el estudio comparativo de las lesiones histopatológicas entre ambos grupos empleando los dos índices descritos previamente (Day *et al.*, 2008; Allenspach *et al.*, 2019), se observó a nivel gástrico una puntuación estadísticamente superior en el infiltrado de linfocitos y células plasmáticas y de neutrófilos en la lámina propia en el grupo de animales con EICI para ambos índices ($p=0,035$ y $p=0,0046$, respectivamente, siendo el valor de p el mismo para estos parámetros en los dos índices). En el caso del duodeno, todos los parámetros tanto morfológicos como inflamatorios, salvo en el caso de la fibrosis de la mucosa del índice de la WSAVA, tuvieron una puntuación significativamente mayor en el grupo de perros con EICI. Las especificaciones de estas comparaciones se han detallado en las tablas 54 y 55.

Tabla 54. Comparación de los parámetros recogidos en el índice histopatológico de la WSAVA entre los perros sanos y los perros con EICI del estudio.

			Graduación	Sanos		EICI		Valor de p
				Número de animales	Porcentaje	Número de animales	Porcentaje	
Estómago	Parámetros morfológicos	Lesión epitelial	0	10	90,91	28	77,78	0,663
			1	1	9,09	8	22,22	
		Lesión en/de las fosas gástricas	0	10	90,91	28	77,78	0,663
			1	1	9,09	8	22,22	
		Fibrosis y atrofia mucosa y/o glandular	0	-	-	3	8,33	0,494
			1	7	63,64	26	72,22	
			2	4	36,36	7	19,44	
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	0	10	90,91	36	100,00	0,070
			1	1	9,09	-	-	
		Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	1	8	72,73	12	33,33	0,035
			2	3	27,27	24	66,67	
		Eosinófilos en la lámina propia	0	11	100,00	31	86,11	0,322
			1	-	-	5	13,89	
		Neutrófilos en la lámina propia	0	11	100,00	25	69,44	0,046
			1	-	-	11	30,56	
		Hiperplasia de folículos linfoides	0	7	63,64	23	63,89	0,805
			1	2	18,18	7	19,44	
			2	1	9,09	5	13,89	
			3	1	9,09	1	2,78	

Duodeno	Parámetros morfológicos	Atrofia de las vellosidades	0	1	6,67	2	5,56	0,001
			1	10	66,67	-	-	
			2	4	26,67	27	75,00	
			3	-	-	7	19,44	
		Lesión epitelial	0	14	93,33	16	44,44	0,003
			1	1	6,67	18	50,00	
			2	-	-	2	5,56	
		Dilatación de las criptas	0	9	60,00	1	2,78	0,001
			1	6	40,00	16	44,44	
			2	-	-	13	36,11	
			3	-	-	6	16,67	
		Dilataciones linfáticas	0	9	60,00	1	2,78	0,001
			1	5	33,33	11	30,56	
			2	1	6,67	17	47,22	
			3	-	-	7	19,44	
		Fibrosis de la mucosa	0	5	33,33	2	5,56	0,059
			1	8	53,33	24	66,67	
			2	2	13,33	9	25,00	
			3	-	-	1	2,78	
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	0	13	86,67	4	11,11	0,001
			1	2	13,33	14	38,89	
			2	-	-	16	44,44	
			3	-	-	2	5,56	
		Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	1	9	60,00	-	-	0,001
			2	5	33,33	23	63,89	
			3	1	6,67	13	36,11	
		Eosinófilos en la lámina propia	0	15	100,00	14	38,89	0,001
			1	-	-	19	52,78	
			2	-	-	3	8,33	
		Neutrófilos en la lámina propia	0	13	86,67	12	33,33	0,001
			1	2	13,33	24	66,67	

Resultados

Tabla 55. Comparación de los parámetros recogidos en el índice histopatológico propuesto por Allenspach y colaboradores entre los perros sanos y los perros con EICI del estudio.

			Graduación	Sanos		EICI		Valor de p
				Número de animales	Porcentaje	Número de animales	Porcentaje	
Estómago	Parámetros morfológicos	Fibrosis	0	-	-	3	8,33	0,494
			1	7	63,64	26	72,22	
			2	4	36,36	7	19,44	
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intraepiteliales	0	10	90,91	36	100,00	0,234
			1	1	9,09	-	-	
		Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	1	8	72,73	12	33,33	0,035
			2	3	27,27	24	66,67	
		Neutrófilos en la lámina propia	0	11	100,00	25	69,44	0,046
			1	-	-	11	30,56	
		Eosinófilos en la lámina propia	0	11	100,00	31	86,11	0,322
			1	-	-	5	13,89	
Duodeno	Parámetros morfológicos	Atrofia de las vellosidades	0	1	6,67	2	5,56	0,001
			1	10	66,67	-	-	
			2	4	26,67	27	75,00	
			3	-	-	7	19,44	
		Lesión epitelial	0	14	93,33	16	44,44	0,003
			1	1	6,67	18	50,00	
			2	-	-	2	5,56	
		Dilatación de las criptas	0	9	60,00	1	2,78	0,001
			1	6	40,00	16	44,44	
			2	-	-	13	36,11	
			3	-	-	6	16,67	

		Dilataciones linfáticas	0	9	60,00	1	2,78	0,001
			1	5	33,33	11	30,56	
			2	1	6,67	17	47,22	
			3	-	-	7	19,44	
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	1	9	60,00	-	-	0,001
			2	5	33,33	23	63,89	
			3	1	6,67	13	36,11	
		Neutrófilos en la lámina propia	0	13	86,67	12	33,33	0,001
			1	2	13,33	24	66,67	
		Eosinófilos en la lámina propia	0	15	100,00	14	38,89	0,001
			1	-	-	19	52,78	
			2	-	-	3	8,33	

Resultados

Respecto a la comparativa de los sumatorios de los índices de evaluación histopatológica entre ambos grupos, como se observa en la tabla 56, todos los sumatorios que recogen los parámetros duodenales, tanto el del índice de la WSAVA global ($p=0,001$), el de la WSAVA para los parámetros morfológicos ($p=0,001$), el de la WSAVA para los parámetros inflamatorios ($p=0,001$) y el del índice de Allenspach y colaboradores ($p=0,001$), resultaron estadísticamente mayores en el grupo de perros con EICI. A nivel gástrico, por el contrario, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 56. Comparativa de los sumatorios de los parámetros evaluados con los índices histopatológicos entre los perros de los Grupos 1 y 2.

		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
Estómago WSAVA	Sanos	3,55	1,97	3,00	3,00	2,00	7,00	0,316
	EICI	4,22	2,07	4,00	3,00	1,00	10,00	
Duodeno WSAVA	Sanos	4,67	2,16	4,00	3,00	2,00	9,00	0,001
	EICI	12,61	3,26	13,00	3,00	5,00	20,00	
Estómago parámetros morfológicos WSAVA	Sanos	1,55	0,69	1,00	1,00	1,00	3,00	0,827
	EICI	1,56	1,00	1,00	1,00	0,00	4,00	
Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	Sanos	2,00	1,55	1,00	1,00	1,00	5,00	0,124
	EICI	2,67	1,43	3,00	2,50	1,00	7,00	
Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	Sanos	2,93	1,62	2,00	2,00	1,00	6,00	0,001
	EICI	7,44	2,16	7,00	2,50	3,00	12,00	
Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	Sanos	1,73	0,88	1,00	2,00	1,00	3,00	0,001
	EICI	5,17	1,42	6,00	2,00	2,00	8,00	
Estómago Allenspach y col.	Sanos	2,73	1,10	2,00	2,00	2,00	5,00	0,165
	EICI	3,22	1,12	3,00	2,00	1,00	5,00	
Duodeno Allenspach y col.	Sanos	3,73	1,71	3,00	2,00	2,00	7,00	0,001
	EICI	9,92	2,48	10,00	3,00	5,00	15,00	

Como se detalló previamente en el apartado 5.3.6. de esta sección de “Resultados”, en los 10 perros del Grupo 2 que recibieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la endoscopia,

encontramos valores significativamente superiores para los sumatorios de los parámetros inflamatorios ($p=0,011$) y globales ($p=0,020$) duodenales evaluados con el índice de la WSAVA y de los parámetros duodenales evaluados con el índice de Allenspach y colaboradores ($p=0,011$) en comparación con los perros que no lo recibieron. Al comparar de forma individual los perros con EICI que recibieron tratamiento y los que no lo recibieron con el grupo de perros sanos para estas variables, observamos que todas ellas fueron estadísticamente superiores en los perros con EICI independientemente de si habían recibido tratamiento o no (sumatorio de los parámetros inflamatorios duodenales índice WSAVA: perros con EICI tratados $p=0,001$, perros con EICI no tratados $p=0,001$; sumatorio de los parámetros globales duodenales índice WSAVA: perros con EICI tratados $p=0,001$, perros con EICI no tratados $p=0,001$; sumatorio de los parámetros globales duodenales índice Allenspach y colaboradores: perros con EICI tratados $p=0,001$, perros con EICI no tratados $p=0,001$).

5.5. ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPO

Como se ha descrito en la sección de “Materiales y métodos” de esta tesis doctoral, a partir de las muestras de sangre recogidas con el anticoagulante EDTA y de las biopsias duodenales recogidas en medio completo durante la realización del procedimiento endoscópico, se procedió a realizar el estudio del inmunofenotipo mediante el marcaje de los linfocitos de sangre periférica y del epitelio y de la lámina propia duodenal con los anticuerpos monoclonales anti-CD45, anti-CD14, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-FoxP3, anti-IL-4 y anti-IFN- γ y su posterior análisis en un citómetro de flujo.

5.5.1. Estudio del inmunofenotipo en sangre periférica

Siguiendo el protocolo de aislamiento linfocitario en sangre periférica y el protocolo de marcaje de los linfocitos para su estudio por citometría de flujo detallados en los apartados 4.6.2. y 4.6.5., respectivamente, de la sección de “Materiales y métodos”, se llevó a cabo el inmunofenotipaje sanguíneo de los perros del estudio.

5.5.1.1. Inmunofenotipaje en sangre periférica en el grupo de perros sanos

Los resultados del inmunofenotipaje de las poblaciones linfocitarias sanguíneas propuestas para esta tesis doctoral en el grupo de perros sanos del estudio se han reflejado en la tabla 57. Para el cálculo del número absoluto de estas poblaciones linfocitarias a partir del valor porcentual se empleó el número total de linfocitos por microlitro de sangre, cuyo valor en el grupo de perros sanos se detalló en la tabla 18B del apartado 5.2.3. de esta sección de “Resultados”.

Tabla 57. Valores resultantes del inmunofenotipaje de los linfocitos de sangre periférica del grupo de perros sanos. **A:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias y cociente CD4/CD8. **B:** resultados en valores absolutos respecto al total de linfocitos sanguíneos.

A:	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máy.
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	87,90	5,33	88,53	7,04	74,52	95,59
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	43,06	7,35	42,69	8,48	26,39	57,56
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	29,32	8,04	28,00	14,29	16,28	42,28
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+ CD8+)	1,06	0,55	1,03	0,82	0,21	1,97
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	12,70	3,33	12,36	5,51	8,45	18,65
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)*	3,37	1,78	3,09	1,96	1,16	8,42
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)*	9,87	22,04	3,56	4,87	0,95	91,97
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)	2,75	2,12	2,28	3,75	0,05	5,94
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	17,42	10,30	17,56	8,79	2,17	42,87
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	7,78	8,86	3,98	12,83	0,19	28,10
% de linfocitos Th1 (CD3+CD4+ IFN- γ +)*)	25,20	16,36	21,57	21,65	2,88	60,74
% de linfocitos Th2 (CD3+CD4+ IL-4+)*)	1,35	1,07	0,90	1,62	0,13	3,46
Cociente CD4/CD8	1,61	0,62	1,48	0,71	0,62	3,17

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados y de linfocitos Th1 y Th2 está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

B:	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
Linfocitos T (CD45+CD3+)/ μ L	1385	407	1266	565	885	2214
Linfocitos Th (CD3+CD4+)/ μ L	687	233	668	373	349	1137
Linfocitos Tc (CD3+CD8+)/ μ L	446	145	451	159	224	768
Linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)/ μ L	17	11	16	11	3	47
Linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)/ μ L	200	73	174	97	116	371
Linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)/ μ L	55	37	44	35	16	162
Linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)/ μ L	44	99	16	20	5	413
Linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)/ μ L	44	36	34	57	1	114
Linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+ IFN- γ +)/ μ L	267	162	226	148	22	707
Linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)/ μ L	132	158	57	223	2	503
Linfocitos Th1 (CD3+CD4+ IFN- γ +)/ μ L	172	124	120	196	33	463
Linfocitos Th2 (CD3+CD4+ IL-4+)/ μ L	10	10	6	16	1	36

5.5.1.2. Inmunofenotipaje en sangre periférica en el grupo de perros con EICI

La descripción del inmunofenotipo sanguíneo en el grupo de perros con EICI del estudio se ha reflejado en la tabla 58. Del mismo modo que en el grupo de sanos, para el cálculo del número absoluto de estas poblaciones linfocitarias se empleó el número total de linfocitos por microlitro de sangre, cuyo valor en el grupo de perros sanos se detalló en la tabla 31B del apartado 5.3.3. de esta sección de “Resultados”.

Tabla 58. Valores resultantes del inmunofenotipaje de los linfocitos de sangre periférica del grupo de perros con EICI. **A:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias y cociente CD4/CD8. **B:** resultados en valores absolutos respecto al total de linfocitos sanguíneos.

A:	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	86,32	10,52	88,59	10,62	46,52	97,71
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	41,50	9,35	41,57	14,34	25,54	54,94
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	29,76	10,06	26,89	15,19	14,75	52,86
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)	1,62	1,14	1,30	1,01	0,40	5,82
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	17,22	8,62	14,92	8,50	7,03	50,65
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)*	5,14	3,19	4,18	2,33	1,55	18,25
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+CD25+)*	6,52	5,67	4,56	5,48	0,68	22,38
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	5,62	3,58	5,73	4,33	0,20	17,10
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	21,00	15,94	18,46	20,92	0,79	71,84
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	4,26	6,16	1,13	6,57	0,00	25,36
% de linfocitos Th1 (CD3+CD4+ IFN- γ +)*)	34,78	23,10	30,20	44,04	0,12	78,05
% de linfocitos Th2 (CD3+CD4+ IL-4+)*)	5,44	6,13	3,97	7,60	0,00	30,87
Cociente CD4/CD8	1,62	0,80	1,46	0,84	0,50	3,57

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados y de linfocitos Th1 y Th2 está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

Resultados

B:	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
Linfocitos T (CD45+CD3+)/ μ L	1424	572	1445	821	448	2396
Linfocitos Th (CD3+CD4+)/ μ L	694	337	651	515	175	1558
Linfocitos Tc (CD3+CD8+)/ μ L	481	239	445	310	134	1205
Linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)/ μ L	27	24	19	17	4	129
Linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)/ μ L	288	188	234	254	75	856
Linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)/ μ L	87	60	73	71	17	273
Linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)/ μ L	30	33	23	24	3	158
Linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)/ μ L	96	68	89	110	2	257
Linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+ IFN- γ +)/ μ L	351	343	342	362	13	1588
Linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)/ μ L	70	98	19	102	0	332
Linfocitos Th1 (CD3+CD4+ IFN- γ +)/ μ L	251	248	158	287	1	975
Linfocitos Th2 (CD3+CD4+ IL-4+)/ μ L	45	83	27	43	0	481

Como se ha ido describiendo previamente en esta sección de “Resultados”, 10 perros del Grupo 2, dada su gravedad clínica, requirieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la realización de la endoscopia diagnóstica y con ello de forma previa al análisis del inmunofenotipo sanguíneo. Los valores de las distintas poblaciones linfocitarias de sangre periférica evaluadas en este trabajo se compararon entre los perros que recibieron tratamiento de forma previa a la endoscopia y los que no. Se encontraron diferencias significativas en los valores tanto absolutos como relativos de los linfocitos Th activados ($p=0,030$ y $p=0,040$, respectivamente) y en el valor relativo de los linfocitos Treg ($p=0,040$, respectivamente) en sangre periférica, siendo estas poblaciones menores en los animales que recibieron tratamiento frente a los que no lo recibieron (% de linfocitos Th activados: no tratados $5,74\pm3,56$, tratados $3,57\pm0,81$; linfocitos Th activados/ μ L: no tratados 99 ± 64 , tratados 53 ± 32 ; % de linfocitos Treg: no tratados $6,32\pm3,88$, tratados $3,78\pm1,69$).

5.5.2. Estudio del inmunofenotipo intestinal

En este apartado, inicialmente se describirán los resultados de la puesta a punto de los protocolos de aislamiento de los linfocitos de los dos compartimentos intestinales estudiados, para posteriormente exponer los resultados del inmunofenotipaje intestinal obtenidos para cada uno de los grupos de perros del estudio.

5.5.2.1. Resultados de la puesta a punto del protocolo de aislamiento de los linfocitos intraepiteliales

En el apartado 4.5.1. de la sección de “Materiales y métodos” se describieron los tres protocolos evaluados para el aislamiento de los linfocitos intraepiteliales (“suave”, “intenso” y “muy intenso”). El objetivo de todos ellos era la eliminación de la mayor cantidad de epitelio intestinal aportando un buen rendimiento de las muestras para su análisis por citometría de flujo y una buena viabilidad celular. Por lo tanto, la selección del protocolo de aislamiento de LIE para este estudio se hizo en función de los resultados de la viabilidad celular (tabla 59), la observación histológica de la capacidad para eliminar la capa epitelial (imagen 8) y el rendimiento de las muestras en el análisis por citometría de flujo.

Tabla 59. Resultados de viabilidad con los diferentes protocolos empleados para el aislamiento de los LIE.

Protocolo	Viabilidad (%)
Suave	98,29%
Intenso	97,45%
Muy intenso	97,81%

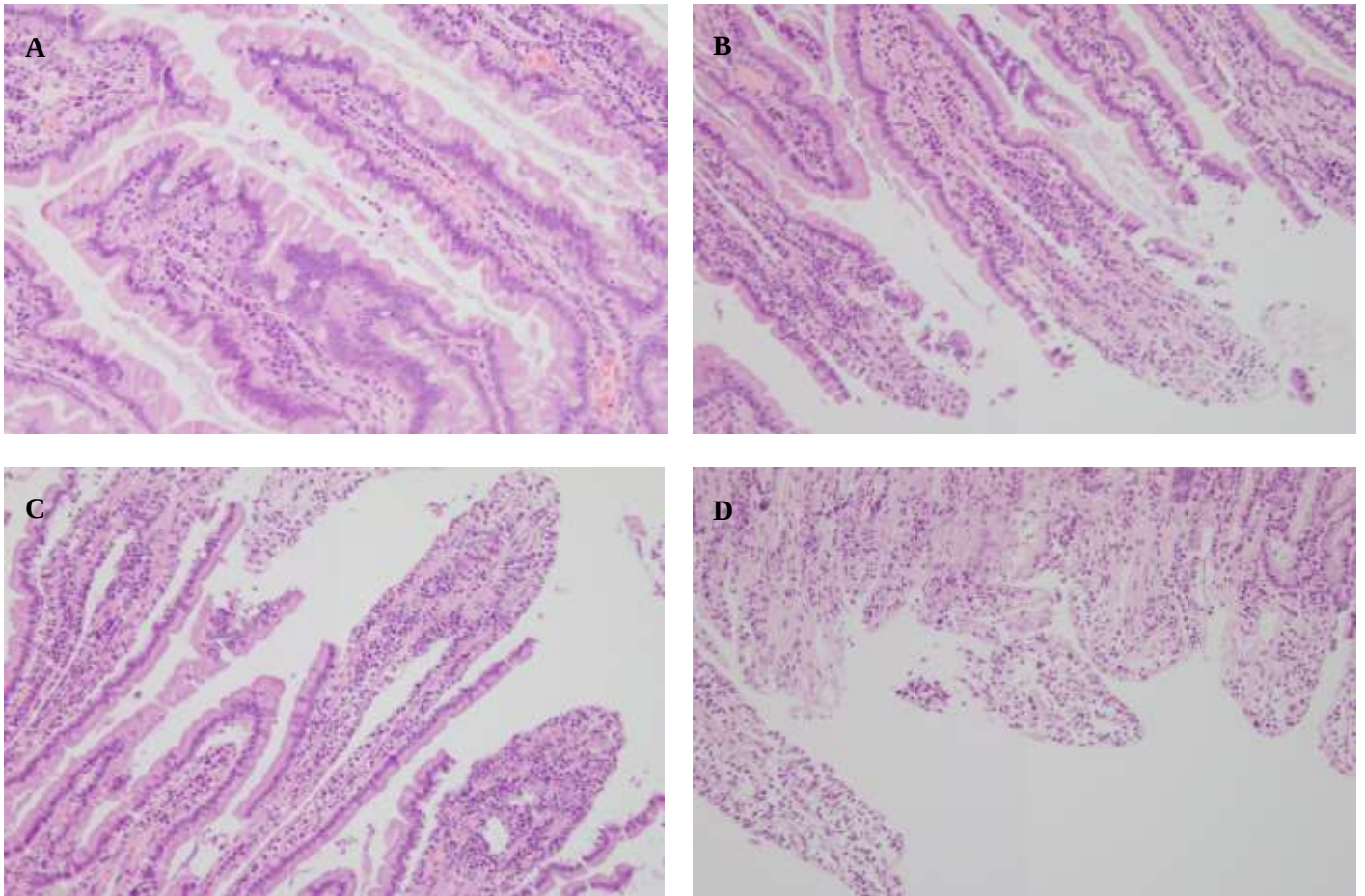


Imagen 8. Imágenes histológicas de biopsias duodenales con tinción de Hematoxilina-Eosina (20X). **A.** Biopsia sin tratamiento. **B.** Biopsia tras protocolo suave. **C.** Biopsia tras protocolo intenso. **D.** Biopsia tras protocolo muy intenso. Se observan los distintos grados de eliminación del epitelio.

En este caso, fundamentalmente la observación de las imágenes histológicas tras la aplicación de los protocolos descritos nos llevó a seleccionar el protocolo “muy intenso”, ya que era el que mejor eliminaba el epitelio duodenal, aportando además una buena viabilidad celular.

5.5.2.2. Resultados de la puesta a punto del protocolo de aislamiento de los linfocitos de la lámina propia

Para el aislamiento de los linfocitos de la lámina propia duodenal se evaluaron seis protocolos detallados en el apartado 4.5.2. de la sección de “Materiales y métodos” de este trabajo. Como se comentó, se comparó un protocolo de cultivo, cuatro enzimáticos mediante la utilización de colagenasa II y un protocolo basado en métodos mecánicos.

La selección del protocolo más apropiado para la consecución de los objetivos marcados se basó en los resultados de la viabilidad celular (tabla 60) y en el rendimiento del análisis por citometría de flujo (imagen 9), poniendo especial atención al marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-CD4, ya que como se comentó previamente, los métodos enzimáticos dañan este marcador celular.

Tabla 60. Resultados de viabilidad con los diferentes protocolos empleados para el aislamiento de los LLP.

Protocolo	Viabilidad (%)
Cultivo (Carrasco <i>et al.</i> , 2013)	73,33%
Enzimático 1 (Barbosa, 2011)	28,26%
Enzimático 2 (Barbosa, 2011) modificado	0%
Enzimático 3 (Howard <i>et al.</i> , 2005) modificado	55,67%
Enzimático 4 (Carrasco <i>et al.</i> , 2013) modificado	40,53%
Mecánico (Carrasco <i>et al.</i> , 2013)	45,53%

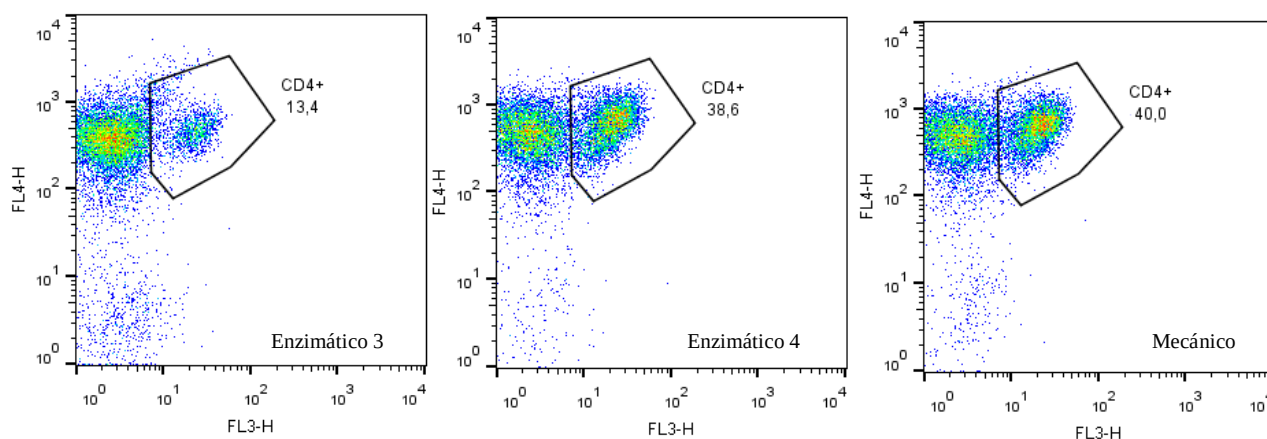


Imagen 9. Imágenes de citometría de flujo. Representación biparamétrica de la emisión de fluorescencia en la población linfocitaria delimitada previamente en función del citograma de dispersión. En ellas, se observa una disminución de la población de linfocitos CD4+ en el protocolo enzimático 3 como consecuencia del daño ejercido por la colagenasa II sobre este marcador.

En función de los resultados de la viabilidad celular, el protocolo de cultivo sería el más adecuado para el aislamiento de los linfocitos de la lámina propia en el perro. Sin embargo, los problemas de contaminación bacteriana asociados a este protocolo, que en algunas ocasiones interferían gravemente en los resultados, llevaron a descartarlo a pesar de su elección inicial. Del mismo modo, se consideraron inadecuados los protocolos enzimáticos 1 y 2, debido a los bajos porcentajes de viabilidad celular obtenidos. Finalmente, los resultados de citometría de flujo, fundamentalmente en relación al efecto sobre el marcador CD4, llevaron a seleccionar el método mecánico frente a los protocolos enzimáticos 3 y 4.

5.5.2.3. Inmunofenotipaje de los linfocitos intestinales en el grupo de perros sanos

Los resultados del inmunofenotipaje de las poblaciones linfocitarias tanto del epitelio como de la lámina propia duodenal propuestas para esta tesis doctoral en el grupo de perros sanos del estudio se han reflejado en la tabla 61. Debido a los problemas de contaminación bacteriana comentados anteriormente, y a su efecto negativo sobre la activación linfocitaria y a nivel del inmunofenotipo de la lámina propia, las poblaciones linfocíticas propuestas no pudieron ser

evaluadas en todos los animales del estudio. Por ello, se ha incorporado una columna en las siguientes tablas que hace referencia al número de animales en los que se evaluó cada variable.

Tabla 61. Valores resultantes del inmunofenotipaje de los linfocitos de las biopsias duodenales en el grupo de perros sanos del estudio. **A:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias de LIE y cociente CD4/CD8. **B:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias de LLP y cociente CD4/CD8.

A:	n	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	16	76,34	11,94	80,03	13,63	54,24	89,88
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	16	9,84	5,83	8,77	4,18	3,79	25,03
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	16	40,39	12,70	40,28	18,25	21,77	63,69
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+ CD8+)	16	1,00	1,17	0,63	0,86	0,00	4,75
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	16	25,03	12,13	27,04	14,09	0,00	38,96
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)*	16	0,31	0,17	0,33	0,27	0,05	0,57
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)*	16	13,76	10,31	12,32	8,97	1,21	39,22
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)	16	1,73	1,13	1,73	1,79	0,26	4,31
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	11	2,28	3,05	1,44	2,69	0,00	10,56
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	11	1,21	1,23	1,13	2,18	0,00	3,65
Cociente CD4/CD8	16	0,28	0,22	0,21	0,22	0,07	0,85

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente

Resultados

B:	n	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	12	83,41	9,04	85,38	13,53	69,58	97,61
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	12	39,89	10,89	40,24	11,40	26,40	60,52
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	12	29,26	8,64	26,68	12,52	18,02	47,24
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+ CD8+)	12	1,53	0,88	1,48	0,69	0,42	3,73
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	12	24,13	9,62	21,78	15,20	12,32	43,34
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)*	12	5,84	2,67	5,30	4,41	2,71	10,83
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)*	12	32,53	9,67	33,50	15,00	18,74	49,48
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)	12	4,24	3,06	3,52	3,52	0,18	10,52
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	9	2,26	3,77	0,35	1,17	0,00	10,10
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	9	1,37	1,65	0,95	1,29	0,00	4,41
Cociente CD4/CD8	12	1,53	0,75	1,35	1,04	0,57	2,94

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Tc y Th, respectivamente.

5.5.2.4. Inmunofenotipaje de los linfocitos intestinales en el grupo de perros con EICI

La descripción del inmunofenotipo tanto del epitelio como de la lámina propia duodenal en el grupo de perros con EICI del estudio se ha reflejado en la tabla 62. Del mismo modo que en el grupo de perros sanos, la evaluación de las distintas poblaciones linfocitarias no pudo llevarse a cabo en todos los perros del estudio y se ha reflejado igualmente en dicha tabla.

Tabla 62. Valores resultantes del inmunofenotipaje de los linfocitos de las biopsias duodenales en el grupo de perros con EICI del estudio. **A:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias de LIE y cociente CD4/CD8. **B:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias de LLP y cociente CD4/CD8.

A:	n	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	36	81,54	10,84	84,76	7,56	47,04	95,58
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	36	4,82	3,20	4,36	2,45	0,96	18,67
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	36	50,66	14,84	54,58	19,31	21,72	79,57
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+ CD8+)	36	0,60	0,53	0,52	0,71	0,03	2,70
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	36	29,41	8,88	29,02	11,88	10,97	52,85
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)*	36	0,17	0,17	0,12	0,14	0,01	0,83
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)*	36	24,37	22,59	19,25	34,39	0,48	85,64
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)	36	1,78	1,48	1,40	1,24	0,12	6,82
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	25	11,97	14,59	8,07	9,23	0,63	55,83
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	25	1,34	3,62	0,00	0,48	0,00	17,39
Cociente CD4/CD8	36	0,11	0,08	0,08	0,08	0,02	0,39

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

B:	n	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	20	85,87	6,97	87,12	7,96	71,59	93,70
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	20	36,38	12,74	32,31	13,86	17,29	67,80
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	20	38,60	17,40	33,63	36,19	18,56	64,04
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+ CD8+)	20	2,71	2,71	1,64	1,80	0,00	9,77
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	20	17,19	10,06	15,01	15,18	0,00	35,77

% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)*	20	7,57	5,25	6,40	4,21	1,63	25,09
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+CD25+)*	20	38,78	20,93	35,28	27,47	2,63	81,32
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	20	8,19	5,04	6,85	6,50	1,00	21,48
% de linfocitos T productores de IFN-γ (CD3+IFN-γ+))	7	2,01	2,49	0,83	2,09	0,18	7,31
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	7	0,33	0,50	0,07	0,53	0,00	1,35
Cociente CD4/CD8	20	1,19	0,72	1,27	0,97	0,29	2,77

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

En los perros del Grupo 2 que recibieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la endoscopia digestiva, también se estudió el inmunofenotipo intestinal de forma aislada. Al comparar estos valores con el del resto de animales del Grupo 2 que no recibieron tratamiento inmunosupresor, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las poblaciones linfocitarias analizadas a este nivel.

5.5.3. Estudio comparativo del inmunofenotipo entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI

Del mismo modo que con el resto de las variables incluidas en este estudio, con el fin de conocer la posible existencia de diferencias en los resultados del inmunofenotipo entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI se realizó un estudio comparativo del mismo tanto a nivel sanguíneo como intestinal. En las tablas de este apartado pueden observarse los resultados de cada población linfocitaria en ambos grupos, así como el valor de p obtenido en la comparación de las mismas. En los casos en los que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$), el valor de p se ha remarcado en color rojo.

Cabe mencionar que del mismo modo que para el resto de variables de este estudio, a nivel del inmunofenotipo, para facilitar la comprensión de los resultados se ha considerado al grupo de perros con EICI como un único grupo para llevar a cabo las comparativas que se exponen

en este apartado, pero se han descrito las diferencias existentes entre los animales del Grupo 2 que recibieron tratamiento de forma previa a la endoscopia y los que no lo recibieron.

5.5.3.1. Estudio comparativo del inmunofenotipo sanguíneo entre los perros sanos y los perros con EICI

Los resultados de la comparación entre las distintas poblaciones linfocitarias sanguíneas en valor relativo y absoluto entre los Grupos 1 y 2 se han reflejado en la tabla 63. Como puede observarse en esta tabla, las poblaciones sanguíneas de linfocitos Th activados en valor relativo ($p=0,019$), los linfocitos Treg tanto relativos ($p=0,006$) como absolutos ($p=0,009$) y los linfocitos Th2 relativos ($p=0,016$) y absolutos ($p=0,032$) fueron significativamente mayores en los perros con EICI.

Tabla 63. Valores de la comparación del inmunofenotipo sanguíneo entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI del estudio. **A:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias y cociente CD4/CD8. **B:** resultados en valores absolutos respecto al total de linfocitos sanguíneos.

A:		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	Sanos	87,90	5,33	88,53	7,04	74,52	95,59	0,650
	EICI	86,32	10,52	88,59	10,62	46,52	97,71	
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Sanos	43,06	7,35	42,69	8,48	26,39	57,56	0,805
	EICI	41,50	9,35	41,57	14,34	25,54	54,94	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Sanos	29,32	8,04	28,00	14,29	16,28	42,28	0,961
	EICI	29,76	10,06	26,89	15,19	14,75	52,86	
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)	Sanos	1,06	0,55	1,03	0,82	0,21	1,97	0,145
	EICI	1,62	1,14	1,30	1,01	0,40	5,82	
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	Sanos	12,70	3,33	12,36	5,51	8,45	18,65	0,067
	EICI	17,22	8,62	14,92	8,50	7,03	50,65	
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)*	Sanos	3,37	1,78	3,09	1,96	1,16	8,42	0,019
	EICI	5,14	3,19	4,18	2,33	1,55	18,25	

Resultados

% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+CD25+)*	Sanos	9,87	22,04	3,56	4,87	0,95	91,97	0,715
	EICI	6,52	5,67	4,56	5,48	0,68	22,38	
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	Sanos	2,75	2,12	2,28	3,75	0,05	5,94	0,006
	EICI	5,62	3,58	5,73	4,33	0,20	17,10	
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	Sanos	17,42	10,30	17,56	8,79	2,17	42,87	0,548
	EICI	21,00	15,94	18,46	20,92	0,79	71,84	
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	Sanos	7,78	8,86	3,98	12,83	0,19	28,10	0,061
	EICI	4,26	6,16	1,13	6,57	0,00	25,36	
% de linfocitos Th1 (CD3+CD4+IFN- γ +)*)	Sanos	25,20	16,36	21,57	21,65	2,88	60,74	0,423
	EICI	34,78	23,10	30,20	44,04	0,12	78,05	
% de linfocitos Th2 (CD3+CD4+IL-4+)*	Sanos	1,35	1,07	0,90	1,62	0,13	3,46	0,016
	EICI	5,44	6,13	3,97	7,60	0,00	30,87	
Cociente CD4/CD8	Sanos	1,61	0,62	1,48	0,71	0,62	3,17	0,730
	EICI	1,62	0,80	1,46	0,84	0,50	3,57	

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados y de linfocitos Th1 y Th2 está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

B:		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
Linfocitos T (CD45+CD3+)/ μ L	Sanos	1385	407	1266	565	885	2214	0,706
	EICI	1424	572	1445	821	448	2396	
Linfocitos Th (CD3+CD4+)/ μ L	Sanos	687	233	668	373	349	1137	0,805
	EICI	694	337	651	515	175	1558	
Linfocitos Tc (CD3+CD8+)/ μ L	Sanos	446	145	451	159	224	768	0,976
	EICI	481	239	445	310	134	1205	
Linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)/ μ L	Sanos	17	11	16	11	3	47	0,174
	EICI	27	24	19	17	4	129	
Linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)/ μ L	Sanos	200	73	174	97	116	371	0,193
	EICI	288	188	234	254	75	856	
Linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)/ μ L	Sanos	55	37	44	35	16	162	0,050
	EICI	87	60	73	71	17	273	

Linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)/μL	Sanos	44	99	16	20	5	413	0,766
	EICI	30	33	23	24	3	158	
Linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+) /μL	Sanos	44	36	34	57	1	114	0,009
	EICI	96	68	89	110	2	257	
Linfocitos T productores de IFN-γ (CD3+ IFN-γ+)/μL	Sanos	267	162	226	148	22	707	0,713
	EICI	351	343	342	362	13	1588	
Linfocitos T productores de IL4 (CD3+ IL-4+)/μL	Sanos	132	158	57	223	2	503	0,053
	EICI	70	98	19	102	0	332	
Linfocitos Th1 (CD3+CD4+ IFN-γ+)/μL	Sanos	172	124	120	196	33	463	0,686
	EICI	251	248	158	287	1	975	
Linfocitos Th2 (CD3+CD4+ IL-4+)/μL	Sanos	10	10	6	16	1	36	0,032
	EICI	45	83	27	43	0	481	

Como se describió en el apartado 5.5.1.1. de esta sección de “Resultados”, los perros con EICI que recibieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la endoscopia presentaron tanto unos porcentajes como valores absolutos de linfocitos Th activados y unos porcentajes de linfocitos Treg significativamente inferiores a los perros con EICI que no recibieron tratamiento. En este sentido, en la comparativa entre los perros sanos con ambos subgrupos de perros con EICI para estas dos poblaciones linfocitarias hemos observado que: no hay diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones de linfocitos Th activados ni en porcentaje ni en valor absoluto ($p=0,339$ y $p=0,979$, respectivamente) ni en los Treg en porcentaje ($p=0,208$) entre el grupo de perros sanos y los perros con EICI que recibieron tratamiento; sin embargo, dichas poblaciones tanto en valor relativo como absoluto fueron significativamente mayores en los perros con EICI que no recibieron tratamiento en comparación con los perros sanos (Th activados en % $p=0,012$, Th activados/ μ L $p=0,013$, Treg en % $p=0,003$ y Treg/ μ L $p=0,004$).

5.5.3.2. Estudio comparativo del inmunofenotipo intestinal entre los perros sanos y los perros con EICI

Por su parte, los resultados del estudio comparativo de las distintas poblaciones linfocitarias evaluadas tanto a nivel del epitelio como de la lámina propia duodenal entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI del estudio se han detallado en la tabla 64. Como puede observarse en la tabla 64A, la comparación del inmunofenotipo a nivel del epitelio duodenal entre los Grupos 1 y 2 mostró un menor porcentaje de linfocitos Th ($p=0,001$) y un mayor porcentaje de linfocitos Tc ($p=0,040$), lo que derivó en una disminución estadísticamente significativa del cociente CD4/CD8 a este nivel en perros con EICI ($p=0,001$). Además, también se observó un menor porcentaje de linfocitos T dobles positivos ($p=0,006$) y Th activados ($p=0,007$) y mayor porcentaje de los productores de IFN- γ ($p=0,004$) en los perros con EICI en comparación con el grupo control o grupo de perros sanos. Por otro lado, a nivel de la lámina propia duodenal solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos Treg ($p=0,013$) que resultó también ser mayor en el grupo de perros con EICI (tabla 64B).

Tabla 64. Valores de la comparación del inmunofenotipo intestinal entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI del estudio. **A:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias de LIE y cociente CD4/CD8. **B:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias de LLP y cociente CD4/CD8.

A:		n	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	Sanos	16	76,34	11,94	80,03	13,63	54,24	89,88	0,142
	EICI	36	81,54	10,84	84,76	7,56	47,04	95,58	
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Sanos	16	9,84	5,83	8,77	4,18	3,79	25,03	0,001
	EICI	36	4,82	3,20	4,36	2,45	0,96	18,67	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Sanos	16	40,39	12,70	40,28	18,25	21,77	63,69	0,040
	EICI	36	50,66	14,84	54,58	19,31	21,72	79,57	
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)	Sanos	16	1,00	1,17	0,63	0,86	0,00	4,75	0,006
	EICI	36	0,60	0,53	0,52	0,71	0,03	2,70	
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	Sanos	16	25,03	12,13	27,04	14,09	0,00	38,96	0,232
	EICI	36	29,41	8,88	29,02	11,88	10,97	52,85	

% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)*	Sanos	16	0,31	0,17	0,33	0,27	0,05	0,57	0,007
	EICI	36	0,17	0,17	0,12	0,14	0,01	0,83	
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+CD25+)*	Sanos	16	13,76	10,31	12,32	8,97	1,21	39,22	0,163
	EICI	36	24,37	22,59	19,25	34,39	0,48	85,64	
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	Sanos	16	1,73	1,13	1,73	1,79	0,26	4,31	0,693
	EICI	36	1,78	1,48	1,40	1,24	0,12	6,82	
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	Sanos	11	2,28	3,05	1,44	2,69	0,00	10,56	0,004
	EICI	25	11,97	14,59	8,07	9,23	0,63	55,83	
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	Sanos	11	1,21	1,23	1,13	2,18	0,00	3,65	0,100
	EICI	25	1,34	3,62	0,00	0,48	0,00	17,39	
Cociente CD4/CD8	Sanos	16	0,28	0,22	0,21	0,22	0,07	0,85	0,001
	EICI	36	0,11	0,08	0,08	0,08	0,02	0,39	

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

B:		n	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	Sanos	12	83,41	9,04	85,38	13,53	69,58	97,61	0,435
	EICI	20	85,87	6,97	87,12	7,96	71,59	93,70	
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Sanos	12	39,89	10,89	40,24	11,40	26,40	60,52	0,329
	EICI	20	36,38	12,74	32,31	13,86	17,29	67,80	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Sanos	12	29,26	8,64	26,68	12,52	18,02	47,24	0,276
	EICI	20	38,60	17,40	33,63	36,19	18,56	64,04	
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)	Sanos	12	1,53	0,88	1,48	0,69	0,42	3,73	0,134
	EICI	20	2,71	2,71	1,64	1,80	0,00	9,77	
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	Sanos	12	24,13	9,62	21,78	15,20	12,32	43,34	0,108
	EICI	20	17,19	10,06	15,01	15,18	0,00	35,77	
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)*	Sanos	12	5,84	2,67	5,30	4,41	2,71	10,83	0,367
	EICI	20	7,57	5,25	6,40	4,21	1,63	25,09	
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+CD25+)*	Sanos	12	32,53	9,67	33,50	15,00	18,74	49,48	0,409
	EICI	20	38,78	20,93	35,28	27,47	2,63	81,32	

Resultados

% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	Sanos	12	4,24	3,06	3,52	3,52	0,18	10,52	0,013
	EICI	20	8,19	5,04	6,85	6,50	1,00	21,48	
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	Sanos	9	2,26	3,77	0,35	1,17	0,00	10,10	0,356
	EICI	7	2,01	2,49	0,83	2,09	0,18	7,31	
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+))	Sanos	9	1,37	1,65	0,95	1,29	0,00	4,41	0,143
	EICI	7	0,33	0,50	0,07	0,53	0,00	1,35	
Cociente CD4/CD8	Sanos	12	1,53	0,75	1,35	1,04	0,57	2,94	0,177
	EICI	20	1,19	0,72	1,27	0,97	0,29	2,77	

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Tc y Th, respectivamente.

5.5.4. Estudio comparativo del inmunofenotipo entre los diferentes compartimentos inmunitarios

Con el fin de conocer la existencia de diferencias en el inmunofenotipo entre los tres compartimentos inmunitarios estudiados en los dos grupos del estudio (perros sanos y perros con EICI), se realizó una comparativa de los mismos empleando para ello el test de los rangos signados de Wilcoxon para muestras pareadas, cuyo valor fue corregido por Bonferroni al tratarse de comparaciones múltiples. Por ello en este caso, para un nivel de confianza del 95% se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,017$.

5.5.4.1. Estudio comparativo entre las poblaciones linfocitarias sanguíneas y del epitelio intestinal en los perros sanos y en los perros con EICI

El estudio comparativo entre el inmunofenotipo sanguíneo y el inmunofenotipo del epitelio intestinal en ambos grupos del estudio se ha reflejado en la tabla 65. En el grupo de animales sanos, como puede observarse en la tabla 65A, los porcentajes de linfocitos sanguíneos fueron significativamente mayores que los LIE para las poblaciones de linfocitos Th ($p=0,001$), Th activados ($p=0,001$), T productores de IFN- γ ($p=0,001$), T productores de IL-4 ($p=0,002$) y en el caso del cociente CD4/CD8 ($p=0,001$), y significativamente menores para las poblaciones de linfocitos Tc ($p=0,014$) y T dobles negativos ($p=0,003$). En el caso de los animales del Grupo 2 o grupo de perros con EICI, como se detalla en la tabla 65B, los porcentajes de linfocitos sanguíneos fueron significativamente mayores que los LIE para las poblaciones de linfocitos T ($p=0,004$), Th ($p=0,001$), T dobles positivos ($p=0,001$), Th activados ($p=0,001$), Treg ($p=0,001$),

T productores de IFN- γ ($p=0,011$) y en el caso del cociente CD4/CD8 ($p=0,001$), y significativamente menores para las poblaciones de linfocitos Tc ($p=0,001$), T dobles negativos ($p=0,001$) y Tc activados ($p=0,001$).

Tabla 65. Comparación del inmunofenotipo entre los linfocitos de sangre periférica y los LIE **A:** en el grupo de perros sanos o Grupo 1. **B:** en el grupo de perros con EICI o Grupo 2.

