

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**Validación de la Enteroscopia de Doble Balón (EDB)
en el Perro (*Canis lupus familiaris*, L.)**

D. Ricardo Sarriá Cabrera

2013



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS

**“VALIDACIÓN DE LA ENTEROSCOPIA DE DOBLE BALÓN (EDB) EN EL
PERRO (*Canis lupus familiaris*, L.)”**

**“VALIDATION OF DOUBLE BALLOON ENTEROSCOPY IN THE DOG
PERRO (*Canis lupus familiaris*, L.)”**

**RICARDO SARRIÁ CABRERA
2013**

TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1. López Albors, O, Rojo, D, Sarriá, R, Soria, F, Pérez Cuadrado, E, and Latorre, R. Morphometry of the canine intestine with reference to the use of double balloon endoscopy. *The Veterinary Journal* (2011); **190**, 113-118.
2. Sarriá, R, Latorre, R, Henroteaux, M, Henroteaux, N, Soria, F, Pérez-Cuadrado, E, and López Albors, O. Morphometric study of the layers of the canine small intestine at five sampling sites. *The Veterinary Journal* (2012); **192**, 498-502.
3. Sarriá, R, López Albors, O, Soria, F, Ayala, I, Pérez Cuadrado, E, Esteban, P, and Latorre, R. Characterization of oral double balloon endoscopy in the dog. *The Veterinary Journal* (2013); **195**, 331-336.
4. Sarriá, R, López Albors, O, Soria, F, Ayala, I, Pérez Cuadrado, E, Chacón, S, and Latorre, R. Characterization of anal double balloon endoscopy in the dog. *The Veterinary Journal* (2013); doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.020>.

RELACIÓN ALFABÉTICA DE ABREVIATURAS

ESPAÑOL:

EDB: enteroscopia de doble balón.

PCR: proteína C-reactiva

INGLÉS:

CRP: c-reactive protein

CT: computed tomography

DBE: double balloon enteroscopy

GALT: gut associated lymphoid tissue

MRI: magnetic resonance imaging

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 7 |
| 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 3.1. <u>ANATOMÍA DEL INTESTINO DELGADO DEL PERRO</u> | 13 |
| 3.1.1. Duodeno..... | 13 |
| 3.1.2. Yeyuno e íleon..... | 14 |
| 3.1.3. Mesenterio..... | 15 |
| 3.1.4. Vascularización..... | 16 |
| 3.1.5. Factores anatómicos que condicionan la EDB en el perro..... | 17 |
| 3.2. <u>ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL INTESTINO DELGADO DEL PERRO</u> | 18 |
| 3.2.1. Túnica mucosa..... | 19 |
| 3.2.2. Túnica submucosa..... | 21 |
| 3.2.3. Túnica muscular..... | 22 |
| 3.2.4. Túnica serosa..... | 22 |
| 3.2.5. Vascularización de la pared intestinal..... | 23 |
| 3.2.6. Plexo entérico..... | 23 |
| 3.2.7. Tejido linfático asociado al intestino..... | 24 |
| 3.2.8. Necesidad de la estandarización del grosor de las tunicas a lo largo del intestino..... | 24 |
| 3.3. <u>ENDOSCOPIA GASTROINTESTINAL EN PERROS</u> | 25 |
| 3.3.1. Equipamiento de un endoscopio..... | 25 |
| 3.3.2. Utilidad clínica..... | 26 |
| 3.3.3. Complicaciones de la endoscopia convencional..... | 27 |
| 3.4. <u>ENTEROSCOPIA DE DOBLE BALÓN (EDB) EN MEDICINA HUMANA</u> | 28 |
| 3.4.1. Características del equipo EN-450T5..... | 28 |
| 3.4.2. Técnica endoscópica de doble balón..... | 29 |
| 3.4.3. Rutas de inserción..... | 30 |
| 3.4.4. Utilidad clínica EDB..... | 31 |
| 3.4.5. Complicaciones de la EDB..... | 32 |

| | |
|--------------------------------------|------------|
| 4. RELACIÓN DE ARTÍCULOS..... | 35 |
| 4.1. <u>ARTÍCULO 1</u> | 39 |
| 4.2. <u>ARTÍCULO 2</u> | 43 |
| 4.3. <u>ARTÍCULO 3</u> | 47 |
| 4.4. <u>ARTÍCULO 4</u> | 51 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 55 |
| 6. RESUMEN GENERAL..... | 59 |
| 7. EXTENDED SUMMARY..... | 77 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 93 |
| 9. APÉNDICE..... | 101 |

1. INTRODUCCIÓN

En las dos últimas décadas el auge de las técnicas de mínima invasión como la laparoscopia y endoscopia en medicina veterinaria ha permitido grandes avances en el diagnóstico y terapéutica de las enfermedades gastrointestinales en el perro y el gato (Tams, 2003).