A:		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máy.	Valor de p
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	Sangre	87,19	5,33	88,53	7,04	74,52	95,59	0,057
	LIE	76,34	11,94	80,03	13,63	54,24	89,88	
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Sangre	43,06	7,35	42,69	8,48	26,39	57,56	0,001
	LIE	9,84	5,83	8,77	4,18	3,79	25,03	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Sangre	29,32	8,04	28,00	14,29	16,28	42,28	0,014
	LIE	40,39	12,70	40,28	18,25	21,77	63,69	
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)	Sangre	1,06	0,55	1,03	0,82	0,21	1,97	0,359
	LIE	1,00	1,17	0,63	0,86	0,00	4,75	
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	Sangre	12,70	3,33	12,36	5,51	8,45	18,65	0,003
	LIE	25,03	12,13	27,04	14,09	0,00	38,96	
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)*	Sangre	3,37	1,78	3,09	1,96	1,16	8,42	0,001
	LIE	0,31	0,17	0,33	0,27	0,05	0,57	
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+CD25+)*	Sangre	9,87	22,04	3,56	4,87	0,95	91,97	0,022
	LIE	13,76	10,31	12,32	8,97	1,21	39,22	
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	Sangre	2,75	2,12	2,28	3,75	0,05	5,94	0,135
	LIE	1,73	1,13	1,73	1,79	0,26	4,31	
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	Sangre	25,20	16,36	21,57	21,65	2,88	60,74	0,001
	LIE	2,28	3,05	1,44	2,69	0,00	10,56	
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	Sangre	1,35	1,07	0,90	1,62	0,13	3,46	0,002
	LIE	1,21	1,23	1,13	2,18	0,00	3,65	

Resultados

Cociente CD4/CD8	Sangre	1,61	0,62	1,48	0,71	0,62	3,17	0,001
	LIE	0,28	0,22	0,21	0,22	0,07	0,85	

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

B:		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	Sangre	86,32	10,52	88,59	10,62	46,52	97,71	0,004
	LIE	81,54	10,84	84,76	7,56	47,04	95,58	
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Sangre	41,50	9,35	41,57	14,34	25,54	54,94	0,001
	LIE	4,82	3,20	4,36	2,45	0,96	18,67	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Sangre	29,76	10,06	26,89	15,19	14,75	52,86	0,001
	LIE	50,66	14,84	54,58	19,31	21,72	79,57	
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+ CD8+)	Sangre	1,62	1,14	1,30	1,01	0,40	5,82	0,001
	LIE	0,60	0,53	0,52	0,71	0,03	2,70	
% de linfocitos T DN (CD3+CD4- CD8-)	Sangre	17,22	8,62	14,92	8,50	7,03	50,65	0,001
	LIE	29,41	8,88	29,02	11,88	10,97	52,85	
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)*	Sangre	5,14	3,19	4,18	2,33	1,55	18,25	0,001
	LIE	0,17	0,17	0,12	0,14	0,01	0,83	
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)*	Sangre	6,52	5,67	4,56	5,48	0,68	22,38	0,001
	LIE	24,37	22,59	19,25	34,39	0,48	85,64	
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)	Sangre	5,62	3,58	5,73	4,33	0,20	17,10	0,001
	LIE	1,78	1,48	1,40	1,24	0,12	6,82	
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	Sangre	21,00	15,94	18,46	20,92	0,79	71,84	0,011
	LIE	11,97	14,59	8,07	9,23	0,63	55,83	
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+ IL-4+)	Sangre	4,26	6,16	1,13	6,57	0,00	25,36	0,033
	LIE	1,34	3,62	0,00	0,48	0,00	17,39	
Cociente CD4/CD8	Sangre	1,62	0,80	1,46	0,84	0,50	3,57	0,001
	LIE	0,11	0,08	0,08	0,08	0,02	0,39	

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

5.5.4.2. Estudio comparativo entre las poblaciones linfocitarias sanguíneas y de la lámina propia intestinal de los perros sanos y de los perros con EICI

El estudio comparativo entre el inmunofenotipo sanguíneo y el inmunofenotipo de la lámina propia intestinal en ambos grupos del estudio se ha reflejado en la tabla 66. En el grupo de animales sanos, como puede observarse en la tabla 66A, los porcentajes de linfocitos sanguíneos fueron significativamente mayores que los LLP para las poblaciones de linfocitos T productores de IFN- γ ($p=0,004$) y T productores de IL-4 ($p=0,012$), y significativamente menores para las poblaciones de linfocitos T dobles negativos ($p=0,001$) y Th activados ($p=0,002$). En el caso de los animales del Grupo 2 o grupo de perros con EICI, como se detalla en la tabla 66B, los porcentajes de linfocitos sanguíneos fueron significativamente mayores que los LLP para las poblaciones de linfocitos T productores de IFN- γ ($p=0,016$), y significativamente menores para las poblaciones de linfocitos Tc activados ($p=0,001$).

Tabla 66. Comparación del inmunofenotipo entre los linfocitos de sangre periférica y los LLP **A:** en el grupo de perros sanos o Grupo 1. **B:** en el grupo de perros con EICI o Grupo 2.

A:		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	Sangre	87,19	5,33	88,53	7,04	74,52	95,59	0,301
	LLP	83,41	9,04	85,38	13,53	69,58	97,61	
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Sangre	43,06	7,35	42,69	8,48	26,39	57,56	0,339
	LLP	39,89	10,89	40,24	11,40	26,40	60,52	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Sangre	29,32	8,04	28,00	14,29	16,28	42,28	0,622
	LLP	29,26	8,64	26,68	12,52	18,02	47,24	
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)	Sangre	1,06	0,55	1,03	0,82	0,21	1,97	0,129
	LLP	1,53	0,88	1,48	0,69	0,42	3,73	
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	Sangre	12,70	3,33	12,36	5,51	8,45	18,65	0,001
	LLP	24,13	9,62	21,78	15,20	12,32	43,34	
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)*	Sangre	3,37	1,78	3,09	1,96	1,16	8,42	0,002
	LLP	5,84	2,67	5,30	4,41	2,71	10,83	
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+CD25+)*	Sangre	9,87	22,04	3,56	4,87	0,95	91,97	0,034
	LLP	32,53	9,67	33,50	15,00	18,74	49,48	

Resultados

% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	Sangre	2,75	2,12	2,28	3,75	0,05	5,94	0,301
	LLP	4,24	3,06	3,52	3,52	0,18	10,52	
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	Sangre	17,42	10,30	17,56	8,79	2,17	42,87	0,004
	LLP	2,26	3,77	0,35	1,17	0,00	10,10	
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	Sangre	7,78	8,86	3,98	12,83	0,19	28,10	0,012
	LLP	1,37	1,65	0,95	1,29	0,00	4,41	
Cociente CD4/CD8	Sangre	1,61	0,62	1,48	0,71	0,62	3,17	1,000
	LLP	1,53	0,75	1,35	1,04	0,57	2,94	

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

B:		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	Sangre	86,32	10,52	88,59	10,62	46,52	97,71	0,984
	LLP	85,87	6,97	87,12	7,96	71,59	93,70	
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Sangre	41,50	9,35	41,57	14,34	25,54	54,94	0,070
	LLP	36,38	12,74	32,31	13,86	17,29	67,80	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Sangre	29,76	10,06	26,89	15,19	14,75	52,86	0,090
	LLP	38,60	17,40	33,63	36,19	18,56	64,04	
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)	Sangre	1,62	1,14	1,30	1,01	0,40	5,82	0,409
	LLP	2,71	2,71	1,64	1,80	0,00	9,77	
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	Sangre	17,22	8,62	14,92	8,50	7,03	50,65	0,674
	LLP	17,19	10,06	15,01	15,18	0,00	35,77	
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)*	Sangre	5,14	3,19	4,18	2,33	1,55	18,25	0,430
	LLP	7,57	5,25	6,40	4,21	1,63	25,09	
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+CD25+)*	Sangre	6,52	5,67	4,56	5,48	0,68	22,38	0,001
	LLP	38,78	20,93	35,28	27,47	2,63	81,32	
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	Sangre	5,62	3,58	5,73	4,33	0,20	17,10	0,985
	LLP	8,19	5,04	6,85	6,50	1,00	21,48	

% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +)	Sangre	21,00	15,94	18,46	20,92	0,79	71,84	0,016
	LLP	2,01	2,49	0,83	2,09	0,18	7,31	
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	Sangre	4,26	6,16	1,13	6,57	0,00	25,36	0,313
	LLP	0,33	0,50	0,07	0,53	0,00	1,35	
Cociente CD4/CD8	Sangre	1,62	0,80	1,46	0,84	0,50	3,57	0,058
	LLP	1,19	0,72	1,27	0,97	0,29	2,77	

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

5.5.4.3. Estudio comparativo entre las poblaciones linfocitarias del epitelio y de la lámina propia intestinal en los perros sanos y en los perros con EICI

El estudio comparativo entre el inmunofenotipo del epitelio y el inmunofenotipo de la lámina propia intestinal en ambos grupos del estudio se ha reflejado en la tabla 67. En el grupo de animales sanos, como puede observarse en la tabla 67A, los porcentajes de LIE fueron significativamente menores que los LLP para las poblaciones de linfocitos T ($p=0,012$), Th ($p=0,001$), T dobles positivos ($p=0,014$), Th activados ($p=0,001$), Tc activados ($p=0,001$), Treg ($p=0,010$) y para el cociente CD4/CD8 ($p=0,001$). En el caso de los animales del Grupo 2 o grupo de perros con EICI, como se detalla en la tabla 67B, los porcentajes de LIE fueron significativamente mayores que los LLP para las poblaciones de linfocitos T dobles negativos ($p=0,001$) y T productores de IFN- γ ($p=0,016$), y significativamente menores para las poblaciones de linfocitos Th ($p=0,001$), T dobles positivos ($p=0,001$), Th activados ($p=0,001$), Tc activados ($p=0,006$), Treg ($p=0,001$) y para el cociente CD4/CD8 ($p=0,001$).

Resultados

Tabla 67. Comparación del inmunofenotipo entre los LIE y los LLP **A:** en el grupo de perros sanos o Grupo 1. **B:** en el grupo de perros con EICI o Grupo 2.

A:		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	LIE	76,34	11,94	80,03	13,63	54,24	89,88	0,012
	LLP	83,41	9,04	85,38	13,53	69,58	97,61	
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	LIE	9,84	5,83	8,77	4,18	3,79	25,03	0,001
	LLP	39,89	10,89	40,24	11,40	26,40	60,52	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	LIE	40,39	12,70	40,28	18,25	21,77	63,69	0,175
	LLP	29,26	8,64	26,68	12,52	18,02	47,24	
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)	LIE	1,00	1,17	0,63	0,86	0,00	4,75	0,014
	LLP	1,53	0,88	1,48	0,69	0,42	3,73	
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	LIE	25,03	12,13	27,04	14,09	0,00	38,96	0,765
	LLP	24,13	9,62	21,78	15,20	12,32	43,34	
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)*	LIE	0,31	0,17	0,33	0,27	0,05	0,57	0,001
	LLP	5,84	2,67	5,30	4,41	2,71	10,83	
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+CD25+)*	LIE	13,76	10,31	12,32	8,97	1,21	39,22	0,001
	LLP	32,53	9,67	33,50	15,00	18,74	49,48	
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	LIE	1,73	1,13	1,73	1,79	0,26	4,31	0,010
	LLP	4,24	3,06	3,52	3,52	0,18	10,52	
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	LIE	2,28	3,05	1,44	2,69	0,00	10,56	0,844
	LLP	2,26	3,77	0,35	1,17	0,00	10,10	
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	LIE	1,21	1,23	1,13	2,18	0,00	3,65	0,844
	LLP	1,37	1,65	0,95	1,29	0,00	4,41	
Cociente CD4/CD8	LIE	0,28	0,22	0,21	0,22	0,07	0,85	0,001
	LLP	1,53	0,75	1,35	1,04	0,57	2,94	

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

B:		Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	LIE	81,54	10,84	84,76	7,56	47,04	95,58	0,060
	LLP	85,87	6,97	87,12	7,96	71,59	93,70	
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	LIE	4,82	3,20	4,36	2,45	0,96	18,67	0,001
	LLP	36,38	12,74	32,31	13,86	17,29	67,80	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	LIE	50,66	14,84	54,58	19,31	21,72	79,57	0,022
	LLP	38,60	17,40	33,63	36,19	18,56	64,04	
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)	LIE	0,60	0,53	0,52	0,71	0,03	2,70	0,001
	LLP	2,71	2,71	1,64	1,80	0,00	9,77	
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	LIE	29,41	8,88	29,02	11,88	10,97	52,85	0,001
	LLP	17,19	10,06	15,01	15,18	0,00	35,77	
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)*	LIE	0,17	0,17	0,12	0,14	0,01	0,83	0,001
	LLP	7,57	5,25	6,40	4,21	1,63	25,09	
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+CD25+)*	LIE	24,37	22,59	19,25	34,39	0,48	85,64	0,006
	LLP	38,78	20,93	35,28	27,47	2,63	81,32	
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	LIE	1,78	1,48	1,40	1,24	0,12	6,82	0,001
	LLP	8,19	5,04	6,85	6,50	1,00	21,48	
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	LIE	11,97	14,59	8,07	9,23	0,63	55,83	0,016
	LLP	2,01	2,49	0,83	2,09	0,18	7,31	
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	LIE	1,34	3,62	0,00	0,48	0,00	17,39	0,625
	LLP	0,33	0,50	0,07	0,53	0,00	1,35	
Cociente CD4/CD8	LIE	0,11	0,08	0,08	0,08	0,02	0,39	0,001
	LLP	1,19	0,72	1,27	0,97	0,29	2,77	

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

5.6. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Como se comentó en el apartado de clasificación de los animales de esta sección de “Resultados”, en 10 de los perros del grupo 2 o grupo de perros con EICI fue posible la realización de un seguimiento completo tras la finalización del tratamiento específico para la enfermedad, detallado en el apartado 4.4. de la sección de “Materiales y métodos”. En este grupo de perros se llevó a cabo una reevaluación de los parámetros clínicos, endoscópicos, histopatológicos y de las poblaciones linfocitarias estudiadas mediante citometría de flujo en torno a dos meses tras la finalización del tratamiento inmunosupresor.

En este estudio comparativo se ha determinado si el potencial cambio de los valores de las variables analizadas después del tratamiento es estadísticamente significativo respecto a los valores de las variables evaluadas antes del tratamiento para este grupo de animales. Del mismo modo que en el resto de apartados de esta sección de “Resultados”, en los casos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) en el cambio de los valores de las variables, el valor de p se ha remarcado en color rojo.

5.6.1. Evolución clínica y de los parámetros de la analítica sanguínea

De estos 10 animales del grupo de perros con EICI, ocho mostraron una remisión completa de los signos clínicos en el momento de la reevaluación, mientras que en los dos restantes se describió una mejoría parcial, pero no total.

Uno de los signos clínicos evaluados fue la pérdida de peso; por ello, es de especial interés resaltar la evolución del peso y de la condición corporal en este grupo de animales una vez finalizado el tratamiento. Tanto el incremento del peso ($2,16 \pm 3,61$ Kg) como el aumento de la condición corporal ($1,40 \pm 0,97$ puntos, tabla 68) fueron estadísticamente significativos ($p = 0,04$ y $p = 0,008$, respectivamente).

Tabla 68. Evolución de la condición corporal después del tratamiento inmunosupresor en los 10 perros con EICI con control postratamiento.

Nº caso	Condición corporal pre-	Condición corporal post-
20	7	8
25	5	7
27	5	7
30	4	7
36	3	5
37	5	6
39	4	4
40	4	6
41	6	7
48	4	4

Respecto a los valores de la analítica sanguínea, como se observa en las tablas 69 y 70, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables evaluadas al comparar los datos pre- y postratamiento. Los valores medios de las variables analíticas se encontraban dentro de los rangos de referencia para la especie canina en el momento de la reevaluación de estos 10 perros. A nivel individual, sí se observaron mejorías en los animales del estudio en cuanto a los parámetros que se encontraban alterados de forma previa al tratamiento, resolviéndose en la mayoría de los casos.

Resultados

Tabla 69. Comparación de los valores de la analítica sanguínea en los 10 perros del Grupo 2 con control postratamiento. **A:** Series eritroide y plaquetaria. **B:** Recuento y fórmula leucocitarios.

A:		De la variación								
		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de <i>p</i>
Glóbulos rojos x $10^6/\mu\text{L}$	Pre-	6,49	1,21	0,53	2,44	0,00	0,78	-2,63	6,92	0,742
	Post-	7,02	1,96							
Hemoglobina (g/dL)	Pre-	15,60	3,02	-1,31	3,32	-0,20	1,60	-7,45	2,40	0,496
	Post-	14,31	3,86							
Hematocrito (%)	Pre-	45,10	8,34	-1,08	6,12	0,25	5,00	-15,40	5,40	0,910
	Post-	44,00	6,22							
Plaquetas x $10^3/\mu\text{L}$	Pre-	340,00	210,00	-39,33	129,27	0,00	100,00	-340,00	101,00	0,641
	Post-	291,10	98,46							

B:		De la variación								
		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de <i>p</i>
Leucocitos x 10 ³ /μL	Pre-	10,64	6,45	-2,98	7,33	-1,07	2,72	-21,93	5,05	0,195
	Post-	7,66	2,45							
Neutrófilos/μL	Pre-	7925	5914	-2713	6491	-654	2189	-1942	4577	0,074
	Post-	5212	1680							
Neutrófilos (%)	Pre-	71,16	8,00	-3,24	9,13	-4,10	16,40	-15,10	11,20	0,301
	Post-	67,92	4,77							
Linfocitos/μL	Pre-	1692	397	845	680	133	1286	-910	1125	0,734
	Post-	1777	614							
Linfocitos (%)	Pre-	18,45	7,40	4,61	7,71	4,95	12,60	-7,80	17,40	0,098
	Post-	23,06	4,15							
Monocitos/μL	Pre-	478	417	-176	437	-75	205	-1336	325	0,129
	Post-	302	103							
Monocitos (%)	Pre-	4,23	1,47	0,06	2,35	0,10	1,60	-3,20	4,50	0,910
	Post-	4,29	1,61							
Eosinófilos/μL	Pre-	374	327	-42	279	0	205	-511	497	0,742
	Post-	332	196							
Eosinófilos (%)	Pre-	4,30	3,43	-0,05	2,87	0,00	3,90	-4,00	5,00	1,000
	Post-	4,25	1,85							
Basófilos/μL	Pre-	4	7	2	9	0	9	-11	18	0,563
	Post-	6	7							
Basófilos (%)	Pre-	0,05	0,07	0,04	0,13	0,00	0,10	-0,10	0,30	0,100
	Post-	0,09	0,10							

Tabla 70. Comparación de los valores de la bioquímica sanguínea en los 10 perros del Grupo 2 con control postratamiento.

		De la variación								
		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de <i>p</i>
Glucosa (mg/dL)	Pre-	103,00	14,00	2,80	11,45	4,00	15,00	-18,00	19,00	0,418
	Post-	106,00	8,71							
Urea (mg/dL)	Pre-	48,00	34,70	-6,50	21,03	-2,00	13,00	-62,00	16,00	0,450
	Post-	41,50	27,86							
Creatinina (mg/dL)	Pre-	1,00	0,30	-0,08	0,21	-0,05	0,30	-0,40	0,30	0,234
	Post-	0,92	0,23							
ALT (U/L)	Pre-	26,70	9,08	-2,60	8,47	-1,50	16,00	-14,00	8,00	0,447
	Post-	24,10	8,52							
Proteínas totales (g/dL)	Pre-	6,24	0,97	0,20	0,70	0,10	1,20	-0,80	1,40	0,406
	Post-	6,40	0,50							
Albúmina (g/dL)	Pre-	3,13	0,48	0,05	0,28	0,05	0,50	-0,40	0,40	0,625
	Post-	3,18	0,35							

La reevaluación de los índices de actividad clínica de la enfermedad en estos 10 animales del grupo de perros con EICI tras la finalización del tratamiento inmunosupresor mostró los resultados que se han reflejado en la tabla 71. Como puede observarse en dicha tabla, todos los parámetros evaluados en cada índice clínico tuvieron una puntuación menor tras la finalización del tratamiento, salvo en el caso de los niveles de albúmina del índice CCECAI en el cual no se observó variación. Esta disminución fue estadísticamente significativa para los parámetros: vómitos ($p=0,008$), consistencia de las heces ($p=0,031$) y frecuencia de la defecación ($p=0,016$) en los tres índices de actividad clínica.

Tabla 71. Evolución de los parámetros de los índices de actividad clínica de la enfermedad en los 10 perros del Grupo 2 con control postratamiento.

				De la variación		
Parámetro		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Valor de <i>p</i>
Índice CIBDAI						
Actividad/actitud	Pre-	0,60	0,84	-0,60	0,84	0,125
	Post-	0,00	0,00			
Apetito	Pre-	1,10	1,29	-0,90	1,45	0,125
	Post-	0,20	0,42			
Vómitos	Pre-	1,70	1,16	-1,50	1,08	0,008
	Post-	0,20	0,42			
Consistencia de las heces	Pre-	1,20	1,03	-0,90	0,99	0,031
	Post-	0,30	0,48			
Frecuencia de la defecación	Pre-	1,8	0,92	-0,90	0,74	0,016
	Post-	0,90	0,99			
Pérdida de peso	Pre-	0,90	1,10	-0,80	0,92	0,063
	Post-	0,10	0,32			
Índice CIBDAISI						
Actividad/actitud	Pre-	0,60	0,84	-0,60	0,84	0,125
	Post-	0,00	0,00			
Apetito	Pre-	1,10	1,29	-0,60	1,65	0,313
	Post-	0,50	0,71			
Vómitos	Pre-	1,70	1,16	-1,50	1,08	0,008
	Post-	0,20	0,42			
Consistencia de las heces	Pre-	1,20	1,03	-0,90	0,99	0,031
	Post-	0,30	0,48			
Frecuencia de la defecación	Pre-	1,80	0,92	-0,90	0,74	0,016
	Post-	0,90	0,99			
Pérdida de peso	Pre-	0,90	1,10	-0,80	0,92	0,063
	Post-	0,10	0,32			
Dolor abdominal	Pre-	1,00	0,94	-0,50	0,97	0,250
	Post-	0,50	0,53			

Resultados

Flatulencias/borborismos	Pre-	0,80	1,03	-0,70	0,82	0,063
	Post-	0,10	0,32			
Índice CCECAI						
Actividad/actitud	Pre-	0,60	0,84	-0,60	0,84	0,125
	Post-	0,00	0,00			
Apetito	Pre-	1,10	1,29	-0,90	1,45	0,125
	Post-	0,20	0,42			
Vómitos	Pre-	1,70	1,16	-1,50	1,08	0,008
	Post-	0,20	0,42			
Consistencia de las heces	Pre-	1,20	1,03	-0,90	0,99	0,031
	Post-	0,30	0,48			
Frecuencia de la defecación	Pre-	1,80	0,92	-0,90	0,74	0,016
	Post-	0,90	0,99			
Pérdida de peso	Pre-	0,90	1,10	-0,80	0,92	0,063
	Post-	0,10	0,32			
Niveles de albúmina	Pre-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000
	Post-	0,00	0,00			
Ascitis y edema periférico	Pre-	0,10	0,32	-0,10	0,32	1,000
	Post-	0,00	0,00			
Prurito	Pre-	0,90	1,29	-0,30	1,25	0,625
	Post-	0,60	0,84			

En cuanto a los sumatorios de cada uno de los índices clínicos evaluados en estos 10 perros, todos sufrieron una disminución significativa de su valor: CIBDAI (pre-: $7,30 \pm 3,80$, post-: $1,70 \pm 1,42$), $-5,60 \pm 3,75$, $p = 0,002$; CIBDAISI (pre-: $9,10 \pm 4,72$, post-: $2,60 \pm 1,43$), $-6,50 \pm 4,62$, $p = 0,004$; y CCECAI (pre-: $8,30 \pm 3,20$, post-: $1,70 \pm 1,34$), $-6,00 \pm 2,94$, $p = 0,002$.

Respecto a la clasificación de la gravedad de la enfermedad en función del valor de los índices clínicos, en nueve perros la enfermedad fue clasificada como insignificante, mientras que en el perro restante con control postratamiento fue clasificada como leve para los tres índices empleados tras la finalización de la terapia farmacológica. La evolución de la clasificación en cada uno de los índices para estos 10 perros se muestra en la tabla 72.

Tabla 72. Evolución de la gravedad de la enfermedad en los perros del Grupo 2 con control postratamiento.

Nº caso	Índice CIBDAI	Índice CIBDAISI	Índice CCECAI	Post-
	Pre-	Pre-	Pre-	
20	insignificante	insignificante	leve	insignificante
25	moderada	grave	moderada	insignificante
27	grave	grave	muy grave	insignificante
30	insignificante	leve	leve	insignificante
36	leve	leve	leve	insignificante
37	grave	moderada	grave	insignificante
39	grave	grave	grave	leve
40	moderada	grave	grave	insignificante
41	grave	grave	muy grave	insignificante
48	moderada	grave	grave	insignificante

5.6.2. Evolución de las lesiones endoscópicas

Tras la finalización del tratamiento farmacológico y durante la repetición del procedimiento endoscópico se volvieron a evaluar los mismos parámetros esofágicos, del estómago y del duodeno en los perros con EICI con control postratamiento para valorar la evolución de los índices endoscópicos empleados, obteniendo los resultados que se reflejan en las tablas 73 y 74. Como puede observarse en la tabla 73, empleando el índice de evaluación endoscópica de la WSAVA, la mayoría de las lesiones de las diferentes localizaciones digestivas muestran una mejoría tras la finalización del tratamiento farmacológico en estos 10 perros con EICI. Esta reducción en la graduación de las lesiones fue además estadísticamente significativa en el caso de los parámetros hiperemia/vascularización ($p=0,016$), edema ($p=0,008$) y alteraciones en la coloración de la mucosa ($p=0,008$) a nivel duodenal. Sin embargo, al emplear el índice endoscópico simplificado propuesto por Slovak y colaboradores en los perros con EICI después del tratamiento, el grado de lesión disminuye en la mayoría de parámetros evaluados, pero como se detalla en la tabla 74 no se observan diferencias estadísticamente significativas entre la graduación de las lesiones de forma previa y posterior al tratamiento farmacológico.

Del mismo modo, al evaluar la evolución de los sumatorios de los parámetros en cada localización digestiva con los dos índices endoscópicos empleados, se observó una disminución del valor en todos ellos en estos 10 perros con EICI tras la finalización del tratamiento inmunosupresor que resultó estadísticamente significativa en el caso del sumatorio de las lesiones del estómago ($p=0,023$) y de las del duodeno ($p=0,004$) con el índice endoscópico de la WSAVA, como puede observarse en la tabla 75.

Tabla 73. Evolución de los parámetros del índice endoscópico de la WSAVA de 2010 en los 10 perros con EICI tras la finalización del tratamiento.

				De la variación			
Parámetro		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Valor de <i>p</i>	
Esófago	Hiperemia/vascularización	Pre-	0,20	0,63	-0,20	0,63	1,000
		Post-	0,00	0,00			
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	Pre-	0,30	0,67	-0,10	0,88	1,000
		Post-	0,20	0,42			
	Friabilidad	Pre-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000
		Post-	0,00	0,00			
	Hemorragia	Pre-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000
		Post-	0,00	0,00			
	Erosiones/úlceras	Pre-	0,00	0,00	0,20	0,42	0,500
		Post-	0,20	0,42			
	Contenido (moco/bilis/alimento)	Pre-	0,00	0,00	0,30	0,67	0,500
		Post-	0,30	0,67			
Dilatación	Pre-	0,10	0,32	0,10	0,32	1,000	
	Post-	0,20	0,42				
Esfínter gastroesofágico	Pre-	0,60	1,27	-0,50	1,08	0,500	
	Post-	0,10	0,32				
Otros	Pre-	0,00	0,00	0,10	0,32	1,000	
	Post-	0,10	0,32				
Estómago	Imposibilidad de dilatación	Pre-	0,00	0,00	0,10	0,32	1,000
		Post-	0,10	0,32			
	Hiperemia/vascularización	Pre-	1,50	0,71	-0,40	1,26	0,500
		Post-	1,10	0,74			
	Edema	Pre-	0,50	0,70	-0,40	0,70	0,250
		Post-	0,10	0,32			
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	Pre-	1,70	0,67	-0,80	0,92	0,063
		Post-	0,90	0,57			
	Friabilidad	Pre-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000
		Post-	0,00	0,00			
	Hemorragia	Pre-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000
		Post-	0,00	0,00			
	Erosiones/úlceras	Pre-	0,50	0,70	0,00	0,81	1,000
		Post-	0,50	0,70			
	Contenido (moco/bilis/alimento)	Pre-	0,80	0,79	0,00	1,05	1,000
		Post-	0,80	0,79			
	Esfínter gastroesofágico	Pre-	0,70	1,25	-0,50	0,972	0,250
		Post-	0,20	0,63			
Paso del endoscopio a través del píloro	Pre-	0,30	0,67	-0,30	0,67	0,500	
	Post-	0,00	0,00				
Otros	Pre-	0,20	0,42	-0,20	0,42	0,500	
	Post-	0,00	0,00				

Duodeno	Imposibilidad de dilatación	Pre-	0,10	0,31	0,00	0,47	1,000
		Post-	0,10	0,32			
	Hiperemia/vascularización	Pre-	1,90	0,99	-1,30	1,06	0,016
		Post-	0,60	0,52			
	Edema	Pre-	1,40	1,07	-1,20	0,92	0,008
		Post-	0,20	0,42			
	Alteraciones en la coloración de la mucosa	Pre-	2,20	0,42	-0,90	0,57	0,008
		Post-	1,30	0,48			
	Friabilidad	Pre-	1,20	0,79	-0,50	0,71	0,125
		Post-	0,70	0,82			
	Irregularidad de la mucosa (textura)	Pre-	1,80	0,92	-0,60	1,17	0,172
		Post-	1,20	0,79			
	Hemorragia	Pre-	0,10	0,32	-0,10	0,32	1,000
		Post-	0,00	0,00			
	Erosiones/úlceras	Pre-	0,10	0,32	0,00	0,47	1,000
		Post-	0,10	0,32			
	Dilataciones linfáticas	Pre-	1,20	0,92	-0,40	0,84	0,313
		Post-	0,80	0,79			
	Contenido (moco/bilis/alimento)	Pre-	0,20	0,42	-0,10	0,57	1,000
		Post-	0,10	0,32			
	Otros	Pre-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000
		Post-	0,00	0,00			

Resultados

Tabla 74. Evolución de los parámetros del índice endoscópico de Slovak y colaboradores de 2015 en los 10 perros con EICI tras la finalización del tratamiento.

Parámetro			Índice cuantitativo					Índice cualitativo				
			Media	Desviación estándar	De la variación			Media	Desviación estándar	De la variación		
					Media	Desviación estándar	Valor de <i>p</i>			Media	Desviación estándar	Valor de <i>p</i>
Estómago	Friabilidad	Pre-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000
		Post-	0,00	0,00				0,00	0,00			
	Irregularidad	Pre-	1,00	0,00	-0,10	0,57	1,000	1,00	0,00	-0,20	0,42	0,500
		Post-	0,90	0,57				0,80	0,42			
	Erosiones	Pre-	0,40	0,52	-0,10	0,57	1,000	0,40	0,52	-0,10	0,57	1,000
		Post-	0,30	0,48				0,30	0,48			
Duodeno	Friabilidad	Pre-	0,70	0,67	-0,20	0,79	0,686	0,50	0,53	-0,10	0,57	1,000
		Post-	0,50	0,71				0,40	0,52			
	Irregularidad	Pre-	1,50	0,52	-0,20	0,63	0,625	1,00	0,00	-0,10	0,32	1,000
		Post-	1,30	0,67				0,90	0,32			
	Erosiones	Pre-	0,00	0,00	0,10	0,32	1,000	0,00	0,00	0,10	0,32	1,000
		Post-	0,10	0,32				0,10	0,32			
	Dilataciones linfáticas	Pre-	0,80	0,63	-0,10	0,74	1,000	0,70	0,48	-0,10	0,57	1,000
		Post-	0,70	0,67				0,60	0,52			

Tabla 75. Evolución de los sumatorios de las lesiones endoscópicas en los 10 perros del Grupo 2 tras la finalización del tratamiento inmunosupresor.

		De la variación								
		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de <i>p</i>
Esófago WSAVA	Pre-	1,20	2,25	-0,10	1,20	0,00	1,00	-3,00	1,00	1,000
	Post-	1,10	1,45							
Estómago WSAVA	Pre-	6,20	3,01	-2,50	3,17	-2,00	3,00	-10,00	1,00	0,023
	Post-	3,70	2,02							
Duodeno WSAVA	Pre-	10,20	3,26	-5,10	3,00	-5,50	3,00	-11,00	0,00	0,004
	Post-	5,10	2,51							
Estómago cuantitativo Slovak y col.	Pre-	1,4	0,52	-0,20	0,79	0,00	1,00	-1,00	1,00	0,688
	Post-	1,20	0,79							
Estómago cualitativo Slovak y col.	Pre-	1,40	0,52	-0,30	0,67	0,00	1,00	-1,00	1,00	0,375
	Post-	1,10	0,74							
Duodeno cuantitativo Slovak y col.	Pre-	3,00	1,05	-0,40	1,58	-0,50	3,00	-2,00	2,00	0,395
	Post-	2,60	1,17							
Duodeno cualitativo Slovak y col.	Pre-	2,20	0,63	-0,20	1,03	0,00	2,00	-2,00	1,00	0,766
	Post-	2,00	0,82							

5.6.3. Evolución de las lesiones histopatológicas

En estos 10 perros del Grupo 2, durante el procedimiento endoscópico se volvieron a tomar biopsias de las distintas localizaciones digestivas para el estudio de la evolución de las lesiones histológicas tras el tratamiento inmunosupresor mediante el empleo de los dos índices previamente utilizados. Como puede observarse en la tabla 76, la graduación de las lesiones gástricas fue mayor tras la finalización de la terapia farmacológica en ambos índices; no obstante, ninguno de estos incrementos resultó estadísticamente significativo. Por el contrario, a nivel duodenal, la puntuación de todas las lesiones resultó menor en estos 10 perros con EICI tras concluir el tratamiento con ambos índices, no resultando tampoco estas disminuciones estadísticamente significativas en ningún caso.

En cuanto a la evaluación de los sumatorios de los parámetros histopatológicos analizados con cada índice empleado, como puede observarse en la tabla 77, los sumatorios a nivel gástrico tras el tratamiento aumentan su valor, mientras que los parámetros duodenales disminuyen. Sin embargo, ninguna de estas variaciones tras la terapia inmunosupresora resultó estadísticamente significativa.

Tabla 76. Evolución de los parámetros del índice histopatológico de la WSAVA de 2008 y del índice simplificado de Allenspach y colaboradores de 2019 en los 10 perros con EICI tras la finalización del tratamiento.

				Índice WSAVA					Índice Allenspach y col.				
				Media	Desviación estándar	De la variación			Media	Desviación estándar	De la variación		
						Media	Desviación estándar	Valor de <i>p</i>			Media	Desviación estándar	Valor de <i>p</i>
Estómago	Parámetros morfológicos	Lesión epitelial	Pre-	0,40	0,52	0,30	0,67	0,375	-	-	-	-	-
			Post-	0,70	0,48				-	-			
		Lesión en/de las fosas gástricas	Pre-	0,40	0,51	0,30	0,67	0,375	-	-	-	-	-
			Post-	0,70	0,48				-	-			
		Fibrosis y atrofia mucosa y/o glandular	Pre-	1,30	0,67	0,20	0,79	0,688	1,30	0,67	0,20	0,79	0,688
			Post-	1,50	0,71				1,50	0,71			
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intra-epiteliales	Pre-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000
			Post-	0,00	0,00				0,00	0,00			
		Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	Pre-	1,70	0,48	0,10	0,74	1,000	1,70	0,48	0,10	0,74	1,000
			Post-	1,80	0,63				1,80	0,63			
		Eosinófilos en la lámina propia	Pre-	0,20	0,42	0,20	0,78	0,750	0,20	0,42	0,20	0,79	0,750
			Post-	0,40	0,70				0,40	0,70			
		Neutrófilos en la lámina propia	Pre-	0,40	0,52	0,20	0,79	0,688	0,40	0,52	0,20	0,79	0,688
			Post-	0,60	0,52				0,60	0,52			

Resultados

Duodeno		Hiperplasia de folículos linfoides	Pre-	0,60	1,07	0,20	1,32	0,766	-	-	-	-	-
			Post-	0,80	0,92				-	-			
	Parámetros morfológicos	Atrofia de las vellosidades	Pre-	2,30	0,48	-0,20	0,63	0,625	2,30	0,48	-0,20	0,63	0,625
			Post-	2,10	0,32				2,10	0,32			
		Lesión epitelial	Pre-	0,80	0,79	-0,30	0,95	0,531	0,80	0,79	-0,30	0,95	0,513
			Post-	0,50	0,53				0,50	0,53			
		Dilatación de las criptas	Pre-	1,80	0,92	-0,40	1,07	0,343	1,80	0,92	-0,40	1,07	0,344
			Post-	1,40	0,52				1,40	0,52			
		Dilataciones linfáticas	Pre-	1,60	0,70	-0,20	1,14	0,781	1,60	0,70	-0,20	1,14	0,781
			Post-	1,40	0,70				1,40	0,70			
		Fibrosis de la mucosa	Pre-	1,40	0,52	-0,40	0,70	0,219	-	-	-	-	-
			Post-	1,00	0,47				-	-			
	Parámetros inflamatorios	Linfocitos intra-epiteliales	Pre-	1,60	0,52	-0,40	0,52	0,125	-	-	-	-	-
			Post-	1,20	0,42				-	-			
		Linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia	Pre-	2,40	0,52	-0,10	0,57	1,000	2,40	0,52	-0,10	0,57	1,000
			Post-	2,30	0,48				2,30	0,48			
		Eosinófilos en la lámina propia	Pre-	0,60	0,70	-0,20	0,92	0,750	0,60	0,70	-0,20	0,92	0,750
			Post-	0,40	0,52				0,40	0,52			
		Neutrófilos en la lámina propia	Pre-	0,90	0,32	-0,20	0,63	0,625	0,90	0,32	-0,20	0,63	0,625
			Post-	0,70	0,48				0,70	0,48			

Tabla 77. Evolución de los sumatorios de las lesiones histopatológicas en los 10 perros del Grupo 2 tras la finalización del tratamiento inmunosupresor.

		De la variación								
		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de <i>p</i>
Estómago WSAVA	Pre-	5,00	2,62	1,50	2,12	2,00	3,00	-2,00	4,00	0,063
	Post-	6,50	2,84							
Duodeno WSAVA	Pre-	13,40	2,67	-2,40	4,01	-2,50	5,00	-8,00	5,00	0,109
	Post-	11,00	2,26							
Estómago parámetros morfológicos WSAVA	Pre-	2,10	1,19	0,80	1,48	1,00	2,00	-2,00	3,00	0,176
	Post-	2,90	1,45							
Estómago parámetros inflamatorios WSAVA	Pre-	2,90	1,91	0,70	2,36	0,00	4,00	-2,00	4,00	0,336
	Post-	3,60	2,07							
Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	Pre-	7,90	2,08	-1,50	3,17	-1,00	3,00	-7,00	4,00	0,203
	Post-	6,40	1,65							
Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	Pre-	5,50	0,85	-0,90	1,37	-1,00	2,00	-3,00	1,00	0,086
	Post-	4,60	0,97							
Estómago Allenspach y col.	Pre-	3,60	1,35	0,70	1,70	0,50	2,00	-3,00	3,00	0,313
	Post-	4,30	1,95							
Duodeno Allenspach y col.	Pre-	10,40	2,17	-1,60	3,41	-2,00	5,00	-7,00	4,00	0,207
	Post-	8,80	1,93							

5.6.4. Evolución del inmunofenotipo

Como el resto de variables de este trabajo, la reevaluación del inmunofenotipo tanto de sangre periférica como del epitelio y de la lámina propia duodenal también se llevó a cabo en los perros con EICI en los que se pudo contar con un control postratamiento.

Del mismo modo que en el resto de variables, el estudio de la evolución del inmunofenotipo tras el tratamiento inmunosupresor se ha calculado como la diferencia de los valores obtenidos después del tratamiento y los obtenidos de forma previa al mismo, determinando si dicha diferencia es estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95%.

Los resultados del inmunofenotipo sanguíneo se han reflejado en la tabla 78 y los del inmunofenotipo intestinal en la tabla 79. Como puede observarse en la tabla 78, tras la finalización del tratamiento no se evidenció ningún cambio estadísticamente significativo en ninguna de las poblaciones linfocitarias sanguíneas estudiadas tanto en valor relativo como absoluto. A nivel duodenal, por el contrario, como se ha detallado en la tabla 79A, en el epitelio se evidenció un aumento estadísticamente significativo tanto de los linfocitos Th ($p=0,048$) como del cociente CD4/CD8 ($p=0,010$). Del mismo modo, a nivel de la lámina propia duodenal se observó un aumento significativo del porcentaje de linfocitos T dobles negativos ($p=0,028$) después del tratamiento inmunosupresor en este grupo de perros (tabla 79B). En este caso, los problemas de contaminación bacteriana que tuvieron lugar en algunas ocasiones, tampoco han permitido la reevaluación de todas las poblaciones linfocitarias intestinales en estos 10 perros del Grupo 2. Por ello, en la tabla 79 se ha añadido una columna que hace referencia al número de animales en los que pudo evaluarse cada una de las variables incluidas. Concretamente, a nivel de la lámina propia, las poblaciones de linfocitos productores de citocinas no pudieron ser evaluadas.

Tabla 78. Evolución del inmunofenotipo sanguíneo en los 10 perros con EICI tras la finalización del tratamiento. **A:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias y cociente CD4/CD8. **B:** resultados en valores absolutos respecto al total de linfocitos sanguíneos.

A:		De la variación								
		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de <i>p</i>
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	Pre-	85,13	9,72	2,78	7,21	4,22	9,45	-13,56	10,47	0,193
	Post-	87,91	9,46							
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Pre-	43,19	9,26	1,03	6,60	0,13	10,54	-9,88	11,08	0,770
	Post-	44,22	10,07							
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Pre-	24,06	6,19	3,35	6,83	5,60	9,12	-9,44	12,54	0,232
	Post-	27,40	7,63							
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+ CD8+)	Pre-	1,78	1,50	0,05	2,40	0,40	0,59	-6,05	3,61	0,193
	Post-	1,83	1,14							
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	Pre-	19,94	6,66	-3,28	11,48	0,69	18,11	-23,59	10,81	0,557
	Post-	18,34	5,87							
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)*	Pre-	6,45	4,60	1,45	4,71	1,99	6,40	-8,90	6,79	0,232
	Post-	7,90	2,96							
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)*	Pre-	7,11	4,48	-0,42	5,43	0,41	6,04	-13,57	5,00	0,770
	Post-	6,69	3,36							
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)	Pre-	7,79	4,83	2,66	7,45	-0,07	9,90	-6,41	17,70	0,557
	Post-	10,15	8,27							
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	Pre-	18,28	14,75	-0,54	14,99	-5,49	21,30	-16,24	31,12	0,625
	Post-	17,74	13,13							

Resultados

% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+ IL-4+)	Pre-	3,11	3,85	-0,59	4,40	-0,04	6,88	-6,59	5,83	0,547
	Post-	2,52	2,35							
% de linfocitos Th1 (CD3+CD4+ IFN- γ)*	Pre-	27,14	26,00	-1,40	27,35	-1,80	36,02	-44,19	55,23	0,696
	Post-	25,73	25,37							
% de linfocitos Th2 (CD3+CD4+ IL-4+)*	Pre-	2,63	2,73	-0,25	4,51	0,27	7,06	-7,50	6,75	1,000
	Post-	2,38	3,06							
Cociente CD4/CD8	Pre-	1,95	0,85	-0,07	0,76	-0,36	1,11	-1,40	1,10	0,846
	Post-	1,88	1,19							

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

B:		De la variación								
		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de p
Linfocitos T (CD45+CD3+)/ μ L	Pre-	1448	404	139	631	-19	995	-731	1270	0,695
	Post-	1587	640							
Linfocitos Th (CD3+CD4+)/ μ L	Pre-	719	188	63	324	8	457	-490	556	0,625
	Post-	782	287							
Linfocitos Tc (CD3+CD8+)/ μ L	Pre-	420	162	89	227	48	298	-226	544	0,275
	Post-	509	267							
Linfocitos T DP (CD3+CD4+CD8+)/ μ L	Pre-	32	35	-2	43	6	23	-115	41	0,557
	Post-	30	20							
Linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)/ μ L	Pre-	352	162	-15	267	-73	375	-323	417	0,922
	Post-	337	204							
Linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)/ μ L	Pre-	106	66	30	67	57	105	-63	138	0,131
	Post-	136	54							

Linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)/μL	Pre-	32	30	-5	31	4	24	-86	27	0,846
	Post-	28	8							
Linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)/μL	Pre-	125	82	30	70	-3	90	-37	193	0,163
	Post-	155	97							
Linfocitos T productores de IFN-γ (CD3+ IFN-γ+)/ μL	Pre-	288	228	14	277	-27	315	-445	534	0,846
	Post-	302	224							
Linfocitos T productores de IL4 (CD3+ IL-4+)/μL	Pre-	63	81	-14	96	-10	152	-133	161	0,570
	Post-	50	54							
Linfocitos Th1 (CD3+CD4+ IFN-γ+)/μL	Pre-	194	204	266	526	32	404	-295	1354	0,275
	Post-	447	504							
Linfocitos Th2 (CD3+CD4+ IL-4+)/μL	Pre-	20	20	25	66	5	101	-33	153	0,695
	Post-	45	60							

Resultados

Tabla 79. Evolución del inmunofenotipo intestinal en los 10 perros con EICI tras la finalización del tratamiento. **A:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones de LIE y cociente CD4/CD8. **B:** resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones de LLP y cociente CD4/CD8.

A:		n	Media	Desviación estándar	De la variación						
					Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de <i>p</i>
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	Pre-	10	81,97	7,72	-2,10	13,70	2,63	11,33	-32,25	19,41	0,826
	Post-		79,87	8,78							
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Pre-	10	5,66	5,09	2,10	2,48	2,20	3,25	-0,81	7,20	0,048
	Post-		7,76	6,49							
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Pre-	10	48,76	14,11	-2,63	11,48	-0,95	11,61	-22,65	16,32	0,492
	Post-		46,12	17,72							
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+ CD8+)	Pre-	10	0,67	0,49	0,02	0,98	-0,06	1,03	-1,06	2,07	0,922
	Post-		0,68	0,71							
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	Pre-	10	30,94	5,74	3,24	12,26	-3,40	22,79	-8,38	21,88	0,557
	Post-		34,18	15,26							
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)*	Pre-	10	0,21	0,24	0,13	0,26	0,05	0,29	-0,17	0,63	0,232
	Post-		0,34	0,37							
% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)*	Pre-	10	31,97	24,62	-3,97	24,86	-2,70	27,39	-58,57	27,78	0,846
	Post-		28,00	14,82							
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)	Pre-	10	1,76	1,64	0,26	1,33	0,57	1,51	-2,78	1,96	0,322
	Post-		2,02	1,01							
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +))	Pre-	3	9,10	11,82	-18,53	18,01	-18,53	25,47	-31,26	-5,79	0,500
	Post-		4,84	6,13							

% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	Pre-	3	1,00	2,38	-1,47	5,70	-1,47	8,06	-5,50	2,56	1,000
	Post-		0,97	1,39							
Cociente CD4/CD8	Pre-	10	0,14	0,13	0,08	0,09	0,03	0,13	-0,01	0,28	0,010
	Post-		0,22	0,21							

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

B:		n	Media	Desviación estándar	De la variación						
					Media	Desviación estándar	Mediana	IQR	Mín.	Máx.	Valor de <i>p</i>
% de linfocitos T (CD45+CD3+)	Pre-	8	87,20	9,08	-6,06	16,81	-4,24	22,62	-28,18	12,41	0,625
	Post-		78,58	10,86							
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Pre-	8	36,40	16,65	-4,11	12,33	-5,18	7,44	-22,11	15,80	0,313
	Post-		30,49	16,70							
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Pre-	8	41,74	14,92	-4,84	23,21	-3,32	45,53	-30,93	24,30	0,688
	Post-		43,61	22,03							
% de linfocitos T DP (CD3+CD4+ CD8+)	Pre-	8	1,40	0,55	0,07	3,38	-0,08	0,72	-5,05	5,61	0,087
	Post-		2,05	1,76							
% de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-)	Pre-	8	13,70	7,58	3,38	18,53	-5,03	14,18	-11,58	38,66	0,028
	Post-		17,60	11,54							
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+ CD25+)*	Pre-	8	6,67	4,68	-1,85	4,09	-1,78	6,80	-6,53	3,69	0,438
	Post-		4,55	2,62							

Resultados

% de linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)*	Pre-	8	34,04	11,97	10,45	32,93	8,62	43,53	-26,31	64,88	0,688
	Post-		45,95	24,69							
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)	Pre-	8	7,99	4,86	-3,04	7,22	-2,92	9,02	-14,38	6,40	0,438
	Post-		5,20	3,33							
Cociente CD4/CD8	Pre-	8	1,11	0,97	0,38	0,98	0,25	1,14	-0,90	1,96	0,436
	Post-		1,22	1,51							

*El porcentaje de linfocitos Th y Tc activados está expresado sobre el porcentaje de linfocitos Th y Tc, respectivamente.

5.7. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO SANGUÍNEO CON LAS VARIABLES CLÍNICAS, ENDOSCÓPICAS E HISTOPATOLÓGICAS EN LOS PERROS CON EICI

Para finalizar la sección de “Resultados” se evaluó la posible existencia de asociaciones entre el inmunofenotipo sanguíneo y los parámetros de los índices clínicos, endoscópicos e histopatológicos en el grupo de perros con EICI, lo que permitió valorar la posible utilidad de parámetros inmunitarios obtenidos de modo mínimamente invasivo como biomarcadores en esta entidad. Además, para comprobar si las asociaciones encontradas eran consecuencia de la enfermedad, se comprobó si también estaban presentes en el grupo de perros sanos o perros control y si se mantenían tras la finalización del tratamiento específico de la enfermedad en los 10 perros del Grupo 2 de los que se dispuso de control postratamiento.

En este apartado, únicamente se indican las relaciones que han resultado ser estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%.

5.7.1. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices clínicos de la enfermedad

Se valoró la posible existencia de asociaciones entre los valores de los tres índices clínicos obtenidos en el grupo de perros con EICI o Grupo 2 y las poblaciones linfocitarias sanguíneas analizadas en el inmunofenotipaje. Las asociaciones encontradas fueron las que se describen a continuación y solo se encontraron en los perros del Grupo 2:

- Porcentaje de linfocitos T en sangre periférica (% de linfocitos CD45+CD3+): se encontró una asociación positiva entre el porcentaje en sangre de esta población linfocitaria y los valores totales del índice CIBDAI ($r_s=0,368$; $p=0,027$), CIBDAISI ($r_s=0,429$; $p=0,009$) y CCECAI ($r_s=0,365$; $p=0,029$) en el grupo de perros con EICI. De este modo, a mayor porcentaje de linfocitos T en sangre periférica, mayor gravedad clínica de la enfermedad.

- Porcentaje de linfocitos Tc en sangre periférica (% de linfocitos CD3+CD8+): se evidenció un mayor porcentaje de esta población linfocitaria asociado a una mayor gravedad clínica de la enfermedad con el empleo del índice clínico CIBDAISI ($r_s=0,376$; $p=0,024$).

5.7.2. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices endoscópicos

En este sentido se trató de identificar la presencia de relaciones estadísticamente significativas entre los valores de los sumatorios de los índices empleados para la valoración endoscópica de los perros con EICI y los valores del inmunofenotipaje sanguíneo. Además, se comprobó si estas asociaciones eran exclusivas de la enfermedad identificando su presencia o ausencia en el grupo de perros control, y la evolución de esta asociación tras la finalización del tratamiento farmacológico en los perros con EICI con control postratamiento.

Como puede observarse en la tabla 80, las asociaciones encontradas entre las poblaciones linfocitarias sanguíneas estudiadas y los valores de los sumatorios de los índices empleados para la valoración endoscópica en el Grupo 2 no fueron estadísticamente significativas ni en el grupo de perros sanos ni en los perros tratados del Grupo 2, tras la finalización del tratamiento. Sí se encontró en perros del Grupo 2 una asociación negativa o inversamente proporcional entre: el porcentaje y el valor absoluto de linfocitos T productores de IL-4 y el sumatorio de los parámetros gástricos del índice cuantitativo de Slovak y colaboradores ($p=0,016$ y $p=0,020$, respectivamente) y entre el porcentaje de linfocitos Th activados y el sumatorio de los parámetros duodenales según el índice de la WSAVA ($p=0,035$); y una asociación positiva o directamente proporcional únicamente entre el porcentaje y el valor absoluto de linfocitos Treg y el sumatorio de los parámetros gástricos del índice cualitativo de Slovak y colaboradores ($p=0,034$ y $p=0,025$, respectivamente).

Tabla 80. Asociaciones encontradas entre el inmunofenotipo sanguíneo y los sumatorios de los índices endoscópicos empleados.

Asociación		EICI		EICI post		Sanos	
Inmunofenotipo sanguíneo	Índice endoscópico	r_s	Valor de p	r_s	Valor de p	r_s	Valor de p
% de linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	Estómago cualitativo Slovak y col.	0,354	0,034	0,250	0,486	0,278	0,336
Linfocitos Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)/ μ L	Estómago cualitativo Slovak y col.	0,374	0,025	-0,197	0,585	0,165	0,573
% de linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)	Estómago cuantitativo Slovak y col.	-0,400	0,016	0,079	0,829	0,325	0,256
Linfocitos T productores de IL4 (CD3+IL-4+)/ μ L	Estómago cuantitativo Slovak y col.	-0,385	0,020	0,131	0,718	0,255	0,398
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)	Duodeno WSAVA	-0,353	0,035	-0,208	0,565	0,246	0,359

5.7.3. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices histopatológicos

Del mismo modo, se evaluó la presencia de asociaciones entre los valores del inmunofenotipo en sangre periférica con los resultados de los sumatorios de los índices histopatológicos empleados en este estudio en el grupo de perros con EICI. En este caso también se determinó si estas asociaciones eran debidas a la enfermedad evaluando su significación estadística en el grupo de perros sanos y su mantenimiento tras la finalización del tratamiento en los perros con EICI con control postratamiento.

Respecto a las asociaciones encontradas entre las distintas poblaciones linfocitarias sanguíneas y los sumatorios de los índices histopatológicos, estas solo se encontraron en el grupo de perros con EICI o Grupo 2, como se ha reflejado en la tabla 81. A nivel gástrico se encontraron asociaciones negativas o inversamente proporcionales entre: el número absoluto de linfocitos T productores de IFN- γ y los sumatorios de los parámetros morfológicos de la WSAVA ($p=0,030$) y entre el porcentaje de linfocitos T productores de IFN- γ y el sumatorio de los parámetros globales de la WSAVA ($p=0,046$).

Resultados

Por otro lado, como puede observarse también en la tabla 81, a nivel de los parámetros duodenales se encontró una asociación positiva o directamente proporcional entre el valor absoluto de linfocitos Tc activados y el sumatorio de los parámetros inflamatorios de la WSAVA ($p=0,049$). Las asociaciones negativas o inversamente proporcionales por su parte se encontraron entre: el porcentaje de linfocitos Th activados y el sumatorio de los parámetros morfológicos ($p=0,007$) y globales ($p=0,011$) de la WSAVA, y del índice de Allenspach y colaboradores ($p=0,023$); el valor absoluto de linfocitos Th activados y el sumatorio de los parámetros morfológicos ($p=0,011$) y globales ($p=0,027$) de la WSAVA, y del índice de Allenspach y colaboradores ($p=0,031$); el valor absoluto de linfocitos Treg y el sumatorio de los parámetros morfológicos de la WSAVA ($p=0,019$); y el porcentaje y el valor absoluto de linfocitos T productores de IFN- γ y el sumatorio de los parámetros del índice de Allenspach y colaboradores ($p=0,025$ y $p=0,035$, respectivamente).

Tabla 81. Asociaciones encontradas entre el inmunofenotipo sanguíneo y los sumatorios de los índices histopatológicos empleados.

Asociación		EICI		EICI post		Sanos	
Inmunofenotipo sanguíneo	Índice histopatológico	r_s	Valor de p	r_s	Valor de p	r_s	Valor de p
Linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +)/ μ L	Estómago parámetros morfológicos WSAVA	-0,362	0,030	0,283	0,428	0,331	0,320
% de linfocitos T productores de IFN- γ (CD3+IFN- γ +)	Estómago WSAVA	-0,335	0,046	-0,123	0,973	0,441	0,175
% de linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	-0,445	0,007	-0,143	0,694	0,232	0,406
	Duodeno WSAVA	-0,417	0,011	-0,320	0,367	0,061	0,828
	Duodeno Allenspach y col.	-0,377	0,023	-0,208	0,564	0,061	0,830
Linfocitos Th activados (CD3+CD4+CD25+)/ μ L	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	-0,418	0,011	0,031	0,932	0,095	0,737
	Duodeno WSAVA	-0,369	0,027	-0,172	0,634	-0,134	0,634
	Duodeno Allenspach y col.	-0,361	0,031	-0,110	0,762	-0,237	0,395

Linfocitos Tc activados (CD3+CD8+ CD25+)/μL	Duodeno parámetros inflamatorios WSAVA	0,330	0,049	-0,515	0,128	0,228	0,414
Linfocitos Treg (CD3+CD4+ CD25+FoxP3+)/ μL	Duodeno parámetros morfológicos WSAVA	-0,388	0,019	-0,578	0,080	-0,028	0,922
% de linfocitos T productores de IFN-γ (CD3+IFN-γ+))	Duodeno Allenspach y col.	-0,372	0,025	-0,416	0,232	-0,042	0,881
Linfocitos T productores de IFN-γ (CD3+IFN-γ+))/ μL	Duodeno Allenspach y col.	-0,353	0,035	-0,257	0,474	-0,088	0,755

6. DISCUSIÓN

6.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, ENDOSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DE LA EICI CANINA

La comparativa de las características endoscópicas e histopatológicas entre los dos grupos de perros incluidos en este estudio (perros sanos y perros con EICI), así como la minuciosa recogida de datos clínicos de los animales enfermos, ha permitido llevar a cabo una caracterización de la enfermedad en la especie canina.

6.1.1. Reseña

La EICI es una enfermedad que se presenta más frecuentemente en perros adultos de **edad** media (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Los perros con EICI de nuestro estudio mostraron una edad media de $6,30 \pm 3,08$ años (rango 1,80-12,00 años), edad de presentación similar a las descritas previamente en múltiples series de casos de animales con dicha enfermedad (Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007; Jergens *et al.*, 2010; Heilmann *et al.*, 2018; Kathrani *et al.*, 2019). La EICI es una enfermedad de muy infrecuente presentación en perros menores de 12 meses, en los cuales la causa de los signos gastrointestinales crónicos suele ser, habitualmente, patologías infecciosas o reacciones adversas a los alimentos (Hall, 2013a). De acuerdo con lo descrito, en el grupo de perros enfermos de este trabajo de investigación se observó que la edad mínima de presentación de la enfermedad fue de 1,80 años. Algunas series de casos con un elevado número de perros con enteropatías crónicas han evidenciado que los animales más jóvenes son aquellos cuyo cuadro clínico responde a terapia antibiótica, seguidos de aquellos que responden a tratamiento dietético, siendo los de mayor edad los que requieren tratamiento inmunosupresor (Allenspach *et al.*, 2016; Volkmann *et al.*, 2017). En todos los perros con EICI de este estudio, de forma previa a la realización de la endoscopia digestiva, se realizó un ensayo dietético que no logró la remisión del cuadro clínico, hecho por el cual se continuó con el protocolo diagnóstico tal y como se ha detallado en la sección de “Materiales y métodos”, llegando al diagnóstico definitivo de enteritis crónica linfoplasmocitaria. En este sentido, en la distribución por edad de los perros enfermos del estudio se encuentra solo un perro menor de dos años (2,78%), 27 perros con edades comprendidas entre los dos y los nueve años (75%) y ocho animales mayores de nueve años (22,22%), concordando con lo previamente observado por otros autores en perros con EICI que no respondían a tratamiento dietético (Volkmann *et al.*, 2017). Por otro lado, todos los perros del grupo control eran adultos, encontrándose la edad media de

este grupo en la franja de perros adultos maduros o de edad media (Creevy *et al.*, 2019). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la edad entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI de nuestro estudio. También se considera relevante que la edad media de nuestro grupo de perros sanos se encuentra en el rango de edad típico descrito para la EICI canina, por si dicha variable pudiese ejercer alguna influencia en las exploraciones endoscópicas o histopatológicas, ya que, por ejemplo, hay descripciones de la influencia de la edad en la proliferación celular a nivel gastrointestinal en medicina humana, en modelos animales y en el perro (Roncucci *et al.*, 1988; Wilcock, 2013; Tomasetti *et al.*, 2019).

Se ha descrito tanto en el hombre como en la especie canina que la edad conduce a una serie de cambios en el sistema inmunitario (Greeley *et al.*, 1996; Weiskopf *et al.*, 2009; Villaescusa *et al.*, 2012a), y dado que el estudio de las diferentes poblaciones linfocitarias tanto en sangre periférica como a nivel intestinal son la base de esta tesis doctoral, consideramos importante la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en esta variable entre ambos grupos de animales. Algunas de las modificaciones más importantes en las poblaciones linfocitarias caninas asociadas a la edad son el descenso generalizado de la población linfocitaria en sangre periférica con el paso del tiempo, con disminuciones del porcentaje de linfocitos B e incremento del porcentaje de linfocitos T. Parece ser que respecto a los linfocitos T se produce una tendencia a lo largo del tiempo a la disminución de la población Th, unida a un incremento de la población Tc, lo que se traduce en un descenso del cociente CD4/CD8 (Greeley *et al.*, 1996; Faldyna *et al.*, 2001; Blount *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2005; Villaescusa *et al.*, 2012a), que en medicina humana se ha asociado con un incremento de la mortalidad (Provinciali *et al.*, 2009; Bruno *et al.*, 2017). También se ha descrito en el perro un incremento con la edad de la relación Th1/Th2 en sangre periférica (Horiuchi *et al.*, 2007), incrementos de los linfocitos Treg (Biller *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2017) y disminuciones de los linfocitos T $\gamma\delta$ (Marchetti *et al.*, 2020).

En este estudio, respecto al **sexo**, se encontró una ligera superioridad de los machos no estadísticamente significativa en ambos grupos de animales (56,25% en el grupo de perros sanos y 58,33% en el grupo de perros con EICI). Esta ligera superioridad de machos coincide con otras series de casos de perros con EICI (Craven *et al.*, 2004b; García-Sancho *et al.*, 2007; Volkmann *et al.*, 2017; Benvenuti *et al.*, 2020). No obstante, hay otros trabajos que describen lo contrario (Galler *et al.*, 2017; Heilmann *et al.*, 2018; Wennogle *et al.*, 2019a). En la literatura, hasta el momento no se ha descrito una predisposición sexual para la EICI canina, del mismo modo que tampoco se ha visto ninguna influencia debida al **estado fértil** de los animales (Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Sin embargo, algunas series de casos de perros con EICI muestran elevados porcentajes de animales castrados, coincidiendo con el 72,22% de perros castrados con EICI que constituyen el Grupo 2 de este trabajo, lo que puede estar influenciado por ciertos motivos, tales como la edad de los animales o el área geográfica

(Allenspach *et al.*, 2007; Wennogle *et al.*, 2019a). Sin embargo, sí que se han observado ciertas influencias por parte de estas dos variables en el sistema inmunitario (Faldyna *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2005). Concretamente algunos autores detallan la presencia de mayores porcentajes de linfocitos T y Th y menores porcentajes de linfocitos B periféricos en hembras que en machos (Faldyna *et al.*, 2001), así como una mayor frecuencia de aparición de reacciones de hipersensibilidad frente a la vacunación en animales castrados, sugiriendo que la falta de retroalimentación negativa por parte de las hormonas gonadales sobre la pituitaria influye en la respuesta del sistema inmunitario frente a la vacunación (Moore *et al.*, 2005). Por ello, consideramos adecuada la ausencia de diferencias estadísticamente significativas para estas variables entre los dos grupos de perros objeto de comparación de nuestro estudio.

Por otro lado, en referencia a la **raza**, aunque nuestro grupo de perros con EICI estuvo compuesto por un mayor número de animales de razas puras (72,22% frente al 56,25% en el grupo de perros sanos), no encontramos diferencias estadísticamente significativas para esta variable entre los dos grupos de perros de nuestro estudio. Esto nos permite afirmar que no tuvimos ninguna raza sobreexpresada en nuestro trabajo, lo cual es importante de cara al estudio del inmunofenotipo, ya que se han descrito variaciones en ciertas poblaciones de linfocitos T, tales como los Tc, debidas a esta variable en la especie canina (Byrne *et al.*, 2000; Faldyna *et al.*, 2001; Villaescusa *et al.*, 2012c).

Los perros con EICI suelen presentar una baja **condición corporal** en la exploración física (Hall, 2013a). En nuestro caso, en 19 de los perros con EICI (52,78%) se observó una condición corporal por debajo de lo considerado normal (5 en la escala 1-9 (Freeman *et al.*, 2011)), siendo quizás este porcentaje menor de lo esperado. Además, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para esta variable entre ambos grupos, como sería de esperar (Hall, 2013a), lo que podría explicarse, al menos parcialmente, por el elevado porcentaje de animales con EICI que presentaban una condición corporal de 5 o superior.

6.1.2. Analítica sanguínea

Los resultados medios obtenidos en el estudio hematológico y en la bioquímica sanguínea de la población de perros sanos y de perros con EICI muestran unos valores dentro de los rangos de referencia para la especie canina. A pesar de las limitaciones derivadas del tamaño muestral, puede considerarse que los valores analíticos en nuestro grupo de perros sanos o grupo control son equiparables y extrapolables a otras poblaciones de perros sanos. Así, en nuestro estudio estas

variables nos han servido de referencia para su comparación con los valores obtenidos en los perros con EICI.

Como se comentó en la sección de “Revisión bibliográfica”, las alteraciones laboratoriales en los perros con EICI son a menudo infrecuentes (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Sin embargo, algunas de las alteraciones individuales de la analítica sanguínea descritas en el apartado 5.3.3. de la sección de “Resultados” destacan por su alta frecuencia de presentación. La mayoría de estas alteraciones han sido observadas en alguna ocasión en perros con dicha enfermedad (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). La trombocitosis se observó en 12 perros con EICI (33,33%) de nuestro estudio. En la especie canina este hallazgo se ha relacionado con las formas más graves de la EICI, la enteropatía con pérdida de proteínas (Craven y Washabau, 2019). Se estima que la incidencia de presentación del aumento de recuento de plaquetas en perros con EICI es del 6%, aunque algunos autores consideran que su incidencia real está subestimada (Goodwin *et al.*, 2011; Jacinto *et al.*, 2017; Craven y Washabau, 2019). De nuestros 12 perros con trombocitosis, seis presentaron de forma conjunta hipoproteinemia. Además, el recuento de plaquetas fue significativamente mayor en el grupo de perros con EICI en comparación con nuestro grupo de perros sanos o control. Estos resultados coinciden con lo previamente descrito por algunos autores tanto en la EICI en medicina humana como en el perro, los cuales también identifican recuentos de plaquetas dentro de la normalidad, pero significativamente mayores que en individuos sanos o con estadios latentes de la enfermedad, encontrando además una asociación positiva entre el valor plaquetar y la gravedad clínica de la enfermedad en el ser humano (Danese *et al.*, 2004; Mehain *et al.*, 2019). El incremento del recuento plaquetario puede asociarse a un estado hipercoagulativo, y su causa exacta en la EICI tanto en el hombre como en el perro se desconoce. Se sugiere que puede ser consecuencia de los bajos niveles de antitrombina III, del estado inflamatorio sistémico o por el efecto de los glucocorticoides empleados en el tratamiento, entre otras hipótesis (Srirajaskanthan *et al.*, 2005; Goodwin *et al.*, 2011; Magro *et al.*, 2014). En el leucograma, nuestros perros con EICI presentaron un recuento de leucocitos significativamente mayor que los perros sanos, observándose concretamente un mayor recuento de neutrófilos tanto en valor absoluto como relativo, a pesar de que solo dos de nuestros perros con EICI presentaron neutrofilia. Algunos autores atribuyen recuentos mayores del número de neutrófilos en perros con EICI a la presencia de lesiones erosivas o ulcerativas a nivel intestinal (Jergens y Simpson, 2012).

En cuanto a la bioquímica, nueve (25%) de los perros con EICI presentaron hipoproteinemia (aunque tan solo en seis de ellos se acompañó de hipoalbuminemia), es decir, que presentaban una enteropatía con pérdida de proteínas, considerada la forma más grave de esta enfermedad y la de peor pronóstico (Allenspach *et al.*, 2007; Craven y Washabau, 2019). Como se detalló en el apartado de “Resultados”, en 10 de los perros con EICI fue necesaria la instauración de tratamiento inmunosupresor de forma previa a la realización de la endoscopia

dado su grave estado clínico. En cinco de ellos, el motivo fue que la baja concentración de proteínas totales plasmáticas suponía un riesgo anestésico de cara a la realización de la endoscopia digestiva con el fin de alcanzar el diagnóstico definitivo. Esta práctica es frecuente en casos graves de la enfermedad. En cualquier caso, la administración de fármacos inmunosupresores parece no afectar al infiltrado inflamatorio gastrointestinal, permitiendo alcanzar igualmente un diagnóstico preciso (Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007). Finalmente, se ha encontrado un valor medio de urea significativamente menor en nuestro grupo de perros con EICI en comparación con el grupo control o de perros sanos, si bien debemos destacar que este parámetro se encontraba dentro del rango de referencia para la especie. El único trabajo que relaciona los niveles de urea con la EICI canina determina que niveles elevados de la misma en el momento del diagnóstico se asocian con un mayor riesgo de mortalidad (Kathrani *et al.*, 2019).

6.1.3. Signos clínicos

Los signos clínicos evaluados en este trabajo son los que aparecen con mayor frecuencia en la EICI canina, y, como ya se ha comentado previamente, estos son: la diarrea y las alteraciones en la frecuencia de la defecación, el vómito, la pérdida de peso, el dolor abdominal, las alteraciones del apetito, el aumento en las flatulencias y los borborismos, las alteraciones en la actitud o en el grado de actividad de los animales y el prurito (Jergens *et al.*, 2003; Allenspach *et al.*, 2007; Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a). Las formas de presentación clínica más frecuentes de la enfermedad suelen ser la presencia de vómitos o diarrea aislados o la combinación de ambos signos clínicos (Tams, 2003; Hall, 2013a). Sin embargo, en nuestro estudio todos los animales presentaron diferentes combinaciones de tres o más de estos signos clínicos. Esto puede ser debido a que a pesar de que alguno de los signos clínicos sean los verdaderamente predominantes y los que hacen al propietario acudir al veterinario, a la hora de realizar la anamnesis de forma exhaustiva se detecta la presencia de otros signos clínicos que bien por desconocimiento o bien por costumbre y normalización, el propietario no consideraba importantes.

La duración media del proceso en nuestros perros con EICI fue de $24,33 \pm 26,42$ meses. En 16 animales ($44,44 \pm 18,52\%$) cabe destacar la larga duración del proceso, extendiéndose más de un año. Otras series de casos de perros con EICI también han descrito periodos de enfermedad de semejante duración (Volkman *et al.*, 2017). En ocasiones, como ya hemos mencionado anteriormente, los propietarios normalizan ciertas condiciones clínicas o no les dan la suficiente importancia como para acudir al veterinario hasta que el problema es realmente evidente. También es importante mencionar en este sentido, que el HCVC es un centro de referencia, siendo

mucho más habitual encontrar casos crónicos. Estos hechos pueden justificar en cierta medida los largos periodos de enfermedad encontrados en nuestros animales. Un punto reseñable que apoya esta hipótesis es que el 80% de los perros que requirieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la endoscopia dada su gravedad clínica, presentaron un periodo de enfermedad menor de 12 meses.

Coincidiendo con lo previamente descrito por múltiples autores (Craven *et al.*, 2004b; García-Sancho *et al.*, 2007; Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a; Berghoff *et al.*, 2014), los signos clínicos más frecuentes observados en nuestros perros con EICI fueron la alteración en la frecuencia de defecación (94,44%), la diarrea crónica (79%) y el aumento en las flatulencias y los borborismos (69,44%). Es interesante mencionar que ocho de los perros (22,22%) que presentaron alteraciones en la frecuencia de defecación no mostraron conjuntamente diarrea, por lo que la interpretación de este signo clínico debe ser tomada con precaución. Respecto a la presencia de un aumento en las flatulencias y borborismos intestinales, tan solo tres animales de los 25 que mostraron dicho signo no presentaron de forma conjunta diarrea, por lo que podemos considerar que se trata de un signo clínico muy asociado a la alteración en la consistencia de las heces, como han descrito previamente algunos autores (García-Sancho *et al.*, 2006).

El cuarto signo clínico más frecuente en los perros con EICI de nuestro trabajo fue la alteración en su actividad o actitud (63,89%). En ninguno de los casos este signo clínico se presentó de forma aislada, sino que siempre se acompañó de vómitos, diarrea, dolor abdominal o una combinación de varios de ellos. Este hecho ya ha sido previamente descrito por nuestro grupo de trabajo (García-Sancho *et al.*, 2007). En función de estas observaciones puede sugerirse que la causa de la aparición de alteraciones en la actividad o actitud en estos animales viene determinada por la presencia del resto de signos clínicos descritos.

El vómito crónico es uno de los signos clínicos más habituales en los perros con EICI (Craven *et al.*, 2004b; Jergens y Simpson, 2012; Hall, 2013a). En nuestro trabajo, a pesar de ser el quinto signo clínico en frecuencia de presentación, podemos considerar que se describió en un elevado número de perros, concretamente en 21 (58,33%). A diferencia de la diarrea, la causa de los vómitos en esta enfermedad no se conoce con exactitud. Algunos autores consideran que la extensión del proceso inflamatorio al estómago puede estimular las fibras viscerales aferentes y ciertos quimiorreceptores y, con ello, el centro del vómito (Washabau, 2013a), que también puede verse estimulado como consecuencia de los cambios de pH desencadenados por el reflujo duodenal al antro pilórico gástrico, incrementado la producción de ácido clorhídrico (Rodríguez-Franco *et al.*, 1997; García-Sancho *et al.*, 2005b). Además, se ha observado que los perros con EICI con formas graves de la enfermedad son los que más vómitos presentan (Volkman *et al.*, 2017). En nuestro caso, cabe mencionar que de los perros que requirieron tratamiento

inmunosupresor de forma previa a la endoscopia por su gravedad clínica, el 80% presentaron vómitos.

La pérdida de peso y las alteraciones del apetito estuvieron presentes en el 55,56% de los perros en el momento del diagnóstico. Estos resultados son semejantes a lo anteriormente descrito por otros autores (Jacobs *et al.*, 1990; Craven *et al.*, 2004b; García-Sancho *et al.*, 2007; Hall, 2013a; Kathrani *et al.*, 2019). Como ya se ha comentado previamente en la sección de “Revisión bibliográfica”, la pérdida de peso es consecuencia del síndrome de malabsorción que se desencadena en el curso de la enfermedad ligado a la presencia de diarrea (Hall, 2013a; Marks, 2013). Diecinueve de los 20 perros con EICI de nuestro estudio que mostraron pérdida de peso también presentaban diarrea. El elevado porcentaje de perros con EICI que presentaron pérdida de peso contrasta con el hecho de que solo el 52,78% mostrasen una baja condición corporal (<5). Este hecho puede ser debido a que muchos animales se encontrasen por encima de su peso ideal antes del inicio del cuadro clínico, si se tiene en cuenta la elevada prevalencia actual de la obesidad en perros (Zoran, 2010).

Respecto al dolor abdominal, pese a ser común en cuadros de enteritis (Hall, 2013b), no son muchos los trabajos que evalúen la presencia de dicho signo clínico en esta enfermedad. Los escasos trabajos que lo evalúan describen unos porcentajes de presentación tan altos como los encontrados en los perros con EICI de nuestro estudio (50%) (Rodríguez-Franco y Palacios, 2002; García-Sancho *et al.*, 2005a).

Finalmente, casi la mitad de los perros con EICI de este trabajo (47,22%) presentaron prurito en combinación con otros signos clínicos gastrointestinales. Nuestros resultados contrastan con lo previamente observado por otros autores, que relacionan más la presencia de este signo clínico con cuadros de enteropatías crónicas que responden a dieta que a la EICI que requiere el tratamiento con inmunosupresión (Allenspach *et al.*, 2007; Allenspach *et al.*, 2016). No obstante, nuestra experiencia clínica a lo largo de los años coincide con lo observado en esta tesis doctoral, si bien también consideramos que la evaluación de este signo clínico puede estar influenciada por la subjetividad de los propietarios de los animales.

6.1.4. Índices de actividad clínica

En este estudio, para la valoración de la gravedad clínica de los perros con EICI, se emplearon los tres índices de actividad de la enfermedad existentes para la especie canina. Como ya se ha descrito previamente, se calcularon el índice CIBDAI (Jergens *et al.*, 2003), el índice CIBDAISI, que incorpora los parámetros específicos del intestino delgado dolor abdominal y

borborigmos y flatulencias, además de considerar la polifagia dentro de las alteraciones del apetito (Rodríguez-Franco *et al.*, 2004), y el índice CCECAI, que añade los niveles de albúmina, presencia de edemas o ascitis y prurito y que ha demostrado tener un mejor poder predictivo del pronóstico y de la evolución de la enfermedad (Allenspach *et al.*, 2007).

Los resultados para el índice CIBDAI mostraron un grado de enfermedad moderada para nuestros perros con EICI ($7,61 \pm 3,83$), y grave en el caso del índice CIBDAISI ($10,17 \pm 4,84$) y el índice CCECAI ($8,83 \pm 4,21$). Dentro de las enteropatías crónicas, diversos estudios han determinado que los perros que responden a tratamiento dietético y/o antibiótico presentan una menor gravedad clínica y una menor puntuación en dichos índices que aquellos con confirmación histopatológica de la EICI que requieren tratamiento inmunosupresor, siendo los perros con hipoproteinemia asociada los que tienen mayores puntuaciones en los mismos (Allenspach *et al.*, 2007; Gaschen *et al.*, 2008; Allenspach *et al.*, 2016; Kalenyak *et al.*, 2019; Wennogle *et al.*, 2019a). En el caso de nuestros perros, todos ellos requirieron tratamiento inmunosupresor tras la falta de respuesta al ensayo dietético y la confirmación histopatológica de la enfermedad, y el 25% presentaron hipoproteinemia. Además, reforzando lo descrito previamente, los 10 perros de nuestro grupo de perros enfermos que requirieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la realización de la endoscopia presentaron mayores puntuaciones en los tres índices clínicos que los perros que no lo recibieron, siendo estas diferencias estadísticamente significativas para el índice CCECAI.

La gravedad clínica reflejada por los índices empleados supera a la de algunos estudios en los que no se incluyeron perros con enteropatía perdedora de proteínas o separaron a los perros con hipoproteinemia en un grupo aparte (Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007; Heilmann *et al.*, 2018). En el caso del índice CCECAI, nuestros resultados son más semejantes a lo descrito en la bibliografía, estudiando algunos trabajos únicamente perros con EICI e hipoproteinemia (Kathrani *et al.*, 2019; Wennogle *et al.*, 2019a; Benvenuti *et al.*, 2020). Dado que todos los perros con EICI de nuestro estudio presentaban afección duodenal, al incorporar parámetros específicos de alteraciones del intestino delgado del índice CIBDAISI, la clasificación de la enfermedad de nuestro grupo fue grave, del mismo modo que en el índice CCECAI al incorporar la valoración de los niveles de albúmina, la presencia de ascitis o edemas periféricos y la presencia de prurito, destacando que el 47,22% de los perros con EICI presentaron este último signo clínico mencionado.

En un reciente trabajo en el que se han comparado los resultados entre el índice CIBDAI y el índice CCECAI, se encontraron idénticas clasificaciones de la enfermedad en el 83% de los perros (Allenspach *et al.*, 2019), lo que difiere del $66,67 \pm 11,71\%$ de coincidencia entre las clasificaciones de ambos índices observadas en nuestro trabajo. Esto puede ser debido al elevado

porcentaje de perros que presentaron prurito en nuestro grupo con EICI, ya que su porcentaje de perros con hipoalbuminemia (17%) fue prácticamente idéntico al nuestro (16,67%).

Basándonos en los resultados encontrados y la capacidad descrita del índice CCECAI para predecir una evolución negativa de la enfermedad (Allenspach *et al.*, 2007) se puede sugerir que dicho índice es el que más información aporta en la valoración clínica de la EICI canina, sobre todo cuando tenemos animales con enteropatía perdedora de proteínas.

6.1.5. Evaluación endoscópica

A diferencia de la EICI humana, hasta hace una década en medicina veterinaria no existían unos criterios de evaluación establecidos para la valoración de la imagen macroscópica del tracto gastrointestinal de los perros con EICI. A pesar de la publicación de unos índices de graduación de las lesiones endoscópicas para la EICI canina por parte del grupo de expertos en gastroenterología de pequeños animales de la WSAVA y por Slovak y colaboradores, incluyendo las lesiones más frecuentemente observadas en esta enfermedad (Washabau *et al.*, 2010; Slovak *et al.*, 2015), su uso actual sigue siendo muy limitado. Esto puede ser debido a las numerosas observaciones de la ausencia de correlación entre la imagen endoscópica, histopatológica y la actividad clínica de la enfermedad en la especie canina y a la inespecificidad de las lesiones evaluadas, las cuales también son hallazgos frecuentes de otras patologías gastrointestinales (Jergens *et al.*, 1992b; Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007; Burgener *et al.*, 2008; Hall, 2013a; Nagata *et al.*, 2020).

En la evaluación endoscópica del tracto gastrointestinal la subjetividad de la valoración y la existencia de diferencias en el grado de experiencia del endoscopista dan lugar a muchas discrepancias (Slovak *et al.*, 2014), si bien en nuestro estudio, los endoscopistas que realizaron la evaluación eran todos de contrastada experiencia y llevan a cabo un trabajo en equipo desde hace años, lo que garantiza la aplicación de unos criterios uniformes. Por ello, para la evaluación endoscópica de los perros de este estudio, decidimos emplear tanto el índice propuesto por el grupo de expertos en gastroenterología de pequeños animales de la WSAVA (Washabau *et al.*, 2010), como el índice simplificado de Slovak y colaboradores, en el cual se evalúan solo aquellos parámetros que evitan la discordancia debida a la experiencia del endoscopista y de este modo mejorar la objetividad de la evaluación (Slovak *et al.*, 2015).

A pesar de que la apariencia endoscópica de mucosas gastrointestinales normales en perros no incluye la presencia de ninguna de las lesiones evaluadas en los índices de valoración macroscópica empleados (Chamness, 2013), algunos estudios reflejan la dificultad de encontrar

mucosas totalmente sanas en animales sin patologías digestivas (Yamasaki *et al.*, 1996; García-Sancho *et al.*, 2007). En estos trabajos, coincidiendo con los resultados obtenidos en la evaluación endoscópica de nuestro grupo de perros sanos (tablas 20 y 21), se describieron ciertas lesiones a nivel gástrico y duodenal, si bien estas lesiones pueden ser consideradas leves en comparación con las observadas en animales con enfermedades digestivas (Yamasaki *et al.*, 1996; García-Sancho *et al.*, 2007). El hecho de encontrar estas lesiones leves en perros sin enfermedad digestiva podría ser consecuencia de la ingesta de objetos ajenos a la dieta del animal o de errores en la dieta.

En nuestro trabajo, a nivel esofágico encontramos lesiones en el 44,44% de los perros con EICI, siendo la incompetencia del esfínter gastroesofágico (22,23%), las alteraciones en la coloración de la mucosa (19,45%) y la hiperemia (13,89%) las más frecuentes (tabla 36). La ausencia de estudios que describan las lesiones esofágicas observadas endoscópicamente en perros con EICI no nos permite establecer comparaciones. La causa de estas lesiones podría estar justificada por los vómitos crónicos presentes en un elevado número de nuestros animales (55,56%). No obstante, el sumatorio de las lesiones esofágicas en nuestros perros enfermos fue $1,39 \pm 2,16$ (rango 0-9), por lo que podemos considerar una baja gravedad de las mismas. Además, no encontramos diferencias significativas para las lesiones esofágicas entre ambos grupos de estudio.

A nivel gástrico, mediante el empleo del índice de la WSAVA encontramos lesiones macroscópicas en el 100% de los animales con EICI, discrepando ligeramente con el índice de Slovak y colaboradores, en el que dos perros no presentaron ninguna lesión. Este hecho puede deberse al mayor número de parámetros que son evaluados con el índice de la WSAVA en comparación con el de Slovak y colaboradores. Nuestros resultados coinciden con lo descrito previamente por nuestro grupo de trabajo, mostrando porcentajes de lesión gástrica en perros con EICI del 84-100% (García-Sancho *et al.*, 2005a; García-Sancho *et al.*, 2007), y difieren con otros autores que encontraron una frecuencia de presentación de lesiones a nivel del estómago del 25-52% (Jergens *et al.*, 1992b; Yamasaki *et al.*, 1996). Sin embargo, son muy escasos los trabajos que detallen las alteraciones macroscópicas gástricas en perros con EICI. Las lesiones más frecuentemente observadas empleando el índice de la WSAVA en este trabajo de investigación fueron la hiperemia (97,21%), las alteraciones en la coloración de la mucosa (63,89%) y la presencia de contenido anormal (63,89%), mientras que con el índice de Slovak y colaboradores fueron la irregularidad de la mucosa (88,89%) y la presencia de erosiones (33,33%) (tablas 36 y 37). La alta frecuencia de presentación de la hiperemia, las alteraciones en la coloración y la irregularidad de la mucosa gástrica coinciden con lo observado previamente por nuestro grupo de investigación (García-Sancho *et al.*, 2007). En cuanto a la presencia de erosiones, tan solo hay un trabajo en el que se describe la presencia de estas lesiones gástricas en siete casos de perros con

EICI (Jergens *et al.*, 1992a). Respecto al sumatorio de estas lesiones, en nuestro caso fue $6,75 \pm 2,94$ (rango 2-15) empleando el índice de la WSAVA, valor muy superior al descrito en un reciente estudio con 31 perros con EICI con hipoproteinemia (Salavati Schmitz *et al.*, 2019). Esta diferencia puede ser debida a diferencias poblacionales entre estudios o a la subjetividad de la valoración endoscópica, hecho por el cual se decidió utilizar también el índice simplificado de Slovak y colaboradores. No obstante, la ausencia de más trabajos empleando tanto el índice de la WSAVA como el de Slovak y colaboradores para la valoración de las lesiones macroscópicas del estómago en perros con EICI dificulta realizar más comparaciones. La presencia de lesiones a nivel gástrico en perros con EICI que afecta al intestino delgado en concreto sigue siendo motivo de debate. Algunos autores consideran que son la consecuencia de la extensión del proceso inflamatorio a este área (Hall, 2013a; Simpson, 2013), mientras que otros afirman que son resultado del reflujo duodenogástrico que aparece frecuentemente en esta enfermedad (Rodríguez-Franco *et al.*, 1997).

En cuanto a la mucosa duodenal, coincidiendo con algunos autores (García-Sancho *et al.*, 2007; Nagata *et al.*, 2020) observamos lesiones macroscópicas en el 100% de los perros, en mayor o menor intensidad, tanto con el índice de la WSAVA como con el índice simplificado de Slovak y colaboradores (tablas 36 y 37). Este hecho se encuentra dentro de lo esperado, ya que estas lesiones podrían ser/parecen ser el reflejo del proceso inflamatorio que alberga esta localización gastrointestinal. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que se han descrito en la literatura perros diagnosticados de esta enfermedad en los que no se han hallado lesiones endoscópicas (Jergens *et al.*, 2003; Allenspach *et al.*, 2007; Salavati Schmitz *et al.*, 2019), por lo que la ausencia de estas lesiones no debe interpretarse como ausencia de enfermedad. Las lesiones duodenales más frecuentes en nuestro estudio fueron las alteraciones en la coloración de la mucosa, la irregularidad de la mucosa y la hiperemia con el índice de la WSAVA y la irregularidad de la mucosa y la friabilidad de la misma con el índice de Slovak y colaboradores. Aunque en la mayoría de los trabajos no se detallan las frecuencias exactas de presentación de cada parámetro evaluado, nuestras lesiones más frecuentes coinciden con las más habitualmente descritas en el duodeno de los perros con EICI (Jergens *et al.*, 2003; Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Respecto al sumatorio de las lesiones a nivel duodenal con el índice de valoración endoscópica de la WSAVA, $9,28 \pm 3,97$ (rango 2-18), observamos una puntuación mayor que la descrita recientemente por Salavati y colaboradores para perros con EICI e hipoproteinemia, de 7 (rango 0-20) (Salavati Schmitz *et al.*, 2019). Nuevamente consideramos que esta diferencia puede ser consecuencia de diferencias entre poblaciones o de la subjetividad que acompaña a la valoración endoscópica previamente descrita (Slovak *et al.*, 2014). Por ello, en nuestro estudio se decidió emplear además el índice simplificado propuesto por Slovak y

colaboradores para minimizar al máximo posible esta limitación, obteniendo unos resultados a nivel duodenal con el índice cualitativo ($2,06 \pm 0,71$, rango 1-3) mucho más semejantes a los descritos en un reciente estudio en perros con EICI que requirieron tratamiento inmunosupresor ($1,5$, rango 1-3) (Nagata *et al.*, 2020).

En el estudio comparativo entre las lesiones endoscópicas gástricas y duodenales entre ambos grupos de estudio encontramos que, aunque tanto perros sanos como enfermos potencialmente pueden presentar este tipo de lesiones, el sumatorio de las mismas en ambas localizaciones digestivas con los dos índices empleados fue significativamente mayor en el grupo de perros con EICI (tabla 53). Este hallazgo era previsible, ya que parece más probable que un animal con signos clínicos de enfermedad gastrointestinal presente lesiones endoscópicas gástricas y duodenales más graves que un perro sano (Yamasaki *et al.*, 1996; García-Sancho *et al.*, 2007). Por otro lado, estos resultados refuerzan la importancia de los índices endoscópicos, más allá de un signo endoscópico específico, a la hora de diferenciar perros sanos de perros con EICI.

6.1.6. Evaluación histopatológica

Del mismo modo que a nivel endoscópico, para la evaluación de las biopsias gastrointestinales de los perros de este trabajo se emplearon los índices de valoración de lesiones histopatológicas para perros con EICI propuestos por grupos expertos en la materia (Washabau *et al.*, 2010; Allenspach *et al.*, 2019).

Como ya se comentó en la sección de “Revisión bibliográfica” de esta tesis doctoral, la interpretación histológica de las biopsias endoscópicas no es sencilla y está fuertemente influenciada por la calidad de las mismas, su procesado y la subjetividad individual del patólogo (Willard *et al.*, 2001; Willard *et al.*, 2002; Willard *et al.*, 2008; Willard *et al.*, 2010). En este estudio cinco muestras gástricas y una duodenal no presentaron la calidad adecuada para su evaluación. En este sentido, es interesante destacar que en estudios previos, un grupo de trabajo evaluó un elevado número de biopsias gástricas y duodenales tanto de perros sanos como de perros con cuadros digestivos (de 501 y 400 perros, respectivamente), observando que la calidad de las mismas impidió la evaluación del 11% de las biopsias gástricas y del 22,6% de las duodenales (van der Gaag, 1988; van der Gaag y Happé, 1990). En nuestro caso, el porcentaje de biopsias gástricas que no pudieron ser evaluadas fue ligeramente menor (9,62%), y muy inferior en el caso de las muestras duodenales (1,92%).

Un bajo número de trabajos han evaluado histológicamente biopsias gástricas e intestinales en perros sanos, describiendo variaciones importantes tanto en las características morfológicas como celulares de las muestras entre los distintos animales, lo que dificulta el establecimiento de unos criterios de clasificación claros (Hart y Kidder, 1978; van der Gaag, 1988; van der Gaag y Happé, 1990; German *et al.*, 1999a). De acuerdo con estudios previos (Yamasaki *et al.*, 1996; García-Sancho *et al.*, 2007), a pesar de que los animales de nuestro grupo control no mostraban signos clínicos, se detectaron ciertas alteraciones histopatológicas, destacando el aumento de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia duodenal y la atrofia de las vellosidades duodenales (tablas 23 y 24), si bien la mayoría de los perros recibieron una graduación leve de las mismas. Concretamente estas lesiones son consideradas por expertos en la materia como los parámetros de mayor subjetividad y dificultad de evaluación (Willard y Mansell, 2011). En el caso de los linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia duodenal, fisiológicamente pueden llegar a ocupar hasta el 20% del área, por lo que apreciar ligeros aumentos de estas células resulta muy complejo (German *et al.*, 1999a; Willard y Mansell, 2011). De hecho, como ya hemos señalado, nueve de los perros de nuestro grupo control presentaron un aumento leve del número de estas células en la lámina propia duodenal.

En este trabajo, decidimos emplear no solo el índice de valoración histopatológica de biopsias gastrointestinales propuesto por el grupo de expertos en gastroenterología de la WSAVA (Day *et al.*, 2008; Washabau *et al.*, 2010), sino también el índice simplificado propuesto por Allenspach y colaboradores. Este último parece limitar en cierta medida la subjetividad debida al patólogo al eliminar aquellos parámetros del propuesto por la WSAVA que mostraban mayores discrepancias, además de que parece mostrar una mayor correlación con el estado clínico de los animales. (Allenspach *et al.*, 2019).