La ventaja de la endoscopia flexible respecto a otros métodos diagnósticos como la radiología y la ecografía, es que no solo permite la visualización directa de la mucosa del esófago, estómago, duodeno, íleon y colon, sino que, además, hace posible la toma de muestras biológicas y microbiológicas de la mucosa intestinal (Tams, 2003). Sin embargo, una de las principales limitaciones de la endoscopia flexible en la clínica veterinaria es que la exploración del intestino delgado actualmente está limitada, por vía oral al duodeno, y por vía anal al íleon, quedando la mayor parte (yeyuno) sin explorar. En consecuencia, cuando se pretende obtener diagnósticos precisos en el intestino delgado mediante endoscopia, la restricción que impone muestrear una porción escasa de este órgano puede suponer una limitación importante. Un ejemplo de ello son las enteropatías multifocales, que cursan con lesiones más severas en la mucosa ileal que en el duodeno, y cuyo diagnóstico histopatológico varía según la porción de intestino biopsiada (Moore, 2003; Tams, 2003). Actualmente, el estudio histopatológico de las yeyunopatías solo es posible mediante laparotomía o laparoscopia, procedimientos, sobre todo el primero, con un mayor potencial de complicaciones (Casamian-Sorrosal et al., 2010).

Con independencia del procedimiento de muestreo, en el diagnóstico de las enteropatías es importante contemplar posibles variaciones en la morfología de las tunicas intestinales según sea la porción afectada. Estos cambios podrían ser relevantes para la correcta interpretación de las biopsias o de la imagen ecográfica, sin embargo, de

momento, la información en este sentido es poco precisa y limitada a ciertas partes del intestino (Washabau et al., 2010). Uno de los aspectos que convendría definir es el referido a los cambios en el grosor de la mucosa, submucosa y muscular en las diferentes porciones intestinales, ya que en los procesos inflamatorios se aprecian alteraciones importantes que se deberían tener en cuenta (Delaney et al., 2003).

Según lo expuesto, entre los retos actuales de la gastroenterología canina destaca lograr una exploración endoscópica y biopsiado de la totalidad del intestino delgado, así como la posibilidad de disponer de un patrón estandarizado de la morfología intestinal a lo largo de toda su extensión. Esto permitiría profundizar en el conocimiento global del intestino delgado, así como realizar diagnósticos histopatológicos rigurosos de las diferentes enteropatías.

Una situación parecida existía en medicina humana hasta finales del siglo pasado, sin embargo, los avances en endoscopia de los últimos años permitieron examinar tramos profundos del intestino delgado, e incluso la posibilidad de una exploración completa de todo el tracto gastrointestinal. Una de las primeras técnicas diseñada con este fin fue la cápsula endoscópica (Iddan et al., 2000), que si bien supuso la primera posibilidad real de visualizar el intestino delgado completo, no permite terapéutica alguna. En el año 2001, Yamamoto y colaboradores presentaron la enteroscopia de doble balón (EDB), lo que promovió grandes avances tanto en el diagnóstico como en la terapéutica de enfermedades gastrointestinales en tramos profundos del intestino delgado, extendiéndose su empleo rápidamente en la clínica hospitalaria de todo el mundo. En los años siguientes a la invención de la EDB surgieron otras técnicas de enteroscopia flexible alternativas, como la enteroscopia espiral (Akerman et al., 2008) o la enteroscopia mono-balón (Tsujikawa et al., 2008). Sin embargo, transcurrida una década, la EDB sigue siendo el método más usado y

preferido por la mayoría de los servicios de enteroscopia, dado que presenta un mayor porcentaje de éxito en el diagnóstico (Lenz and Domagk, 2012), alcanza mayor profundidad de exploración (Messer et al 2013) y presenta una mayor tasa de exploraciones completas del tracto gastrointestinal (Takano et al., 2011; Akerman, 2013; Messer 2013).

Según lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo de Tesis Doctoral se pretende profundizar en el conocimiento del intestino delgado del perro mediante el empleo de la enteroscopia de doble balón. Para ello creemos que es necesario conocer, en primer lugar, si la anatomía del intestino delgado de esta especie cumple las condiciones necesarias para el empleo de la EDB. Así, planteamos como primer objetivo “*evaluar de forma detallada la morfología del intestino delgado en el perro y su relación con las condiciones de seguridad necesarias para la aplicación de la EDB*” (artículo 1). Por otro lado, tal y como se ha expuesto, para garantizar un correcto diagnóstico histopatológico resulta relevante definir los posibles cambios morfológicos (grosor) en las tunicas del intestino delgado a lo largo de toda su extensión. Por ello, planteamos como segundo objetivo “*contribuir a la caracterización de la histología normal del intestino del perro mediante la cuantificación sistemática del grosor de sus tunicas*” (artículo 2). Por último, para validar el empleo clínico de la EDB en el perro es imprescindible comprobar, de forma experimental, que la técnica es efectiva en esta especie, y que además, no ocasiona efectos indeseados y garantiza las condiciones de seguridad del paciente. Así pues, el tercer objetivo que nos hemos planteado consiste en: “*evaluar la eficacia y seguridad de la técnica EDB en el perro tanto vía oral* (artículo 3) *como vía anal*” (artículo 4).

2.OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se plantea con los siguientes objetivos:

1. Evaluar de forma detallada la morfología del intestino delgado en el perro y su relación con las condiciones de seguridad necesarias para la aplicación de la EDB (artículo 1).
2. Contribuir a la caracterización de la histología normal del intestino del perro mediante la cuantificación sistemática del grosor de sus tunicas (artículo 2).
3. Evaluar la eficacia y seguridad de la técnica de EDB en el perro tanto vía oral (artículo 3) como vía anal (artículo 4).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Esta revisión bibliográfica comprende cuatro apartados, el primero corresponde a la descripción de la anatomía del intestino delgado del perro, incluyendo aspectos morfológicos del mesenterio y de la vascularización. El segundo se centra en la organización histológica del intestino delgado del perro. En el tercero se revisan aspectos generales de la endoscopia gastrointestinal en el perro y sus limitaciones en el intestino delgado. En el cuarto y último se describe la enteroscopia de doble balón (EDB) en medicina humana.

3.1. ANATOMIA DEL INTESTINO DELGADO DEL PERRO

El intestino delgado es la porción del tubo digestivo comprendida entre el píloro y el orificio ileal. Su longitud media aproximada es variable según autores: 3 metros (Climent y col., 2005), 4 metros (Sandoval, 2000), o entre 1,8 y 4,8 metros (Nickel y col., 1979). El intestino delgado se divide en tres porciones; duodeno, yeyuno e íleon, que son tratadas a continuación por separado, al igual que el mesenterio y la vascularización. Los factores anatómicos que podrían condicionar la EDB en el perro son analizados al final de este capítulo.

3.1.1. Duodeno

Aunque etimológicamente duodeno significa “doce dedos”, su longitud aproximada en el perro es de 25 cm (Evans, 1993). Está dividido en cuatro porciones, desde la parte más proximal se identifican como craneal, descendente, transversa y ascendente.

La porción craneal se inicia en el píloro, a nivel de la 9^a-10^a costilla, terminando su corto trayecto en la flexura duodenal craneal. Esta porción corta (2-4 cm) contacta dorsal y cranealmente con el hígado, y caudalmente con el páncreas. La porción craneal del duodeno está unida al hígado mediante el ligamento hepatoduodenal, parte del omento menor que se une al porta hepático. **La porción**

descendente del duodeno tiene una longitud aproximada de 15 cm, se dirige caudalmente hasta la entrada de la pelvis contactando su cara lateral con la pared abdominal derecha. En su inicio, transita entre los lóbulos derechos lateral y medial del hígado. Dorsomedialmente contacta con el lóbulo derecho del páncreas, y medialmente se relaciona con el ciego y colon ascendente. En la porción inicial del duodeno descendente se encuentra la papila duodenal mayor, donde desembocan el conducto colédoco y el conducto pancreático principal (ausente en el 20% de los perros) (Climent y col., 2005). A unos 3-5 cm de la papila duodenal mayor, se localiza la papila duodenal menor, donde desemboca el conducto pancreático accesorio. Este conducto es el de mayor importancia funcional en el perro. **La porción transversa** mide unos 5 cm, se localiza en el plano horizontal, ventralmente a la sexta vértebra lumbar. Esta porción también es descrita como flexura caudal del duodeno (Evans, 1993). Rodea caudalmente al ciego y abraza el íleon y algunas asas del yeyuno. **La porción ascendente** se dirige cranealmente desde la flexura caudal, a la izquierda del ciego, colon ascendente y raíz del mesenterio. Dorsalmente se relaciona con estructuras retroperitoneales como los uréteres, vena cava caudal, aorta, tronco linfático lumbar, y nódulos linfáticos lumbares. Su cara ventral se relaciona con el yeyuno, y la izquierda con el colon descendente.

3.1.2. Yeyuno e íleon.

El yeyuno e íleon integran la mayor parte del intestino delgado. El yeyuno es la porción más larga (aproximadamente 2,5-3,5 m). Se inicia en la flexura duodenoyeyunal, a la izquierda de la raíz del mesenterio. Las asas yeyunales se topografían en la mitad ventral de la cavidad abdominal, formando 6-8 grandes giros, que terminan hacia el flanco derecho del abdomen, cerca del pubis, desde donde se inicia el íleon en dirección dorsocraneal.