En referencia a los perros con EICI, la evaluación de las biopsias gástricas reveló la presencia de lesiones de mayor o menor gravedad en todos los animales de nuestro grupo. Estos resultados coinciden con lo observado previamente por nuestro equipo de trabajo (García-Sancho *et al.*, 2007). No obstante, hay autores que describen la existencia de perros con EICI sin lesiones a nivel del estómago (Jergens *et al.*, 2003; Heilmann *et al.*, 2019; Salavati Schmitz *et al.*, 2019). A pesar de que el estudio histopatológico del estómago en perros con EICI forma parte de los índices propuestos por los grupos de expertos en la materia (Washabau *et al.*, 2010; Jergens *et al.*, 2014b; Allenspach *et al.*, 2019), son pocos los estudios que hasta el momento reflejan esta valoración. En nuestro caso, las lesiones histológicas más frecuentemente observadas a este nivel fueron la presencia de infiltrado inflamatorio de linfocitos y células plasmáticas (100%) y la fibrosis de la mucosa (91,66%) (tablas 40 y 41), coincidiendo con descripciones previas (García-Sancho *et al.*, 2007; Jergens *et al.*, 2014b; Allenspach *et al.*, 2019). Cabe destacar nuevamente la

dificultad de la cuantificación del infiltrado inflamatorio, motivo por el cual algunos autores consideran como fiables y representativos infiltrados inflamatorios moderados o graves (Tams, 2003), encontrando en nuestro caso en concreto que el 66,67% de los perros con EICI presentaron esta graduación inflamatoria a nivel gástrico, mientras que en los restantes fue considerada leve. Por su parte, la elevada frecuencia de presentación de fibrosis de la mucosa a este nivel puede ser consecuencia de la respuesta inflamatoria exacerbada que tiene lugar, cuyos productos ocasionarían la proliferación fibroblástica (Lyons y Moses, 1990; Rodríguez-Franco *et al.*, 1997; Simpson, 2013). Sin embargo, la presencia de fibrosis gástrica ha sido descrita en un trabajo en 128 de 482 perros con vómitos sin estar asociada a un proceso inflamatorio y en cinco de los 19 perros sanos del mismo estudio (van der Gaag, 1988). Por ello, algunos autores consideran que este parámetro debe ser evaluado con cautela y comprobar su concurrencia con otras lesiones, como inflamación y atrofia glandular, para ser considerado patológico (Wilcock, 2013). Respecto al sumatorio de los parámetros evaluados a nivel gástrico empleando el índice propuesto por el grupo de expertos de la WSAVA (Day *et al.*, 2008; Washabau *et al.*, 2010), nuestros resultados en esta localización, $4,22 \pm 2,07$, difieren de lo observado por Salavati y colaboradores, cuya graduación media de la lesiones gástricas en los 84 perros con EICI de su estudio con dicho índice fue de 2 (Salavati Schmitz *et al.*, 2019). No obstante, observamos una mayor semejanza en nuestros resultados con lo descrito por Heilmann y colaboradores en 2019, que describieron que en 9 de los 21 perros evaluados las lesiones gástricas recibieron una graduación moderada o grave (Heilmann *et al.*, 2019). Estas discrepancias pueden ser debidas a la influencia del observador, como ya se ha comentado (Willard *et al.*, 2010). Con el empleo del índice simplificado propuesto por Allenspach y colaboradores obtuvimos un valor medio de lesiones gástricas de $3,22 \pm 1,12$ (rango 1-5), pudiendo considerar la existencia de una lesión moderada en nuestros perros con EICI en esta localización. Sin embargo, dada su reciente publicación, no se dispone de trabajos en la literatura que permitan realizar una comparación con nuestros resultados.

A nivel duodenal encontramos lesiones en los 36 perros con EICI de nuestro estudio, como no puede ser de otro modo, ya que la presencia de un infiltrado inflamatorio en la lámina propia duodenal es el hallazgo que determina el diagnóstico de la enfermedad (Day *et al.*, 2008; Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Resulta interesante valorar las lesiones duodenales desde el punto de vista morfológico e inflamatorio por separado, ya que, al tratarse de una enfermedad que se localiza en el intestino, encontraremos un mayor número de alteraciones en esta localización que deben evaluarse de forma detallada. En cuanto a las lesiones morfológicas, las más frecuentes fueron la dilatación de las criptas y las dilataciones linfáticas (97,22% ambas) y la atrofia de las vellosidades y la fibrosis de la mucosa (94,44% ambas), destacando que la atrofia de las vellosidades fue graduada como moderada o grave en todos los perros que la presentaban (tablas 40 y 41). En la literatura existe mucha variabilidad en cuanto a la frecuencia de presentación de

estas lesiones. Por ejemplo, en el caso de la presencia de dilataciones linfáticas, encontramos resultados semejantes a los nuestros (García-Sancho *et al.*, 2007) y otros con menor porcentaje de presentación (19-74%) (Kathrani *et al.*, 2019; Nagata *et al.*, 2020). Esto, según algunos autores, es consecuencia de la falta de acuerdo en la valoración de muchos de los parámetros histopatológicos propuestos para los perros con EICI entre los distintos patólogos, destacando en concreto la discordancia en la valoración de las dilataciones linfáticas y de las criptas y la atrofia de las vellosidades (Willard *et al.*, 2010; Willard y Mansell, 2011). Respecto a las lesiones inflamatorias, cabe mencionar que todos los perros con EICI de nuestro estudio presentaron un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia moderado o grave (tablas 40 y 41), existiendo también mucha variabilidad de resultados en la literatura consultada. No obstante, dada la dificultad de discernir entre infiltrados leves y normales (Willard y Mansell, 2011), podemos asegurar que nuestros perros no presentaban un número normal de estos tipos celulares en su lámina propia. La presencia de linfocitos intraepiteliales fue descrita en el 88,89% de los perros y, dentro de ellos, fue considerada moderada o grave en el 50%. Sin embargo, debido a que no existe uniformidad en cuanto al número de linfocitos considerado normal en el intestino de la especie canina, a su distribución variable a lo largo de los diferentes tramos intestinales y a la discrepancia en su valoración entre los distintos patólogos (van der Gaag y Happé, 1990; German *et al.*, 1999a; Sonea *et al.*, 2000; German *et al.*, 2001; Willard *et al.*, 2010; Willard y Mansell, 2011), algunos autores no consideran útil su evaluación para la valoración histopatológica de la EICI en el perro (Jergens *et al.*, 2014b; Allenspach *et al.*, 2019). Respecto al sumatorio de los parámetros empleando el índice de la WSAVA, nuevamente no son muchos los trabajos que exponen un número global, pero con aquellos estudios con los que se ha podido establecer comparaciones, observamos que nuestros resultados globales a nivel de duodeno ($12,61 \pm 3,26$ rango 5-20) son superiores a los descritos por Salavati Schmitz y colaboradores ($7,1 \pm 3,2$) (Salavati Schmitz *et al.*, 2019), pero prácticamente iguales a nivel inflamatorio y en el cómputo global a los descritos por Wennogle y colaboradores en sus 25 perros con EICI (5 rango 2-8 y 11 rango 5-18, respectivamente) (Wennogle *et al.*, 2019a). Por otro lado, del mismo modo que a nivel gástrico, la ausencia de estudios empleando el índice simplificado de Allenspach y colaboradores no nos permite por el momento comparar nuestros resultados.

En cuanto a la comparación de las lesiones histopatológicas entre ambos grupos de animales observamos que el sumatorio de las lesiones duodenales resultó estadísticamente mayor en los perros con EICI respecto a los perros sanos (tabla 56). Por el contrario, a nivel gástrico, si bien ciertos parámetros sí que resultaron estadísticamente más graves en el grupo de perros con EICI, concretamente el infiltrado de linfocitos y células plasmáticas y de neutrófilos (tablas 54 y 55), el resto de parámetros fueron semejantes entre ambos grupos. Como ya se mencionó, en la

literatura son pocos los estudios que comparen las lesiones histopatológicas gástricas entre perros sanos y perros con EICI. Nuestros resultados difieren de lo descrito previamente por nuestro grupo de trabajo, ya que, en el estudio de García-Sancho y colaboradores de 2007, sí que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las lesiones histopatológicas del estómago de perros con EICI y de perros sanos (García-Sancho *et al.*, 2007). Esto puede ser debido a diferencias en las características de las poblaciones caninas estudiadas, pero más probablemente será el resultado de diferencias metodológicas, ya que cuando se realizó el estudio de 2007 no existía una estandarización de los índices de valoración histopatológica, por lo que los parámetros evaluados, aunque la mayoría semejantes, no fueron los mismos que en este trabajo. Por otro lado, es interesante destacar la ausencia de diferencias entre ambos grupos de perros de este estudio para el parámetro fibrosis gástrica, coincidiendo con otros autores y resaltando, como ya se ha discutido previamente, la inespecificidad del mismo (Yamasaki *et al.*, 1996; Wilcock, 2013). A nivel duodenal por el contrario, todos los parámetros evaluados con los dos índices empleados resultaron significativamente mayores en los perros con EICI (tablas 54 y 55), salvo la fibrosis evaluada con el índice de la WSAVA, recalando nuevamente la inespecificidad de este parámetro (Wilcock, 2013). Esto, por lo tanto, supuso la identificación de diferencias en los sumatorios de los parámetros duodenales (tabla 56). En la misma línea que nuestra consideración referente a la imagen endoscópica, es de esperar que las lesiones histológicas sean mayores en perros con una patología localizada concretamente a nivel duodenal, coincidiendo con estudios previos (García-Sancho *et al.*, 2007).

A pesar de los múltiples esfuerzos de diversos grupos de investigación en intentar desarrollar unos índices de actividad clínica, endoscópica e histopatológica para la EICI canina que permitan relacionar la gravedad clínica de los animales con las imágenes macroscópicas e histopatológicas, intentando eliminar la posible subjetividad de las interpretaciones individuales, parece que hasta la fecha estas tres valoraciones, la clínica, la endoscópica y la histopatológica se comportan de manera individual en esta enfermedad en el perro (Yamasaki *et al.*, 1996; German *et al.*, 2001; Jergens *et al.*, 2003; Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007; Burgener *et al.*, 2008; Procoli *et al.*, 2013; Nagata *et al.*, 2020). Así, coincidiendo con los autores previamente mencionados, no encontramos asociaciones estadísticamente significativas entre la gravedad clínica de los perros con EICI de nuestro estudio y las imágenes endoscópicas e histopatológicas valoradas con la mayoría de los índices propuestos por los grupos de expertos en la materia (Jergens *et al.*, 2003; Rodríguez-Franco *et al.*, 2004; Allenspach *et al.*, 2007; Day *et al.*, 2008; Washabau *et al.*, 2010; Slovak *et al.*, 2015; Allenspach *et al.*, 2019). Tan solo encontramos una asociación positiva entre la gravedad clínica evaluada con los índices CIBDAI y CIBDAISI y las lesiones macroscópicas a nivel duodenal evaluadas con el índice endoscópico cuantitativo propuesto por Slovak y colaboradores, es decir, a mayor gravedad clínica evaluada con estos dos

índices clínicos, mayor puntuación de las lesiones macroscópicas duodenales (Slovak *et al.*, 2015). Este hallazgo puede apoyar la hipótesis de la influencia de la subjetividad del endoscopista en la valoración de la imagen macroscópica gastrointestinal y validar la utilidad de este índice endoscópico simplificado. Sin embargo, al tratarse del primer trabajo que describe tal asociación y el hecho de que no hayamos encontrado el mismo resultado con el índice cualitativo que aparentemente tiene la misma validez (Slovak *et al.*, 2015), hace necesaria la realización de más trabajos al respecto.

Al evaluar específicamente los perros que recibieron tratamiento inmunosupresor, éstos presentaron una graduación clínica con el índice CCECAI y un sumatorio de las lesiones endoscópicas gástricas mediante el empleo del índice de la WSAVA significativamente mayores que los perros con EICI que no lo recibieron, si bien tampoco se encontraron asociaciones en estos perros en concreto entre el índice clínico CCECAI y los resultados endoscópicos e histopatológicos, y entre los índices clínicos y la imagen endoscópica gástrica evaluada con el índice de la WSAVA considerando el grupo de perros con EICI de forma global y evaluando de forma separada estos 10 animales que recibieron tratamiento inmunosupresor. En estos 10 perros, también se observó un sumatorio de los parámetros inflamatorios y globales duodenales evaluados con el índice histopatológico de la WSAVA y de los parámetros duodenales evaluados con el índice histopatológico de Allenspach y colaboradores significativamente mayores que los perros con EICI que no recibieron tratamiento, pero tampoco se encontraron asociaciones entre los índices clínicos de estos 10 perros y la imagen histopatológica. Se ha sugerido que el índice simplificado propuesto por Allenspach y colaboradores podría resultar especialmente útil por la existencia de una asociación entre el mismo y la gravedad clínica evaluada tanto con el índice clínico CIBDAI como con el CCECAI (Allenspach *et al.*, 2019) y, sin embargo, nuestro estudio no ha mostrado esta asociación estadística. Estas diferencias pueden deberse, al menos parcialmente, a diferencias en la población canina estudiada. Por tanto, son necesarios nuevos trabajos de investigación evaluando este índice.

6.2. PUESTA A PUNTO DE LOS PROTOCOLOS DE AISLAMIENTO DE LINFOCITOS DEL EPITELIO Y DE LA LÁMINA PROPIA DUODENAL

Las poblaciones linfocitarias emplazadas en el epitelio y en la lámina propia duodenal están constituidas por distintos tipos celulares con propiedades, fenotipos y funciones diferentes (German *et al.*, 1999a; Maynard y Weaver, 2009). Este hecho hace que su estudio independiente sea crucial para la correcta comprensión de la inmunidad gastrointestinal. Para la especie canina no hay descripciones en la literatura que evalúen las poblaciones linfocitarias de ambas localizaciones efectoras intestinales de forma simultánea mediante citometría de flujo. Por ello, inicialmente fue necesario poner a punto los protocolos de aislamiento para los linfocitos tanto intraepiteliales como los localizados en la lámina propia duodenal en biopsias endoscópicas de perro.

El objetivo de estos protocolos de aislamiento para el estudio de los linfocitos por citometría de flujo es la obtención de un buen rendimiento celular y pureza con las mínimas alteraciones fenotípicas y funcionales de estas células. Así, para el aislamiento de los linfocitos intraepiteliales se compararon tres protocolos basados en el empleo de los quelantes iónicos DTT y EDTA. Estos compuestos bloquean los canales iónicos celulares, lo que, favorecido por la agitación mecánica y temperaturas elevadas (24-37°C), permite el desprendimiento epitelial (Santaolalla *et al.*, 2011; Carrasco *et al.*, 2013). Los tres protocolos evaluados en este trabajo, denominados “suave, intenso y muy intenso” se diferencian en la aplicación de diferentes temperaturas y velocidades de agitación junto con la misma concentración de DTT y EDTA (tabla 7). Todos ellos, de acuerdo a lo observado previamente por distintos autores (Howard *et al.*, 2005; Carrasco *et al.*, 2013; Haas *et al.*, 2014), mostraron una buena viabilidad linfocitaria para su estudio por citometría de flujo (tabla 59). Sin embargo, el protocolo denominado “muy intenso”, en el cual se empleaba una mayor velocidad de agitación y un mayor tiempo de actuación de los quelantes iónicos, ofreció la mayor capacidad de desprendimiento epitelial observada histológicamente (imagen 8) que aseguraba una buena separación de ambas poblaciones linfocitarias sin dañar la lámina propia duodenal. Por ello, dicho protocolo fue el seleccionado en este trabajo para el aislamiento de los linfocitos intraepiteliales de las biopsias duodenales. Además, el protocolo “muy intenso”, cumpliendo con los objetivos requeridos para el estudio linfocitario por citometría de flujo, permitió obtener 10.000 eventos en la región de linfocitos, siendo el 87,18±8,35% positivos para la molécula de superficie CD45, presente en todos los leucocitos, mostrando así una buena pureza y rendimiento celular.

En cuanto al aislamiento de los linfocitos de la lámina propia, nuestro trabajo constituye la primera descripción de esta técnica para muestras de intestino delgado en el perro. Este aislamiento resultó más complejo en comparación con el aislamiento de los linfocitos del epitelio duodenal, de acuerdo con lo observado por Howard y colaboradores, los cuales también tuvieron que realizar diversas modificaciones de dicho protocolo durante su estudio para poder llevar a cabo el análisis de los LPL en la especie felina (Howard *et al.*, 2005). De los seis protocolos evaluados, el método basado en la utilización de cultivo fue el que aportó una mayor viabilidad linfocitaria (tabla 60) y un buen rendimiento celular para su estudio por citometría de flujo. Sin embargo, a pesar de que en un principio consideramos que las muestras de duodeno podrían tener una menor tasa de contaminación bacteriana en comparación con lo observado por Carrasco y colaboradores en las muestras de colon humano (Carrasco *et al.*, 2013), la alta frecuencia de presentación de este suceso hizo necesario descartar este método de aislamiento. En cuanto al empleo de métodos enzimáticos para conseguir la rotura del colágeno de la lámina propia y la liberación de los linfocitos al medio, algunos autores señalan el daño ejercido por estas sustancias sobre la viabilidad celular y sobre el marcador CD4 (Howard *et al.*, 2005; Carrasco *et al.*, 2013). En nuestro estudio, empleamos la colagenasa II basándonos en los resultados obtenidos por Barbosa y colaboradores en muestras de colon de perro (Barbosa, 2011), utilizando además la concentración de dicha enzima y condiciones de incubación y agitación recomendadas en su trabajo (método “enzimático 1”) y una modificación de dichas condiciones (método “enzimático 2”). Sin embargo, la baja viabilidad celular observada tras la aplicación de dichos protocolos (tabla 60) impidió su utilización. Por su parte, en el método “enzimático 3” empleamos las condiciones de incubación y agitación de las biopsias propuestas en el trabajo de Howard y colaboradores para duodeno de gato pero incorporando colagenasa II en lugar de dispasa II al tratarse de muestras de perro, observando en este caso una marcada disminución de los linfocitos positivos a CD4 como consecuencia del daño ejercido por la concentración enzimática sobre la molécula de superficie CD4 (imagen 9) (Howard *et al.*, 2005; Carrasco *et al.*, 2013). Finalmente, el método “enzimático 4” evaluado consistió en la utilización de una baja concentración enzimática durante un largo periodo de tiempo (16 horas y media), observando del mismo modo que Carrasco y colaboradores una ausencia de alteración fenotípica en función de la expresión de la molécula CD4 (imagen 9) (Carrasco *et al.*, 2013). No obstante, finalmente el protocolo seleccionado para el aislamiento de los linfocitos de la lámina propia en nuestro estudio fue el método “mecánico” propuesto del mismo modo por Carrasco y colaboradores para muestras de colon humano, consistente en la liberación linfocitaria al medio como consecuencia de la rotura del colágeno de la lámina propia debida únicamente a la agitación y golpeo de las biopsias con el recipiente que las contiene (Carrasco *et al.*, 2013). Este protocolo mostró una viabilidad superior al “enzimático 4” (tabla 60), permitió obtener 10.000 eventos en la región de linfocitos con una

Discusión

pureza determinada por la expresión de CD45 del $89,68 \pm 8,35\%$, no se evidenció daño de la molécula de superficie CD4 (imagen 9), permitiéndonos evaluar las poblaciones linfocitarias de interés sin alteraciones fenotípicas ni funcionales, y evitó el uso de compuestos enzimáticos.

6.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES DEL INMUNOFENOTIPO EN LA EICI CANINA

El estudio del inmunofenotipo mediante citometría de flujo permite caracterizar las distintas células del sistema inmunitario gracias al empleo de anticuerpos monoclonales específicos, y analizar así el impacto de las enfermedades sobre dicho sistema, así como su implicación en ellas (Bleesing y Fleisher, 2001; Adan *et al.*, 2017). Dados los grandes avances en el conocimiento de la inmunopatogenia de la EICI en el hombre, que han derivado en el descubrimiento de nuevos tratamientos y biomarcadores inmunitarios de utilidad (Reinglas *et al.*, 2018; Smids *et al.*, 2018), y el desarrollo cada vez mayor de la citometría de flujo en medicina veterinaria con la comercialización de nuevos anticuerpos (Pantelyushin *et al.*, 2020), el estudio mediante esta técnica laboratorial de las poblaciones de linfocitos detalladas previamente en perros con EICI resulta de gran interés.

Como puede observarse en la sección de “Resultados” de esta tesis doctoral, en la interpretación de los resultados del inmunofenotipo que se discutirán a continuación, deben tenerse en cuenta las elevadas desviaciones encontradas en muchas de las poblaciones linfocitarias analizadas, lo que sugiere una gran variabilidad individual del inmunofenotipo, tal y como ya se ha descrito previamente en la bibliografía tanto en animales sanos como en animales con diferentes enfermedades (Haas *et al.*, 2014; Villaescusa *et al.*, 2015; Hauck *et al.*, 2016; Galler *et al.*, 2017; Rautenbach *et al.*, 2017).

6.3.1. Caracterización de las alteraciones del inmunofenotipo sanguíneo en la EICI canina

Mientras que en medicina humana la citometría de flujo se emplea en muchos laboratorios de análisis clínicos de forma rutinaria, habiéndose establecido una metodología clara y unos criterios de estandarización para las diversas poblaciones celulares (Keeney *et al.*, 2004; Jaye *et al.*, 2012), en medicina veterinaria la aplicación de esta técnica ha sido más limitada. No fue hasta 1994, momento en el que se identificaron las moléculas CD en la especie canina (Cobbold y Metcalfe, 1994), que empezaron a desarrollarse anticuerpos monoclonales específicos para el perro. En la actualidad, gracias a la cada vez más amplia batería de anticuerpos monoclonales existentes frente a diversos antígenos caninos y a los prometedores resultados que el empleo de la citometría de flujo está generando en el campo de la hematología y la oncología veterinarias (Weiss, 2002; Reggeti y Bienzle, 2011), su uso es cada vez más frecuente y preciso.

Concretamente en el inmunofenotipaje linfocitario, a pesar de que son numerosos los estudios que han tratado de describir protocolos y establecer unos valores de referencia para las diferentes subpoblaciones linfocitarias sanguíneas en perros sanos (Byrne *et al.*, 2000; Faldyna *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2005; Pantelyushin *et al.*, 2020), son más numerosos los trabajos en los que se describen los valores del inmunofenotipo obtenidos en un grupo de perros sanos o control únicamente para poder compararlos con los resultados del estudio llevado a cabo en diversas patologías (Biller *et al.*, 2007; Cortese *et al.*, 2013; Villaescusa *et al.*, 2015; Galler *et al.*, 2017; Palatucci *et al.*, 2018). Por ello, ante la ausencia de rangos de referencia y dada la gran influencia de ciertos factores en la citometría de flujo tales como los propios anticuerpos, los fluorocromos empleados o el citómetro (Adan *et al.*, 2017), en nuestro estudio optamos por contar con el inmunofenotipo de un grupo de perros sanos que nos permitiese posteriormente comparar nuestros resultados en perros con EICI.

Como se ha ido detallando a lo largo de esta tesis doctoral, el sistema inmunitario juega un papel crucial en la EICI tanto humana como canina, habiéndose descrito múltiples alteraciones celulares y funcionales (Hall, 2013a; Park *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017; Eissa *et al.*, 2019). A pesar de tratarse de un proceso inflamatorio localizado a nivel gastrointestinal, son muchas las anomalías detectadas en los componentes inmunitarios a nivel sanguíneo en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Sin embargo, en la especie canina estas posibles alteraciones sistémicas son mucho menos conocidas, encontrándose muy pocos estudios en la literatura que aborden esta cuestión y por lo tanto no permitiéndonos establecer comparaciones relevantes. Por ello, abordaremos los cambios observados en el inmunofenotipo de nuestros perros con EICI en comparación con nuestra población de perros sanos. Esto hace necesario comenzar discutiendo los hallazgos del inmunofenotipo sanguíneo en el grupo de perros sanos de este estudio, al haber sido tomados como referencia, para pasar a continuación a evaluar las alteraciones detectadas en los perros con EICI.

Tal y como se describió en el apartado de “Resultados” de la presente memoria, en nuestra población de perros sanos de diferentes razas y edades, se obtuvieron unos valores medios de $87,90 \pm 5,33\%$ de linfocitos T y de 1385 ± 407 de estas células por microlitro de sangre periférica (tabla 57). Los valores porcentuales de esta población en sangre periférica de perros clínicamente sanos es muy variable en la literatura consultada, habiéndose descrito rangos que van del 61,56% al 85,4% (Byrne *et al.*, 2000; Faldyna *et al.*, 2001; Winnicka *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2005; Watabe *et al.*, 2011; Villaescusa *et al.*, 2012b; Platt *et al.*, 2013; Galler *et al.*, 2017), resultando nuestro valor superior al obtenido en la mayoría de los estudios. Sin embargo, los valores porcentuales se encuentran influenciados por los resultados de las demás poblaciones celulares de la muestra (Blount *et al.*, 2005), por lo que resulta recomendable no solo comparar los valores porcentuales sino también los valores absolutos. En

este sentido, nuestro valor absoluto de linfocitos T periféricos se encuentra dentro de los rangos previamente descritos en la bibliografía, que se sitúan entre 1220 y 1869,25 linfocitos T/ μ L (Winnicka *et al.*, 2002; Gauthier *et al.*, 2005; Villaescusa *et al.*, 2012b; Zeigler *et al.*, 2013).

Respecto a la subpoblación de linfocitos Th el valor porcentual medio en nuestro grupo de perros sanos ($43,06 \pm 7,35\%$) fue prácticamente el mismo que el descrito en la mayoría de artículos consultados, situándose el rango entre 34 y 51% (Byrne *et al.*, 2000; Faldyna *et al.*, 2001; Winnicka *et al.*, 2002; Gauthier *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2005; Watabe *et al.*, 2011; Villaescusa *et al.*, 2012b; Platt *et al.*, 2013; Galler *et al.*, 2017; Pantelyushin *et al.*, 2020). No obstante, el valor absoluto, 687 ± 233 linfocitos Th/ μ L, resultó inferior a los rangos descritos por otros autores, de entre 810-1080,14 linfocitos Th/ μ L (Winnicka *et al.*, 2002; Gauthier *et al.*, 2005; Villaescusa *et al.*, 2012b; Zeigler *et al.*, 2013). En relación al rango descrito en la literatura para los linfocitos Tc caninos en sangre periférica, entre 14,3 y 32,08% (Byrne *et al.*, 2000; Faldyna *et al.*, 2001; Winnicka *et al.*, 2002; Gauthier *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2005; Watabe *et al.*, 2011; Villaescusa *et al.*, 2012b; Platt *et al.*, 2013; Galler *et al.*, 2017; Pantelyushin *et al.*, 2020), nuestros resultados para dicha población linfocitaria se encontraron en el límite superior ($29,32 \pm 8,04\%$). A nivel del recuento absoluto de esta población linfocitaria, nuestros resultados (446 ± 145 linfocitos Tc/ μ L) fueron también muy semejantes a lo observado en otros trabajos (440-506 linfocitos Tc/ μ L) (Winnicka *et al.*, 2002; Gauthier *et al.*, 2005; Villaescusa *et al.*, 2012b; Zeigler *et al.*, 2013). Por su parte, el cociente CD4/CD8 ofrece información sobre la relación de las dos subpoblaciones linfocitarias previamente mencionadas (Th y Tc). Nuestro resultado en este caso, $1,61 \pm 0,62$, fue ligeramente inferior al rango previamente identificado en otros estudios, 1,64-2,5 (Byrne *et al.*, 2000; Faldyna *et al.*, 2001; Winnicka *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2003; Villaescusa *et al.*, 2012b).

Todas estas pequeñas diferencias entre nuestros resultados y el resto de estudios, pueden venir dadas por múltiples factores tales como el clon y la fuente de los anticuerpos empleados, la metodología, el citómetro de flujo y/o las características propias de las poblaciones caninas estudiadas.

Los linfocitos T dobles positivos han sido caracterizados en múltiples especies, incluida la especie canina, como una población de linfocitos T maduros extratímicos y circulantes en sangre periférica (Bismarck *et al.*, 2012; von Buttlar *et al.*, 2015). Esta caracterización se llevó a cabo con la comprobación de la expresión simultánea de las moléculas de superficie CD3, CD4 y CD8 y la ausencia de expresión de la molécula CD1a, marcador de timocitos caninos, por parte de esta población linfocitaria (Bismarck *et al.*, 2012). Los linfocitos T dobles positivos caninos se asemejan más en cuanto a frecuencia de presentación en sangre periférica a dicha población en el ser humano ($\sim 2\text{-}3\%$) que a lo observado en otras especies (Parel y Chizzolini, 2004; Bismarck *et al.*, 2012). El rango de estos linfocitos en perros sanos descrito en la literatura se encuentra

entre 0,23% y 2,42% (Xie *et al.*, 2009; Bismarck *et al.*, 2012; Bismarck *et al.*, 2014; von Buttlar *et al.*, 2015; Rothe *et al.*, 2017), encontrándose nuestros resultados ($1,06 \pm 0,55\%$) dentro de dicho rango. Por otro lado, nuestros resultados en valor absoluto fueron 17 ± 11 linfocitos T dobles positivos/ μL , pero la ausencia de esta determinación en la bibliografía disponible nos impide establecer comparaciones. Como ya se ha comentado previamente en el apartado de “Revisión bibliográfica”, aunque la función de esta población linfocitaria no se conoce con exactitud, parece que juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria frente a virus y en enfermedades inmunomediadas (Parel y Chizzolini, 2004; Overgaard *et al.*, 2015), por lo que su inclusión en este trabajo podría resultar de interés.

Por su parte, la población de linfocitos T dobles negativos también ha sido caracterizada en el perro como aquellos linfocitos circulantes en sangre periférica portadores de la molécula de superficie CD3, pero con ausencia tanto de la molécula CD4 como CD8 (Luckschander *et al.*, 2009; Alexandre-Pires *et al.*, 2010; Platt *et al.*, 2013; Maina *et al.*, 2019; Rabiger *et al.*, 2019a). Sin embargo, la existencia de una población de células NK con el mismo fenotipo, denominadas células NKT, por el momento no nos permite concluir que dentro de la población de linfocitos T dobles negativos no estemos contabilizando también este fenotipo de células NK (Gingrich *et al.*, 2019). Nuestros resultados para esta población, $12,70 \pm 3,33\%$, se encuentran dentro del rango descrito en la bibliografía consultada, 10-15% de los leucocitos sanguíneos (Luckschander *et al.*, 2009; Alexandre-Pires *et al.*, 2010; Platt *et al.*, 2013; Maina *et al.*, 2019; Rabiger *et al.*, 2019a). Nuevamente la ausencia de referencias en valor absoluto de dicha población en la literatura nos impide comparar nuestros resultados en este sentido (200 ± 73 linfocitos T dobles negativos/ μL).

Una vez que los linfocitos T vírgenes interactúan con el antígeno se producen grandes cantidades de IL-2, dando lugar a la diferenciación de dichos linfocitos en linfocitos Th o Tc en función del tipo antigénico y a su activación mediante la expresión de la molécula de superficie CD25 (Brummelman *et al.*, 2018). En nuestro estudio, como se describió en la sección de “Resultados” (tabla 57), encontramos un bajo porcentaje de linfocitos Th y Tc activados en la sangre periférica de nuestros perros sanos ($3,37 \pm 1,78\%$ y $9,87 \pm 22,04\%$, respectivamente). A pesar de la escasez de trabajos presentes en la literatura en los que se describa el porcentaje de activación de los linfocitos Th y Tc sanguíneos en perros sanos, este bajo porcentaje de presentación se asemeja a lo observado por Bismarck y colaboradores (Bismarck *et al.*, 2012). Sin embargo, en otro estudio previo en el que se valoró la expresión de la molécula de activación CD25 por parte de dichas poblaciones linfocitarias en cuatro perros, no se encontró tal expresión (Mizuno *et al.*, 2009). Nuevamente la ausencia de referencias en valor absoluto de dichas poblaciones linfocitarias nos impide comparar nuestros resultados.

Desde la descripción de la reactividad del anticuerpo específico humano para el factor de transcripción FoxP3 en la especie canina (Biller *et al.*, 2007), diferentes estudios han identificado la población de linfocitos Treg en sangre periférica de perros sanos y de perros con diversas enfermedades, ya que dicha población se caracteriza por la expresión simultánea de las moléculas CD3, CD4, CD25 y FoxP3 (Biller *et al.*, 2007; Hauck *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2017). El rango para los linfocitos Treg sanguíneos caninos encontrado en la bibliografía es muy variable, desde el 0,05% al 12% de los linfocitos circulantes (Biller *et al.*, 2007; Horiuchi *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2011; Volkmann *et al.*, 2014; Hauck *et al.*, 2016; Palatucci *et al.*, 2018), situándose nuestro resultado dentro del mismo ($2,75 \pm 2,12\%$). Este amplio rango puede deberse a la heterogeneidad de las poblaciones de perros sanos incluidos en los diversos estudios y a la gran influencia de factores tales como la edad en dicha población linfocitaria, así como a variaciones metodológicas (Biller *et al.*, 2007). Por otro lado, el valor absoluto de linfocitos Treg observado en nuestros perros sanos, 44 ± 36 linfocitos Treg/ μ L resultó menor que el descrito en un trabajo llevado a cabo en 16 perros de la raza labrador de diferentes edades, con 116,6 linfocitos Treg/ μ L, siendo no obstante su valor porcentual muy superior al nuestro también (Palatucci *et al.*, 2018).

Como ya se ha detallado previamente, para la detección de citocinas linfocitarias mediante citometría de flujo se requiere de protocolos de activación celular (Pedersen *et al.*, 2002; Horiuchi *et al.*, 2007; Matralis *et al.*, 2016). La evaluación de las subpoblaciones de linfocitos Th1 y Th2 periféricos mostró una clara polarización Th1, ya que el $25,20 \pm 16,36\%$ de los linfocitos Th expresaron IFN- γ frente al $1,35 \pm 1,07\%$ que expresaron IL-4. Nuestros resultados coinciden con lo previamente descrito por otros autores en sangre periférica de perros sanos, si bien la comparación de valores exactos no resulta adecuada dada la gran influencia debida a los distintos protocolos de activación empleados (Horiuchi *et al.*, 2007; Matralis *et al.*, 2016; Palatucci *et al.*, 2018).

En el apartado 4.6. de la sección de “Materiales y métodos” se detalló el interés de calcular la producción de IFN- γ e IL-4 por parte de los linfocitos T de forma global, debido a que el daño de la molécula de superficie CD4 consecuencia del efecto de los activadores celulares, el cual ha sido en ocasiones identificado por algunos autores (Horiuchi *et al.*, 2007; Palatucci *et al.*, 2018), impidió la detección de las poblaciones Th1 y Th2 a nivel duodenal. En nuestro estudio, el protocolo de activación empleado sí nos permitió detectar dicha molécula a nivel sanguíneo. Sin embargo, a nivel intestinal observamos una gran disminución de la misma, coincidiendo con lo descrito por Carrasco y colaboradores sobre la mayor sensibilidad de los linfocitos intestinales (Carrasco *et al.*, 2013). De este modo, calculando la producción de IFN- γ e IL-4 por parte de los linfocitos T también en sangre periférica, pudimos comparar las diferencias en la producción de estas citocinas entre los distintos compartimentos inmunitarios. Además, el IFN- γ y la IL-4 no

solo son producidas por los linfocitos Th, sino también por los linfocitos Tc, los linfocitos T dobles positivos y las células NKT que, como ya comentamos, pueden ser englobadas dentro de los linfocitos T dobles negativos (Young y Bream, 2007; Xie *et al.*, 2009; Ho y Miaow, 2016; Palatucci *et al.*, 2018), resultando de interés el cálculo de este parámetro. En este sentido observamos un porcentaje de linfocitos T productores de IFN- γ ($17,42 \pm 10,30\%$) muy semejante al previamente descrito en sangre periférica de una población de 20 perros sanos de diferentes razas y edades (Cortese *et al.*, 2015) y superior al de linfocitos T productores de IL-4 ($7,78 \pm 8,86\%$).

En cuanto al estudio de las alteraciones en el inmunofenotipo sanguíneo en el curso de la EICI canina, el panel de anticuerpos empleado en nuestro trabajo nos ha permitido evaluar ciertas poblaciones linfocitarias sanguíneas que nunca antes habían sido estudiadas en perros con dicha enfermedad. Hemos observado un incremento significativo del porcentaje de linfocitos Th activados periféricos en nuestra población de perros con EICI en comparación con el grupo control o de perros sanos (tabla 63). Este hecho ha sido previamente descrito por Funderburg y colaboradores en sangre de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (Funderburg *et al.*, 2013). La hipótesis que proponen dichos autores es que la pérdida de la permeabilidad que tiene lugar a nivel intestinal durante el curso de esta enfermedad conduciría a una translocación sistémica de productos de la microbiota que activaría la respuesta inmunitaria celular mediada por las poblaciones de linfocitos Th y Tc. A diferencia de este trabajo, nosotros no encontramos un incremento significativo de la población de linfocitos Tc activados en la sangre de nuestros perros con EICI. Esto puede ser debido a diferencias entre especies, a los diferentes marcadores empleados para la identificación del estado de activación celular o a que en todos los perros de nuestro estudio la enfermedad se localizó en intestino delgado, habiendo descrito estos autores un mayor estado de activación de los linfocitos Tc en pacientes con colitis ulcerosa. También es interesante mencionar que en los perros con EICI de nuestro estudio que recibieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la realización de la endoscopia debido a su estado clínico, encontramos diferencias estadísticamente significativas tanto en el valor relativo como en el absoluto de la población de linfocitos Th activados, encontrando en este caso un menor estado de activación de estas células en comparación con los perros de este grupo que no recibieron tratamiento. El hecho de que, además, no hubiese diferencias en esta población linfocitaria entre los perros que recibieron tratamiento y el grupo control, podría sugerir que el tratamiento inmunosupresor disminuye el estado de activación de los linfocitos Th periféricos. No obstante, estos resultados deben interpretarse con cautela, teniendo en cuenta que en este mismo estudio no se ha observado esta variación al evaluar la evolución tras el tratamiento para el grupo de perros con EICI de los que se dispuso de estos datos. Estos hallazgos deben ser reevaluados con un

mayor número de animales afectados de esta enfermedad e, idealmente, comparando el tratamiento inmunosupresor con un tratamiento placebo.

Los linfocitos Treg han sido estudiados en sangre periférica de perros con diversas enfermedades y trastornos, tales como dermatitis, obesidad, sepsis o neoplasias. En todas ellas, salvo en el caso de la obesidad, se encontró un aumento de esta población linfocitaria periférica asociada, sugiriendo estos autores que el incremento observado podía deberse a una insuficiencia en sus funciones de tolerancia inmunológica (Biller *et al.*, 2007; Horiuchi *et al.*, 2009; Hauck *et al.*, 2016; Palatucci *et al.*, 2018). Sin embargo, la población de linfocitos Treg sanguíneos solo ha sido evaluada en un trabajo en 10 perros con EICI, mostrando un recuento inferior de dicha población en los perros enfermos en comparación con su grupo control (Volkmann *et al.*, 2014). Nuestros resultados, discrepando con dicho estudio, muestran un incremento significativo de esta población tanto en porcentaje como en número total en los perros con EICI en comparación con la población de perros sanos. Este hallazgo también ha sido descrito en medicina humana en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Un estudio demostró que no solo estaba incrementada la población de linfocitos Treg habitualmente caracterizada, sino que esta población además era positiva a IL-17 y ROR γ t, marcadores que indican una conversión de las funciones hacia el fenotipo proinflamatorio Th17. Estos autores hipotetizan que en un ambiente inflamatorio como el que tiene lugar en la EICI, se produce una polarización de los linfocitos Treg hacia Th17 debido a que proceden de un progenitor común (Ueno *et al.*, 2013). Sin embargo, hay otros autores que consideran que este incremento puede deberse a un deterioro de base de sus funciones reguladoras o a un intento por parte de dicha población de restablecer la tolerancia perdida durante el curso de la enfermedad (Ban *et al.*, 2008; de Souza y Fiocchi, 2016). En el caso de esta población linfocitaria también encontramos diferencias estadísticas entre los perros que recibieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la endoscopia: en este caso el porcentaje de linfocitos Treg fue menor en los perros en tratamiento en comparación con los perros con EICI que no lo recibieron, y además, tampoco se encontraron diferencias significativas en esta población periférica entre los perros con tratamiento inmunosupresor y el grupo de perros sanos o control, por lo que en este caso también consideramos que la población de linfocitos Treg sanguíneos podría verse afectada por los fármacos inmunosupresores y la gravedad clínica. Nuevamente, estos resultados deben ser interpretados con precaución debido al hecho de que no se ha observado esta variación en el grupo de perros con EICI de los que se dispuso de control tras el tratamiento farmacológico. Por ello, estos hallazgos también deben ser reevaluados con un mayor número de animales afectados con esta enfermedad.

A pesar de que en la especie canina no se ha conseguido determinar la existencia de una clara polarización Th1 o Th2 en el curso de la EICI (Ridyard *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2005b),

en medicina humana sí se ha asociado un mayor fenotipo Th1 en la enfermedad de Crohn y un predominio del fenotipo Th2 en la colitis ulcerosa relacionado con incrementos de los niveles de IFN- γ o IL-4 tanto a nivel periférico como intestinal (Ueno *et al.*, 2013; de Souza y Fiocchi, 2016; Park *et al.*, 2017). Dado que en los perros con EICI de nuestro estudio la enfermedad se localizó en intestino delgado, cabría esperar una mayor semejanza con lo descrito en la enfermedad de Crohn. Sin embargo, no observamos un aumento de los linfocitos Th1 sanguíneos sino de los Th2 productores de IL-4 tanto en porcentaje como en valor absoluto. Nuestros hallazgos constituyen la primera descripción de estas poblaciones sanguíneas en la EICI canina.

No se han encontrado otras alteraciones en el resto de poblaciones linfocitarias sanguíneas estudiadas de los perros con EICI de este estudio en comparación con los perros sanos, coincidiendo con lo previamente descrito en la escasa bibliografía existente sobre el inmunofenotipo periférico de estos perros (Maeda *et al.*, 2013; García-Sancho *et al.*, 2014; Galler *et al.*, 2017).

6.3.2. Caracterización de las alteraciones del inmunofenotipo intestinal en la EICI canina

A nivel intestinal son escasos los trabajos publicados en la literatura que evalúen las poblaciones linfocitarias caninas mediante el empleo de citometría de flujo, habiéndose utilizado tradicionalmente la inmunohistoquímica. Concretamente nuestro trabajo es el primero en el que se emplea la citometría de flujo para la caracterización de los linfocitos caninos de la lámina propia intestinal. Por ello y dado que además muchas de las poblaciones linfocitarias evaluadas en esta tesis doctoral no habían sido siquiera descritas en la población canina general, fue imprescindible la comparación de nuestras observaciones en perros con EICI con una población de perros sanos para poder así determinar la posible existencia de alteraciones en el inmunofenotipo intestinal en los animales con dicha enfermedad.

Los resultados del inmunofenotipo intestinal de nuestro grupo control (tabla 61) muestran que en el epitelio intestinal los linfocitos T ($76,34 \pm 11,94\%$) son la población mayoritaria, coincidiendo con lo descrito previamente por otros autores. No obstante, nuestro porcentaje resultó inferior al 95-97% observado en dichos estudios (Luckschander *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2014). Del mismo modo, la población de linfocitos T también fue mayoritaria a nivel de la lámina propia del grupo de perros sanos ($83,41 \pm 9,04\%$). Este resultado es semejante al encontrado en la lámina propia felina utilizando citometría de flujo (Howard *et al.*, 2005), si bien en la especie canina, solo podemos comparar nuestros resultados con estudios inmunohistoquímicos en los que también se describe dicha superioridad (Elwood *et al.*, 1997; German *et al.*, 1999a). Respecto a la subpoblación de linfocitos Th a nivel epitelial, los porcentajes descritos en la especie canina,

del 3-15%, (Sonea *et al.*, 2000; Luckschander *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2014) coinciden con el bajo porcentaje ($9,84 \pm 5,83\%$) observado en los perros sanos de nuestro estudio. A nivel de la lámina propia nuestro porcentaje de linfocitos Th fue muy superior, de $39,89 \pm 10,89\%$, coincidiendo con los valores descritos en el intestino del gato o del ser humano (Schieferdecker *et al.*, 1992; Howard *et al.*, 2005). Los trabajos que evalúan los linfocitos Tc en el epitelio intestinal del perro describen rangos muy variables, desde el 10% al 73,3% (Sonea *et al.*, 2000; Luckschander *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2014). Como era de esperar, nuestros resultados para los linfocitos Tc a este nivel, de $40,39 \pm 12,70\%$, se encontraron dentro de dicho rango. Las grandes diferencias descritas pueden deberse a, como ya se comentó, el clon y la fuente de los anticuerpos empleados, la metodología, el citómetro de flujo y/o las características propias de las poblaciones caninas estudiadas en los diferentes trabajos. A nivel de la lámina propia nuevamente nuestro porcentaje de linfocitos Tc ($29,26 \pm 8,64\%$) coincide con lo descrito en la especie felina (Howard *et al.*, 2005). Basándonos en los porcentajes de linfocitos Th y Tc identificados a nivel del epitelio, es lógico que el cociente entre ambas subpoblaciones (cociente CD4/CD8) obtenido en nuestro estudio tenga un valor muy bajo ($0,28 \pm 0,22$). Nuestros resultados discrepan con lo descrito en el epitelio intestinal del gato, 0,50, debido en este caso al porcentaje superior de linfocitos Th encontrados a este nivel en la especie felina (Howard *et al.*, 2005), no describiéndose este valor en los trabajos llevados a cabo en linfocitos intraepiteliales en la especie canina y no pudiendo comparar nuestros resultados. Por su parte, a nivel de la lámina propia el cociente CD4/CD8 encontrado en nuestro trabajo fue $1,53 \pm 0,75$, siendo muy semejante a lo descrito por Howard y colaboradores en el gato (Howard *et al.*, 2005) y además coincidiendo con los estudios de inmunohistoquímica en el intestino del perro que detallan en la lámina propia un ratio linfocitos Th:Tc de 60:40, equivalente a un cociente 1,5 (Elwood *et al.*, 1997).

Respecto a la población de linfocitos T dobles positivos a nivel del epitelio intestinal, en la especie canina tan solo hay dos trabajos que describan dicha población en esta localización. En uno de ellos identificaron tan solo un $0,17 \pm 0,20$ de estas células (Sonea *et al.*, 2000), mientras que en el más reciente obtuvieron un porcentaje del 1,9% de linfocitos T dobles positivos respecto al total de linfocitos intraepiteliales (Rabiger *et al.*, 2019b). En nuestra población de perros sanos encontramos un $1,00 \pm 1,17\%$ pudiendo ser equiparable a lo descrito por Rabiger y colaboradores. A nivel de la lámina propia, la ausencia de referencias en la literatura sobre la población de linfocitos T dobles positivos en la especie canina, nos lleva nuevamente a comparar nuestros resultados con otras especies. En este sentido, nuestro porcentaje de esta población linfocitaria, $1,53 \pm 0,88\%$, es semejante al observado en la especie felina (1,5%) (Howard *et al.*, 2005), pero muy inferior al observado en el ser humano (14%) o en otras especies, como el macaco (19,3%) (Abuzakouk *et al.*, 1998; Pahar *et al.*, 2006). Para la población de linfocitos T dobles negativos a

nivel intestinal son muy escasas las referencias encontradas en la literatura que describan dicha población. Sonea y colaboradores identificaron un 50% de estos linfocitos en el epitelio intestinal de su población de perros sanos (Sonea *et al.*, 2000) y ciertos trabajos en medicina humana han descrito desequilibrios de linfocitos T doubles negativos asociados a enfermedades inmunomediadas como la celiaquía (Steenholt *et al.*, 2017). Este hecho, unido al alto porcentaje de estos linfocitos encontrados en nuestra población de perros sanos tanto en el epitelio ($25,03 \pm 12,13\%$) como en la lámina propia intestinal ($24,13 \pm 9,62\%$), hace que esta población nos resulte de gran interés, pudiendo estar incluidas en la misma, como ya comentamos, las células NKT.