Exteriormente el íleon se diferencia del yeyuno por el mayor grosor de sus paredes, debido a un incremento de las fibras musculares (Sandoval, 2000). Además, es menos móvil que el yeyuno, al estar conectado al ciego por el pliegue ileocecal. Debido a que no existe una demarcación macroscópica yeyuno-íleon, Nickel y col. (1979) determinaron la longitud del íleon por la extensión proximal del pliegue ileocecal y de las arterias ileales. Aunque Evans (1993) cita la existencia de ciertas diferencias entre la mucosa del yeyuno e íleon, no precisa cuáles son, concluyendo que no son lo suficientemente marcadas como para diferenciar las paredes de yeyuno e íleon. No obstante, se considera que el íleon del perro mide aproximadamente 15 cm y contiene menos folículos linfoides agregados que las porciones proximales del intestino delgado, incluyendo el duodeno. Ante la falta de un criterio anatómico e histológico unívoco que lo diferencie del yeyuno, Evans (1993) definió el íleon desde la unión cecocólica hasta el extremo de los vasos ileales antimesentéricos.

3.1.3. Mesenterio.

El mesenterio está formado por una doble hoja de peritoneo visceral descolgada del techo del abdomen a nivel de la 2ª vértebra lumbar. El origen o raíz del mesenterio incluye la arteria mesentérica craneal junto al plexo vegetativo intestinal. Desde la raíz, se extiende en abanico aproximadamente unos 20 cm, hasta alcanzar el borde mesentérico del intestino. Según la porción que sustente hablamos de mesoduodeno, mesoyeyuno y mesoíleon, aunque por extensión, de forma genérica, mesoyeyuno es sinónimo de mesenterio. Las dos láminas serosas del mesoduodeno, tras envolver la porción craneal del duodeno se fusionan a las del omento menor para constituir el ligamento hepatoduodenal. En la porción descendente del duodeno, el mesoduodeno envuelve al lóbulo derecho del páncreas, así como a los vasos pancreáticoduodenales craneales, antes de unirse al borde mesentérico del duodeno. En la porción ascendente,

el mesoduodeno se une a la hoja peritoneal derecha del mesocolon descendente. Esta parte del mesoduodeno forma un pliegue con un borde libre oblicuo que se denomina pliegue duodenocólico.

El mesoyeyuno y mesoíleon se encuentran ampliamente plegados junto con los giros intestinales y su grosor es mucho más fino distalmente que en la raíz. El íleon posee dos dependencias peritoneales, el mesoíleon (continuación directa del mesoyeyuno) y el pliegue ileocecal. Dicho pliegue es estrecho, pues no sobrepasa el centímetro de ancho en su origen, siendo variable en longitud según las razas (2-30 cm) (Evans, 1993).

3.1.4. Vascularización.

La principal arteria implicada en la vascularización del intestino delgado es la arteria mesentérica craneal, si bien otras arterias participan en el aporte vascular del duodeno.

El duodeno está irrigado en su porción proximal por la arteria pancreaticoduodenal craneal, derivada indirectamente de la arteria celíaca. Dicha arteria desprende ramos colaterales para las porciones craneal y descendente del duodeno, además del cuerpo y la mayor parte del lóbulo derecho del páncreas. Una segunda arteria, la arteria pancreaticoduodenal caudal (procedente de la arteria mesentérica craneal), participa en el riego de la porción ascendente y transversa del duodeno, y de la extremidad caudal del lóbulo derecho del páncreas. Las ramas terminales de ambas arterias pancreaticoduodenales se anastomosan.

A partir de la arteria mesentérica craneal se desprenden 13-15 arterias yeyunales que transitan por la parte central del mesenterio. A pocos centímetros del yeyuno forman arcos de anastomosis entre ellas, y desde dichos arcos se desprenden las arterias rectas, que alcanzan el borde mesentérico del yeyuno.

En el íleon, los vasos se sitúan tanto en el borde mesentérico como en el antimesentérico. En el primero de ellos interviene la rama ileal mesentérica, procedente de la arteria ileocólica, mientras que en el lado antimesentérico se sitúa la rama ileal antimesentérica, desprendida de la arteria cecal (procedente de la arteria ileocólica) (Nickel y col., 1981; Sandoval, 2000). La rama ileal antimesentérica suele anastomosarse con las arterias yeyunales distales en la pared muscular del intestino delgado (Noer, 1943; Sommerova, 1980, citado por Evans, 1993).

El drenaje venoso del yeyuno-íleon es homónimo a los trayectos arteriales. La vena mesentérica craneal tributa a la vena porta hepática. Aparte de la vena pancreaticoduodenal caudal y de la vena ileocólica, las principales tributarias de la vena mesentérica craneal son las venas yeyunales, que reciben la sangre de todo el yeyuno drenada de los arcos venosos y venas rectas del intestino. Por otro lado, la vena pancreaticoduodenal craneal, con la mayor parte de la sangre venosa del duodeno, desemboca en la vena gastroduodenal, y desde ahí a la vena porta (Sandoval, 2000).

3.1.5. Factores anatómicos que condicionan la EDB en el perro.

Dada la multiplicidad de razas en la especie canina, uno de los factores limitantes de la exploración endoscópica del intestino, en relación al tamaño del enteroscopio, es el diámetro del lumen intestinal. El diámetro externo del equipo empleado en la EDB es de 13.2 mm, lo que en perros de pequeño tamaño podría dificultar el avance en bloque del endoscopio y el sobretubo. No hemos encontrado ningún estudio previo donde se realice una cuantificación detallada del calibre del intestino delgado en sus diferentes porciones. Tampoco se ha estudiado la existencia de posibles correlaciones entre parámetros corporales externos como el peso, la altura, la longitud cefalocaudal, etc, y parámetros de tamaño intestinal como el diámetro y longitud intestinal, entre otros. Ambos estudios parecen necesarios para definir los

límites anatómicos que podría presentar la EDB en perros de mediano o pequeño tamaño.

Por otro lado, la longitud del mesenterio también podría actuar como limitante de las maniobras de exploración, ya que el intestino delgado podría quedar sometido a una importante tensión y tracción. En la especie humana se ha comprobado que durante la EDB el ligamento de Treitz, -entre el pilar derecho del diafragma y la flexura duodenoyeyunal- se tensiona de forma ostensible, y esto, en gran medida, condiciona la profundidad total de inserción del enteroscopio (May y Ell, 2006). En el perro, la diferente extensión del mesodudoeno, mesoyeyuno y mesoíleon podría marcar diferencias importantes en sus posibilidades de exploración endoscópica. En este sentido, sería interesante conocer los valores medios de estas dependencias peritoneales y su variabilidad en función del tamaño corporal de los animales.

3.2. ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL INTESTINO DELGADO DEL PERRO.

En este apartado se compendian los aspectos estructurales del intestino delgado de mayor relevancia para la enteroscopia. Histológicamente la pared intestinal está compuesta por cuatro tunicas, que ordenadas desde la luz intestinal hacia el exterior son mucosa, submucosa, muscular y serosa. Según sea la porción del intestino delgado, en las tunicas mencionadas podemos encontrar diferencias consistentes en la aparición de estructuras propias, en diferente número, o con mayor o menor desarrollo. El segundo de los artículos de esta tesis tuvo como objetivo estandarizar el grosor de las tunicas del intestino delgado del perro en puntos bien definidos de toda su longitud. Esto contribuirá a facilitar un correcto diagnóstico histopatológico de las muestras obtenidas mediante enteroscopia.

Uno de los aspectos más llamativos del intestino delgado es que presenta diferentes especializaciones destinadas al incremento de la superficie interna, lo que favorece los procesos de digestión y absorción. De forma genérica, se trata de pliegues circulares, vellosidades, criptas y microvellosidades (Buendía et al., 2004). Los pliegues circulares de los animales domésticos, formados por la mucosa y la submucosa, equivalen a los pliegues de Kerckring o válvulas conniventes del intestino delgado en la especie humana, si bien el grado de desarrollo es variable según la especie (Buendía et al., 2004). Se debe destacar que en el perro, estos pliegues están ausentes, por lo que serán las vellosidades las principales responsables del aumento de superficie (Evans, 1993). Las vellosidades son proyecciones digitiformes de la mucosa, cuya longitud varía en función de la actividad fisiológica intestinal y de la especie. Las criptas son invaginaciones del epitelio que se abren en la base de las vellosidades y, por último, las microvellosidades se encuentran en el borde apical de los enterocitos formando el denominado ribete en cepillo.

3.2.1. Túnica mucosa.

La túnica mucosa consta de un epitelio de revestimiento que descansa sobre la lámina propia de la mucosa, y ésta, a su vez, sobre la muscular de la mucosa, que consta de dos capas de fibras musculares en diferente dirección (circular y longitudinal).

El epitelio de revestimiento de la mucosa es simple, compuesto por células cilíndricas absorbentes (enterocitos) y células caliciformes (productoras de moco). Los complejos de unión formados en la superficie de estas células impiden que los líquidos del contenido intestinal difundan hacia la lámina propia sin pasar a través de las células. Las células caliciformes se sitúan de manera dispersa entre los enterocitos. El número de células caliciformes disminuye en el ápice de las vellosidades, y su densidad es dos o

tres veces mayor en la porción final del intestino delgado que en su porción inicial (Stinson and Calhoun, 1993).