En cuanto al estado de activación de los linfocitos Th y Tc en el intestino, nuestros resultados para los linfocitos Th positivos a la molécula CD25 ($0,31 \pm 0,17\%$ en el epitelio y $5,84 \pm 2,67\%$ en la lámina propia), son significativamente más bajos que lo observado por Rabiger y colaboradores en el epitelio, donde encontraron un 45% de esta población activada (Rabiger *et al.*, 2019b). Para los linfocitos Tc activados los porcentajes de nuestra población de perros sanos en el epitelio ($13,76 \pm 10,31\%$), también fueron más bajos que lo observado en el estudio anteriormente citado (30%) (Rabiger *et al.*, 2019b). Llama la atención el elevado porcentaje de estos linfocitos Tc activados encontrados en la lámina propia en nuestro estudio ($32,52 \pm 9,67\%$) en comparación con el compartimento epitelial. En la especie felina, Howard y colaboradores, por su parte, encontraron un 13,9% de linfocitos positivos a CD25 en el epitelio y un 24,2% en la lámina propia duodenal (Howard *et al.*, 2005). El hecho de este elevado estado de activación encontrado a nivel intestinal, sobre todo por parte de los linfocitos Tc, puede ser consecuencia del intenso contacto antigénico que tiene lugar en estas localizaciones (Howard *et al.*, 2005; Pahar *et al.*, 2006; Rabiger *et al.*, 2019b).

En cuanto a la caracterización de la población de linfocitos Treg intestinales, este es el primer estudio en el que se lleva a cabo mediante citometría de flujo tanto a nivel del epitelio como de la lámina propia en la especie canina. Estudios previos empleando inmunohistoquímica en perros sanos han descrito una baja presencia de esta población en el epitelio y más abundante en la lámina propia, siendo su distribución mayor en las vellosidades y decreciente caudalmente en el intestino (Junginger *et al.*, 2012; Maeda *et al.*, 2016). Coincidiendo con estos trabajos y con lo observado en el modelo murino por citometría de flujo (Sujino *et al.*, 2016), en nuestro grupo de perros sanos identificamos un mayor porcentaje de linfocitos Treg en la lámina propia ($4,24 \pm 3,06\%$) que en epitelio intestinal ($1,73 \pm 1,13\%$).

El estudio de la producción de citocinas a nivel intestinal en la especie canina ha sido llevado a cabo mediante técnicas de PCR, pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) e hibridación *in situ* del ARN, siendo nuestro trabajo el primero en emplear la citometría de flujo

para este fin. Todos estos estudios han conseguido determinar la presencia de IFN- γ en el intestino de perros sanos con una relativa buena abundancia (Garden *et al.*, 1999; Ridyard *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2005a; Ohta *et al.*, 2014b; Tamura *et al.*, 2014), mientras que por el contrario la existencia de IL-4 ha sido identificada como muy baja o inexistente en algunos trabajos (Ridyard *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2005a). Nuestros perros sanos mostraron un porcentaje de linfocitos T productores de IFN- γ bajo, tanto a nivel del epitelio ($2,28 \pm 3,05\%$) como de la lámina propia duodenal ($2,26 \pm 3,77\%$) discrepando del alto porcentaje observado por Van Damme y colaboradores en muestras de íleon en el ser humano (33%, rango 20-67% en epitelio; 65%, rango 13-82% en lámina propia) (Van Damme *et al.*, 2001). Los resultados para los linfocitos productores de IL-4 de nuestro estudio tanto en el epitelio ($1,21 \pm 1,23\%$) como en la lámina propia duodenal ($1,37 \pm 1,65$) también mostraron un bajo porcentaje de esta población celular. Sin embargo, en esta ocasión estos resultados coinciden con lo identificado en el intestino humano tanto en epitelio, 1,1% (rango 0,2-2%) como en la lámina propia 1,6% (rango 0,6-3,8%) (Van Damme *et al.*, 2001). Las diferencias observadas en la producción de citocinas, como ya se comentó, pueden estar fuertemente influenciadas por los diferentes protocolos de activación empleados.

Las alteraciones observadas en el inmunofenotipo intestinal de los perros con EICI en comparación con el grupo de perros sanos o grupo control han sido detalladas en la tabla 64 de la sección de “Resultados”. Así, a nivel del epitelio intestinal hemos observado una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de linfocitos Th y un aumento de la población de linfocitos Tc en los perros con EICI en relación con los animales sanos, lo que conlleva un descenso estadísticamente significativo del cociente CD4/CD8. Nuestros resultados coinciden con lo observado por Haas y colaboradores, que describieron un menor porcentaje de linfocitos Th intraepiteliales en perros con EICI, si bien estos autores no hallaron diferencias estadísticamente significativas en esta comparación (Haas *et al.*, 2014). En medicina humana, el incremento de los linfocitos Tc a nivel del epitelio intestinal en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa es considerado frecuente (Cheroutre, 2006; Hu y Edelblum, 2017). Se ha postulado que una alteración en el mecanismo de reconocimiento patogénico de los linfocitos Tc epiteliales a través del CMH de tipo I rompe el equilibrio entre la tolerancia inmunológica y la actividad citotóxica de esta población celular, desencadenando el proceso inflamatorio (Cheroutre, 2006; Jabri y Ebert, 2007). Los linfocitos Tc de esta localización serían pues los responsables directos del daño de la barrera epitelial, la pérdida de tolerancia inmunológica y la perpetuación del proceso inflamatorio (Cheroutre, 2006; Hu y Edelblum, 2017). Además, tal y como se ha comprobado en modelos animales, parece que el incremento de esta población se corresponde con linfocitos intraepiteliales inducidos con fenotipo TCR $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\beta$ +

(Kontoyiannis *et al.*, 2002; Apostolaki *et al.*, 2008), lo cual también ha sido descrito en perros con EICI a nivel epitelial, donde se observó un 43% de linfocitos Tc con dicho fenotipo (Haas *et al.*, 2014). En nuestro trabajo, a pesar de no haber incluido el marcador TCR, cabe destacar que el marcador CD8 empleado detecta el fenotipo CD8 $\alpha\beta$. Por otro lado, se considera que el daño epitelial resultante de la actividad citotóxica de los linfocitos Tc permite la invasión bacteriana de la mucosa y el incremento del estado de activación celular (Kontoyiannis *et al.*, 1999; Hu y Edelblum, 2017). Sin embargo, nuestros resultados difieren de esta hipótesis, ya que los linfocitos Th de los perros con EICI presentaron un estado de activación significativamente disminuido y no se observaron diferencias en el estado de activación de los linfocitos Tc a este nivel.

Como ya se ha comentado, la enfermedad de Crohn, a diferencia de la colitis ulcerosa, se caracteriza por una polarización Th1, con el predominio de interleucinas tales como el IFN- γ (de Souza y Fiocchi, 2016; Park *et al.*, 2017), por lo que en nuestro estudio, dado que la localización de las lesiones en los perros con EICI fue a nivel duodenal no es de extrañar el resultado que muestra un incremento significativo del porcentaje de linfocitos T intraepiteliales productores de IFN- γ . Este hallazgo coincide con lo observado en los linfocitos intraepiteliales en el modelo murino (Chang *et al.*, 2012). En la especie canina, los estudios que han evaluado los niveles de IFN- γ en el intestino de perros con EICI no han detectado diferencias respecto a la población de perros sanos (German *et al.*, 2000b; Peters *et al.*, 2005b; Jergens *et al.*, 2009; Eissa *et al.*, 2019), si bien debe tenerse en cuenta que las técnicas empleadas y el objetivo de las mismas difiere entre los distintos estudios. Así, cabe destacar que nuestro trabajo es el primero que emplea la citometría de flujo y que lo que evalúa es la expresión de citocinas intracelulares y sin llevar a cabo una cuantificación de las mismas. Además, como ya se comentó previamente, el daño del marcador CD4 nos condujo a evaluar la producción de las mismas por parte de los linfocitos T en general, dado que en el caso de las citocinas evaluadas, IFN- γ e IL-4, estas no son producidas exclusivamente por los linfocitos Th (Young y Bream, 2007; Xie *et al.*, 2009; Ho y Miaw, 2016; Palatucci *et al.*, 2018). Todos estos hallazgos sugieren la existencia de una polarización hacia la respuesta inmunitaria de tipo 1.

Finalmente, a nivel del epitelio intestinal, la última alteración detectada en nuestro trabajo fue un descenso estadísticamente significativo del porcentaje de linfocitos T dobles positivos en los perros con EICI en comparación con el grupo control. Esta es la primera referencia que se hace sobre la alteración de los linfocitos T dobles positivos en el epitelio duodenal en el curso de la EICI canina, ya que, como se comentó anteriormente, tan solo hay dos trabajos que evalúen esta población linfocitaria a nivel intestinal en perros sanos (Sonea *et al.*, 2000; Rabiger *et al.*, 2019b). Nuestros hallazgos se asemejan a lo previamente observado en medicina humana en la lámina propia del colon de pacientes con EICI, donde se describen descensos de esta población, pero del fenotipo CD8 $\alpha\alpha$ (Sarrabayrouse *et al.*, 2014; Sarrabayrouse *et al.*, 2015). Dado que esta

población muestra funciones inmunitarias reguladoras mediante la producción de IL-10 (Sarrabayrouse *et al.*, 2015), parece lógico observar un descenso de esta población en el ambiente proinflamatorio de la EICI. Por ello, sería interesante llevar a cabo un mayor número de estudios que corroboren estas observaciones e incluir el fenotipo CD8 $\alpha\alpha$ para determinar su implicación en esta enfermedad canina.

A nivel de la lámina propia intestinal se han descrito ciertas alteraciones en las poblaciones linfocitarias evaluadas en nuestro trabajo durante la EICI, tanto en medicina humana como en la especie canina. Una de las más relevantes es el aumento del número global de linfocitos T presentes en la lámina propia de individuos enfermos (German *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2014; Smids *et al.*, 2018). Sin embargo, la citometría de flujo a nivel intestinal en este trabajo no fue empleada para la contabilización celular, sino para el cálculo de los valores relativos de las distintas poblaciones linfocitarias, por lo que no es posible confirmar esa apreciación. No obstante, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos T en la lámina propia duodenal entre los perros con EICI y nuestro grupo control. A diferencia de nuestros resultados, hay trabajos que describen un mayor porcentaje de linfocitos Th en la lámina propia de pacientes con EICI (Li *et al.*, 2016; Smids *et al.*, 2018), lo cual también ha sido observado en el intestino de perros enfermos con el empleo de inmunohistoquímica (German *et al.*, 2001). Este estudio constituye la primera descripción de dichas poblaciones linfocitarias en la lámina propia intestinal canina utilizando citometría de flujo y, si bien las diferencias encontradas con estudios previos pueden deberse a diferencias metodológicas, también pueden relacionarse con las características de las poblaciones caninas estudiadas, por lo que se hacen necesarios nuevos estudios con un mayor número de animales.

Sin embargo, coincidiendo con lo observado en sangre periférica, hemos detectado un incremento significativo del porcentaje de linfocitos T reguladores en la lámina propia de los perros con EICI en comparación con el grupo control. Como ya se detalló, el incremento de estos linfocitos tanto a nivel periférico como en la lámina propia intestinal también ha sido identificado en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, justificándose este hecho con un posible déficit de base de sus funciones reguladoras o con un intento de compensar la situación proinflamatoria que tiene lugar en la EICI (Ban *et al.*, 2008; de Souza y Fiocchi, 2016).

6.3.3. Estudio comparativo del inmunofenotipo entre los diferentes compartimentos inmunitarios

Los linfocitos de las localizaciones aferentes del GALT o de los nódulos linfáticos mesentéricos, tras el contacto antigénico, comienzan una migración que les conduce a la

circulación sistémica, donde terminan de madurar para volver a las localizaciones efectoras intestinales y ejercer sus funciones (Agace, 2008; Maynard y Weaver, 2009; Agace, 2010). Por ello, las alteraciones observadas en el inmunofenotipo periférico durante el curso de patologías gastrointestinales como la EICI pueden ser el reflejo de esta migración linfocitaria (Agace, 2010; Greuter y Vavricka, 2019).

Esta hipótesis motivó la determinación de las posibles diferencias existentes en el inmunofenotipo entre los tres compartimentos inmunitarios estudiados en este trabajo, para así profundizar un poco más en el comportamiento de estas células. Estas comparativas se llevaron a cabo entre los compartimentos inmunitarios de los perros sanos y posteriormente de los perros con EICI para valorar si las alteraciones descritas previamente en el inmunofenotipo asociadas a la enfermedad también se reflejaban en este sentido.

Así, tanto en los perros sanos como en los perros con EICI observamos diferencias estadísticamente significativas entre la mayor parte de las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica y del epitelio intestinal (tabla 65). Concretamente, encontramos diferencias en las poblaciones de linfocitos Th, Tc, T dobles negativos, Th activados, T productores de IFN- γ y en el cociente CD4/CD8. Sin embargo, tan solo en el grupo de perros con EICI se ha observado un porcentaje significativamente mayor en sangre periférica de las poblaciones de linfocitos T, T dobles positivos, Tc activados y Treg, además de una ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los linfocitos T productores de IL-4, a diferencia de lo observado en el grupo control.

Por su parte, al comparar los linfocitos sanguíneos y los emplazados en la lámina propia duodenal encontramos un porcentaje significativamente menor de linfocitos T sanguíneos productores de IFN- γ . Sin embargo, algunas de las diferencias entre las distintas poblaciones linfocitarias de estos dos compartimentos inmunitarios detectadas en el grupo de perros sanos (linfocitos T dobles negativos, Th activados y T productores de IL-4) dejan de detectarse en los perros con EICI, en los que la composición linfocitaria de la sangre y de la lámina propia duodenal tiende a asemejarse más. Además, en el grupo de perros con EICI, a diferencia del grupo de perros sanos, también se detectó un porcentaje significativamente menor de los linfocitos Tc activados sanguíneos en comparación con los de la lámina propia duodenal (tabla 66).

Finalmente, en la comparativa entre los dos compartimentos inmunitarios intestinales, observamos un porcentaje significativamente menor de los linfocitos T, Th, T dobles positivos, Th y Tc activados, Treg y del cociente CD4/CD8 epiteliales en relación con la lámina propia duodenal en ambos grupos de animales (tabla 67). Nuevamente encontramos diferencias únicamente en el grupo de perros con EICI para la población de linfocitos T dobles negativos, que presentó un porcentaje mayor a nivel epitelial, y para la población de linfocitos T productores

de IFN- γ , que presentó un menor porcentaje en el epitelio en comparación con la lámina propia; además de una ausencia de significación para el caso de los linfocitos T a diferencia del grupo de perros control en los cuales esta población presentó un porcentaje significativamente menor en el epitelio.

Tal y como puede observarse, de forma general existen grandes diferencias en las poblaciones linfocitarias estudiadas entre los tres compartimentos inmunitarios, siendo estas más acusadas en el compartimento epitelial, dejando patencia de la peculiaridad inmunitaria previamente comentada de esta localización (Cheroutre *et al.*, 2011) mientras que la composición linfocitaria en sangre y lámina propia es más semejante. Este hecho resalta la gran importancia de evaluar por separado el inmunofenotipo del epitelio y de la lámina propia intestinal, dadas las grandes diferencias fenotípicas observadas. En este sentido, gracias a esta evaluación por separado de los compartimentos inmunitarios llevada a cabo en este trabajo de investigación, ha podido constatar que durante la EICI se acentúan las diferencias en la distribución linfocitaria entre el epitelio duodenal y la sangre, mientras que la composición de la lámina propia y la sangre tienden a mostrar una mayor similitud que en los animales sanos.

Finalmente es preciso comentar que estudios previos en los que se han empleado marcadores para la identificación de moléculas de adhesión intestinal presentes en los linfocitos, tales como la CC9, han permitido identificar estas poblaciones en la sangre periférica de perros sanos (Maeda *et al.*, 2012a). Dado que en medicina humana la descripción del incremento de linfocitos sanguíneos portadores de esta clase de moléculas ha permitido el desarrollo de terapias de “anti-adhesión” impidiendo el retorno de ciertas poblaciones linfocitarias alteradas al intestino (Binder *et al.*, 2018), resultaría de interés para futuros estudios incluir estos marcadores en perros con EICI para aportar más información sobre el tráfico linfocitario en el curso de esta enfermedad.

6.4. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Como se ha ido describiendo en esta tesis doctoral, en 10 perros del Grupo 2 o grupo de perros con EICI se dispuso de un control tras la finalización del tratamiento específico para la

enfermedad que nos permitió llevar a cabo una reevaluación de todos los parámetros incluidos en este estudio. A continuación, se discutirá la evolución de cada uno de ellos.

6.4.1. Evolución clínica y de los parámetros de la analítica sanguínea

En ocho de los 10 perros con EICI de los que se pudo llevar a cabo un control postratamiento se describió una remisión completa de los signos clínicos tras la finalización del tratamiento farmacológico ($80 \pm 16,33\%$) detallado en el apartado 4.5. de la sección de “Materiales y métodos”. En los dos restantes (casos 30 y 39), sin embargo, los vómitos se mantuvieron, si bien con una frecuencia de presentación mucho menor. Esta alta tasa de resolución del cuadro clínico tras la administración de tratamiento dietético, inmunosupresor (glucocorticoides) y antibiótico (metronidazol) coincide con lo previamente descrito por diversos autores para la EICI canina (Jergens *et al.*, 2003; Craven *et al.*, 2004b; García-Sancho *et al.*, 2007; Jergens *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2014; Otoni *et al.*, 2018; Guard *et al.*, 2019). En el apartado de “Revisión bibliográfica” de esta tesis doctoral se revisó en profundidad el efecto del tratamiento dietético y farmacológico empleado sobre el sistema inmunitario en el curso de la EICI. Así, la dieta empleada para el tratamiento de la enfermedad tiene como base reducir la carga y la presentación antigénica al GALT (Jergens y Simpson, 2012; Cave, 2013; Juge, 2020), mientras que el tratamiento inmunosupresor actúa reduciendo el procesamiento y la presentación antigénica en macrófagos y células dendríticas, suprime de forma directa la respuesta mediada por linfocitos T (y, con ello, actúan sobre los linfocitos B) y disminuye la afinidad de los anticuerpos por sus receptores (Whitley y Day, 2011). En definitiva, estos fármacos actúan bloqueando la respuesta inflamatoria y la liberación de los mediadores inflamatorios responsables del daño de la barrera epitelial intestinal y de la consecuente alteración de la permeabilidad intestinal (Michielan y D'Inca, 2015). En este sentido, la atenuación o el control del proceso inflamatorio y la resolución del síndrome de malabsorción derivado serían los responsables de la desaparición del proceso diarreico, de la pérdida de peso y de las alteraciones del apetito, así como de la mejoría de los vómitos y del dolor abdominal (Hall, 2013a; Hall y Day, 2017). Además, en nuestro trabajo, hemos podido comprobar no solo la resolución de la pérdida de peso, sino que la buena respuesta al tratamiento se ha hecho patente con un incremento tanto del peso ($2,16 \pm 3,61$ Kg) como de la condición corporal ($1,40 \pm 0,97$ puntos en la escala 1-9), que resultaron estadísticamente significativos respecto a los valores previos al inicio de la terapia, coincidiendo con lo observado previamente (García-Sancho *et al.*, 2007; Jergens *et al.*, 2010).

Por otro lado, hay autores que describen una menor tasa de resolución del cuadro clínico en la EICI canina, especialmente en animales con factores pronósticos negativos, tales como

hipoproteinemia o una mayor gravedad de los signos clínicos, entre otros (Allenspach *et al.*, 2007; Craven y Washabau, 2019). Cabe destacar que de los dos perros de nuestro trabajo que presentaron una remisión parcial de los signos clínicos, el caso 30 presentaba enteropatía perdedora de proteínas en el momento del diagnóstico, mientras que el caso 39 recibió una elevada puntuación en la graduación clínica de la enfermedad, considerándose una enfermedad grave con los tres índices clínicos empleados.

Respecto a la evolución de los parámetros de la analítica sanguínea de nuestros 10 perros con control postratamiento, no se observó ninguna variación significativa tras el tratamiento en los valores medios (tablas 69 y 70). En cuanto a las alteraciones individuales observadas en la analítica de estos perros, es interesante destacar que la mayoría se resolvieron tras la finalización del tratamiento, mereciendo un especial interés el caso de la neutrofilia detectada en dos perros en el momento del diagnóstico. La neutrofilia, como ya se ha comentado, es un hallazgo que ha sido descrito en la EICI tanto en medicina humana como en la especie canina, aunque no de forma muy frecuente. Ha sido asociada al propio ambiente proinflamatorio y a las fases tempranas de la enfermedad (Hall, 2013a; Zhou y Liu, 2017), por lo que no es de extrañar que el efecto de la terapia inmunosupresora también se refleje en dicha población celular. Por otro lado, dos de los perros de este grupo, el caso 30 y el 48, presentaban entre otras anomalías analíticas, hipoproteinemia en el momento del diagnóstico, que se resolvió también tras la finalización del tratamiento. La hipoproteinemia es considerada un factor de mal pronóstico y de mala respuesta al tratamiento, cabiendo mencionar que en el caso 30 no se observó una resolución completa de los signos clínicos en el momento de la reevaluación (Allenspach *et al.*, 2007; Craven y Washabau, 2019). Además, este mismo animal presentaba trombocitosis que no se modificó tras el tratamiento, lo cual también ha sido descrito en perros con EICI, sugiriéndose que la alteración plaquetaria es inherente a la enfermedad (Goodwin *et al.*, 2011; Jacinto *et al.*, 2017).

El reflejo de la mejoría del cuadro clínico de los perros con EICI de los que dispusimos de control tras la finalización del tratamiento se observa en la disminución significativa del valor de los tres índices de actividad clínica empleados en este estudio: CIBDAI, $-5,60 \pm 3,75$; CIBDAISI, $-6,50 \pm 4,62$; y CCECAI, $-6,00 \pm 2,94$. Nuestros resultados coinciden con las descripciones de la mayoría de los trabajos que utilizan dichos índices de actividad clínica para la EICI canina, que reflejan estas disminuciones significativas (García-Sancho *et al.*, 2007; Jergens *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2014; Allenspach *et al.*, 2016; Galler *et al.*, 2017; Heilmann *et al.*, 2018). Por otro lado, nuestros resultados sobre la evolución del índice de actividad (tabla 72) parecen sugerir que ésta tiene el mismo comportamiento independientemente del grado de enfermedad clínica del que partamos. Esto contrasta con lo sugerido por los autores de los índices CIBDAI y CCECAI, que atribuyen la cualidad de aportar valor pronóstico a su empleo (Jergens

et al., 2003; Allenspach *et al.*, 2007). Sin embargo, esta observación debe tomarse con precaución debido a la posible limitación derivada del tamaño muestral y al hecho de que de estos 10 animales tan solo dos presentaron la forma más grave de la enfermedad, es decir, con hipoproteinemia asociada. Además, cabe destacar que la tasa de recidivas de los signos clínicos ha sido descrita en aproximadamente la mitad de los casos en aquellos trabajos con largos periodos de seguimiento clínico (Hall, 2013a; Allenspach *et al.*, 2016). No obstante, consideramos que la aplicación de estos índices aporta una información interesante de cara al manejo clínico de esta enfermedad en el perro, respaldado por el hecho de que, por ejemplo, los perros con cuadro clínico digestivo con respuesta a tratamiento dietético exclusivo muestran unos valores inferiores de los mismos (Allenspach *et al.*, 2016; Nagata *et al.*, 2020), y a que se están encontrando asociaciones de los mismos con ciertos biomarcadores, tales como los niveles de aminoácidos o de proteína C reactiva séricos (Jergens *et al.*, 2003; Benvenuti *et al.*, 2020).

6.4.2. Evolución de las lesiones endoscópicas

Como puede observarse en nuestros resultados (tablas 73 y 74), la exploración endoscópica de los perros con EICI tras la finalización del tratamiento muestra resultados muy variables. Con el empleo del índice de la WSAVA las lesiones esofágicas muestran tanto leves incrementos como disminuciones o ausencia de variación, no resultando estadísticamente significativo el cambio en ningún caso. A nivel gástrico, la mayoría de los parámetros evaluados tanto con el índice de la WSAVA como con el de Slovak y colaboradores identifica una disminución o una ausencia de variación en todos ellos tras la finalización del tratamiento, no resultando significativas dichas diferencias, de igual manera. No obstante, sí que encontramos diferencias a nivel del sumatorio de los mismos con el empleo del índice endoscópico de la WSAVA, por lo que podemos decir que, de forma global, sí que se observa una mejoría macroscópica en la mucosa gástrica tras la finalización del tratamiento farmacológico en los perros con EICI. Nuestros resultados a nivel gástrico coinciden con lo previamente descrito por nuestro grupo de investigación en 2007, con una reducción de las lesiones gástricas en el 75% de los perros con EICI (García-Sancho *et al.*, 2007).

Por otro lado, a nivel duodenal la inmensa mayoría de las lesiones sufren una disminución de su puntuación tras la finalización de la terapia farmacológica, resultando esta diferencia estadísticamente significativa en el caso de la hiperemia/vascularización, del edema y de las alteraciones en la coloración de la mucosa con el índice de valoración endoscópica de la WSAVA. Cabe destacar además que la hiperemia/vascularización y las alteraciones en la coloración de la mucosa fueron dos de las lesiones más frecuentemente observadas en nuestro grupo de perros con

EICI en el momento del diagnóstico (tablas 36 y 37). Además, también identificamos diferencias estadísticamente significativas en estos tres parámetros entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI (tabla 51), por lo que podemos considerar que dichas lesiones son un buen reflejo de la enfermedad y de su evolución tras el tratamiento a nivel de la exploración macroscópica de la mucosa duodenal.

También observamos una mejoría estadísticamente significativa del sumatorio de las lesiones macroscópicas evaluadas con el empleo del índice de la WSAVA. Hay que resaltar que la mejoría de las lesiones en duodeno es mayor que en estómago, explicándose por el hecho de que la enfermedad se localiza en este tramo gastrointestinal y, por tanto, las lesiones endoscópicas de las que partíamos en el grupo de perros con EICI eran de mayor gravedad en el duodeno que en el estómago. Nuevamente nuestros resultados a nivel duodenal coinciden con lo observado por nuestro grupo de investigación en un estudio previo (García-Sancho *et al.*, 2007). Sin embargo, difieren de lo descrito en los únicos dos trabajos de la literatura que evalúan la evolución de las lesiones macroscópicas duodenales en perros con EICI tras el tratamiento inmunosupresor, que no observaron cambios significativos (Allenspach *et al.*, 2007; Burgener *et al.*, 2008). Estas diferencias pueden ser consecuencia de muchos factores, tales como la subjetividad de la evaluación endoscópica y las características de las poblaciones de estudio. No obstante, estos trabajos previos no utilizaron los índices endoscópicos para evaluar la evolución de las lesiones en perros tras el tratamiento, siendo nuestro estudio el primero y único hasta la fecha en emplear esta metodología que trata de aportar objetividad a los hallazgos encontrados.

Además, es interesante comentar que, como en anteriores ocasiones, los escasos estudios en la especie canina se contrarrestan con los numerosos trabajos llevados a cabo en medicina humana. Tanto en la enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerosa se describe de manera general una mejoría de la apariencia endoscópica de los diferentes tramos intestinales tras la instauración de un correcto tratamiento en estos pacientes, a pesar de que en pocas ocasiones se alcanza una remisión completa desde el punto de vista endoscópico (D'Haens *et al.*, 1999; Colombel *et al.*, 2011; Bryant *et al.*, 2016). Estos hallazgos en el ser humano son, como hemos descrito previamente, similares a nuestras observaciones en la especie canina.

6.4.3. Evolución de las lesiones histopatológicas

En cuanto a la reevaluación de las lesiones histopatológicas tras la finalización del tratamiento en los perros con EICI, nuestros resultados (tabla 76) muestran la ausencia de diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros evaluados con los dos índices histopatológicos empleados. A nivel gástrico incluso hemos observado un

empeoramiento, si bien leve, de todos los parámetros evaluados, no resultando significativa de igual manera la diferencia del sumatorio de las lesiones en esta localización antes y después del tratamiento (tabla 77). Por el contrario, a nivel duodenal identificamos una mejoría también leve de todos los parámetros, tanto los morfológicos como los inflamatorios, no observando tampoco diferencias significativas en el sumatorio de estas lesiones tras la finalización del tratamiento (tabla 77). Nuestros hallazgos coinciden con lo previamente descrito por algunos autores (Allenspach *et al.*, 2007; García-Sancho *et al.*, 2007; Burgener *et al.*, 2008; Schreiner *et al.*, 2008), si bien existen algunas diferencias con estos estudios previos, ya que, por ejemplo Allenspach y colaboradores en 2007 describieron un empeoramiento de la graduación de las lesiones histopatológicas a nivel duodenal en los 70 perros de su estudio tras el tratamiento (Allenspach *et al.*, 2007). Por tanto, la observación global es la misma, que no hay modificación de la imagen histopatológica tras el tratamiento en los perros con EICI, y las diferencias encontradas al comparar nuestros resultados con los de otros estudios pueden ser debidas a que estos son previos a la publicación de los índices histopatológicos propuestos por los grupos de expertos en la materia y en ellos emplearon sus propios criterios de evaluación histopatológica. En la literatura consultada tan solo hay un trabajo que detalle la evolución de las lesiones histopatológicas en perros con EICI tras el tratamiento mediante el empleo del índice propuesto por la WSAVA. En él, a diferencia de nuestros resultados, sus autores sí que describen una disminución de las lesiones histopatológicas a nivel duodenal después de la finalización de la terapia inmunosupresora (Rossi *et al.*, 2014). Este hecho puede ser debido, como ya se comentó, a la difícil interpretación histopatológica de las biopsias endoscópicas, habiéndose descrito discrepancias entre distintos patólogos para el índice propuesto por la WSAVA (Willard *et al.*, 2010). Es por ello que decidimos incorporar a nuestro estudio el índice histopatológico simplificado de Allenspach y colaboradores (Allenspach *et al.*, 2019), que parecía solventar dicho problema y tener mayor correlación con el estado clínico de los animales. Sin embargo, nuestros resultados tampoco muestran modificaciones de las lesiones histopatológicas con este índice a pesar de la mejoría clínica y de la imagen endoscópica evidenciada en nuestros perros con EICI. No obstante, hay que tener en cuenta la limitación que puede suponer el tamaño muestral empleado en nuestro trabajo y el hecho de que constituye la primera referencia en cuanto al empleo de este índice para valorar la evolución de la EICI canina tras la finalización del tratamiento.

En medicina humana, también hay descripciones sobre la existencia de inflamación en la mucosa de pacientes con EICI que se encuentran en remisión clínica, habiéndose identificado esta persistencia entre el 16 y el 100% de los mismos (Villanacci *et al.*, 2013; Bryant *et al.*, 2014). La causa de la ausencia de remisión de las lesiones histopatológicas se desconoce. Algunos autores sugieren que puede ser consecuencia de la falta de estandarización de los procesos de tratamiento de las muestras y de los parámetros histopatológicos a evaluar, o que puede deberse

a que el proceso inflamatorio permanece presente aunque en estado latente, pudiendo justificarse en este sentido la alta frecuencia de recaídas descritas tanto en medicina humana como en la especie canina (García-Sancho *et al.*, 2007; Hall, 2013a; Bryant *et al.*, 2014).

6.4.4. Evolución del inmunofenotipo

La evolución de las poblaciones linfocitarias estudiadas tanto a nivel sanguíneo como intestinal tras la finalización del tratamiento inmunosupresor en el grupo de perros con EICI se discute a continuación.

En la reevaluación de las poblaciones de linfocitos T estudiadas en sangre periférica en los perros con EICI tras la finalización del tratamiento médico, observamos la ausencia de diferencias estadísticamente significativas tanto en el valor relativo como en el número absoluto de estas células (tabla 78). Cabe destacar que las diferencias encontradas entre el grupo de perros sanos y el grupo de perros con EICI a nivel del inmunofenotipo periférico en las poblaciones de linfocitos Th activados y Treg de forma previa al tratamiento (tablas 63 y 64) se mantuvieron, con valores estadísticamente superiores en el grupo de perros con EICI tras la finalización del tratamiento en comparación con el grupo de perros sanos. Los resultados de la comparación entre el grupo control y el grupo de perros con EICI tras la finalización del tratamiento no han sido incluidos en la sección de “Resultados” para no extender más nuestro trabajo, pero han sido calculados para todas las variables incluidas en esta tesis doctoral. Nuestros resultados coinciden con lo observado por Galler y colaboradores en sangre periférica de perros con EICI, que tampoco describieron cambios en las poblaciones de los linfocitos estudiados tras la finalización del tratamiento (Galler *et al.*, 2017). Sin embargo, en medicina humana sí se han identificado variaciones en sangre periférica de pacientes con EICI en poblaciones de linfocitos reguladores y en el estado de activación (Dai *et al.*, 2017), sugiriéndose que el tratamiento inmunosupresor podría influir en el inmunofenotipo periférico. En nuestro caso, cabe destacar que, tal y como se ha comentado previamente, los perros del grupo con EICI que recibieron tratamiento inmunosupresor de forma previa a la primera endoscopia mostraron valores significativamente menores de linfocitos Th y Treg que los perros con EICI que no lo recibieron y no se encontró diferencia al comparar estas poblaciones linfocitarias entre este subgrupo de perros con EICI con los controles. Dado que nuestro trabajo es el primero que describe estas poblaciones linfocitarias en sangre periférica de perros con EICI y su evolución tras el tratamiento, sería recomendable ampliar el tamaño muestral y el periodo de valoración de la evolución para esclarecer estas observaciones.

En cuanto al inmunofenotipo intestinal son muy pocos los trabajos que determinan la evolución de las poblaciones linfocitarias en perros con EICI tras empleo de tratamiento inmunosupresor, utilizando todos ellos inmunohistoquímica para su valoración y centrándose únicamente en la lámina propia intestinal (Allenspach *et al.*, 2006b; Schreiner *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2014). En ellos, se observa una gran discrepancia en cuanto a los resultados, ya que algunos describen disminuciones del número total de linfocitos T tras el tratamiento (Allenspach *et al.*, 2006b; Rossi *et al.*, 2014), mientras que otros no identifican variaciones en dicha población linfocitaria (Schreiner *et al.*, 2008). Por su parte Rossi y colaboradores también identificaron un menor número de linfocitos Treg tras la finalización de la terapia (Rossi *et al.*, 2014). Nuestro trabajo es el primero que emplea la citometría de flujo en la valoración de la evolución de las poblaciones linfocitarias intestinales en perros con EICI, y nuestros resultados muestran un incremento significativo del porcentaje de linfocitos Th y del cociente CD4/CD8 a nivel del epitelio duodenal, así como un aumento del porcentaje de linfocitos T dobles negativos a nivel de la lámina propia, no encontrando más diferencias tras la finalización del tratamiento (tabla 79). Como ya detallamos, los perros con EICI mostraron una disminución significativa del porcentaje de linfocitos Th intraepiteliales y del cociente CD4/CD8 en comparación con los perros sanos. Además, no hemos encontrado diferencias al comparar los linfocitos Th entre los perros con EICI tras la finalización del tratamiento y el grupo control ($p=0,267$). También es interesante destacar que hemos observado la situación inversa con los linfocitos Tc: tras el tratamiento se observa una disminución de su porcentaje, aunque no significativo estadísticamente, habiéndose encontrado significativamente aumentados en los perros con EICI antes del tratamiento en comparación con los sanos y no observándose diferencias en esta población en los perros con EICI tras la finalización del tratamiento en comparación con el grupo control ($p=0,461$). De todos estos datos podemos concluir que el tratamiento inmunosupresor tiene influencia en las poblaciones de linfocitos Th y Tc a nivel del epitelio intestinal y que parece que este efecto tiende a la normalización de sus porcentajes. Estos hechos han sido previamente descritos en la lámina propia intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa en remisión clínica (Smids *et al.*, 2018; Roosenboom *et al.*, 2019).

Finalmente, en cuanto al incremento encontrado en la población de linfocitos T dobles negativos en la lámina propia duodenal en los perros con EICI tras la finalización del tratamiento, debe destacarse que la función exacta de esta población a nivel intestinal se desconoce. Algunos autores han atribuido propiedades inmunoregulatoras a estos linfocitos (Thomson *et al.*, 2006; Hillhouse y Lesage, 2013), por lo que este hallazgo podría relacionarse con que la mayoría de animales se encontraban en remisión clínica. Sin embargo, consideramos que son necesarios más estudios que respalden estos resultados, ya que hay que recordar que con los marcadores celulares empleados, en esta población también debemos incluir las células NKT (Gingrich *et al.*, 2019).

Además, es importante matizar que esta población no mostró alteraciones en la comparativa del inmunofenotipo a este nivel entre los perros con EICI antes del tratamiento y los perros sanos. A esto se une la gran desviación estándar de la media que acompaña al incremento del porcentaje de esta población linfocitaria tras la terapia inmunosupresora ($3,38 \pm 18,53\%$), por lo que este resultado debe ser interpretado con cautela.

6.5. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO SANGUÍNEO CON LAS VARIABLES CLÍNICAS, ENDOSCÓPICAS E HISTOPATOLÓGICAS EN LOS PERROS CON EICI

6.5.1. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices clínicos de la enfermedad

En el apartado 5.7.1. de la sección de “Resultados” de esta memoria se especificaron las asociaciones encontradas entre los índices de actividad clínica de los perros con EICI y las variables inmunofenotípicas sanguíneas estudiadas. Tan solo se encontraron asociaciones entre las poblaciones de linfocitos T y Tc de sangre periférica y el estado clínico de los animales enfermos.

La existencia de dichas asociaciones podría permitir el empleo de la valoración de estas células como un nuevo biomarcador de utilidad para facilitar el abordaje diagnóstico y la monitorización de la EICI canina. En las últimas décadas diversos grupos de investigación han trabajado en esta línea tanto en medicina humana como veterinaria. Así, en el perro se han identificado múltiples biomarcadores sanguíneos de utilidad relacionados con el estado clínico de los animales, tales como los niveles de proteína C reactiva, de vitamina D, de zinc o de plaquetas (Jergens *et al.*, 2003; Mehain *et al.*, 2019; Wennogle *et al.*, 2019a; Sakai *et al.*, 2020). En cuanto a posibles biomarcadores inmunitarios en perros con EICI se han estudiado ciertos componentes humorales, como citocinas, quimiocinas y anticuerpos. Algunos de ellos parecen tener una buena relación con la actividad clínica de la enfermedad en estos animales, destacando los anticuerpos p-ANCA y el anticuerpo frente a la porina C de la membrana externa bacteriana (OmpC) (Florey *et al.*, 2017; Otoni *et al.*, 2018; Estruch *et al.*, 2020). Sin embargo, en referencia a la posibilidad del uso de biomarcadores inmunitarios celulares en la EICI canina, tan solo hay un estudio en el que se observa una variación de los linfocitos Treg en función de la gravedad de la enfermedad, pero sin llegar a establecer asociaciones con los índices de actividad clínica de la misma (Volkman *et al.*, 2014). Nuestros resultados, en este sentido, mostraron un incremento del porcentaje de linfocitos T en sangre periférica proporcional a la gravedad clínica de la enfermedad evaluada con los índices CIBDAI, CIBDAISI y CCECAI. Este resultado, a pesar de estar presente en los tres índices clínicos, debe tomarse con cautela por el hecho de que no se obtuvo tal asociación con el valor absoluto de dicha población linfocitaria, pudiendo estar los porcentajes influenciados por el resto de poblaciones linfocitarias. En medicina humana, hay un trabajo que describe un incremento de los porcentajes de linfocitos T en sangre periférica de pacientes con

enfermedad de Crohn, aunque no lo relacionan con la gravedad clínica de la enfermedad (Alkim *et al.*, 2007). Nuestra observación es la primera descripción sobre el incremento de los linfocitos T periféricos en relación con la gravedad clínica de la EICI canina.

Por otra parte, también se ha encontrado en este trabajo de investigación una asociación estadística entre el porcentaje de linfocitos Tc en sangre periférica y la gravedad clínica de la enfermedad evaluada con el índice clínico CIBDAISI. Del mismo modo que en el caso anterior, esta asociación solo se ha detectado a nivel porcentual. En medicina humana, la alteración del balance CD8+CD28+/CD8+CD28-, que hace referencia a la población de linfocitos Tc activados en sangre periférica, ha demostrado ser un marcador inmunológico con una alta sensibilidad y especificidad para predecir la gravedad de la enfermedad (Dai *et al.*, 2017). En nuestro estudio, además de emplear otro marcador de activación celular, el CD25, no encontramos esta asociación con la población de linfocitos Tc activados.

Nuestros resultados sugieren que el uso de marcadores inmunológicos en la EICI canina podría ser de gran utilidad, si bien se requieren un mayor número de estudios que incorporen un mayor número de animales para poder determinar la sensibilidad y la especificidad de estos hallazgos.

6.5.2. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices endoscópicos

En la bibliografía consultada no hay referencias sobre la posible asociación entre inmunofenotipo periférico y las lesiones macroscópicas observadas por endoscopia en la EICI. Nuestros resultados en este sentido (tabla 80) son interesantes, teniendo en cuenta que solo se observaron en el grupo de perros con EICI, no encontrándose ni en el grupo control de perros sanos, ni tras la finalización del tratamiento en los perros enfermos.

Se encontró una asociación directamente proporcional entre la población de linfocitos Treg sanguíneos con las lesiones gástricas evaluadas con el índice endoscópico cualitativo de Slovak y colaboradores. Además, cabe mencionar que dicha población se encontró significativamente incrementada en la sangre periférica de los perros con EICI tanto en valor relativo como absoluto, por lo que este hallazgo puede tener cierta relevancia. Por el contrario, se ha observado que a menor porcentaje y valor absoluto de linfocitos T productores de IL-4 en sangre, mayor gravedad de las lesiones macroscópicas gástricas evaluadas con el índice cualitativo de Slovak y colaboradores. Esta asociación podría sugerir un cierto efecto protector

sobre la mucosa gástrica por parte de la IL-4 que ha sido sugerido en pacientes con enfermedad de Crohn con IFN- γ sanguíneo aumentado (Park *et al.*, 2017).

Por otra parte, se ha observado en este estudio que a menor porcentaje de linfocitos sanguíneos Th activados, mayor valor del índice de la WSAVA en la evaluación de las lesiones macroscópicas duodenales en los perros con EICI. Teniendo en cuenta que en los perros que habían requerido tratamiento previo a la primera endoscopia, con una enfermedad más grave y con mayores índices endoscópicos de enfermedad, este porcentaje era menor que en los que no precisaron dicho tratamiento, este hallazgo sugiere un descenso de estas células Th activadas en sangre periférica, especialmente en situaciones de enfermedad en las que la imagen endoscópica sea más grave.

6.5.3. Asociaciones del inmunofenotipo sanguíneo con los valores de los índices histopatológicos

En la literatura consultada tan solo se han encontrado referencias de la asociación del inmunofenotipo sanguíneo y la evolución clínica de la enfermedad para algunas poblaciones linfocitarias de interés (Volkman *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2017). Sin embargo, no hemos encontrado descripciones sobre las posibles asociaciones del inmunofenotipo periférico y las lesiones histopatológicas en la EICI. Nuestros resultados en este sentido (tabla 81) muestran una asociación inversamente proporcional entre los valores absolutos de los linfocitos T productores de IFN- γ y las lesiones histopatológicas morfológicas gástricas evaluadas con el índice de la WSAVA y entre los valores relativos de dicha población linfocitaria y las lesiones histopatológicas gástricas globales evaluadas con el índice de la WSAVA, así como entre esta población linfocitaria tanto en valor relativo como absoluto y la gravedad de las lesiones histopatológicas duodenales encontradas con el índice simplificado de Allenspach y colaboradores. Debemos recordar que precisamente esta población linfocitaria fue significativamente mayor en el epitelio intestinal de los perros enfermos en comparación con el grupo control. Tomando ambos datos en conjunto, un mayor requerimiento de estos linfocitos en el epitelio gastrointestinal puede reflejarse en un descenso a nivel sanguíneo, si bien la confirmación de este hipótesis requeriría nuevos estudios. Por otro lado, también observamos una correlación inversamente proporcional entre el valor relativo y absoluto de la población de linfocitos Th activados en sangre periférica y la gravedad de las lesiones duodenales histopatológicas desde el punto de vista morfológico y global evaluadas con el índice de la WSAVA y las lesiones histopatológicas duodenales evaluadas con el índice simplificado de Allenspach y colaboradores, así como entre el porcentaje de linfocitos Treg periféricos y las

lesiones morfológicas duodenales evaluadas con el índice de la WSAVA. Estos hallazgos parecen sugerir que en los perros afectados de esta enfermedad, cuanto mayor es la lesión duodenal, menor cantidad de linfocitos Th activados y Treg encontraremos en sangre periférica, lo que podría relacionarse con una redistribución de estas células entre los diferentes compartimentos inmunitarios del organismo o una polarización hacia otros tipos de respuesta inmunitaria, concretamente hacia una respuesta mediada por linfocitos Tc. En este sentido, es interesante mencionar la asociación directamente proporcional encontrada entre la población de linfocitos Tc activados totales sanguíneos y la gravedad de las lesiones inflamatorias histopatológicas duodenales evaluadas con el índice de la WSAVA. A pesar de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas para esta población linfocitaria periférica entre nuestros perros con EICI y el grupo control, Dai y colaboradores describieron una alteración del balance de linfocitos Tc activados en sangre periférica en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa en función del estado activo o latente de la enfermedad evaluado clínica e histopatológicamente (Dai *et al.*, 2017).

Para finalizar este apartado queremos remarcar la importancia de las asociaciones descritas, pues se trata del primer estudio que las evalúa en la EICI canina. No obstante, también hay que tener en cuenta en su interpretación la falta de asociación descrita entre el estado clínico, la imagen endoscópica y la lesión histopatológica que acompañan a esta enfermedad en el perro, y el hecho de que algunas asociaciones no fueron encontradas con todos los índices clínicos, endoscópicos o histopatológicos empleados.