Ambos tipos de células descansan sobre un tejido conectivo laxo que forma la parte central de las vellosidades y que se denomina lámina propia de la mucosa. Ésta presenta glándulas (de tipo mucoso), tejido linfoide difuso y algunos folículos linfoides simples.

En el centro de las vellosidades se localiza un plexo capilar y un vaso linfático, en general único, que se inicia en el ápice de la vellosidad en forma de vaso ciego, y termina en una red linfática en la lámina propia de la mucosa. Alrededor de este vaso se extienden haces de fibras musculares lisas derivadas de la muscular de la mucosa, cuya acción contráctil tiene una marcada influencia hemodinámica sobre las redes capilares. En los carnívoros las vellosidades son alargadas y delgadas (Stinson y Calhoun, 1993).

Las criptas (de Lieberkühn) o glándulas intestinales son invaginaciones tubulares de la mucosa situadas en la base de las vellosidades. Estas glándulas tubulares son simples, largas y de naturaleza mucosa en carnívoros. En la parte externa están constituidas por enterocitos y células caliciformes, mientras que en el fondo predominan células indiferenciadas que se multiplican, diferencian y emigran hacia las vellosidades, dando lugar a los enterocitos y a las células caliciformes. Este proceso de diferenciación celular progresiva, determina que el epitelio se renueve aproximadamente cada 2-3 días (Stinson y Calhoun, 1993). En ocasiones, las criptas pueden extenderse hasta la submucosa debido a que la muscular de la mucosa aparece interrumpida por la presencia de agregados linfoides.

En las criptas, y en menor medida en las vellosidades, también hay células enteroendocrinas. La secreción de este tipo de células está compuesta por diferentes hormonas y péptidos reguladores que actúan coordinando las funciones digestivas.

La capa muscular de la mucosa está formada por dos estratos finos de fibras musculares lisas perpendiculares entre sí. El estrato más próximo a la luz intestinal es circular, mientras que el otro es longitudinal. Esta capa es continua en el perro, y tres veces más gruesa que en otras especies (Evans, 1993). Su función es mantener la superficie de la mucosa y de las glándulas en un estado constante de suave agitación. De esta forma se ayuda a expulsar la secreción de las criptas, evitando así, su estancamiento y potenciando el contacto entre el epitelio y el contenido luminal, con el fin de facilitar la absorción (Young y Heath, 2002). Esta capa se continúa con la submucosa.

En el perro, además, existe un tejido conectivo especial de aproximadamente 30 micrómetros de espesor entre las glándulas intestinales y la lámina muscular de la mucosa. Esta capa es aparentemente similar a la localizada en el estómago (Titkemeyer y Calhoun, 1955, citado por Evans (1993)), y su función parece ser impedir una perforación de la pared intestinal por contenido de huesos en el alimento (Baum et al., 2007).

3.2.2. Túnica submucosa.

La túnica submucosa de los carnívoros está formada por tejido conectivo moderadamente denso (Bacha y Bacha, 2000). Las glándulas submucosas o duodenales (glándulas de Brünner) compuestas y tubuloacinares, se sitúan en la submucosa del duodeno craneal y descendente y, a menudo, se extienden dentro de la lámina propia de la mucosa. Otro aspecto característico de la submucosa son los folículos linfoides, distribuidos por las tres porciones del intestino delgado. Trautmann y Fiebiger (1957), (citado por Evans, 1993) indican que los agregados foliculares se localizan principalmente en la submucosa y sólo una pequeña parte en la lámina propia de la mucosa. En el perro, los agregados foliculares son más abundantes en los tramos iniciales del intestino delgado (Evans, 1993; Sandoval, 2000). Se han descrito

agregados foliculares con una dimensión de 2 x 1,5cm; (Titkemeyer y Calhound, 1955, citado por Evans, 1993). En el perro los folículos linfoides no sólo se localizan en el lado antimesentérico de la pared intestinal, sino a ambos lados del intestino, indistintamente. En la túnica submucosa también se sitúan redes capilares de arterias y venas que integran el plexo más categórico de la pared del intestino o plexo vascular submucoso. Igualmente, se presenta un plexo vegetativo submucoso, que será descrito más adelante.

3.2.3. Túnica muscular.

La túnica muscular consta de una capa circular interna y otra longitudinal externa, ambas de músculo liso. En general, puede decirse que las dos capas son relativamente finas a nivel del duodeno. En el yeyuno el espesor de la capa circular interna puede llegar a duplicar el de la capa longitudinal externa, mientras que en el íleon las dos capas se hacen mucho más densas, preferentemente la de fibras longitudinales (Sandoval, 2000). No obstante, podemos diferenciar engrosamientos específicos de uno de los dos estratos en zonas concretas, debido a exigencias funcionales. Así, en el duodeno, por condensación de las fibras musculares de la capa circular se forman el músculo esfínter de la ampolla hepatopancreática, el músculo esfínter del conducto pancreático y el músculo esfínter del conducto pancreático accesorio (Sandoval, 2000). El plexo nervioso que se halla entre las dos capas musculares es el plexo mientérico (de Auerbach) que controla la progresión de las ondas peristálticas.

3.2.4. Túnica serosa.

La túnica serosa está formada por un tejido conectivo laxo recubierto por un mesotelio que se corresponde con la hoja visceral del peritoneo.

3.2.5. Vascularización de la pared intestinal.

Las arterias que vascularizan la pared intestinal derivan de las arterias pancreátoduodenales craneal y caudal en el duodeno, las arterias rectas desprendidas de las arterias yeyunales en el yeyuno, y ramas de las arterias ileales mesentérica y antimesentérica en el íleon. A excepción de la rama ileal antimesentérica, todas estas arterias penetran la pared intestinal por el borde mesentérico. Tras aportar riego a la serosa, dan lugar a un plexo subseroso, que proporciona ramas que se distribuyen por la túnica muscular. Éstas se continúan hasta la submucosa, donde forman el plexo submucoso ya mencionado. A partir del plexo submucoso se emiten arteriolas cortas que irrigan la capa muscular de la mucosa y el área de las glándulas de la mucosa. Por otro lado, desde el plexo submucoso también se emiten arteriolas largas que alcanzan el ápice de las vellosidades. En los carnívoros, al igual que en el caballo y en el cerdo, no se forma una red arteriovenosa en el ápice de la vellosidad, sino que en la submucosa se forman anastomosis arteriovenosas. Su función sería desviar la sangre hacia las vellosidades durante la digestión, ocluyéndose cuando el proceso está inactivo (Stinson y Calhoun, 1993). Según Morton (1929), citado por Evans (1993), el duodeno tiene 5-10 veces más flujo de sangre que el íleon.

3.2.6. Plexo entérico.

Un plexo entérico vegetativo controla las funciones de motilidad, secreción glandular y absorción de las paredes intestinales. A él llegan fibras simpáticas aferentes, que proceden directamente de los ganglios y plexos aórticos abdominales (celíaco y mesentérico craneal), mientras que las fibras parasimpáticas son de origen vagal. Ambos tipos fibrilares transitan junto a los vasos sanguíneos arteriales. El plexo entérico se sitúa en dos estratos neuronales topográficamente y funcionalmente bien diferenciados: el plexo mientérico y el plexo submucoso. El primero, también conocido

como plexo de Auerbach, se distribuye entre los estratos longitudinal y circular de la túnica muscular. Está integrado preferentemente por fibras nerviosas no mielinizadas responsables de la motilidad intestinal y activadoras de la secreción glandular. El segundo plexo, conocido clásicamente como plexo de Meissner, se distribuye por la túnica submucosa, satélite de la red arterial de dicha zona. Además de inervar la muscular de la mucosa, este plexo controla el flujo de sangre por dicha red y la secreción de las glándulas. Ambos plexos tienen capacidad funcional autónoma e independiente de la inervación vagal.

3.2.7. Tejido linfático asociado al intestino.

Este tejido, conocido abreviadamente en inglés como GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue), está integrado por áreas de tejido linfoide asociado a la mucosa y submucosa del tracto digestivo, donde tiene lugar la interacción entre los linfocitos y los antígenos de agentes patógenos procedentes del exterior. Esto origina una respuesta inmunológica local específica capaz de evitar una respuesta inmune sistémica.

El GALT puede presentarse como áreas de tejido linfoide difuso, a base de linfocitos infiltrados en el tejido conectivo de la propia, y el epitelio de la mucosa. Por otro lado están los folículos linfoides aislados, en la lámina propia o en la submucosa, y por último, agrupaciones conspicuas de los dos tipos anteriores, lo que forma las placas de Peyer.