7. CONCLUSIONES

A partir del análisis y discusión de los resultados obtenidos y atendiendo a los objetivos planteados al inicio de este trabajo de investigación, se puede concluir lo siguiente:

1. La enfermedad inflamatoria crónica intestinal en la especie canina se caracteriza clínicamente por la combinación de tres o más signos clínicos, con una duración del proceso superior al año en el $44,44 \pm 18,52\%$ de los casos y, aunque las alteraciones en la analítica sanguínea no son una constante entre los perros con esta enfermedad, se detecta un aumento del recuento plaquetario en aproximadamente un tercio de los casos e hipoproteinemia en un cuarto. La aplicación de los índices clínicos de actividad muestra un grado medio de enfermedad moderada utilizando el índice CIBDAI y grave con los índices CIBDAISI y CCECAI.
2. Durante la exploración endoscópica, todos los perros con enfermedad inflamatoria crónica intestinal presentan una afectación macroscópica del duodeno, mostrando lesiones reseñadas tanto por el índice de la WSAVA como por el índice simplificado de Slovak y colaboradores. Además, las lesiones duodenales incluidas en la forma cuantitativa del índice de Slovak y colaboradores se asocian con la gravedad clínica evaluada con los índices CIBDAI y CIBDAISI, hecho que respalda el empleo de este índice simplificado.
3. El estudio histopatológico de las biopsias endoscópicas muestra la presencia de lesiones gástricas y duodenales en todos los perros con enfermedad inflamatoria crónica intestinal, tanto con el índice de la WSAVA como con el índice simplificado de Allenspach y colaboradores.
4. En el perro, el aislamiento de linfocitos intraepiteliales duodenales puede lograrse de manera adecuada mediante la incubación de biopsias endoscópicas en una solución con 1mM de 1,4-dithiothreitol (DTT) y 1mM de tetra-acetato de etilenediamida (EDTA) en baño en agitación a 120 revoluciones por minuto y 37°C durante 90 minutos y posterior filtrado en malla de 40µm. Este protocolo asegura el desprendimiento del epitelio sin afectar a la lámina propia intestinal y permite obtener muestras adecuadas en cuanto al rendimiento celular y pureza para el posterior inmunofenotipaje mediante citometría de flujo.
5. El aislamiento de linfocitos de la lámina propia duodenal en la especie canina puede obtenerse tras la incubación de las biopsias endoscópicas, una vez sometidas al proceso de desprendimiento del epitelio, en baño de agitación a 120 revoluciones por minuto y 37°C durante 16 horas y media en ausencia de componentes enzimáticos y posterior filtrado en malla de 40µm. Con este protocolo se consigue, por vez primera en esta especie, el aislamiento de linfocitos de la lámina propia duodenal con un rendimiento celular y una pureza adecuados para el posterior inmunofenotipaje por citometría de flujo.

Conclusiones

6. La sangre periférica, el epitelio duodenal y la lámina propia duodenal presentan importantes diferencias en las poblaciones de linfocitos T, tanto en perros sanos como en perros con enfermedad inflamatoria crónica intestinal, existiendo una mayor similitud entre el compartimento sanguíneo y la lámina propia duodenal.
7. En el curso de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal canina se observan alteraciones en el inmunofenotipo, destacando en relación a las subpoblaciones de linfocitos T los incrementos de: el porcentaje de linfocitos Th activados y los valores porcentuales y absolutos de linfocitos T reguladores y Th2 en sangre periférica; los porcentajes de linfocitos Tc y T productores de IFN- γ en el epitelio duodenal; y el porcentaje de linfocitos T reguladores en la lámina propia intestinal. En cambio, se observa un descenso de los porcentajes de linfocitos Th, Th activados y T dobles positivos y del cociente CD4/CD8 en el epitelio intestinal de los perros con esta enfermedad.
8. Tras la finalización del tratamiento, el $80\pm 16,33\%$ de los perros con enfermedad inflamatoria crónica intestinal presentan una remisión total del cuadro clínico. El comportamiento de los índices de actividad clínica CIBDAI, CIBDAISI y CCECAI es similar, mostrando un descenso significativo en el control postratamiento. En relación a la evaluación endoscópica, el índice propuesto por el grupo de estandarización de la WSAVA evidencia una reducción significativa de las lesiones endoscópicas gástricas y duodenales evaluadas. Por el contrario, las lesiones histopatológicas no sufren modificaciones significativas como consecuencia del tratamiento, independientemente del índice histopatológico empleado en su evaluación.
9. El tratamiento en los perros con enfermedad inflamatoria crónica intestinal muestra un efecto sobre el inmunofenotipo en los compartimentos intestinales. En el epitelio duodenal, el incremento del porcentaje de los linfocitos Th y del cociente CD4/CD8 acerca a la normalidad ambos parámetros, que se encontraban alterados de forma previa a la terapia. En la lámina propia duodenal, el efecto recae sobre los linfocitos T dobles negativos, que aumentan tras el tratamiento.
10. Diferentes poblaciones sanguíneas de linfocitos T muestran una asociación con los índices clínicos, endoscópicos o histopatológicos que son empleados en la valoración de la gravedad de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal canina, lo que apoya su uso como potenciales biomarcadores en esta enfermedad.

8. CONCLUSIONS

From the analysis and discussion of the results obtained and attending to the aims of this study, the following conclusions can be drawn:

1. Canine inflammatory bowel disease is clinically characterized by the combination of three or more clinical signs that are present in dogs for more than a year in the $44,44 \pm 18,52\%$ of the cases. Although alterations in hematology and blood biochemistry are not always detected in the dogs affected by this disease, an increase in platelet count appears in approximately a third of cases and hypoproteinemia in a quarter of the population. The application of disease clinical activity indexes shows a mean value of total cumulative score that corresponds with a moderate disease with CIBDAI index and a severe with CIBDAISI and CCECAI indexes.
2. During the endoscopic examination, all dogs with inflammatory bowel disease show macroscopic lesions in the duodenum when using the indexes proposed by the WSAVA and by Slovak and coworkers. Furthermore, duodenal lesions included in the quantitative method described by the Slovak and coworkers are associated with clinical severity of the disease when using the CIBDAI and CIBADAISI indexes, supporting the use of this simplified index.
3. The histopathological study of the endoscopic biopsies shows the presence of gastric and duodenal lesions in all dogs with inflammatory bowel disease, both with the WSAVA and with the simplified Allenspach and coworkers indexes.
4. The isolation of canine intraepithelial lymphocytes from the duodenum can be achieved by incubating endoscopic biopsies in a 1mM 1,4-dithiothreitol (DTT) and 1mM ethylenediamide tetra-acetate (EDTA) solution for 90 minutes in a shaking bath at 120 revolutions per minute and 37°C, filtering subsequently the supernatant through a 40µm cell strainer. This protocol ensures the detachment of the epithelium without affecting the intestinal lamina propria and allows to obtain adequate samples in terms of cell yield and purity for immunophenotyping using flow cytometry.
5. The isolation of duodenal lamina propria lymphocytes can be achieved in the dog after the epithelium detachment process by incubating endoscopic biopsies, for 16 hours and a half in a shaking bath at 120 revolutions per minute and 37°C in absence of enzymatic components and filtering the supernatant through a 40µm cell strainer. This cell isolation is described for the first time in dogs, with a method that allows an adequate cell yield and purity for flow cytometry immunophenotyping.

Conclusions

6. Significant differences in T lymphocyte populations does exist amongst peripheral blood, duodenal epithelium and duodenal lamina propria, both in healthy dogs and in dogs with inflammatory bowel disease. When the lymphocytes from these compartments are compared, the greatest similarities are found between the bloodstream and the duodenal lamina propria.
7. Immunophenotype alterations are present in canine inflammatory bowel disease. The percentage of activated Th lymphocytes, and the percentage and absolute values of regulatory T and Th2 lymphocytes in peripheral blood; the percentages of Tc and IFN- γ -producing T lymphocytes in the duodenal epithelium; and the percentage of regulatory T lymphocytes in the intestinal lamina propria are increased. Conversely, the percentages of Th, activated Th and double positive T lymphocytes and the CD4/CD8 ratio in the intestinal epithelium of dogs with this disease are decreased.
8. Treatment induces clinical remission in $80 \pm 16,33\%$ of inflammatory bowel disease dogs. The evolution over time of the CIBDAI, CIBDAISI and CCECAI clinical activity indexes is similar, showing a significant decrease after finishing the treatment. Regarding to the endoscopic evaluation, both gastric and duodenal lesions show a significant reduction when evaluated by the WSAVA index. On the contrary, histopathological lesions do not change significantly after treatment, regardless of the histopathological index used in their evaluation.
9. The intestinal immunophenotype of dogs affected by inflammatory bowel disease is modified by the treatment. The percentage of Th lymphocytes and the CD4/CD8 ratio in the duodenal epithelium, which were altered before treatment, increase after therapy, approaching both parameters to the healthy dogs' values. Double negative T lymphocytes in the duodenal lamina propria increase after treatment.
10. Different T lymphocyte populations from bloodstream are associated with the clinical, endoscopic or histopathological indexes used for the severity classification of canine inflammatory bowel disease, supporting their use as potential biomarkers.

9. RESUMEN



La enfermedad inflamatoria crónica intestinal (EICI) es una enfermedad de etiología desconocida caracterizada por la persistencia y recurrencia de signos clínicos gastrointestinales, siendo la primera causa de diarrea y vómito crónicos en la especie canina. Es considerada una enfermedad inmunomediada en cuyo mecanismo patogénico parecen intervenir factores inmunitarios, dietéticos, genéticos y ambientales interrelacionados. Su diagnóstico se alcanza tras la realización de un correcto protocolo de exclusión de todas aquellas causas que puedan desencadenar un proceso inflamatorio a nivel intestinal y con la evidencia histológica de un infiltrado inflamatorio en la mucosa del intestino delgado, grueso o ambos.

A pesar de que en medicina humana los grandes avances en el estudio de la inmunopatogenia de la EICI han permitido el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas basadas en la inmunoterapia y la descripción de biomarcadores inmunitarios de utilidad, los conocimientos existentes por el momento sobre la alteración del sistema inmunitario en el curso de esta enfermedad en el perro son escasos. Este hecho condujo al planteamiento de este trabajo de investigación, cuyo objetivo principal se centró en la evaluación del inmunofenotipo mediante citometría de flujo, tanto a nivel sanguíneo como intestinal (en el epitelio y en la lámina propia duodenales) en perros con EICI.

Para poder emplear la citometría de flujo en el estudio del inmunofenotipo intestinal fue necesario poner a punto los protocolos para el aislamiento de los linfocitos emplazados en las dos localizaciones inmunitarias efectoras duodenales: el epitelio (LIE) la lámina propia (LLP), ya que en el caso de los LLP esta técnica no había sido previamente descrita para muestras de intestino de perro. En este sentido se ha podido seleccionar un protocolo para cada localización linfocitaria que aporta los criterios de calidad necesarios para el análisis de estos linfocitos por citometría de flujo: adecuadas viabilidad y pureza y buen rendimiento celular.

A continuación, con el fin de evaluar las posibles alteraciones existentes en el inmunofenotipo de los perros con EICI, en primer lugar fue necesario caracterizar las poblaciones de linfocitos que más relevancia parecen tener en la enfermedad mediante citometría de flujo (considerando las poblaciones linfocitarias T, Th, Tc, T dobles positivos, T dobles negativos, Th y Tc activados, Treg, T productores de IFN- γ y de IL-4 tanto en sangre periférica como en biopsias intestinales, y las poblaciones Th1 y Th2 sanguíneas) en 16 perros sanos de distintas edades, sexos y razas, lo que permitió disponer de valores de referencia propios. Por otro lado, mediante el estudio comparativo de la distribución de estas poblaciones linfocitarias en los tres compartimentos inmunitarios analizados: la sangre, el epitelio y la lámina propia duodenal, se evidenció la existencia de grandes diferencias en cuanto a la composición de estos tipos celulares, haciendo patente la importancia de su estudio independiente. Además se ha encontrado una mayor semejanza entre el compartimento sanguíneo y la lámina propia duodenal.

También se llevó a cabo una caracterización clínica, endoscópica e histopatológica de la EICI canina, empleando para ello los índices propuestos por los grupos de expertos en la materia en un grupo de 36 perros con esta enfermedad. Así, se ha reafirmado la práctica ausencia de relación entre la situación clínica y las imágenes endoscópicas e histopatológicas que acompañan a esta enfermedad en la especie canina, incluso con la utilización de índices endoscópicos e histopatológicos simplificados destinados a evitar esta situación.

Posteriormente, se realizó el inmunofenotipaje de los linfocitos T sanguíneos y de los compartimentos efectores duodenales en estos animales con EICI. La comparativa de estos resultados con los de los perros sanos del estudio permitió comprobar que en los perros enfermos se produce un incremento significativo para un valor de confianza del 95% con respecto a los valores medios de los perros sanos en el porcentaje de linfocitos Th activados, y en el porcentaje y en el valor absoluto de los linfocitos Treg y Th2 sanguíneos. En el intestino, por su parte, se observa un descenso significativo del porcentaje de linfocitos Th, T dobles positivos, Th activados y del cociente CD4/CD8 en el epitelio duodenal, frente al incremento de los porcentajes de linfocitos Tc y T productores de IFN- γ en esta misma localización, y del porcentaje de linfocitos Treg de la lámina propia. Estos hallazgos evidencian la alteración del inmunofenotipo tanto sistémico como intestinal en el curso de la EICI canina.

Seguidamente, se realizó la evaluación de la evolución clínica, endoscópica e histopatológica, así como de las distintas poblaciones de linfocitos T periféricos y duodenales en 10 perros con EICI tras la finalización del tratamiento inmunosupresor administrado. De esta manera, observamos una remisión completa de los signos clínicos en el $80 \pm 16,33\%$ de estos animales, hecho reflejado por un descenso significativo del valor de los índices clínicos empleados. Macroscópicamente también se evidenció una mejoría significativa de las lesiones gástricas y duodenales, pero, por el contrario, las lesiones histopatológicas no sufrieron un cambio significativo tras la aplicación de la terapia. El inmunofenotipo periférico no mostró variaciones en relación al tratamiento. Sin embargo, en referencia al inmunofenotipo intestinal se observó un incremento significativo del porcentaje de linfocitos Th y del cociente CD4/CD8 a nivel del epitelio, y del porcentaje de linfocitos T dobles negativos en la lámina propia duodenal.

Finalmente, se realizó el estudio de la posible existencia de asociaciones entre el inmunofenotipo sanguíneo y los valores de los índices clínicos, endoscópicos e histopatológicos en los perros con EICI, valorando así la potencial utilidad de los parámetros inmunitarios obtenidos de modo mínimamente invasivo como biomarcadores de la enfermedad. En este sentido, se comprobó la existencia de una asociación directamente proporcional entre: el porcentaje de linfocitos T y Tc y la gravedad clínica de la enfermedad, el porcentaje y el valor absoluto de los linfocitos Treg y las lesiones macroscópicas gástricas y entre el recuento de

linfocitos Tc activados y las lesiones histopatológicas duodenales. Por el contrario, se observó una relación inversamente proporcional entre: el porcentaje y el valor absoluto de los linfocitos T productores de IL-4 y las lesiones macroscópicas gástricas, el porcentaje de linfocitos Th activados y las lesiones endoscópicas duodenales, el porcentaje y el valor absoluto de los linfocitos T productores de IFN- γ y las lesiones histopatológicas gástricas y duodenales, entre el porcentaje y el valor absoluto de la población de linfocitos Th activados y las lesiones histopatológicas duodenales y entre el recuento de linfocitos Treg y las lesiones histopatológicas duodenales. Estas asociaciones, observadas de forma exclusiva en los perros con EICI, apoyan la utilidad del uso de dichas poblaciones como biomarcadores en esta enfermedad.

10. SUMMARY



The etiology of inflammatory bowel disease (IBD) is unknown. This entity is characterized by the persistence and recurrence of gastrointestinal clinical signs and is considered the main cause of chronic vomiting and diarrhea in dogs. Interrelated immunological, dietary, genetic and environmental factors appear to play a role in the pathogenesis of this immune-mediated disease. Its diagnosis is achieved after carrying out an exclusion protocol of all the potential causes of intestinal inflammation, accompanied by histological evidence of mucosal inflammatory infiltrate.

In human medicine, the great advances reached in the study of IBD immunopathogenesis have allowed the development of new therapeutics based on immunotherapy and the description of useful immune biomarkers. However, the knowledge of immune system alterations during canine IBD is limited. For this reason, in the current study the peripheral blood and intestinal immunophenotype of dogs with IBD was assessed by flow cytometry.

In order to use flow cytometry for intestinal immunophenotyping, the first step was the development of protocols for intraepithelial and lamina propria duodenal lymphocytes (IEL and LPL, respectively) isolation, taking into account that this technique had not been previously reported in dogs for LPL isolation. Therefore, specific protocols for each intestinal location were selected, ensuring the achievement of optimal viability, purity and cell yield quality criteria for flow cytometry evaluation of lymphocytes.

Secondly, it was necessary to characterize the lymphocyte populations T, Th, Tc, double positive T, double negative T, activated Th and Tc, IFN- γ - and IL-4- producing T in both peripheral blood and intestinal biopsies, and Th1 and Th2 in the bloodstream in 16 healthy dogs of different age, sex and breed. These data allowed us to have our own reference ranges. In addition, the comparative study of lymphocyte distribution in the three immune compartments analyzed (peripheral blood, duodenal epithelium and lamina propria), highlighted the great differences in the composition of these locations, with the greatest differences found between duodenal epithelium and the other two compartments. This fact supports the importance of its independent study.

Moreover, a clinical, endoscopic and histopathological characterization of canine IBD was carried out using the indexes proposed by the experts in the field by the study of 36 dogs affected by this disease. The almost absence of correlation between clinical, endoscopic and histopathological severity that accompanies this disease in dogs has been confirmed, even with the use of simplified endoscopic and histopathological indexes developed to avoid this situation.

Subsequently, the peripheral blood, duodenal epithelium and lamina propria immunophenotypes were evaluated in the IBD-affected dogs and compared with the healthy dogs'

Summary

values. Dogs with IBD showed an increase in the percentage of activated Th lymphocytes and in the percentage and relative count of Treg and Th2 cells from bloodstream. In the intestine, a decrease in the epithelial percentage of Th, double positive T, and activated Th cells and in the CD4/CD8 ratio; and an increase in the epithelial percentage of Tc and IFN- γ -producing T lymphocytes and lamina propria Treg lymphocytes percentages were observed. These findings show the alteration of both systemic and intestinal immunophenotype in the canine IBD course.

Evolution of clinical, endoscopic and histopathological characteristics and peripheral blood and duodenal immunophenotype was evaluated in 10 dogs with IBD after the completion of the immunosuppressive treatment. In this way, clinical remission was observed in $80 \pm 16,33\%$ of these animals, reflected by a significant decrease in the clinical activity indexes values. Macroscopically, a significant improvement in both gastric and duodenal lesions detected during endoscopy was evidenced. On the contrary, histopathological lesions did not undergo a significant change. The peripheral immunophenotype did not show variations in relation to treatment. However, in reference to intestinal immunophenotype, increases in the epithelial percentage of Th lymphocytes, and in the ratio CD4/CD8 and in the percentage of lamina propria double negative T cells were observed.

Finally, associations between the peripheral blood immunophenotype and the values of clinical, endoscopic and histopathological indexes were evaluated in order to study their potential utility as disease biomarkers. A direct proportional relationship was found between: the percentage of T and Tc lymphocytes and the clinical severity of the disease, the percentage and the relative count of Treg lymphocytes and the endoscopic gastric lesions, and the relative count of activated Tc lymphocytes and the duodenal histopathological lesions. Nevertheless, an inversely proportional relationship was observed between: the percentage and the relative count of IL-4-producing T lymphocytes and the macroscopic gastric lesions, the percentage of activated Th lymphocytes and the duodenal endoscopic lesions, the percentage and the relative count of IFN- γ -producing T lymphocytes and the gastric and duodenal histopathological lesions, the percentage and the relative count of the activated Th lymphocytes and the duodenal histopathological lesions, and the relative count of Treg lymphocytes and the duodenal histopathological lesions. These associations, that were observed exclusively in dogs with IBD, support the usefulness of these immunity cells as canine IBD biomarkers.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu M.T. (2010). "Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function". *Nat Rev Immunol.* 10, 131-144.
- Abuzakouk M., Carton J., Feighery C., O'Donoghue D.P., Weir D.G., O'Farrelly C. (1998). "CD4+ CD8+ and CD8alpha+ beta- T lymphocytes in human small intestinal lamina propria". *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 10, 325-329.
- Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y., Nalbant A. (2017). "Flow cytometry: basic principles and applications". *Crit Rev Biotechnol.* 37, 163-176.
- Agace W.W. (2008). "T-cell recruitment to the intestinal mucosa". *Trends Immunol.* 29, 514-522.
- Agace W. (2010). "Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa". *Immunol Lett.* 128, 21-23.
- Ahluwalia B., Magnusson M.K., Ohman L. (2017). "Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad". *Scand J Gastroenterol.* 52, 1185-1193.
- Akiyama S., Asahina R., Ohta H., Tsukui T., Nishida H., Kamishina H., Maeda S. (2019). "Th17 cells increase during maturation in peripheral blood of healthy dogs". *Vet Immunol Immunopathol.* 209, 17-21.
- Alam R., Gorska M. (2003). "3. Lymphocytes". *J Allergy Clin Immunol.* 111, S476-485.
- Alexandre-Pires G., de Brito M.T., Alguero C., Martins C., Rodrigues O.R., da Fonseca I.P., Santos-Gomes G. (2010). "Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs". *Vet Immunol Immunopathol.* 137, 275-283.
- Algeri M., Conforti A., Pitisci A., Starc N., Tomao L., Bernardo M.E., Locatelli F. (2015). "Mesenchymal stromal cells and chronic inflammatory bowel disease". *Immunol Lett.* 168, 191-200.
- Alkim C., Balci M., Alkim H., Dağlı U., Parlak E., Tezel A., Ulker A. (2007). "The importance of peripheral immune cells in inflammatory bowel disease". *Turk J Gastroenterol.* 18, 82-88.
- Allenspach K., Bergman P.J., Sauter S., Gröne A., Doherr M.G., Gaschen F. (2006a). "P-glycoprotein Expression in Lamina Propria Lymphocytes of Duodenal Biopsy Samples in Dogs with Chronic Idiopathic Enteropathies". *Journal of Comparative Pathology.* 134, 1-7.
- Allenspach K., Rufenacht S., Sauter S., Grone A., Steffan J., Strehlau G., Gaschen F. (2006b). "Pharmacokinetics and clinical efficacy of cyclosporine treatment of dogs with steroid-refractory inflammatory bowel disease". *J Vet Intern Med.* 20, 239-244.
- Allenspach K., Steiner J.M., Shah B.N., Berghoff N., Ruaux C., Williams D.A., Blum J.W., Gaschen F. (2006c). "Evaluation of gastrointestinal permeability and mucosal absorptive capacity in dogs with chronic enteropathy". *Am J Vet Res.* 67, 479-483.
- Allenspach K., Wieland B., Gröne A., Gaschen F. (2007). "Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome". *J Vet Intern Med.* 21, 700-708.
- Allenspach K., Lomas B., Wieland B., Harris T., Pressler B., Mancho C., Lees G.E., Vaden S.L. (2008). "Evaluation of perinuclear anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibodies as an early marker of protein-losing enteropathy and protein-losing nephropathy in Soft Coated Wheaten Terriers". *Am J Vet Res.* 69, 1301-1304.

Bibliografía

- Allenspach K., House A., Smith K., McNeill F.M., Hendricks A., Elson-Riggins J., Riddle A., Steiner J.M., Werling D., Garden O.A., *et al.*, (2010). "Evaluation of mucosal bacteria and histopathology, clinical disease activity and expression of Toll-like receptors in German shepherd dogs with chronic enteropathies". *Vet Microbiol.* 146, 326-335.
- Allenspach K., Culverwell C., Chan D. (2016). "Long-term outcome in dogs with chronic enteropathies: 203 cases". *Vet Rec.* 178, 368.
- Allenspach K.A., Mochel J.P., Du Y., Priestnall S.L., Moore F., Slayter M., Rodrigues A., Ackermann M., Krockenberger M., Mansell J., *et al.*, (2019). "Correlating Gastrointestinal Histopathologic Changes to Clinical Disease Activity in Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease". *Vet Pathol.* 56, 435-443.
- Allman D., Pillai S. (2008). "Peripheral B cell subsets". *Curr Opin Immunol.* 20, 149-157.
- AlShawaqfeh M.K., Wajid B., Minamoto Y., Markel M., Lidbury J.A., Steiner J.M., Serpedin E., Suchodolski J.S. (2017). "A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy". *FEMS Microbiol Ecol.* 93
- Andrews J.M., Holtmann G. (2011). "IBD: Stress causes flares of IBD--how much evidence is enough?". *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 8, 13-14.
- Aniwan S., Park S.H., Loftus E.V., Jr. (2017). "Epidemiology, Natural History, and Risk Stratification of Crohn's Disease". *Gastroenterol Clin North Am.* 46, 463-480.
- Annese V., Duricova D., Gower-Rousseau C., Jess T., Langholz E. (2016). "Impact of New Treatments on Hospitalisation, Surgery, Infection, and Mortality in IBD: a Focus Paper by the Epidemiology Committee of ECCO". *J Crohns Colitis.* 10, 216-225.
- Apostolaki M., Manoloukos M., Roulis M., Wurbel M.A., Müller W., Papadakis K.A., Kontoyiannis D.L., Malissen B., Kollias G. (2008). "Role of beta7 integrin and the chemokine/chemokine receptor pair CCL25/CCR9 in modeled TNF-dependent Crohn's disease". *Gastroenterology.* 134, 2025-2035.
- Atherly T., Rossi G., White R., Seo Y.-J., Wang C., Ackermann M., Breuer M., Allenspach K., Mochel J.P., Jergens A.E. (2019). "Glucocorticoid and dietary effects on mucosal microbiota in canine inflammatory bowel disease". *PLoS ONE.* 14
- Azad M.B., Konya T., Maughan H., Guttman D.S., Field C.J., Chari R.S., Sears M.R., Becker A.B., Scott J.A., Kozyrskyj A.L. (2013). "Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months". *Cmaj.* 185, 385-394.
- Ban H., Andoh A., Shioya M., Nishida A., Tsujikawa T., Fujiyama Y. (2008). "Increased number of FoxP3+CD4+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease". *Mol Med Rep.* 1, 647-650.
- Barbosa V. (2011). "Obtaining cells from colon of dog with leishmaniasis for flow cytometric analysis". *Protocol Exchange.* DOI:10.1038.
- Barclay A.R., Russell R.K., Wilson M.L., Gilmour W.H., Satsangi J., Wilson D.C. (2009). "Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease". *J Pediatr.* 155, 421-426.
- Bastan I., Robinson N.A., Ge X.N., Rendahl A.K., Rao S.P., Washabau R.J., Sriramaraio P. (2017). "Assessment of eosinophil peroxidase as a potential diagnostic and prognostic marker in dogs with inflammatory bowel disease". *Am J Vet Res.* 78, 36-41.
- Batista F.D., Harwood N.E. (2009). "The who, how and where of antigen presentation to B cells". *Nat Rev Immunol.* 9, 15-27.

- Bekiaris V., Persson E.K., Agace W.W. (2014). "Intestinal dendritic cells in the regulation of mucosal immunity". *Immunol Rev.* 260, 86-101.
- Benchimol E.I., Mack D.R., Guttman A., Nguyen G.C., To T., Mojaverian N., Quach P., Manuel D.G. (2015). "Inflammatory bowel disease in immigrants to Canada and their children: a population-based cohort study". *Am J Gastroenterol.* 110, 553-563.
- Bensignor E., Morgan D.M., Nuttall T. (2008). "Efficacy of an essential fatty acid-enriched diet in managing canine atopic dermatitis: a randomized, single-blinded, cross-over study". *Vet Dermatol.* 19, 156-162.
- Benvenuti E., Pierini A., Gori E., Bartoli F., Erba P., Ruggiero P., Marchetti V. (2020). "Serum amino acid profile in 51 dogs with immunosuppressant-responsive enteropathy (IRE): a pilot study on clinical aspects and outcomes". *BMC Vet Res.* 16, 117.
- Berghoff N., Ruaux C.G., Steiner J.M., Williams D.A. (2007). "Gastroenteropathy in Norwegian Lundehunds". *Compend Contin Educ Vet.* 29, 456-465, 468-470; quiz 470-451.
- Berghoff N., Steiner J.M. (2011). "Laboratory tests for the diagnosis and management of chronic canine and feline enteropathies". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 41, 311-328.
- Berghoff N., Hill S., Parnell N.K., Mansell J., Suchodolski J.S., Steiner J.M. (2014). "Fecal and urinary N-methylhistamine concentrations in dogs with chronic gastrointestinal disease". *Vet J.* 201, 289-294.
- Bernardo D., Chaparro M., Gisbert J.P. (2018). "Human Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases". *Mol Nutr Food Res.* 62, e1700931.
- Biller B.J., Elmslie R.E., Burnett R.C., Avery A.C., Dow S.W. (2007). "Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer". *Vet Immunol Immunopathol.* 116, 69-78.
- Billiau A., Matthys P. (2009). "Interferon-gamma: a historical perspective". *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 97-113.
- Billmeier U., Dieterich W., Neurath M.F., Atreya R. (2016). "Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases". *World J Gastroenterol.* 22, 9300-9313.
- Binder M.T., Becker E., Wiendl M., Schleier L., Fuchs F., Leppkes M., Atreya R., Neufert C., Atreya I., Neurath M.F., *et al.*, (2018). "Similar Inhibition of Dynamic Adhesion of Lymphocytes From IBD Patients to MAdCAM-1 by Vedolizumab and Etrolizumab-s". *Inflamm Bowel Dis.* 24, 1237-1250.
- Bismarck D., Schutze N., Moore P., Buttner M., Alber G., Buttlar H. (2012). "Canine CD4+CD8+ double positive T cells in peripheral blood have features of activated T cells". *Vet Immunol Immunopathol.* 149, 157-166.
- Bismarck D., Moore P.F., Alber G., von Buttlar H. (2014). "Canine CD4(+)CD8(+) double-positive T cells can develop from CD4(+) and CD8(+) T cells". *Vet Immunol Immunopathol.* 162, 72-82.
- Blake A.B., Guard B.C., Honneffer J.B., Lidbury J.A., Steiner J.M., Suchodolski J.S. (2019). "Altered microbiota, fecal lactate, and fecal bile acids in dogs with gastrointestinal disease". *PLoS One.* 14, e0224454.
- Bleesing J.J., Fleisher T.A. (2001). "Immunophenotyping". *Semin Hematol.* 38, 100-110.
- Blount D.G., Pritchard D.I., Heaton P.R. (2005). "Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs". *Vet Immunol Immunopathol.* 108, 399-407.

Bibliografía

- Blue M.L., Daley J.F., Levine H., Schlossman S.F. (1985). "Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry". *J Immunol.* 134, 2281-2286.
- Bonilla F.A., Oettgen H.C. (2010). "Adaptive immunity". *J Allergy Clin Immunol.* 125, S33-40.
- Brandtzaeg P., Carlsen H.S., Halstensen T.S. (2006). "The B-cell system in inflammatory bowel disease". *Adv Exp Med Biol.* 579, 149-167.
- Brandtzaeg P. (2009). "Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions". *Scand J Immunol.* 70, 505-515.
- Brandtzaeg P. (2010). "Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease". *Curr Opin Gastroenterol.* 26, 554-563.
- Brandtzaeg P., Kiyono H., Pabst R., Russell M.W. (2008). "Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue". *Mucosal Immunol.* 1, 31-37.
- Braun L., Lester S., Kuzma A.B., Hosie S.C. (1996). "Gastric dilatation-volvulus in the dog with histological evidence of preexisting inflammatory bowel disease: a retrospective study of 23 cases". *J Am Anim Hosp Assoc.* 32, 287-290.
- Breitschwerdt E.B., Waltman C., Hagstad H.V., Ochoa R., McClure J., Barta O. (1982). "Clinical and epidemiologic characterization of a diarrheal syndrome in Basenji dogs". *J Am Vet Med Assoc.* 180, 914-920.
- Breitschwerdt E.B. (1992). "Immunoproliferative enteropathy of basenjis". *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 7, 153-161.
- Brubaker S.W., Bonham K.S., Zanoni I., Kagan J.C. (2015). "Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective". *Annu Rev Immunol.* 33, 257-290.
- Brummelman J., Pilipow K., Lugli E. (2018). "The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8(+) and CD4(+) T Cells". *Int Rev Cell Mol Biol.* 341, 63-124.
- Bruno G., Saracino A., Monno L., Angarano G. (2017). "The Revival of an "Old" Marker: CD4/CD8 Ratio". *AIDS Rev.* 19, 81-88.
- Bryant R.V., Winer S., Travis S.P., Riddell R.H. (2014). "Systematic review: histological remission in inflammatory bowel disease. Is 'complete' remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative". *J Crohns Colitis.* 8, 1582-1597.
- Bryant R.V., Burger D.C., Delo J., Walsh A.J., Thomas S., von Herbay A., Buchel O.C., White L., Brain O., Keshav S., *et al.*, (2016). "Beyond endoscopic mucosal healing in UC: histological remission better predicts corticosteroid use and hospitalisation over 6 years of follow-up". *Gut.* 65, 408-414.
- Burgener I.A., König A., Allenspach K., Sauter S.N., Boisclair J., Doherr M.G., Jungi T.W. (2008). "Upregulation of toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs". *J Vet Intern Med.* 22, 553-560.
- Bush W.W., Kimmel S.E., Wosar M.A., Jackson M.W. (2001). "Secondary hypoparathyroidism attributed to hypomagnesemia in a dog with protein-losing enteropathy". *J Am Vet Med Assoc.* 219, 1732-1734, 1708.
- Byrne K.M., Kim H.W., Chew B.P., Reinhart G.A., Hayek M.G. (2000). "A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes". *Vet Immunol Immunopathol.* 73, 167-182.

- Carrasco A., Mane J., Santaolalla R., Pedrosa E., Mallolas J., Loren V., Fernandez M., Fernandez-Banares F., Rosinach M., Loras C., *et al.*, (2013). "Comparison of lymphocyte isolation methods for endoscopic biopsy specimens from the colonic mucosa". *J Immunol Methods*. 389, 29-37.
- Carrasco V., Rodríguez-Bertos A., Rodríguez-Franco F., Wise A.G., Maes R., Mullaney T., Kiupel M. (2015). "Distinguishing Intestinal Lymphoma From Inflammatory Bowel Disease in Canine Duodenal Endoscopic Biopsy Samples". *Vet Pathol*. 52, 668-675.
- Cartwright J.A., Hill T.L., Smith S., Shaw D. (2016). "Evaluating Quality and Adequacy of Gastrointestinal Samples Collected using Reusable or Disposable Forceps". *J Vet Intern Med*. 30, 1002-1007.
- Casamian-Sorrosal D., Willard M.D., Murray J.K., Hall E.J., Taylor S.S., Day M.J. (2010). "Comparison of histopathologic findings in biopsies from the duodenum and ileum of dogs with enteropathy". *J Vet Intern Med*. 24, 80-83.
- Cave N. (2013) "Adverse food reactions". En: Washabau R., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA. 1st Edtn. Pp 398-408.
- Cerquetella M., Spaterna A., Laus F., Tesei B., Rossi G., Antonelli E., Villanacci V., Bassotti G. (2010). "Inflammatory bowel disease in the dog: differences and similarities with humans". *World J Gastroenterol*. 16, 1050-1056.
- Cerquetella M., Rossi G., Suchodolski J.S., Schmitz S.S., Allenspach K., Rodríguez-Franco F., Furlanello T., Gavazza A., Marchegiani A., Unterer S., *et al.*, (2020). "Proposal for rational antibacterial use in the diagnosis and treatment of dogs with chronic diarrhoea". *J Small Anim Pract*. 61, 211-215.
- Chaitman J., Ziese A.L., Pilla R., Minamoto Y., Blake A.B., Guard B.C., Isaiah A., Lidbury J.A., Steiner J.M., Unterer S., *et al.*, (2020). "Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole". *Front Vet Sci*. 7, 192.
- Chamness C.J. (2013) "Endoscopy". En: washabau R., day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. 1st Edtn. Pp 267-321. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri,
- Chang J.S., Ocvirk S., Berger E., Kisling S., Binder U., Skerra A., Lee A.S., Haller D. (2012). "Endoplasmic reticulum stress response promotes cytotoxic phenotype of CD8 $\alpha\beta$ ⁺ intraepithelial lymphocytes in a mouse model for Crohn's disease-like ileitis". *J Immunol*. 189, 1510-1520.
- Chen T., Zhou Q., Zhang D., Jiang F., Wu J., Zhou J.Y., Zheng X., Chen Y.G. (2018). "Effect of Faecal Microbiota Transplantation for Treatment of Clostridium difficile Infection in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies". *J Crohns Colitis*. 12, 710-717.
- Cheroutre H. (2006). "In IBD eight can come before four". *Gastroenterology*. 131, 667-670.
- Cheroutre H., Lambolez F., Mucida D. (2011). "The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes". *Nat Rev Immunol*. 11, 445-456.
- Chisolm D.A., Weinmann A.S. (2015). "TCR-Signaling Events in Cellular Metabolism and Specialization". *Front Immunol*. 6, 292.
- Cibor D., Domagala-Rodacka R., Rodacki T., Jurczyszyn A., Mach T., Owczarek D. (2016). "Endothelial dysfunction in inflammatory bowel diseases: Pathogenesis, assessment and implications". *World J Gastroenterol*. 22, 1067-1077.
- Cobbold S., Metcalfe S. (1994). "Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW)". *Tissue Antigens*. 43, 137-154.

Bibliografía

- Collin M., Bigley V. (2018). "Human dendritic cell subsets: an update". *Immunology*. 154, 3-20.
- Colombel J.F., Rutgeerts P., Reinisch W., Esser D., Wang Y., Lang Y., Marano C.W., Strauss R., Oddens B.J., Feagan B.G., *et al.*, (2011). "Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis". *Gastroenterology*. 141, 1194-1201.
- Cominelli F., Nast C.C., Duchini A., Lee M. (1992). "Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis". *Gastroenterology*. 103, 65-71.
- Commins S.P., Borish L., Steinke J.W. (2010). "Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines". *J Allergy Clin Immunol*. 125, S53-72.
- Cortese L., Annunziatella M., Palatucci A.T., Rubino V., Piantedosi D., Di Loria A., Ruggiero G., Ciaramella P., Terrazzano G. (2013). "Regulatory T cells, Cytotoxic T lymphocytes and a T(H)1 cytokine profile in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*". *Res Vet Sci*. 95, 942-949.
- Cortese L., Annunziatella M., Palatucci A.T., Lanzilli S., Rubino V., Di Cerbo A., Centenaro S., Guidetti G., Canello S., Terrazzano G. (2015). "An immune-modulating diet increases the regulatory T cells and reduces T helper 1 inflammatory response in Leishmaniosis affected dogs treated with standard therapy". *BMC Vet Res*. 11, 295.
- Craven M., Simpson J.W., Ridyard A.E., Chandler M.L. (2004a). "Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002)". *J Small Anim Pract*. 45, 336-342.
- Craven M., Simpson J.W., Ridyard A.E., Chandler M.L. (2004b). "Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002)". *Journal of Small Animal Practice*. 45, 336-342.
- Craven M.D., Washabau R.J. (2019). "Comparative pathophysiology and management of protein-losing enteropathy". *J Vet Intern Med*. 33, 383-402.
- Cray C., Zaias J., Altman N.H. (2009). "Acute phase response in animals: a review". *Comp Med*. 59, 517-526.
- Creevy K.E., Grady J., Little S.E., Moore G.E., Strickler B.G., Thompson S., Webb J.A. (2019). "2019 AAHA Canine Life Stage Guidelines". *J Am Anim Hosp Assoc*. 55, 267-290.
- Cresci G.A., Bawden E. (2015). "Gut Microbiome: What We Do and Don't Know". *Nutr Clin Pract*. 30, 734-746.
- D'Alessio S., Tacconi C., Fiocchi C., Danese S. (2013). "Advances in therapeutic interventions targeting the vascular and lymphatic endothelium in inflammatory bowel disease". *Curr Opin Gastroenterol*. 29, 608-613.
- D'Haens G., Van Deventer S., Van Hogeand R., Chalmers D., Kothe C., Baert F., Braakman T., Schaible T., Geboes K., Rutgeerts P. (1999). "Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial". *Gastroenterology*. 116, 1029-1034.
- da Costa Gonçalves F., Paz A.H. (2019). "Cell membrane and bioactive factors derived from mesenchymal stromal cells: Cell-free based therapy for inflammatory bowel diseases". *World J Stem Cells*. 11, 618-633.
- Dai S.X., Gu H.X., Lin Q.Y., Huang S.Z., Xing T.S., Zhang Q.F., Wu G., Chen M.H., Tan W.E., Jian H.J., *et al.*, (2017). "CD8(+)/CD28(+)/CD8(+)/CD28(-) T cell equilibrium can predict the active stage for patients with inflammatory bowel disease". *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 41, 693-702.

- Dandrieux J.R., Bornand V.F., Doherr M.G., Kano R., Zurbriggen A., Burgener I.A. (2008). "Evaluation of lymphocyte apoptosis in dogs with inflammatory bowel disease". *Am J Vet Res.* 69, 1279-1285.
- Dandrieux J.R., Noble P.J., Scase T.J., Cripps P.J., German A.J. (2013). "Comparison of a chlorambucil-prednisolone combination with an azathioprine-prednisolone combination for treatment of chronic enteropathy with concurrent protein-losing enteropathy in dogs: 27 cases (2007-2010)". *J Am Vet Med Assoc.* 242, 1705-1714.
- Dandrieux J.R. (2016). "Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same?". *J Small Anim Pract.* 57, 589-599.
- Dandrieux J.R., Martinez Lopez L.M., Stent A., Jergens A., Allenspach K., Nowell C.J., Firestone S.M., Kimpton W., Mansfield C.S. (2018). "Changes in duodenal CD163-positive cells in dogs with chronic enteropathy after successful treatment". *Innate Immun.* 24, 400-410.
- Danese S., Scaldaferrì F., Papa A., Pola R., Sans M., Gasbarrini G., Pola P., Gasbarrini A. (2004). "Platelets: new players in the mucosal scenario of inflammatory bowel disease". *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 8, 193-198.
- Danese S. (2011). "Role of the vascular and lymphatic endothelium in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: 'brothers in arms'". *Gut.* 60, 998-1008.
- Darfeuille-Michaud A., Boudeau J., Bulois P., Neut C., Glasser A.L., Barnich N., Bringer M.A., Swidsinski A., Beaugerie L., Colombel J.F. (2004). "High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease". *Gastroenterology.* 127, 412-421.
- Davis M.S., Willard M.D., Nelson S.L., Mandsager R.E., McKiernan B.S., Mansell J.K., Lehenbauer T.W. (2003). "Prevalence of gastric lesions in racing Alaskan sled dogs". *J Vet Intern Med.* 17, 311-314.
- Davis M.S., Willard M.D., Williamson K.K., Steiner J.M., Williams D.A. (2005). "Sustained strenuous exercise increases intestinal permeability in racing Alaskan sled dogs". *J Vet Intern Med.* 19, 34-39.
- Day M.J., Bilzer T., Mansell J., Wilcock B., Hall E.J., Jergens A., Minami T., Willard M., Washabau R. (2008). "Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group". *J Comp Pathol.* 138 Suppl 1, S1-43.
- de Godoy M.R., Kerr K.R., Fahey G.C., Jr. (2013). "Alternative dietary fiber sources in companion animal nutrition". *Nutrients.* 5, 3099-3117.
- de Mattos B.R., Garcia M.P., Nogueira J.B., Paiatto L.N., Albuquerque C.G., Souza C.L., Fernandes L.G., Tamashiro W.M., Simioni P.U. (2015). "Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments". *Mediators Inflamm.* 2015, 493012.
- de Souza H.S., Fiocchi C. (2016). "Immunopathogenesis of IBD: current state of the art". *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 13, 13-27.
- de Souza H.S.P. (2017). "Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: today and tomorrow". *Curr Opin Gastroenterol.* 33, 222-229.
- de Souza H.S.P., Fiocchi C., Iliopoulos D. (2017). "The IBD interactome: an integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy". *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 14, 739-749.
- Delaney F., O'Brien R.T., Waller K. (2003). "Ultrasound evaluation of small bowel thickness compared to weight in normal dogs". *Vet Radiol Ultrasound.* 44, 577-580.

Bibliografía

- den Haan J.M., Arens R., van Zelm M.C. (2014). "The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells". *Immunol Lett.* 162, 103-112.
- Dicksved J., Halfvarson J., Rosenquist M., Järnerot G., Tysk C., Apajalahti J., Engstrand L., Jansson J.K. (2008). "Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease". *Isme j.* 2, 716-727.
- Dijkstra M., Kraus J.S., Bosje J.T., Den Hertog E. (2010). "[Protein-losing enteropathy in Rottweilers]". *Tijdschr Diergeneeskd.* 135, 406-412.
- Dunkelberger J.R., Song W.C. (2010). "Complement and its role in innate and adaptive immune responses". *Cell Res.* 20, 34-50.
- Dye T.L., Diehl K.J., Wheeler S.L., Westfall D.S. (2013). "Randomized, controlled trial of budesonide and prednisone for the treatment of idiopathic inflammatory bowel disease in dogs". *J Vet Intern Med.* 27, 1385-1391.
- Eastaff-Leung N., Mabarrack N., Barbour A., Cummins A., Barry S. (2010). "Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease". *J Clin Immunol.* 30, 80-89.
- Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora". *Science.* 308, 1635-1638.
- Eckersall P.D., Bell R. (2010). "Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine". *Vet J.* 185, 23-27.
- Eissa N., Kittana H., Gomes-Neto J.C., Hussein H. (2019). "Mucosal immunity and gut microbiota in dogs with chronic enteropathy". *Res Vet Sci.* 122, 156-164.
- Elwood C.M., Hamblin A.S., Batt R.M. (1997). "Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subsets and MHC class II expression in the canine small intestine". *Vet Immunol Immunopathol.* 58, 195-207.
- Engelmann N., Ondreka N., von Pückler K., Mohrs S., Sicken J., Neiger R. (2017). "Applicability of (99m) Tc-Labeled Human Serum Albumin Scintigraphy in Dogs With Protein-Losing Enteropathy". *J Vet Intern Med.* 31, 365-370.
- Estruch J.J., Barken D., Bennett N., Krawiec D.K., Ogilvie G.K., Powers B.E., Polansky B.J., Sueda M.T. (2020). "Evaluation of novel serological markers and autoantibodies in dogs with inflammatory bowel disease". *J Vet Intern Med.* 34, 1177-1186.
- Faldyna M., Leva L., Knotigova P., Toman M. (2001). "Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs--a flow cytometric study". *Vet Immunol Immunopathol.* 82, 23-37.
- Falk P.G., Hooper L.V., Midtvedt T., Gordon J.I. (1998). "Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology". *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 1157-1170.
- Fietta P., Delsante G. (2009). "The effector T helper cell triade". *Riv Biol.* 102, 61-74.
- Filippone R.T., Sahakian L., Apostolopoulos V., Nurgali K. (2019). "Eosinophils in Inflammatory Bowel Disease". *Inflamm Bowel Dis.* 25, 1140-1151.
- Flippe L., Bezie S., Anegon I., Guillonneau C. (2019). "Future prospects for CD8(+) regulatory T cells in immune tolerance". *Immunol Rev.* 292, 209-224.

- Florej J., Viall A., Streu S., DiMuro V., Riddle A., Kirk J., Perazzotti L., Affeldt K., Wagner R., Vaden S., *et al.*, (2017). "Use of a Granulocyte Immunofluorescence Assay Designed for Humans for Detection of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in Dogs with Chronic Enteropathies". *J Vet Intern Med.* 31, 1062-1066.
- Frank D. (2013) "Behavioral Intervention". En: Washabau R.J., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 1st Edtn. Pp 486-488.
- Freeman L., Becvarova I., Cave N., MacKay C., Nguyen P., Rama B., Takashima G., Tiffin R., van Beukelen P., Yathiraj S. (2011). "WSAVA Nutritional Assessment Guidelines". *Compend Contin Educ Vet.* 33, E1-9.
- Funderburg N.T., Park S.R.S., Sung H.C., Hardy G., Clagett B., Ignatz-Hoover J., Harding C.V., Fu P., Katz J.A., Lederman M.M., *et al.*, (2013). "Circulating CD4+ and CD8+ T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation". *Immunology.* 140, 87-97.
- Gagliani N., Amezcua Vesely M.C., Iseppon A., Brockmann L., Xu H., Palm N.W., de Zoete M.R., Licona-Limón P., Paiva R.S., Ching T., *et al.*, (2015). "Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation". *Nature.* 523, 221-225.
- Galler A., Rutgen B.C., Haas E., Saalmuller A., Hirt R.A., Gerner W., Schwendenwein I., Richter B., Thalhammer J.G., Luckschander-Zeller N. (2017). "Immunophenotype of Peripheral Blood Lymphocytes in Dogs with Inflammatory Bowel Disease". *J Vet Intern Med.* 31, 1730-1739.
- García-Sancho M., Sainz Á., Mancho C., Rodríguez-Bertos A., Rodríguez-franco F. (2005a). "Valoración de parámetros endoscópicos en perros con enteritis crónica linfoplasmocitaria". *Clínica veterinaria de pequeños animales.* 25, 165-171.
- García-Sancho M., Rodríguez-Franco F., Sainz A., Rodríguez A., Silván G., Illera J.C. (2005b). "Serum gastrin in canine chronic lymphocytic-plasmacytic enteritis". *Can Vet J.* 46, 630-634.
- García-Sancho M., Sainz A., Mancho C., Rodríguez-Bertos A., Rodríguez-Franco F. (2006). "Evolución clínica de la enteritis crónica linfoplasmocitaria canina: antes, durante y después del tratamiento". *Clínica veterinaria de pequeños animales.* 26, 14-18.
- García-Sancho M., Rodríguez-Franco F., Sainz A., Mancho C., Rodríguez A. (2007). "Evaluation of clinical, macroscopic, and histopathologic response to treatment in nonhypoproteinemic dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis". *J Vet Intern Med.* 21, 11-17.
- García-Sancho M., Villaescusa A., Rodríguez-Franco F., Sainz A. (2014). "Comparative study of peripheral blood leukocytes in healthy dogs and in dogs with cancer and inflammatory diseases". *J Vet Diagn Invest.* 26, 282-285.
- García de Tena J., Manzano L., Leal J.C., San Antonio E., Sualdea V., Alvarez-Mon M. (2004). "Active Crohn's disease patients show a distinctive expansion of circulating memory CD4+CD45RO+CD28null T cells". *J Clin Immunol.* 24, 185-196.
- García de Tena J., Manzano L., Leal J.C., San Antonio E., Sualdea V., Alvarez-Mon M. (2006). "Distinctive pattern of cytokine production and adhesion molecule expression in peripheral blood memory CD4+ T cells from patients with active Crohn's disease". *J Clin Immunol.* 26, 233-242.
- Garden O.A. (2013) "Gastrointestinal Immunology". En: Washabau R.J., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, 1st Edtn. Pp 42-53.
- Garden O.A., Elwood C.M., Desport M., Batt R.M. (1999). "In situ hybridization as a technique for the immunological investigation of canine intestine: jejunal expression of IFNgamma and IL10 in Irish setters and beagles". *Vet Immunol Immunopathol.* 70, 1-17.

Bibliografía

- Gaschen F.P., Merchant S.R. (2011). "Adverse food reactions in dogs and cats". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 41, 361-379.
- Gaschen L., Kircher P., Lang J., Gaschen F., Allenspach K., Gröne A. (2005). "Pattern recognition and feature extraction of canine celiac and cranial mesenteric arterial waveforms: normal versus chronic enteropathy--a pilot study". *Vet J.* 169, 242-250.
- Gaschen L., Kircher P. (2007). "Two-dimensional grayscale ultrasound and spectral Doppler waveform evaluation of dogs with chronic enteropathies". *Clin Tech Small Anim Pract.* 22, 122-127.
- Gaschen L., Kircher P., Stüssi A., Allenspach K., Gaschen F., Doherr M., Gröne A. (2008). "Comparison of ultrasonographic findings with clinical activity index (CIBDAI) and diagnosis in dogs with chronic enteropathies". *Vet Radiol Ultrasound.* 49, 56-64.
- Gauthier M.J., Aubert I., Abrams-Ogg A., Woods J.P., Bienzle D. (2005). "The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinically healthy dogs and dogs with lymphoma in remission". *J Vet Intern Med.* 19, 193-199.
- German A.J., Hall E.J., Day M.J. (1999a). "Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine". *J Comp Pathol.* 120, 129-145.
- German A.J., Hall E.J., Moore P.F., Ringler D.J., Newman W., Day M.J. (1999b). "The distribution of lymphocytes expressing alphabeta and gammadelta T-cell receptors, and the expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 in the canine intestine". *J Comp Pathol.* 121, 249-263.
- German A.J., Hall E.J., Day M.J. (2000a). "Relative deficiency in IgA production by duodenal explants from German shepherd dogs with small intestinal disease". *Vet Immunol Immunopathol.* 76, 25-43.
- German A.J., Helps C.R., Hall E.J., Day M.J. (2000b). "Cytokine mRNA expression in mucosal biopsies from German shepherd dogs with small intestinal enteropathies". *Dig Dis Sci.* 45, 7-17.
- German A.J., Hall E.J., Day M.J. (2001). "Immune Cell Populations within the Duodenal Mucosa of Dogs with Enteropathies". *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 15, 14-25.
- German A.J., Holden D.J., Hall E.J., Day M.J. (2002). "Eosinophilic diseases in two Cavalier King Charles spaniels". *J Small Anim Pract.* 43, 533-538.
- Gingrich A.A., Modiano J.F., Canter R.J. (2019). "Characterization and Potential Applications of Dog Natural Killer Cells in Cancer Immunotherapy". *J Clin Med.* 8, 1802.
- Gleeson M.H., Davis A.J. (2003). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and newly diagnosed colitis: a case-control study". *Aliment Pharmacol Ther.* 17, 817-825.
- Globig A.M., Hennecke N., Martin B., Seidl M., Ruf G., Hasselblatt P., Thimme R., Bengsch B. (2014). "Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFN- γ +IL-17+coproducing CD4⁺ T cells in active inflammatory bowel disease". *Inflamm Bowel Dis.* 20, 2321-2329.
- Goodwin L.V., Goggs R., Chan D.L., Allenspach K. (2011). "Hypercoagulability in dogs with protein-losing enteropathy". *J Vet Intern Med.* 25, 273-277.
- Gough E., Shaikh H., Manges A.R. (2011). "Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection". *Clin Infect Dis.* 53, 994-1002.
- Goutal-Landry C.M., Mansell J., Ryan K.A., Gaschen F.P. (2013). "Effect of endoscopic forceps on quality of duodenal mucosal biopsy in healthy dogs". *J Vet Intern Med.* 27, 456-461.

- Gow A.G., Else R., Evans H., Berry J.L., Herrtage M.E., Mellanby R.J. (2011). "Hypovitaminosis D in dogs with inflammatory bowel disease and hypoalbuminaemia". *J Small Anim Pract.* 52, 411-418.
- Graff L.A., Walker J.R., Lix L., Clara I., Rawsthorne P., Rogala L., Miller N., Jakul L., McPhail C., Ediger J., *et al.*, (2006). "The relationship of inflammatory bowel disease type and activity to psychological functioning and quality of life". *Clin Gastroenterol Hepatol.* 4, 1491-1501.
- Greeley E.H., Kealy R.D., Ballam J.M., Lawler D.F., Segre M. (1996). "The influence of age on the canine immune system". *Vet Immunol Immunopathol.* 55, 1-10.
- Greuter T., Vavricka S.R. (2019). "Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease - epidemiology, genetics, and pathogenesis". *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 13, 307-317.
- Grützner N., Heilmann R.M., Bridges C.S., Suchodolski J.S., Steiner J.M. (2013). "Serum concentrations of canine alpha(1)-proteinase inhibitor in cobalamin-deficient Yorkshire Terrier dogs". *J Vet Diagn Invest.* 25, 376-385.
- Grützner N., Heilmann R.M., Cranford S.M., Holzenburg A., Suchodolski J.S., Steiner J.M. (2015). "Inflammatory, immunological, and intestinal disease biomarkers in Chinese Shar-Pei dogs with marked hypocobalaminemia". *J Vet Diagn Invest.* 27, 31-40.
- Guard B.C., Honneffer J.B., Jergens A.E., Jonika M.M., Toresson L., Lawrence Y.A., Webb C.B., Hill S., Lidbury J.A., Steiner J.M., *et al.*, (2019). "Longitudinal assessment of microbial dysbiosis, fecal unconjugated bile acid concentrations, and disease activity in dogs with steroid-responsive chronic inflammatory enteropathy". *J Vet Intern Med.* 33, 1295-1305.
- Gué M., Bueno L. (1986). "Diazepam and muscimol blockade of the gastrointestinal motor disturbances induced by acoustic stress in dogs". *Eur J Pharmacol.* 131, 123-127.
- Gunawardana S.C., Jergens A.E., Ahrens F.A., Niyo Y. (1997). "Colonic nitrite and immunoglobulin G concentrations in dogs with inflammatory bowel disease". *J Am Vet Med Assoc.* 211, 318-321.
- Guo B., Harstall C., Louie T., Veldhuyzen van Zanten S., Dieleman L.A. (2012). "Systematic review: faecal transplantation for the treatment of *Clostridium difficile*-associated disease". *Aliment Pharmacol Ther.* 35, 865-875.
- Haas E., Rutgen B.C., Gerner W., Richter B., Tichy A., Galler A., Bilek A., Thalhammer J.G., Saalmuller A., Luckschander-Zeller N. (2014). "Phenotypic characterization of canine intestinal intraepithelial lymphocytes in dogs with inflammatory bowel disease". *J Vet Intern Med.* 28, 1708-1715.
- Hajishengallis G., Li X., Mitroulis I., Chavakis T. (2019). "Trained Innate Immunity and Its Implications for Mucosal Immunity and Inflammation". *Adv Exp Med Biol.* 1197, 11-26.
- Hall C.L. (1967). "Three clinical cases of eosinophilic enteritis". *Southwest Veterinarian.* 21, 41-42.
- Hall E.J., Batt R.M. (1990a). "Development of wheat-sensitive enteropathy in Irish Setters: biochemical changes". *Am J Vet Res.* 51, 983-989.
- Hall E.J., Batt R.M. (1990b). "Development of wheat-sensitive enteropathy in Irish Setters: morphologic changes". *Am J Vet Res.* 51, 978-982.
- Hall E.J. (2011). "Antibiotic-responsive diarrhea in small animals". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 41, 273-286.
- Hall E.J. (2013a) "Small Intestine". En: Washabau R.J., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, 1st Edtn. Pp 651-728.

Bibliografía

- Hall E.J., Day M.J. (2017) "Diseases of the Small Intestine". En: Ettinger S.J., Feldman E.C., Côté E. (eds). *Textbook of Veterinary Internal Medicine: diseases of the dog and the cat*. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA. 8th Ednt. Pp 3643-3820.
- Hall J.A. (2013b) "Abdominal Pain". En: Washabau R.J., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 1st Edtn. Pp 70-74.
- Hamerman J.A., Ogasawara K., Lanier L.L. (2005). "NK cells in innate immunity". *Curr Opin Immunol*. 17, 29-35.
- Hart I.R., Kidder D.E. (1978). "The quantitative assessment of normal canine small intestinal mucosa". *Res Vet Sci*. 25, 157-162.
- Harvey R.F., Bradshaw J.M. (1980). "A simple index of Crohn's-disease activity". *Lancet*. 1, 514.
- Hauck V., Hugli P., Meli M.L., Rostaher A., Fischer N., Hofmann-Lehmann R., Favrot C. (2016). "Increased numbers of FoxP3-expressing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood from dogs with atopic dermatitis and its correlation with disease severity". *Vet Dermatol*. 27, 26-29.
- Hawes M., Riddle A., Kirk J., Jergens A., Allenspach K. (2018). "Interleukin-1 β expression is increased in the duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease". *Vet Rec*. 183, 536.
- Heilmann R.M., Suchodolski J.S. (2015). "Is inflammatory bowel disease in dogs and cats associated with a Th1 or Th2 polarization?". *Vet Immunol Immunopathol*. 168, 131-134.
- Heilmann R.M., Volkmann M., Otoni C.C., Grützner N., Kohn B., Jergens A.E., Steiner J.M. (2016). "Fecal S100A12 concentration predicts a lack of response to treatment in dogs affected with chronic enteropathy". *Vet J*. 215, 96-100.
- Heilmann R.M., Steiner J.M. (2018). "Clinical utility of currently available biomarkers in inflammatory enteropathies of dogs". *J Vet Intern Med*. 32, 1495-1508.
- Heilmann R.M., Berghoff N., Mansell J., Grützner N., Parnell N.K., Gurtner C., Suchodolski J.S., Steiner J.M. (2018). "Association of fecal calprotectin concentrations with disease severity, response to treatment, and other biomarkers in dogs with chronic inflammatory enteropathies". *J Vet Intern Med*. 32, 679-692.
- Heilmann R.M., Nestler J., Schwarz J., Grützner N., Ambrus A., Seeger J., Suchodolski J.S., Steiner J.M., Gurtner C. (2019). "Mucosal expression of S100A12 (calgranulin C) and S100A8/A9 (calprotectin) and correlation with serum and fecal concentrations in dogs with chronic inflammatory enteropathy". *Vet Immunol Immunopathol*. 211, 64-74.
- Henderson S.M., Elwood C.M. (2003). "A potential causal association between gastrointestinal disease and primary polydipsia in three dogs". *J Small Anim Pract*. 44, 280-284.
- Hillhouse E.E., Lesage S. (2013). "A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells". *J Autoimmun*. 40, 58-65.
- Ho I.C., Miaw S.C. (2016). "Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases". *Adv Exp Med Biol*. 941, 31-77.
- HogenEsch H., Felsburg P.J. (1992a). "Isolation and phenotypic and functional characterization of cells from Peyer's patches in the dog". *Vet Immunol Immunopathol*. 31, 1-10.
- HogenEsch H., Felsburg P.J. (1992b). "Immunohistology of Peyer's patches in the dog". *Vet Immunol Immunopathol*. 30, 147-160.

- Horiuchi Y., Nakajima Y., Nariai Y., Asanuma H., Kuwabara M., Yukawa M. (2007). "Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes--a flow cytometric study". *Vet Immunol Immunopathol.* 118, 179-185.
- Horiuchi Y., Tominaga M., Ichikawa M., Yamashita M., Jikumaru Y., Nariai Y., Nakajima Y., Kuwabara M., Yukawa M. (2009). "Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors". *Microbiol Immunol.* 53, 468-474.
- Hostutler R.A., Luria B.J., Johnson S.E., Weisbrode S.E., Sherding R.G., Jaeger J.Q., Guilford W.G. (2004). "Antibiotic-responsive histiocytic ulcerative colitis in 9 dogs". *J Vet Intern Med.* 18, 499-504.
- Hou J.K., Abraham B., El-Serag H. (2011). "Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature". *Am J Gastroenterol.* 106, 563-573.
- Hou P.F., Zhu L.J., Chen X.Y., Qiu Z.Q. (2017). "Age-related changes in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and their relationship with lung cancer". *PLoS One.* 12, e0173048.
- Howard K.E., Fisher I.L., Dean G.A., Jo Burkhard M. (2005). "Methodology for isolation and phenotypic characterization of feline small intestinal leukocytes". *J Immunol Methods.* 302, 36-53.
- Hu M.D., Edelblum K.L. (2017). "Sentinels at the frontline: the role of intraepithelial lymphocytes in inflammatory bowel disease". *Curr Pharmacol Rep.* 3, 321-334.
- Igarashi H., Maeda S., Ohno K., Horigome A., Odamaki T., Tsujimoto H. (2014). "Effect of oral administration of metronidazole or prednisolone on fecal microbiota in dogs". *PLoS One.* 9, e107909.
- Imaoka A., Matsumoto S., Setoyama H., Okada Y., Umesaki Y. (1996). "Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice". *Eur J Immunol.* 26, 945-948.
- Iwasaki A., Medzhitov R. (2015). "Control of adaptive immunity by the innate immune system". *Nat Immunol.* 16, 343-353.
- Jabri B., Ebert E. (2007). "Human CD8+ intraepithelial lymphocytes: a unique model to study the regulation of effector cytotoxic T lymphocytes in tissue". *Immunol Rev.* 215, 202-214.
- Jacinto A.M.L., Ridyard A.E., Aroch I., Watson P.J., Morrison L.R., Chandler M.L., Kuzi S. (2017). "Thromboembolism in Dogs with Protein-Losing Enteropathy with Non-Neoplastic Chronic Small Intestinal Disease". *J Am Anim Hosp Assoc.* 53, 185-192.
- Jackson H.A., Jackson M.W., Coblenz L., Hammerberg B. (2003). "Evaluation of the clinical and allergen specific serum immunoglobulin E responses to oral challenge with cornstarch, corn, soy and a soy hydrolysate diet in dogs with spontaneous food allergy". *Vet Dermatol.* 14, 181-187.
- Jacobs G., Collins-Kelly L., Lappin M., Tyler D. (1990). "Lymphocytic-plasmacytic enteritis in 24 dogs". *J Vet Intern Med.* 4, 45-53.
- Janda A., Bowen A., Greenspan N.S., Casadevall A. (2016). "Ig Constant Region Effects on Variable Region Structure and Function". *Front Microbiol.* 7, 22.
- Jaye D.L., Bray R.A., Gebel H.M., Harris W.A., Waller E.K. (2012). "Translational applications of flow cytometry in clinical practice". *J Immunol.* 188, 4715-4719.
- Jergens A.E., Moore F.M., March P., Miles K.G. (1992a). "Idiopathic inflammatory bowel disease associated with gastroduodenal ulceration-erosion: a report of nine cases in the dog and cat". *Journal of the American Animal Hospital Association.* 28, 21-26.

Bibliografía

- Jergens A.E., Moore F.M., Haynes J.S., Miles K.G. (1992b). "Idiopathic inflammatory bowel disease in dogs and cats: 84 cases (1987-1990)". *J Am Vet Med Assoc.* 201, 1603-1608.
- Jergens A.E. (1999). "Inflammatory bowel disease. Current perspectives". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 29, 501-521.
- Jergens A.E., Schreiner C.A., Frank D.E., Niyo Y., Ahrens F.E., Eckersall P.D., Benson T.J., Evans R. (2003). "A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease". *J Vet Intern Med.* 17, 291-297.
- Jergens A.E., Sonea I.M., O'Connor A.M., Kauffman L.K., Grozdanic S.D., Ackermann M.R., Evans R.B. (2009). "Intestinal cytokine mRNA expression in canine inflammatory bowel disease: a meta-analysis with critical appraisal". *Comp Med.* 59, 153-162.
- Jergens A.E., Crandell J., Morrison J.A., Deitz K., Pressel M., Ackermann M., Suchodolski J.S., Steiner J.M., Evans R. (2010). "Comparison of oral prednisone and prednisone combined with metronidazole for induction therapy of canine inflammatory bowel disease: a randomized-controlled trial". *J Vet Intern Med.* 24, 269-277.
- Jergens A.E., Simpson K.W. (2012). "Inflammatory bowel disease in veterinary medicine". *Front Biosci (Elite Ed).* 4, 1404-1419.
- Jergens A., Young J., Moore D., Wang C., Hostetter J., Augustine L., Allenspach K., Schmitz S., Mosher C. (2014a). "Bcl-2/caspase 3 mucosal imbalance favors T cell resistance to apoptosis in dogs with inflammatory bowel disease". *Vet Immunol Immunopathol.* 158, 167-174.
- Jergens A.E., Evans R.B., Ackermann M., Hostetter J., Willard M., Mansell J., Bilzer T., Wilcock B., Washabau R., Hall E.J., *et al.*, (2014b). "Design of a simplified histopathologic model for gastrointestinal inflammation in dogs". *Vet Pathol.* 51, 946-950.
- Jergens A.E., Willard M.D., Allenspach K. (2016). "Maximizing the diagnostic utility of endoscopic biopsy in dogs and cats with gastrointestinal disease". *Vet J.* 214, 50-60.
- Johansson-Lindbom B., Svensson M., Wurbel M.A., Malissen B., Marquez G., Agace W. (2003). "Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant". *J Exp Med.* 198, 963-969.
- Jugan M.C. (2020). "Dietary therapy as a treatment option for dogs with chronic enteropathies". *Vet Rec.* 186, 23-25.
- Junginger J., Schwittlick U., Lemensieck F., Nolte I., Hewicker-Trautwein M. (2012). "Immunohistochemical investigation of Foxp3 expression in the intestine in healthy and diseased dogs". *Vet Res.* 43, 23.
- Junginger J., Lemensieck F., Moore P.F., Schwittlick U., Nolte I., Hewicker-Trautwein M. (2014). "Canine gut dendritic cells in the steady state and in inflammatory bowel disease". *Innate Immun.* 20, 145-160.
- Kalenyak K., Isaiah A., Heilmann R.M., Suchodolski J.S., Burgener I.A. (2018). "Comparison of the intestinal mucosal microbiota in dogs diagnosed with idiopathic inflammatory bowel disease and dogs with food-responsive diarrhea before and after treatment". *FEMS Microbiol Ecol.* 94.
- Kalenyak K., Heilmann R.M., Lest C.H.A.v.d., Brouwers J.F., Burgener I.A. (2019). "Comparison of the systemic phospholipid profile in dogs diagnosed with idiopathic inflammatory bowel disease or food-responsive diarrhea before and after treatment". *PLOS ONE.* 14, e0215435.
- Kamada N., Hisamatsu T., Okamoto S., Chinen H., Kobayashi T., Sato T., Sakuraba A., Kitazume M.T., Sugita A., Koganei K., *et al.*, (2008). "Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis". *J Clin Invest.* 118, 2269-2280.

- Kanauchi O., Matsumoto Y., Matsumura M., Fukuoka M., Bamba T. (2005). "The beneficial effects of microflora, especially obligate anaerobes, and their products on the colonic environment in inflammatory bowel disease". *Curr Pharm Des.* 11, 1047-1053.
- Karp L.C., Targan S.R. (2010) "Heterogeneity of Inflammatory Bowel Diseases". En: Targan S.R., Shanahan F., Karp L.C. (eds). *Inflammatory Bowel Disease: Translating basic science into clinical practice*. Wiley Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication., West Sussex, UK, 1st Edtn. Pp 3-8.
- Kather S., Grützner N., Kook P.H., Dengler F., Heilmann R.M. (2020). "Review of cobalamin status and disorders of cobalamin metabolism in dogs". *J Vet Intern Med.* 34, 13-28.
- Kathrani A., House A., Catchpole B., Murphy A., German A., Werling D., Allenspach K. (2010). "Polymorphisms in the TLR4 and TLR5 gene are significantly associated with inflammatory bowel disease in German shepherd dogs". *PLoS One.* 5, e15740.
- Kathrani A., Werling D., Allenspach K. (2011a). "Canine breeds at high risk of developing inflammatory bowel disease in the south-eastern UK". *Vet Rec.* 169, 635.
- Kathrani A., House A., Catchpole B., Murphy A., Werling D., Allenspach K. (2011b). "Breed-independent toll-like receptor 5 polymorphisms show association with canine inflammatory bowel disease". *Tissue Antigens.* 78, 94-101.
- Kathrani A., Schmitz S., Priestnall S.L., Smith K.C., Werling D., Garden O.A., Allenspach K. (2011c). "CD11c+ Cells are Significantly Decreased in the Duodenum, Ileum and Colon of Dogs with Inflammatory Bowel Disease". *Journal of Comparative Pathology.* 145, 359-366.
- Kathrani A., Holder A., Catchpole B., Alvarez L., Simpson K., Werling D., Allenspach K. (2012). "TLR5 risk-associated haplotype for canine inflammatory bowel disease confers hyper-responsiveness to flagellin". *PLoS One.* 7, e30117.
- Kathrani A., Lee H., White C., Catchpole B., Murphy A., German A., Werling D., Allenspach K. (2014). "Association between nucleotide oligomerisation domain two (Nod2) gene polymorphisms and canine inflammatory bowel disease". *Vet Immunol Immunopathol.* 161, 32-41.
- Kathrani A., Allenspach K., Fascetti A.J., Larsen J.A., Hall E.J. (2018). "Alterations in serum amino acid concentrations in dogs with protein-losing enteropathy". *J Vet Intern Med.* 32, 1026-1032.
- Kathrani A., Sánchez-Vizcaíno F., Hall E.J. (2019). "Association of chronic enteropathy activity index, blood urea concentration, and risk of death in dogs with protein-losing enteropathy". *J Vet Intern Med.* 33, 536-543.
- Kealy J.K., McAllister H., Graham J.P. (2011) "The abdomen". En: Kealy J.K., McAllister H., Graham J.P. (eds). *Diagnostic Radiology and Ultrasonography of the Dog and Cat*. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 5th Edtn. Pp 23-198.
- Keeney M., Barnett D., Gratama J.W. (2004). "Impact of standardization on clinical cell analysis by flow cytometry". *J Biol Regul Homeost Agents.* 18, 305-312.
- Kiank C., Taché Y., Larauche M. (2010). "Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors". *Brain Behav Immun.* 24, 41-48.
- Kilpinen S., Rantala M., Spillmann T., Björkroth J., Westermarck E. (2015). "Oral tylosin administration is associated with an increase of faecal enterococci and lactic acid bacteria in dogs with tylosin-responsive diarrhoea". *Vet J.* 205, 369-374.

Bibliografía

- Kim C.J., Kovacs-Nolan J.A., Yang C., Archbold T., Fan M.Z., Mine Y. (2010). "l-Tryptophan exhibits therapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis". *J Nutr Biochem.* 21, 468-475.
- Kimmel S.E., Waddell L.S., Michel K.E. (2000). "Hypomagnesemia and hypocalcemia associated with protein-losing enteropathy in Yorkshire terriers: five cases (1992-1998)". *J Am Vet Med Assoc.* 217, 703-706.
- Kirwan S.E., Burshtyn D.N. (2007). "Regulation of natural killer cell activity". *Curr Opin Immunol.* 19, 46-54.
- Kleinschek M.A., Boniface K., Sadekova S., Grein J., Murphy E.E., Turner S.P., Raskin L., Desai B., Faubion W.A., de Waal Malefyt R., *et al.*, (2009). "Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation". *J Exp Med.* 206, 525-534.
- Kleinschmidt S., Meneses F., Nolte I., Hewicker-Trautwein M. (2006). "Retrospective study on the diagnostic value of full-thickness biopsies from the stomach and intestines of dogs with chronic gastrointestinal disease symptoms". *Vet Pathol.* 43, 1000-1003.
- Kleinschmidt S., Meneses F., Nolte I., Hewicker-Trautwein M. (2007). "Characterization of mast cell numbers and subtypes in biopsies from the gastrointestinal tract of dogs with lymphocytic-plasmacytic or eosinophilic gastroenterocolitis". *Vet Immunol Immunopathol.* 120, 80-92.
- Kontoyiannis D., Pasparakis M., Pizarro T.T., Cominelli F., Kollias G. (1999). "Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies". *Immunity.* 10, 387-398.
- Kontoyiannis D., Boulougouris G., Manoloukos M., Armaka M., Apostolaki M., Pizarro T., Kotlyarov A., Forster I., Flavell R., Gaestel M., *et al.*, (2002). "Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease". *J Exp Med.* 196, 1563-1574.
- Kostic A.D., Xavier R.J., Gevers D. (2014). "The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead". *Gastroenterology.* 146, 1489-1499.
- Koutroubakis I.E., Tsiolakidou G., Karmiris K., Kouroumalis E.A. (2006). "Role of angiogenesis in inflammatory bowel disease". *Inflamm Bowel Dis.* 12, 515-523.
- Kubes P. (2018). "The enigmatic neutrophil: what we do not know". *Cell Tissue Res.* 371, 399-406.
- Kurosaki T. (2010). "B-lymphocyte biology". *Immunol Rev.* 237, 5-9.
- Kvasnovsky C.L., Auja U., Bjarnason I. (2015). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and exacerbations of inflammatory bowel disease". *Scand J Gastroenterol.* 50, 255-263.
- Lala S., Ogura Y., Osborne C., Hor S.Y., Bromfield A., Davies S., Ogunbiyi O., Nuñez G., Keshav S. (2003). "Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells". *Gastroenterology.* 125, 47-57.
- Lawson T.L., Gomez J.A., Margulis A.R. (1975). "Vascular alterations in canine histiocytic ulcerative colitis". *Invest Radiol.* 10, 212-224.
- Lecoindre P., Chevallier M., Guerret S. (2010). "[Protein-losing enteropathy of non neoplastic origin in the dog: a retrospective study of 34 cases]". *Schweiz Arch Tierheilkd.* 152, 141-146.
- Lee D., Albenberg L., Compher C., Baldassano R., Piccoli D., Lewis J.D., Wu G.D. (2015). "Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases". *Gastroenterology.* 148, 1087-1106.
- Lee S.H. (2015). "Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases". *Intest Res.* 13, 11-18.

- Lee S.H., Kwon J.E., Cho M.L. (2018). "Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease". *Intest Res.* 16, 26-42.
- Lee Y.J., Jameson S.C., Hogquist K.A. (2011). "Alternative memory in the CD8 T cell lineage". *Trends Immunol.* 32, 50-56.
- Lerebours E., Gower-Rousseau C., Merle V., Brazier F., Debeugny S., Marti R., Salomez J.L., Hellot M.F., Dupas J.L., Colombel J.F., *et al.*, (2007). "Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study". *Am J Gastroenterol.* 102, 122-131.
- Lesage S., Zouali H., Cézard J.P., Colombel J.F., Belaiche J., Almer S., Tysk C., O'Morain C., Gassull M., Binder V., *et al.*, (2002). "CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease". *Am J Hum Genet.* 70, 845-857.
- Levine J.S., Burakoff R. (2011). "Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease". *Gastroenterology & Hepatology.* 7, 235-241.
- Li J., Ueno A., Fort Gasia M., Luider J., Wang T., Hirota C., Jijon H.B., Deane M., Tom M., Chan R., *et al.*, (2016). "Profiles of Lamina Propria T Helper Cell Subsets Discriminate Between Ulcerative Colitis and Crohn's Disease". *Inflamm Bowel Dis.* 22, 1779-1792.
- Littman M.P., Dambach D.M., Vaden S.L., Giger U. (2000). "Familial protein-losing enteropathy and protein-losing nephropathy in Soft Coated Wheaten Terriers: 222 cases (1983-1997)". *J Vet Intern Med.* 14, 68-80.
- Lix L.M., Graff L.A., Walker J.R., Clara I., Rawsthorne P., Rogala L., Miller N., Ediger J., Pretorius T., Bernstein C.N. (2008). "Longitudinal study of quality of life and psychological functioning for active, fluctuating, and inactive disease patterns in inflammatory bowel disease". *Inflamm Bowel Dis.* 14, 1575-1584.
- Llewellyn S.R., Britton G.J., Contijoch E.J., Vennaro O.H., Mortha A., Colombel J.F., Grinspan A., Clemente J.C., Merad M., Faith J.J. (2018). "Interactions Between Diet and the Intestinal Microbiota Alter Intestinal Permeability and Colitis Severity in Mice". *Gastroenterology.* 154, 1037-1046.e1032.
- Locher C., Tipold A., Welle M., Busato A., Zurbriggen A., Griot-Wenk M.E. (2001). "Quantitative assessment of mast cells and expression of IgE protein and mRNA for IgE and interleukin 4 in the gastrointestinal tract of healthy dogs and dogs with inflammatory bowel disease". *Am J Vet Res.* 62, 211-216.
- Lu L., Barbi J., Pan F. (2017). "The regulation of immune tolerance by FOXP3". *Nat Rev Immunol.* 17, 703-717.
- Luckschander N., Allenspach K., Hall J., Seibold F., Gröne A., Doherr M.G., Gaschen F. (2006). "Perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibody and response to treatment in diarrheic dogs with food responsive disease or inflammatory bowel disease". *J Vet Intern Med.* 20, 221-227.
- Luckschander N., Pfammatter N.S., Sidler D., Jakob S., Burgener I.A., Moore P.F., Zurbriggen A., Corazza N., Brunner T. (2009). "Phenotyping, functional characterization, and developmental changes in canine intestinal intraepithelial lymphocytes". *Vet Res.* 40, 58.
- Luckschander N., Hall J.A., Gaschen F., Forster U., Wenzlow N., Hermann P., Allenspach K., Dobbelaere D., Burgener I.A., Welle M. (2010). "Activation of nuclear factor-kappaB in dogs with chronic enteropathies". *Vet Immunol Immunopathol.* 133, 228-236.
- Lyons R.M., Moses H.L. (1990). "Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation". *Eur J Biochem.* 187, 467-473.

Bibliografía

- Mabbott N.A., Donaldson D.S., Ohno H., Williams I.R., Mahajan A. (2013). "Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium". *Mucosal Immunol.* 6, 666-677.
- Macri C., Pang E.S., Patton T., O'Keefe M. (2018). "Dendritic cell subsets". *Semin Cell Dev Biol.* 84, 11-21.
- Maeda S., Ohno K., Nakamura K., Uchida K., Nakashima K., Fukushima K., Tsukamoto A., Goto-Koshino Y., Fujino Y., Tsujimoto H. (2011). "Quantification of chemokine and chemokine receptor gene expression in duodenal mucosa of dogs with inflammatory bowel disease". *Vet Immunol Immunopathol.* 144, 290-298.
- Maeda S., Ohno K., Tsukamoto A., Nakashima K., Fukushima K., Goto-Koshino Y., Fujino Y., Tsujimoto H. (2012a). "Molecular cloning and expression analysis of the canine chemokine receptor CCR9". *Vet Immunol Immunopathol.* 145, 534-539.
- Maeda S., Ohno K., Nakamura K., Uchida K., Nakashima K., Fukushima K., Tsukamoto A., Goto-Koshino Y., Fujino Y., Tsujimoto H. (2012b). "Mucosal imbalance of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist in canine inflammatory bowel disease". *The Veterinary Journal.* 194, 66-70.
- Maeda S., Ohno K., Nakamura K., Uchida K., Nakashima K., Fukushima K., Nakajima M., Goto-Koshino Y., Fujino Y., Tsujimoto H. (2012c). "Increased expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 in canine inflammatory bowel disease and their possible role in recruitment of intraepithelial lymphocytes". *Vet Immunol Immunopathol.* 148, 226-235.
- Maeda S., Ohno K., Uchida K., Nakashima K., Fukushima K., Tsukamoto A., Nakajima M., Fujino Y., Tsujimoto H. (2013). "Decreased immunoglobulin A concentrations in feces, duodenum, and peripheral blood mononuclear cells of dogs with inflammatory bowel disease". *J Vet Intern Med.* 27, 47-55.
- Maeda S., Ohno K., Fujiwara-Igarashi A., Uchida K., Tsujimoto H. (2016). "Changes in Foxp3-Positive Regulatory T Cell Number in the Intestine of Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease and Intestinal Lymphoma". *Vet Pathol.* 53, 102-112.
- Maeda S., Tsuboi M., Sakai K., Ohno K., Fukushima K., Kanemoto H., Hiyoshi-Kanemoto S., Goto-Koshino Y., Chambers J.K., Yonezawa T., *et al.*, (2017). "Endoscopic Cytology for the Diagnosis of Chronic Enteritis and Intestinal Lymphoma in Dogs". *Vet Pathol.* 54, 595-604.
- Magro F., Soares J.B., Fernandes D. (2014). "Venous thrombosis and prothrombotic factors in inflammatory bowel disease". *World J Gastroenterol.* 20, 4857-4872.
- Maina E., Devriendt B., Cox E. (2019). "Food allergen-specific sublingual immunotherapy modulates peripheral T cell responses of dogs with adverse food reactions". *Vet Immunol Immunopathol.* 212, 38-42.
- Malewska K., Rychlik A., Nieradka R., Kander M. (2011). "Treatment of inflammatory bowel disease (IBD) in dogs and cats". *Pol J Vet Sci.* 14, 165-171.
- Manchester A.C., Webb C.B., Blake A.B., Sarwar F., Lidbury J.A., Steiner J.M., Suchodolski J.S. (2019). "Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs". *J Vet Intern Med.* 33, 2605-2617.
- Mancho C., Sainz Á., García-Sancho M., Villaescusa A., Rodríguez-Franco F. (2011). "Evaluation of perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibodies in sera from dogs with inflammatory bowel disease or intestinal lymphoma". *Am J Vet Res.* 72, 1333-1337.
- Mandigers P.J., Biourge V., van den Ingh T.S., Ankringa N., German A.J. (2010). "A randomized, open-label, positively-controlled field trial of a hydrolyzed protein diet in dogs with chronic small bowel enteropathy". *J Vet Intern Med.* 24, 1350-1357.

- Mansell J., Willard M.D. (2003). "Biopsy of the gastrointestinal tract". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33, 1099-1116.
- Mansfield C.S., James F.E., Craven M., Davies D.R., O'Hara A.J., Nicholls P.K., Dogan B., MacDonough S.P., Simpson K.W. (2009). "Remission of histiocytic ulcerative colitis in Boxer dogs correlates with eradication of invasive intramucosal *Escherichia coli*". *J Vet Intern Med.* 23, 964-969.
- Marcais A., Viel S., Grau M., Henry T., Marvel J., Walzer T. (2013). "Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines". *Front Immunol.* 4, 450.
- Marchetti C., Borghetti P., Cacchioli A., Ferrari L., Armando F., Corradi A., Cantoni A.M. (2020). "Profile of gamma-delta ($\gamma\delta$) T lymphocytes in the peripheral blood of crossbreed dogs during stages of life and implication in aging". *BMC Vet Res.* 16, 278.
- Marks S.L., Laflamme D.P., McAloose D. (2002). "Dietary trial using a commercial hypoallergenic diet containing hydrolyzed protein for dogs with inflammatory bowel disease". *Vet Ther.* 3, 109-118.
- Marks S.L. (2013) "Diarrhea". En: Washabau R.J., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. 1st Edtn. Pp 99-108. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA,
- Marsilio S., Newman S.J., Estep J.S., Giarretta P.R., Lidbury J.A., Warry E., Flory A., Morley P.S., Smoot K., Seeley E.H., *et al.*, (2020). "Differentiation of lymphocytic-plasmacytic enteropathy and small cell lymphoma in cats using histology-guided mass spectrometry". *J Vet Intern Med.* 34, 669-677.
- Martina M.N., Noel S., Saxena A., Rabb H., Hamad A.R. (2015). "Double negative (DN) alphabeta T cells: misperception and overdue recognition". *Immunol Cell Biol.* 93, 305-310.
- Martínez-Rodrigo A., Mas A., Fernández-Cotrino J., Belinchón-Lorenzo S., Orden J.A., Arias P., de la Fuente R., Carrión J., Domínguez-Bernal G. (2019). "Strength and medium-term impact of HisAK70 immunization in dogs: Vaccine safety and biomarkers of effectiveness for ex vivo *Leishmania infantum* infection". *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 65, 137-143.
- Matralis D., Papadogiannakis E., Kontos V., Papadopoulos E., Ktenas E., Koutinas A. (2016). "Detection of intracellular IFN-gamma and IL-4 cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*". *Parasite Immunol.* 38, 510-515.
- Mayans S., Stepniak D., Palida S., Larange A., Dreux J., Arlian B., Shinnakasu R., Kronenberg M., Cheroutre H., Lambolez F. (2014). "alphabetaT cell receptors expressed by CD4(-)CD8alphabeta(-) intraepithelial T cells drive their fate into a unique lineage with unusual MHC reactivities". *Immunity.* 41, 207-218.
- Maynard C.L., Weaver C.T. (2009). "Intestinal effector T cells in health and disease". *Immunity.* 31, 389-400.
- McCann T.M., Ridyard A.E., Else R.W., Simpson J.W. (2007). "Evaluation of disease activity markers in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease". *J Small Anim Pract.* 48, 620-625.
- McLean M.K., Khan S.A. (2018). "Toxicology of Frequently Encountered Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Dogs and Cats: An Update". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 48, 969-984.
- McMahon L.A., House A.K., Catchpole B., Elson-Riggins J., Riddle A., Smith K., Werling D., Burgener I.A., Allenspach K. (2010). "Expression of Toll-like receptor 2 in duodenal biopsies from dogs with inflammatory bowel disease is associated with severity of disease". *Vet Immunol Immunopathol.* 135, 158-163.
- McTavish S. (2002). "Eosinophilic gastroenteritis in a dog". *Can Vet J.* 43, 463-465.
- Mehain S.O., Haines J.M., Lee P.M. (2019). "Platelet indices as biomarkers for characterization and determination of severity in canine chronic enteropathy". *Vet J.* 248, 37-41.

Bibliografía

- Melville-Walker S.W., Smith K.C., Elwood C.M. (2004). "Protein-losing enteropathy in a soft-coated wheaten terrier in the United Kingdom". *Vet Rec.* 154, 440-441.
- Menozzi A., Pozzoli C., Poli E., Lazzaretti M., Cantoni A., Grandi D., Giovannini E., Coruzzi G. (2005). "Effect of the macrolide antibacterial drug, tylosin, on TNBS-induced colitis in the rat". *Pharmacology.* 74, 135-142.
- Michielan A., D'Inca R. (2015). "Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut". *Mediators Inflamm.* 2015, 628157.
- Minamoto Y., Otoni C.C., Steelman S.M., Büyükleblebici O., Steiner J.M., Jergens A.E., Suchodolski J.S. (2015). "Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease". *Gut Microbes.* 6, 33-47.
- Mizuno T., Suzuki R., Umeki S., Okuda M. (2009). "Crossreactivity of antibodies to canine CD25 and Foxp3 and identification of canine CD4+CD25 +Foxp3+ cells in canine peripheral blood". *J Vet Med Sci.* 71, 1561-1568.
- Montalban-Arques A., Chaparro M., Gisbert J.P., Bernardo D. (2018). "The Innate Immune System in the Gastrointestinal Tract: Role of Intraepithelial Lymphocytes and Lamina Propria Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation". *Inflamm Bowel Dis.* 24, 1649-1659.
- Monteiro-Steagall B.P., Steagall P.V., Lascelles B.D. (2013). "Systematic review of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced adverse effects in dogs". *J Vet Intern Med.* 27, 1011-1019.
- Moore G.E., Gupitill L.F., Ward M.P., Glickman N.W., Faunt K.K., Lewis H.B., Glickman L.T. (2005). "Adverse events diagnosed within three days of vaccine administration in dogs". *J Am Vet Med Assoc.* 227, 1102-1108.
- Moore L.E. (2003). "The advantages and disadvantages of endoscopy". *Clin Tech Small Anim Pract.* 18, 250-253.
- Moreno P.S., Wagner J., Kirkwood C.D., Gilkerson J.R., Mansfield C.S. (2018). "Characterization of the fecal virome in dogs with chronic enteropathy". *Vet Microbiol.* 221, 38-43.
- Mowat A.M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens". *Nat Rev Immunol.* 3, 331-341.
- Mueller C.G., Nayar S., Gardner D., Barone F. (2018). "Cellular and Vascular Components of Tertiary Lymphoid Structures". *Methods Mol Biol.* 1845, 17-30.
- Mueller R.S., Fieseler K.V., Fettman M.J., Zabel S., Rosychuk R.A., Ogilvie G.K., Greenwalt T.L. (2004). "Effect of omega-3 fatty acids on canine atopic dermatitis". *J Small Anim Pract.* 45, 293-297.
- Murdaca G., Spano F., Cagnati P., Puppo F. (2013). "Free radicals and endothelial dysfunction: potential positive effects of TNF-alpha inhibitors". *Redox Rep.* 18, 95-99.
- Murphy K. (2012a) "T Cell-Mediated Immunity". En: Murphy K. (ed). *Janeway's Immunobiology*. Garland Sciences, Taylor & Francis group, London & New York. 8th Edtn. Pp 335-382.
- Murphy K. (2012b) "The Generation of Lymphocyte Antigen Receptors". En: Murphy K. (ed). *Janeway's Immunobiology*. Garland Sciences, Taylor & Francis Group, London & New York. 8th Edtn. Pp 157-198.
- Murphy K. (2012c) "The Development and Survival of Lymphocytes". En: Murphy K. (ed). *Janeway's Immunobiology*. Garland Sciences, Taylor & Francis group, London & New York. 8th Edtn. Pp 275-315.

- Murphy K. (2012d) "Principles of innate and adaptative immunity". En: Murphy K. (ed). *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, London & New York. 8th Ednt. Pp 1-36
- Murphy K. (2012e) "The Mucosal Immune System". En: Murphy K. (ed). *Janeway's Immunobiology*. Garland Sciences, Taylor & Francis group, London & New York. 8th Edtn. Pp 465-486.
- Murphy K. (2012f) "Innate Immunity: The first lines of defense". En: Murphy K. (ed). *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, London & New York. 8th Ednt. Pp 37-73.
- Murphy K.F., German A.J., Ruaux C.G., Steiner J.M., Williams D.A., Hall E.J. (2003). "Fecal alpha1-proteinase inhibitor concentration in dogs with chronic gastrointestinal disease". *Vet Clin Pathol*. 32, 67-72.
- Nagata N., Ohta H., Yokoyama N., Teoh Y.B., Nisa K., Sasaki N., Osuga T., Morishita K., Takiguchi M. (2020). "Clinical characteristics of dogs with food-responsive protein-losing enteropathy". *J Vet Intern Med*. 34, 659-668.
- Nakazawa M., Maeda S., Omori M., Kaji K., Yokoyama N., Nakagawa T., Chambers J.K., Uchida K., Ohno K., Yonezawa T., *et al.*, (2019). "Duodenal expression of antimicrobial peptides in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma". *Vet J*. 249, 47-52.
- Netea M.G., van de Veerdonk F.L., Kullberg B.J., Van der Meer J.W., Joosten L.A. (2008). "The role of NLRs and TLRs in the activation of the inflammasome". *Expert Opin Biol Ther*. 8, 1867-1872.
- Nezu Y., Tagawa M., Sakaue Y., Hara Y., Tsuchida S., Ogawa R. (2002). "Kinetics of endotoxin concentration and tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 activities in the systemic and portal circulation during small intestinal ischemia and reperfusion in dogs". *Am J Vet Res*. 63, 1680-1686.
- Ni J., Wu G.D., Albenberg L., Tomov V.T. (2017). "Gut microbiota and IBD: causation or correlation?". *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 14, 573-584.
- Niina A., Kibe R., Suzuki R., Yuchi Y., Teshima T., Matsumoto H., Kataoka Y., Koyama H. (2019). "Improvement in Clinical Symptoms and Fecal Microbiome After Fecal Microbiota Transplantation in a Dog with Inflammatory Bowel Disease". *Vet Med (Auckl)*. 10, 197-201.
- Nisa K., Lim S.Y., Shinohara M., Osuga T., Yokoyama N., Tamura M., Nagata N., Sasaoka K., Dermlim A., Leela-Arporn R., *et al.*, (2019). "Evaluation of duodenal perfusion by contrast-enhanced ultrasonography in dogs with chronic inflammatory enteropathy and intestinal lymphoma". *J Vet Intern Med*. 33, 559-568.
- Noble A., Durant L., Hoyle L., McCartney A.L., Man R., Segal J., Costello S.P., Hendy P., Reddi D., Bouri S., *et al.*, (2020). "Deficient Resident Memory T Cell and CD8 T Cell Response to Commensals in Inflammatory Bowel Disease". *J Crohns Colitis*. 14, 525-537.
- O'Rourke A.M., Mescher M.F. (1993). "The roles of CD8 in cytotoxic T lymphocyte function". *Immunol Today*. 14, 183-188.
- O'Shea J.J., Ma A., Lipsky P. (2002). "Cytokines and autoimmunity". *Nat Rev Immunol*. 2, 37-45.
- Ohta H., Sunden Y., Yokoyama N., Osuga T., Lim S.Y., Tamura Y., Morishita K., Nakamura K., Yamasaki M., Takiguchi M. (2014a). "Expression of apical junction complex proteins in duodenal mucosa of dogs with inflammatory bowel disease". *Am J Vet Res*. 75, 746-751.

Bibliografía

- Ohta H., Takada K., Sunden Y., Tamura Y., Osuga T., Lim S.Y., Murakami M., Sasaki N., Wickramasekara Rajapakshage B.K., Nakamura K., *et al.*, (2014b). "CD4⁺ T cell cytokine gene and protein expression in duodenal mucosa of dogs with inflammatory bowel disease". *J Vet Med Sci.* 76, 409-414.
- Okanishi H., Kabeya H., Maruyama S., Kagawa Y., Watari T. (2013). "Activation of nuclear factor-kappa B and cell adhesion molecule mRNA expression in duodenal mucosa of dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis". *Vet Immunol Immunopathol.* 154, 145-152.
- Okanishi H., Yoshioka R., Kagawa Y., Watari T. (2014). "The clinical efficacy of dietary fat restriction in treatment of dogs with intestinal lymphangiectasia". *J Vet Intern Med.* 28, 809-817.
- Olivry T., Mayhew D., Paps J.S., Linder K.E., Peredo C., Rajpal D., Hofland H., Cote-Sierra J. (2016). "Early Activation of Th2/Th22 Inflammatory and Pruritogenic Pathways in Acute Canine Atopic Dermatitis Skin Lesions". *J Invest Dermatol.* 136, 1961-1969.
- Omori M., Maeda S., Igarashi H., Ohno K., Sakai K., Yonezawa T., Horigome A., Odamaki T., Matsuki N. (2017). "Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma". *J Vet Med Sci.* 79, 1840-1847.
- Ontsouka C.E., Burgener I.A., Mani O., Albrecht C. (2010). "Polyunsaturated fatty acid-enriched diets used for the treatment of canine chronic enteropathies decrease the abundance of selected genes of cholesterol homeostasis". *Domest Anim Endocrinol.* 38, 32-37.
- Otoni C.C., Heilmann R.M., García-Sancho M., Sainz A., Ackermann M.R., Suchodolski J.S., Steiner J.M., Jergens A.E. (2018). "Serologic and fecal markers to predict response to induction therapy in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease". *J Vet Intern Med.* 32, 999-1008.
- Overgaard N.H., Jung J.W., Steptoe R.J., Wells J.W. (2015). "CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage?". *J Leukoc Biol.* 97, 31-38.
- Owczarek D., Rodacki T., Domagala-Rodacka R., Cibor D., Mach T. (2016). "Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases". *World J Gastroenterol.* 22, 895-905.
- Pabst R. (2007). "Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs. What are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary?". *Immunol Lett.* 112, 1-8.
- Packey C.D., Sartor R.B. (2009). "Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases". *Curr Opin Infect Dis.* 22, 292-301.
- Pahar B., Lackner A.A., Veazey R.S. (2006). "Intestinal double-positive CD4⁺CD8⁺ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines". *Eur J Immunol.* 36, 583-592.
- Palatucci A.T., Piantedosi D., Rubino V., Giovazzino A., Guccione J., Pernice V., Ruggiero G., Cortese L., Terrazzano G. (2018). "Circulating regulatory T cells (Treg), leptin and induction of proinflammatory activity in obese Labrador Retriever dogs". *Vet Immunol Immunopathol.* 202, 122-129.
- Pantelyushin S., Ranninger E., Bettschart-Wolfensberger R., Vom Berg J. (2020). "OMIP-065: Dog Immunophenotyping and T-Cell Activity Evaluation with a 14-Color Panel". *Cytometry A.* 97, 1024-1027.
- Parel Y., Chizzolini C. (2004). "CD4⁺ CD8⁺ double positive (DP) T cells in health and disease". *Autoimmun Rev.* 3, 215-220.
- Park J.H., Peyrin-Biroulet L., Eisenhut M., Shin J.I. (2017). "IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules". *Autoimmun Rev.* 16, 416-426.
- Parkin J., Cohen B. (2001). "An overview of the immune system". *Lancet.* 357, 1777-1789.

- Pasare C., Medzhitov R. (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells". *Science*. 299, 1033-1036.
- Paul W.E. (2015). "History of interleukin-4". *Cytokine*. 75, 3-7.
- Pedersen L.G., Castelruiz Y., Jacobsen S., Aasted B. (2002). "Identification of monoclonal antibodies that cross-react with cytokines from different animal species". *Vet Immunol Immunopathol*. 88, 111-122.
- Peiravan A., Allenspach K., Boag A.M., Soutter F., Holder A., Catchpole B., Kennedy L.J., Werling D., Procoli F. (2016). "Single nucleotide polymorphisms in major histocompatibility class II haplotypes are associated with potential resistance to inflammatory bowel disease in German shepherd dogs". *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 182, 101-105.
- Peiravan A., Bertolini F., Rothschild M.F., Simpson K.W., Jergens A.E., Allenspach K., Werling D. (2018). "Genome-wide association studies of inflammatory bowel disease in German shepherd dogs". *PLoS One*. 13, e0200685.
- Penninck D., Smyers B., Webster C.R., Rand W., Moore A.S. (2003). "Diagnostic value of ultrasonography in differentiating enteritis from intestinal neoplasia in dogs". *Vet Radiol Ultrasound*. 44, 570-575.
- Penninck D. (2008) "Gastrointestinal Tract". En: Penninck D., d'Anjou M. (eds). *Atlas of Small Animal Ultrasonography*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1st Edtn. Pp 281-318
- Penny H.A., Hodge S.H., Hepworth M.R. (2018). "Orchestration of intestinal homeostasis and tolerance by group 3 innate lymphoid cells". *Semin Immunopathol*. 40, 357-370.
- Pereira G.Q., Gomes L.A., Santos I.S., Alfieri A.F., Weese J.S., Costa M.C. (2018). "Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection". *J Vet Intern Med*. 32, 707-711.
- Pereira M., Valerio-Bolas A., Saraiva-Marques C., Alexandre-Pires G., Pereira da Fonseca I., Santos-Gomes G. (2019). "Development of Dog Immune System: From in Uterus to Elderly". *Vet Sci*. 6, 83.
- Pérez-Merino E.M., Usón-Casaús J.M., Zaragoza-Bayle C., Duque-Carrasco J., Mariñas-Pardo L., Hermida-Prieto M., Barrera-Chacón R., Gualtieri M. (2015a). "Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Clinical and laboratory outcomes". *Vet J*. 206, 385-390.
- Pérez-Merino E.M., Usón-Casaús J.M., Duque-Carrasco J., Zaragoza-Bayle C., Mariñas-Pardo L., Hermida-Prieto M., Vilafranca-Compte M., Barrera-Chacón R., Gualtieri M. (2015b). "Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Endoscopic and histological outcomes". *Vet J*. 206, 391-397.
- Peters I.R., Helps C.R., Calvert E.L., Hall E.J., Day M.J. (2005a). "Cytokine mRNA quantification in histologically normal canine duodenal mucosa by real-time RT-PCR". *Vet Immunol Immunopathol*. 103, 101-111.
- Peters I.R., Helps C.R., Calvert E.L., Hall E.J., Day M.J. (2005b). "Cytokine mRNA quantification in duodenal mucosa from dogs with chronic enteropathies by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction". *J Vet Intern Med*. 19, 644-653.
- Petersen H.H., Nielsen J.P., Heegaard P.M. (2004). "Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry". *Vet Res*. 35, 163-187.
- Peterson P.B., Willard M.D. (2003). "Protein-losing enteropathies". *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 33, 1061-1082.

Bibliografía

- Pieper K., Grimbacher B., Eibel H. (2013). "B-cell biology and development". *J Allergy Clin Immunol.* 131, 959-971.
- Pietra M., Fracassi F., Diana A., Gazzotti T., Bettini G., Peli A., Morini M., Pagliuca G., Roncada P. (2013). "Plasma concentrations and therapeutic effects of budesonide in dogs with inflammatory bowel disease". *Am J Vet Res.* 74, 78-83.
- Pinheiro D., Singh Y., Grant C.R., Appleton R.C., Sacchini F., Walker K.R., Chadbourne A.H., Palmer C.A., Armitage-Chan E., Thompson I., *et al.*, (2011). "Phenotypic and functional characterization of a CD4(+) CD25(high) FOXP3(high) regulatory T-cell population in the dog". *Immunology.* 132, 111-122.
- Platt R., Ng T., Glover S., Roof M., Kimura K., Roth J.A. (2013). "Canine peripheral blood lymphocyte phenotyping by 7-color multiparameter flow cytometry". *Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology.* 35, 197-204.
- Priolo V., Masucci M., Spada E., Proverbio D., Pennisi M.G. (2018). "Naturally occurring antibodies in cats against dog erythrocyte antigens and vice versa". *J Feline Med Surg.* 20, 690-695.
- Procoli F., Mötsküla P.F., Keyte S.V., Priestnall S., Allenspach K. (2013). "Comparison of histopathologic findings in duodenal and ileal endoscopic biopsies in dogs with chronic small intestinal enteropathies". *J Vet Intern Med.* 27, 268-274.
- Provinciali M., Moresi R., Donnini A., Lisa R.M. (2009). "Reference values for CD4+ and CD8+ T lymphocytes with naïve or memory phenotype and their association with mortality in the elderly". *Gerontology.* 55, 314-321.
- Puigdemont A., Brazis P., Serra M., Fondati A. (2006). "Immunologic responses against hydrolyzed soy protein in dogs with experimentally induced soy hypersensitivity". *Am J Vet Res.* 67, 484-488.
- Qiu B.S., Vallance B.A., Blennerhassett P.A., Collins S.M. (1999). "The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis". *Nat Med.* 5, 1178-1182.
- Quintin J., Cheng S.C., van der Meer J.W., Netea M.G. (2014). "Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms". *Curr Opin Immunol.* 29, 1-7.
- Qvigstad G., Kolbjørnsen Ø., Skancke E., Waldum H.L. (2008). "Gastric neuroendocrine carcinoma associated with atrophic gastritis in the norwegian lundehund". *J Comp Pathol.* 139, 194-201.
- Rabiger F.V., Rothe K., von Buttlar H., Bismarck D., Buttner M., Moore P.F., Eschke M., Alber G. (2019a). "Distinct Features of Canine Non-conventional CD4(-)CD8alpha(-) Double-Negative TCRalpha beta(+) vs. TCRgamma delta(+) T Cells". *Front Immunol.* 10, 2748.
- Rabiger F.V., Bismarck D., Protschka M., Kohler G., Moore P.F., Buttner M., von Buttlar H., Alber G., Eschke M. (2019b). "Canine tissue-associated CD4+CD8alpha+ double-positive T cells are an activated T cell subpopulation with heterogeneous functional potential". *PLoS One.* 14, e0213597.
- Radosevich P.M., Nash J.A., Lacy D.B., O'Donovan C., Williams P.E., Abumrad N.N. (1989). "Effects of low- and high-intensity exercise on plasma and cerebrospinal fluid levels of ir-beta-endorphin, ACTH, cortisol, norepinephrine and glucose in the conscious dog". *Brain Res.* 498, 89-98.
- Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R. (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis". *Cell.* 118, 229-241.
- Rautenbach Y., Goddard A., Thompson P.N., Mellanby R.J., Leisewitz A.L. (2017). "A flow cytometric assessment of the lymphocyte immunophenotypes in dogs naturally infected with *Babesia rossi*". *Veterinary Parasitology.* 241, 26-34.

- Reboldi A., Cyster J.G. (2016). "Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier". *Immunol Rev.* 271, 230-245.
- Reggeti F., Bienzle D. (2011). "Flow cytometry in veterinary oncology". *Vet Pathol.* 48, 223-235.
- Rehman A., Rausch P., Wang J., Skieceviciene J., Kiudelis G., Bhagalia K., Amarapurkar D., Kupcinskas L., Schreiber S., Rosenstiel P., *et al.*, (2016). "Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD". *Gut.* 65, 238-248.
- Reinglas J., Gonczi L., Kurt Z., Bessissow T., Lakatos P.L. (2018). "Positioning of old and new biologicals and small molecules in the treatment of inflammatory bowel diseases". *World J Gastroenterol.* 24, 3567-3582.
- Reis A.B., Carneiro C.M., Carvalho M., Teixeira-Carvalho A., Giunchetti R.C., Mayrink W., Genaro O., Correa-Oliveira R., Martins-Filho O.A. (2005). "Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes". *Vet Immunol Immunopathol.* 103, 173-185.
- Ridgway J., Jergens A.E., Niyo Y. (2001). "Possible causal association of idiopathic inflammatory bowel disease with thrombocytopenia in the dog". *Journal of the American Animal Hospital Association.* 37, 65-74.
- Ridyard A.E., Nuttall T.J., Else R.W., Simpson J.W., Miller H.R. (2002). "Evaluation of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine mRNA expression within the colonic mucosa of dogs with idiopathic lymphocytic-plasmacytic colitis". *Vet Immunol Immunopathol.* 86, 205-214.
- Riera Romo M., Perez-Martinez D., Castillo Ferrer C. (2016). "Innate immunity in vertebrates: an overview". *Immunology.* 148, 125-139.
- Ristic J.M., Stidworthy M.F. (2002). "Two cases of severe iron-deficiency anaemia due to inflammatory bowel disease in the dog". *J Small Anim Pract.* 43, 80-83.
- Rodríguez-Franco F., Sainz A., Tesouro M.Á., Amusatogui I. (1997). "Gastritis crónica antral asociada a duodenitis idiopática como causa de vómito crónico en el perro". *Pequeños Animales.* 10, 5-10.
- Rodríguez-Franco F., Palacios N. (2002). "Sintomatología de la enteritis linfoplasmocitaria canina: estudio de 41 casos clínicos". *Pequeños Animales.* 39, 18-27.
- Rodríguez-Franco F., García-Sancho M., Mancho C., Sainz A. (2004). "Índice de actividad para la enfermedad inflamatoria crónica del intestino delgado en el perro". *Pequeños Animales.* 53, 39-48.
- Rogler G., Vavricka S. (2015). "Exposome in IBD: recent insights in environmental factors that influence the onset and course of IBD". *Inflamm Bowel Dis.* 21, 400-408.
- Rogler G., Zeitz J., Biedermann L. (2016). "The Search for Causative Environmental Factors in Inflammatory Bowel Disease". *Dig Dis.* 34 Suppl 1, 48-55.
- Roncucci L., Ponz de Leon M., Scalmati A., Malagoli G., Pratissoli S., Perini M., Chahin N.J. (1988). "The influence of age on colonic epithelial cell proliferation". *Cancer.* 62, 2373-2377.
- Roosenboom B., Wahab P.J., Smids C., Groenen M.J.M., van Koolwijk E., van Lochem E.G., Horjus Talabur Horje C.S. (2019). "Intestinal CD103+CD4+ and CD103+CD8+ T-Cell Subsets in the Gut of Inflammatory Bowel Disease Patients at Diagnosis and During Follow-up". *Inflamm Bowel Dis.* 25, 1497-1509.
- Rosser E.C., Mauri C. (2015). "Regulatory B cells: origin, phenotype, and function". *Immunity.* 42, 607-612.

- Rossi G., Pengo G., Caldin M., Palumbo Piccionello A., Steiner J.M., Cohen N.D., Jergens A.E., Suchodolski J.S. (2014). "Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease". *PLoS One*. 9, e94699.
- Rothe K., Bismarck D., Buttner M., Alber G., von Buttler H. (2017). "Canine peripheral blood CD4(+)CD8(+) double-positive Tcell subpopulations exhibit distinct Tcell phenotypes and effector functions". *Vet Immunol Immunopathol*. 185, 48-56.
- Rudinsky A.J., Howard J.P., Bishop M.A., Sherding R.G., Parker V.J., Gilor C. (2017). "Dietary management of presumptive protein-losing enteropathy in Yorkshire terriers". *J Small Anim Pract*. 58, 103-108.
- Rudinsky A.J., Rowe J.C., Parker V.J. (2018). "Nutritional management of chronic enteropathies in dogs and cats". *J Am Vet Med Assoc*. 253, 570-578.
- Rudorf H., van Schaik G., O'Brien R.T., Brown P.J., Barr F.J., Hall E.J. (2005). "Ultrasonographic evaluation of the thickness of the small intestinal wall in dogs with inflammatory bowel disease". *J Small Anim Pract*. 46, 322-326.
- Saalmuller A., Reddehase M.J., Buhring H.J., Jonjic S., Koszinowski U.H. (1987). "Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes". *Eur J Immunol*. 17, 1297-1301.
- Saidel-Odes L., Odes S. (2014). "Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease". *Ann Gastroenterol*. 27, 189-190.
- Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Hafler D.A. (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system". *Nat Rev Immunol*. 10, 490-500.
- Sakai K., Hatoya S., Furuya M., Shimamura S., Nabetani T., Tani H., Shimada T. (2020). "Decreased serum zinc concentration in dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis, and its associations with disease severity and prognosis". *J Vet Med Sci*.
- Sakai M., Otani I., Watari T., Sato T., Kanayama K., Takeuchi A., Hasegawa A. (2003). "Phenotypic analysis of hepatic lymphocytes from healthy dogs". *J Vet Med Sci*. 65, 157-159.
- Salavati Schmitz S., Gow A., Bommer N., Morrison L., Mellanby R. (2019). "Diagnostic features, treatment, and outcome of dogs with inflammatory protein-losing enteropathy". *J Vet Intern Med*. 33, 2005-2013.
- Salem M., Ammitzboell M., Nys K., Seidelin J.B., Nielsen O.H. (2015). "ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease". *Autophagy*. 11, 585-594.
- Sanderson S.L. (2013) " Nutritional Strategies in Gastrointestinal Disease". En: Washabau R., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. 1st Edtn. Pp 409-428. Elsevier Saunders, St. louis, Missouri, USA,
- Santaolalla R., Mane J., Pedrosa E., Loren V., Fernandez-Banares F., Mallolas J., Carrasco A., Salas A., Rosinach M., Forne M., *et al.*, (2011). "Apoptosis resistance of mucosal lymphocytes and IL-10 deficiency in patients with steroid-refractory Crohn's disease". *Inflamm Bowel Dis*. 17, 1490-1500.
- Sarrabayrouse G., Bossard C., Chauvin J.M., Jarry A., Meurette G., Quevrain E., Bridonneau C., Preisser L., Asehnoune K., Labarriere N., *et al.*, (2014). "CD4CD8alpha lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease". *PLoS Biol*. 12, e1001833.

- Sarrabayrouse G., Alameddine J., Altare F., Jotereau F. (2015). "Microbiota-Specific CD4CD8 $\alpha\alpha$ Tregs: Role in Intestinal Immune Homeostasis and Implications for IBD". *Front Immunol.* 6, 522.
- Sartor R.B., Wu G.D. (2017). "Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches". *Gastroenterology.* 152, 327-339.e324.
- Sato A., Iwasaki A. (2005). "Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity". *Cell Mol Life Sci.* 62, 1333-1338.
- Sattasathuchana P., Allenspach K., Lopes R., Suchodolski J.S., Steiner J.M. (2017). "Evaluation of Serum 3-Bromotyrosine Concentrations in Dogs with Steroid-Responsive Diarrhea and Food-Responsive Diarrhea". *J Vet Intern Med.* 31, 1056-1061.
- Sauter S.N., Benyacoub J., Allenspach K., Gaschen F., Ontsouka E., Reuteler G., Cavadini C., Knorr R., Blum J.W. (2006). "Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhoea treated with an elimination diet". *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 90, 269-277.
- Scheiman J.M., Fendrick A.M. (2007). "Summing the risk of NSAID therapy". *Lancet.* 369, 1580-1581.
- Schieferdecker H.L., Ullrich R., Hirseland H., Zeitz M. (1992). "T cell differentiation antigens on lymphocytes in the human intestinal lamina propria". *J Immunol.* 149, 2816-2822.
- Schmitz S., Werling D., Allenspach K. (2015). "Effects of ex-vivo and in-vivo treatment with probiotics on the inflammasome in dogs with chronic enteropathy". *PLoS One.* 10, e0120779.
- Schmitz S., Suchodolski J. (2016). "Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics - what is the evidence?". *Vet Med Sci.* 2, 71-94.
- Schreiner N.M., Gaschen F., Gröne A., Sauter S.N., Allenspach K. (2008). "Clinical signs, histology, and CD3-positive cells before and after treatment of dogs with chronic enteropathies". *J Vet Intern Med.* 22, 1079-1083.
- Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions". *J Leukoc Biol.* 75, 163-189.
- Schroeder H.W., Jr., Cavacini L. (2010). "Structure and function of immunoglobulins". *J Allergy Clin Immunol.* 125, S41-52.
- Segarra S., Martínez-Subiela S., Cerdà-Cuellar M., Martínez-Puig D., Muñoz-Prieto A., Rodríguez-Franco F., Rodríguez-Bertos A., Allenspach K., Velasco A., Cerón J. (2016). "Oral chondroitin sulfate and prebiotics for the treatment of canine Inflammatory Bowel Disease: a randomized, controlled clinical trial". *BMC Vet Res.* 12, 49.
- Shakir L., Javeed A., Ashraf M., Riaz A. (2011). "Metronidazole and the immune system". *Pharmazie.* 66, 393-398.
- Simpson K.W. (2013) "Stomach". En: Washabau R., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology.* Elsevier Saunders, St. Louis Missouri, USA. 1st Edtn. Pp 606-650.
- Simpson K.W., Dogan B., Rishniw M., Goldstein R.E., Klaessig S., McDonough P.L., German A.J., Yates R.M., Russell D.G., Johnson S.E., et al.,. (2006). "Adherent and invasive Escherichia coli is associated with granulomatous colitis in boxer dogs". *Infect Immun.* 74, 4778-4792.
- Singh S., Graff L.A., Bernstein C.N. (2009). "Do NSAIDs, antibiotics, infections, or stress trigger flares in IBD?". *Am J Gastroenterol.* 104, 1298-1313; quiz 1314.

Bibliografía

- Slovak J.E., Wang C., Morrison J.A., Deitz K.L., LeVine D.N., Otoni C., King R.R., Gerber L.E., Hanson K.R., Lundberg A.P., *et al.*, (2014). "Endoscopic assessment of the duodenum in dogs with inflammatory bowel disease". *J Vet Intern Med.* 28, 1442-1446.
- Slovak J.E., Wang C., Sun Y., Otoni C., Morrison J., Deitz K., LeVine D., Jergens A.E. (2015). "Development and validation of an endoscopic activity score for canine inflammatory bowel disease". *Vet J.* 203, 290-295.
- Smids C., Horjus Talabur Horje C.S., Drylewicz J., Roosenboom B., Groenen M.J.M., van Koolwijk E., van Lochem E.G., Wahab P.J. (2018). "Intestinal T Cell Profiling in Inflammatory Bowel Disease: Linking T Cell Subsets to Disease Activity and Disease Course". *J Crohns Colitis.* 12, 465-475.
- Sokol C.L., Luster A.D. (2015). "The chemokine system in innate immunity". *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7
- Sokol H., Leducq V., Aschard H., Pham H.P., Jegou S., Landman C., Cohen D., Liguori G., Bourrier A., Nion-Larmurier I., *et al.*, (2017). "Fungal microbiota dysbiosis in IBD". *Gut.* 66, 1039-1048.
- Sonea I.M., Jergens A.E., Sacco R.E., Niyo Y., Merten E., Kauffman L.K., Moore P.F. (2000). "Flow cytometric analysis of colonic and small intestinal mucosal lymphocytes obtained by endoscopic biopsy in the healthy dog". *Vet Immunol Immunopathol.* 77, 103-119.
- Soontarak S., Chow L., Johnson V., Coy J., Webb C., Wennogle S., Dow S. (2019). "Humoral immune responses against gut bacteria in dogs with inflammatory bowel disease". *PLoS One.* 14, e0220522.
- Souza C.P., Rosychuk R.A.W., Contreras E.T., Schissler J.R., Simpson A.C. (2018). "A retrospective analysis of the use of lokivetmab in the management of allergic pruritus in a referral population of 135 dogs in the western USA". *Vet Dermatol.* 29, 489-e164.
- Srirajaskanthan R., Winter M., Muller A.F. (2005). "Venous thrombosis in inflammatory bowel disease". *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 17, 697-700.
- Stecher B., Hardt W.D. (2008). "The role of microbiota in infectious disease". *Trends Microbiol.* 16, 107-114.
- Steenholt J.V., Nielsen C., Baudewijn L., Staal A., Rasmussen K.S., Sabir H.J., Barington T., Husby S., Toft-Hansen H. (2017). "The composition of T cell subtypes in duodenal biopsies are altered in coeliac disease patients". *PLoS One.* 12, e0170270.
- Steyers C.M., 3rd, Miller F.J., Jr. (2014). "Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases". *Int J Mol Sci.* 15, 11324-11349.
- Strober W., Asano N., Fuss I., Kitani A., Watanabe T. (2014). "Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease". *Immunol Rev.* 260, 249-260.
- Suchodolski J.S., Camacho J., Steiner J.M. (2008). "Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis". *FEMS Microbiol Ecol.* 66, 567-578.
- Suchodolski J.S., Dowd S.E., Westermarck E., Steiner J.M., Wolcott R.D., Spillmann T., Harmoinen J.A. (2009). "The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing". *BMC Microbiol.* 9, 210.
- Suchodolski J.S. (2011). "Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 41, 261-272.

- Suchodolski J.S., Markel M.E., Garcia-Mazcorro J.F., Unterer S., Heilmann R.M., Dowd S.E., Kachroo P., Ivanov I., Minamoto Y., Dillman E.M., *et al.*, (2012). "The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease". *PLoS One*. 7, e51907.
- Suchodolski J.S. (2013) "Gastrointestinal Microbiota". En: Washabau R.J., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, USA. 1st Edtn. Pp 32-41.
- Suchodolski J.S. (2016). "Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats". *Vet J*. 215, 30-37.
- Sugita K., Yanuma N., Ohno H., Takahashi K., Kawano K., Morita H., Ohmori K. (2019). "Oral faecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhoea in a dog: a case report". *BMC Vet Res*. 15, 11.
- Sujino T., London M., Hoytema van Konijnenburg D.P., Rendon T., Buch T., Silva H.M., Lafaille J.J., Reis B.S., Mucida D. (2016). "Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4(+) T cells controls gut inflammation". *Science*. 352, 1581-1586.
- Sutherland-Smith J., Penninck D.G., Keating J.H., Webster C.R. (2007). "Ultrasonographic intestinal hyperechoic mucosal striations in dogs are associated with lacteal dilation". *Vet Radiol Ultrasound*. 48, 51-57.
- Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L., Zhang X., Fathman C.G., Glimcher L.H. (2015). "Pillars article: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell. 2000. 100: 655-669". *J Immunol*. 194, 2961-2975.
- Tamamoto-Mochizuki C., Paps J.S., Olivry T. (2019). "Proactive maintenance therapy of canine atopic dermatitis with the anti-IL-31 lokivetmab. Can a monoclonal antibody blocking a single cytokine prevent allergy flares?". *Vet Dermatol*.
- Tams T.R. (2003) "Chronic disorders of the small intestine". En: Tams T.R. (ed). *Handbook of Small Animal Gastroenterology*. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA. 2nd Edtn. Pp 211-250.
- Tamura Y., Ohta H., Yokoyama N., Lim S.Y., Osuga T., Morishita K., Nakamura K., Yamasaki M., Takiguchi M. (2014). "Evaluation of selected cytokine gene expression in colonic mucosa from dogs with idiopathic lymphocytic-plasmacytic colitis". *J Vet Med Sci*. 76, 1407-1410.
- Tamura Y., Ohta H., Kagawa Y., Osuga T., Morishita K., Sasaki N., Takiguchi M. (2019). "Plasma amino acid profiles in dogs with inflammatory bowel disease". *J Vet Intern Med*. 33, 1602-1607.
- Tanoue T., Atarashi K., Honda K. (2016). "Development and maintenance of intestinal regulatory T cells". *Nat Rev Immunol*. 16, 295-309.
- Teramoto K., Miura S., Tsuzuki Y., Hokari R., Watanabe C., Inamura T., Ogawa T., Hosoe N., Nagata H., Ishii H., *et al.*, (2005). "Increased lymphocyte trafficking to colonic microvessels is dependent on MAdCAM-1 and C-C chemokine mLARC/CCL20 in DSS-induced mice colitis". *Clin Exp Immunol*. 139, 421-428.
- Tezuka H., Ohteki T. (2010). "Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells". *Immunol Rev*. 234, 247-258.
- Thaiss C.A., Zmora N., Levy M., Elinav E. (2016). "The microbiome and innate immunity". *Nature*. 535, 65-74.
- Thapa P., Farber D.L. (2019). "The Role of the Thymus in the Immune Response". *Thorac Surg Clin*. 29, 123-131.
- Thomson C.W., Lee B.P., Zhang L. (2006). "Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators". *Immunol Res*. 35, 163-178.

Bibliografía

- Titmarsh H., Gow A.G., Kilpatrick S., Sinclair J., Hill T., Milne E., Philbey A., Berry J., Handel I., Mellanby R.J. (2015). "Association of Vitamin D Status and Clinical Outcome in Dogs with a Chronic Enteropathy". *J Vet Intern Med.* 29, 1473-1478.
- Tizard I.R. (2009a) "Técnicas de inmunodiagnóstico". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier Saunders, College Staton, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 509-531.
- Tizard I.R. (2009b) "Los anticuerpos: receptores solubles de antígeno". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 170-180.
- Tizard I.R. (2009c) "Los linfocitos B y su respuesta al antígeno". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 152-169.
- Tizard I.R. (2009d) "Los Linfocitos". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 128-151.
- Tizard I.R. (2009e) "Regulación de la Inmunidad Adquirida". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 209-222.
- Tizard I.R. (2009f) "Cómo se activa la inflamación". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 11-27.
- Tizard I.R. (2009g) "Señalización celular: las citocinas y sus receptores". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la inmunología veterinaria*. Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 70-80.
- Tizard I.R. (2009h) "Los neutrófilos y sus productos". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria..* Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 28-40.
- Tizard I.R. (2009i) "Los macrófagos y las últimas fases de la inflamación". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier Saunders, College Station, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 41-56.
- Tizard I.R. (2009j) "La defensa del organismo". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 1-27.
- Tizard I.R. (2009k) "Órganos del sistema inmune". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 112-127.
- Tizard I.R. (2009l) "Función de los linfocitos T y destrucción de los invasores celulares". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria..* Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 196-208.
- Tizard I.R. (2009m) "Los linfocitos T colaboradores y su respuesta al antígeno". En: Tizard I.R. (ed). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier Saunders, College Station, Texas, Estados Unidos. Octava Edtn. Pp 139-151.
- Tizard I.R., Jones S.W. (2018). "The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 48, 307-322.
- Tolstanova G., Deng X., French S.W., Lungu W., Paunovic B., Khomenko T., Ahluwalia A., Kaplan T., Dacosta-Iyer M., Tarnawski A., *et al.*, (2012). "Early endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice". *Lab Invest.* 92, 9-21.

- Tom M.R., Li J., Ueno A., Fort Gasia M., Chan R., Hung D.Y., Chenoo S., Iacucci M., Jijon H.B., Kaplan G.G., *et al.*, (2016). "Novel CD8+ T-Cell Subsets Demonstrating Plasticity in Patients with Inflammatory Bowel Disease". *Inflamm Bowel Dis.* 22, 1596-1608.
- Tomasetti C., Poling J., Roberts N.J., London N.R., Jr., Pittman M.E., Haffner M.C., Rizzo A., Baras A., Karim B., Kim A., *et al.*, (2019). "Cell division rates decrease with age, providing a potential explanation for the age-dependent deceleration in cancer incidence". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116, 20482-20488.
- Toresson L., Steiner J.M., Suchodolski J.S., Spillmann T. (2016). "Oral Cobalamin Supplementation in Dogs with Chronic Enteropathies and Hypocobalaminemia". *J Vet Intern Med.* 30, 101-107.
- Toresson L., Steiner J.M., Spodsberg E., Olmedal G., Suchodolski J.S., Lidbury J.A., Spillmann T. (2019). "Effects of oral versus parenteral cobalamin supplementation on methylmalonic acid and homocysteine concentrations in dogs with chronic enteropathies and low cobalamin concentrations". *Vet J.* 243, 8-14.
- Tørnqvist-Johnsen C., Campbell S., Gow A., Bommer N.X., Salavati S., Mellanby R.J. (2020). "Investigation of the efficacy of a dietetic food in the management of chronic enteropathies in dogs". *Vet Rec.* 186, 26.
- Torres J., Mehandru S., Colombel J.F., Peyrin-Biroulet L. (2017). "Crohn's disease". *Lancet.* 389, 1741-1755.
- Tschöp M.H., Hugenholtz P., Karp C.L. (2009). "Getting to the core of the gut microbiome". *Nat Biotechnol.* 27, 344-346.
- Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenko T., Cantarel B.L., Duncan A., Ley R.E., Sogin M.L., Jones W.J., Roe B.A., Affourtit J.P., *et al.*, (2009). "A core gut microbiome in obese and lean twins". *Nature.* 457, 480-484.
- Ueno A., Jijon H., Chan R., Ford K., Hirota C., Kaplan G.G., Beck P.L., Iacucci M., Fort Gasia M., Barkema H.W., *et al.*, (2013). "Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients". *Inflamm Bowel Dis.* 19, 2522-2534.
- Ungaro F., Massimino L., D'Alessio S., Danese S. (2019). "The gut virome in inflammatory bowel disease pathogenesis: From metagenomics to novel therapeutic approaches". *United European Gastroenterol J.* 7, 999-1007.
- Ungaro R., Fukata M., Hsu D., Hernandez Y., Breglio K., Chen A., Xu R., Sotolongo J., Espana C., Zaias J., *et al.*, (2009). "A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 296, G1167-1179.
- Van Damme N., De Vos M., Baeten D., Demetter P., Mielants H., Verbruggen G., Cuvelier C., Veys E.M., De Keyser F. (2001). "Flow cytometric analysis of gut mucosal lymphocytes supports an impaired Th1 cytokine profile in spondyloarthritis". *Ann Rheum Dis.* 60, 495-499.
- van der Gaag I. (1988). "The histological appearance of peroral gastric biopsies in clinically healthy and vomiting dogs". *Can J Vet Res.* 52, 67-74.
- van der Gaag I., Happé R.P. (1990). "The histological appearance of peroral small intestinal biopsies in clinically healthy dogs and dogs with chronic diarrhea". *Zentralbl Veterinarmed A.* 37, 401-416.
- Van Kruiningen H.J., Hayden D.W. (1972). "Interpreting problem diarrheas of dogs". *Veterinary Clinics of North America.* 2, 29-47.

Bibliografía

- Vermeire S., McGovern D.P., Van Assche G., Rutgeerts P. (2010) " Genetics of Inflammatory Bowel Disease: how modern genomics informs basic, clinical and translational science". En: Targan S.R., Shanahan F., Karp L.C. (eds). *Inflammatory Bowel Disease: Translating basic science into clinical practice*. 1st Edtn. Pp 16-24. Wiley-Blackwell, A John & Sons, Ltd., Publication, West Sussex, UK,
- Villaescusa A., García-Sancho M., Rodríguez-Franco F., Sainz Á. (2012a). "Early-life longitudinal survey of peripheral blood lymphocyte subsets in Beagle dogs". *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 149, 126-131.
- Villaescusa A., Tesouro M.A., García-Sancho M., Ayllón T., Rodríguez-Franco F., Sainz A. (2012b). "Evaluation of peripheral blood lymphocyte subsets in family-owned dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*". *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 35, 391-396.
- Villaescusa A., García-Sancho M., Delgado A.M., Tesouro M.Á., Rodríguez-Franco F., Sainz Á. (2012c). "Immunophenotypic evaluation of working Labrador Retrievers and German Shepherd dogs living in the same environment". *The Veterinary Journal*. 193, 602-605.
- Villaescusa A., García-Sancho M., Rodríguez-Franco F., Tesouro M., Sainz Á. (2015). "Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*". *Vet J*. 204, 263-268.
- Villanacci V., Antonelli E., Geboes K., Casella G., Bassotti G. (2013). "Histological healing in inflammatory bowel disease: a still unfulfilled promise". *World J Gastroenterol*. 19, 968-978.
- Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T., Ugolini S. (2008). "Functions of natural killer cells". *Nat Immunol*. 9, 503-510.
- Volkman M., Hepworth M.R., Ebner F., Rausch S., Kohn B., Hartmann S. (2014). "Frequencies of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with primary immune-mediated thrombocytopenia and chronic enteropathy: A pilot study". *The Veterinary Journal*. 202, 630-633.
- Volkman M., Steiner J.M., Fosgate G.T., Zentek J., Hartmann S., Kohn B. (2017). "Chronic Diarrhea in Dogs – Retrospective Study in 136 Cases". *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 31, 1043-1055.
- von Andrian U.H., Mempel T.R. (2003). "Homing and cellular traffic in lymph nodes". *Nat Rev Immunol*. 3, 867-878.
- von Buttlar H., Bismarck D., Alber G. (2015). "Peripheral canine CD4(+)CD8(+) double-positive T cells - unique amongst others". *Vet Immunol Immunopathol*. 168, 169-175.
- Wagner A., Junginger J., Lemensieck F., Hewicker-Trautwein M. (2018). "Immunohistochemical characterization of gastrointestinal macrophages/phagocytes in dogs with inflammatory bowel disease (IBD) and non-IBD dogs". *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 197, 49-57.
- Wallace K.L., Zheng L.B., Kanazawa Y., Shih D.Q. (2014). "Immunopathology of inflammatory bowel disease". *World J Gastroenterol*. 20, 6-21.
- Washabau R.J., Day M.J., Willard M.D., Hall E.J., Jergens A.E., Mansell J., Minami T., Bilzer T.W. (2010). "Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals". *J Vet Intern Med*. 24, 10-26.
- Washabau R.J. (2013a) "Vomiting". En: Washabau R.J., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 1st Edtn. Pp 167-173.
- Washabau R.J. (2013b) "Large Intestine". En: Washabau R.J., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 1st Edtn. Pp 729-777.
- Watabe A., Fukumoto S., Komatsu T., Endo Y., Kadosawa T. (2011). "Alterations of lymphocyte subpopulations in healthy dogs with aging and in dogs with cancer". *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 142, 189-200.

- Watabe A., Hanazono K., Komatsu T., Fu D.-R., Endo Y., Kadosawa T. (2012). "Peripheral Lymphocyte Subsets as a Prognostic Indicator of Mortality and Morbidity in Healthy Dogs". *Journal of Veterinary Medical Science*. 74, 937-943.
- Weese J.S., Giguère S., Guardabassi L., Morley P.S., Papich M., Ricciuto D.R., Sykes J.E. (2015). "ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance". *J Vet Intern Med*. 29, 487-498.
- Weiskopf D., Weinberger B., Grubeck-Loebenstein B. (2009). "The aging of the immune system". *Transpl Int*. 22, 1041-1050.
- Weiss D.J. (2002). "Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology". *Vet Clin Pathol*. 31, 72-82.
- Wennogle S.A., Priestnall S.L., Webb C.B. (2017). "Histopathologic Characteristics of Intestinal Biopsy Samples from Dogs With Chronic Inflammatory Enteropathy With and Without Hypoalbuminemia". *J Vet Intern Med*. 31, 371-376.
- Wennogle S.A., Priestnall S.L., Suárez-Bonnet A., Webb C.B. (2019a). "Comparison of clinical, clinicopathologic, and histologic variables in dogs with chronic inflammatory enteropathy and low or normal serum 25-hydroxycholecalciferol concentrations". *J Vet Intern Med*. 33, 1995-2004.
- Wennogle S.A., Priestnall S.L., Suárez-Bonnet A., Soontarak S., Webb C.B. (2019b). "Lymphatic endothelial cell immunohistochemical markers for evaluation of the intestinal lymphatic vasculature in dogs with chronic inflammatory enteropathy". *J Vet Intern Med*. 33, 1669-1676.
- Westermarck E., Wiberg M.E. (2006). "Effects of diet on clinical signs of exocrine pancreatic insufficiency in dogs". *J Am Vet Med Assoc*. 228, 225-229.
- Westermarck E., Skrzypczak T., Harmoinen J., Steiner J.M., Ruaux C.G., Williams D.A., Eerola E., Sundbäck P., Rinkinen M. (2005). "Tylosin-responsive chronic diarrhea in dogs". *J Vet Intern Med*. 19, 177-186.
- White R., Atherly T., Guard B., Rossi G., Wang C., Mosher C., Webb C., Hill S., Ackermann M., Sciabarra P., et al., (2017). "Randomized, controlled trial evaluating the effect of multi-strain probiotic on the mucosal microbiota in canine idiopathic inflammatory bowel disease". *Gut Microbes*. 8, 451-466.
- Whitley N.T., Day M.J. (2011). "Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease". *J Small Anim Pract*. 52, 70-85.
- Wilcock B. (1992). "Endoscopic biopsy interpretation in canine or feline enterocolitis". *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 7, 162-171.
- Wilcock B. (2013) " Histopathology". En: Washabau R., Day M.J. (eds). *Canine & Feline Gastroenterology*. 1st Edtn. Pp 333-385. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri,
- Wilkerson M.J., Dolce K., Koopman T., Shuman W., Chun R., Garrett L., Barber L., Avery A. (2005). "Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules". *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 106, 179-196.
- Willard M.D., Lovering S.L., Cohen N.D., Weeks B.R. (2001). "Quality of tissue specimens obtained endoscopically from the duodenum of dogs and cats". *J Am Vet Med Assoc*. 219, 474-479.
- Willard M.D., Jergens A.E., Duncan R.B., Leib M.S., McCracken M.D., DeNovo R.C., Helman R.G., Slater M.R., Harbison J.L. (2002). "Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats". *J Am Vet Med Assoc*. 220, 1177-1182.

Bibliografía

- Willard M.D., Mansell J., Fosgate G.T., Gualtieri M., Olivero D., Lecoindre P., Twedt D.C., Collett M.G., Day M.J., Hall E.J., *et al.*. (2008). "Effect of sample quality on the sensitivity of endoscopic biopsy for detecting gastric and duodenal lesions in dogs and cats". *J Vet Intern Med.* 22, 1084-1089.
- Willard M.D., Moore G.E., Denton B.D., Day M.J., Mansell J., Bilzer T., Wilcock B., Gualtieri M., Olivero D., Lecoindre P., *et al.*. (2010). "Effect of tissue processing on assessment of endoscopic intestinal biopsies in dogs and cats". *J Vet Intern Med.* 24, 84-89.
- Willard M., Mansell J. (2011). "Correlating clinical activity and histopathologic assessment of gastrointestinal lesion severity: current challenges". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 41, 457-463.
- Winnicka A., Jagielski D., Hoffmann-Jagielska M., Lechowski R. (2002). "Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy". *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 49, 303-306.
- Wintjens D.S.J., de Jong M.J., van der Meulen-de Jong A.E., Romberg-Camps M.J., Becx M.C., Maljaars J.P., van Bodegraven A.A., Mahmmoud N., Markus T., Haans J., *et al.*. (2019). "Novel Perceived Stress and Life Events Precede Flares of Inflammatory Bowel Disease: A Prospective 12-Month Follow-Up Study". *J Crohns Colitis.* 13, 410-416.
- Xie D., Hai B., Xie X., Liu L., Ayello J., Ma X., Zhang J. (2009). "Peripheral CD4+CD8+ cells are the activated T cells expressed granzyme B (GrB), Foxp3, interleukin 17 (IL-17), at higher levels in Th1/Th2 cytokines". *Cell Immunol.* 259, 157-164.
- Yamasaki K., Suematsu H., Takahashi T. (1996). "Comparison of gastric and duodenal lesions in dogs and cats with and without lymphocytic-plasmacytic enteritis". *J Am Vet Med Assoc.* 209, 95-97.
- Young H.A., Bream J.H. (2007). "IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications". *Curr Top Microbiol Immunol.* 316, 97-117.
- Yuki M., Sugimoto N., Takahashi K., Otsuka H., Nishii N., Suzuki K., Yamagami T., Ito H. (2006). "A case of protein-losing enteropathy treated with methotrexate in a dog". *J Vet Med Sci.* 68, 397-399.
- Zeigler B.M., Boyle-Holmes Y., Falzone D., Farmer J. (2013). "Validation of an eight parameter immunophenotyping panel in adult canines for assessment of immunotoxicity". *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 154, 75-81.
- Zhang N., Bevan M.J. (2011). "CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system". *Immunity.* 35, 161-168.
- Zhao Y., Lin L., Xiao Z., Li M., Wu X., Li W., Li X., Zhao Q., Wu Y., Zhang H., *et al.*. (2018). "Protective Role of gammadelta T Cells in Different Pathogen Infections and Its Potential Clinical Application". *J Immunol Res.* 2018, 5081634.
- Zhou G., Yu L., Fang L., Yang W., Yu T., Miao Y., Chen M., Wu K., Chen F., Cong Y., *et al.*. (2018). "CD177(+) neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD". *Gut.* 67, 1052-1063.
- Zhou G.X., Liu Z.J. (2017). "Potential roles of neutrophils in regulating intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease". *J Dig Dis.* 18, 495-503.
- Zittan E., Kabakchiev B., Kelly O.B., Milgrom R., Nguyen G.C., Croitoru K., Steinhart A.H., Silverberg M.S. (2017). "Development of the Harvey-Bradshaw Index-pro (HBI-PRO) Score to Assess Endoscopic Disease Activity in Crohn's Disease". *J Crohns Colitis.* 11, 543-548.
- Zoran D.L. (2010). "Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 40, 221-239.

Zuckermann F.A. (1999). "Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells". *Vet Immunol Immunopathol.* 72, 55-66.