3.2.8. Necesidad de la estandarización del grosor de las tunicas a lo largo del intestino delgado.

La evaluación del grosor del intestino delgado es importante para los estudios de patología clínica, ya que diferentes enfermedades –digestivas y no digestivas- pueden causar una variación en alguna de las tunicas del intestino delgado (Larson y Biller, 2009). En algunos estudios previos se han publicado valores del grosor del total del

intestino (Baum et al., 2007), la submucosa (Baum et al., 2007) y la muscular (Paulsen et al., 2003; Baum et al., 2007). Sin embargo, la localización y número de muestras no se realizó de forma estandarizada. Así, por ejemplo, las medidas de grosor se realizaron en un único punto (Baum et al., 2007) o en al menos en tres puntos cualesquiera a lo largo del intestino (Kamiya et al., 1983; Paulsen et al., 2003; Kleinschmidt et al., 2008), de modo que los valores de referencia encontrados apenas son comparables. Según esto, la cuantificación del grosor de la pared intestinal, así como de sus tunicas en puntos anatómicamente bien definidos del intestino delgado podría ayudar a estandarizar su histología normal, así como a definir un patrón de referencia para biopsias tomadas en zonas profundas mediante técnicas de enteroscopia con la EDB.

3.3. ENDOSCOPIA GASTROINTESTINAL EN PERROS

En las últimas décadas, la posibilidad de explorar el tracto gastrointestinal mediante endoscopia ha revolucionado el alcance y posibilidades de la gastroenterología. La posibilidad de pasar un endoscopio flexible a través del tracto gastrointestinal y, además de visualizar la mucosa, poder tomar biopsias sin recurrir a la cirugía ha permitido un gran avance para los clínicos veterinarios (Tams, 2003). Para ilustrar esto, a continuación, de forma sucinta, se resumen los aspectos básicos de la endoscopia digestiva en el perro.

3.3.1. Equipamiento de un endoscopio

La elección de un endoscopio rígido es preferible para la extracción de cuerpos extraños en esófago y estómago (Simpson, 2005; Gualteri, 2010), mientras que para los demás usos es más práctico el endoscopio flexible. Dos de las principales consideraciones a tener en cuenta para favorecer una mayor calidad de la imagen endoscópica son el sistema óptico y la fuente de luz, siendo esto determinante para el

diagnóstico de patologías en la mucosa. Otro punto crítico para la elección del equipo está en el tamaño del endoscopio: en los gastroscopios la longitud del tubo puede variar desde 1 a 1,5 m y el diámetro de 7 a 9 mm. Aunque los colonoscopios tienen una longitud de hasta 2 m, la desventaja es su mayor diámetro (11-14 mm), lo que dificulta su uso en animales de pequeño tamaño (Uson y Tejedo, 1985; Tams, 2003; Simpson, 2005; Gualtieri, 2010). Aparte de las dimensiones del endoscopio, es importante que el canal de trabajo sea mayor a 2 mm (preferible 2.8 mm) lo que permite obtener biopsias de mayor calidad. Otro aspecto importante es el movimiento del extremo libre o punta del endoscopio, que ha de ser en las cuatro direcciones y con al menos 180 grados de flexión. Junto al canal de trabajo estos equipos cuentan con la posibilidad de usar agua, aire y aspiración. Los accesorios disponibles para un endoscopio flexible incluyen: pinzas de biopsia, cepillos de citología, fórceps de cesta, trampas de alambre y catéteres estériles.

3.3.2. Utilidad clínica

La endoscopia permite la evaluación directa de la mucosa del esófago, estómago, duodeno descendente (ascendente y yeyuno proximal en algunos perros), íleon terminal y colon; así como la toma de biopsias endoscópicas, fundamentales en el diagnóstico y posterior terapéutica de muchos trastornos gastrointestinales (Tams, 2003).

La esofagoscopia está indicada en pacientes que presentan regurgitación de comida no digerida, disfagia y salivación excesiva. La endoscopia es relevante para el diagnóstico de estenosis, masas neoplásicas y masas extraesofágicas, así como en la detección de cuerpos extraños. Así, las principales aplicaciones terapéuticas de la endoscopia en esófago son la extracción de cuerpos extraños y la dilatación de estenosis esofágica (Simpson, 2005; Granados, 2010).

La gastroscopia está indicada en pacientes que presentan vómitos, hematemesis, melena y anorexia. Las anormalidades identificadas frecuentemente son gastritis crónica, cuerpos extraños gástricos, disturbios motores estomacales y en menor frecuencia: úlceras gástricas, neoplasias y la gastropatía hipertrófica. Por otro lado, el principal uso terapéutico es la eliminación de cuerpos extraños (Simpson, 2005; Gualtieri, 2010).

La colonoscopia, de gran utilidad en la clínica veterinaria, está indicada en disquecia, tenesmo, constipación o diarrea crónica con contenido mucoso y/o sangre fresca (Simpson, 2005; Henroteaux, 2010).

La enteroscopia está indicada en casos de vómitos y diarrea crónica, y especialmente cuando el paciente presenta hematemesis, melena, hipoproteinemia y pérdida de peso. Hoy día la exploración enteroscopia por vía oral solo permite evaluar totalmente el duodeno y, en animales de menor tamaño, el inicio del yeyuno. De igual forma, el abordaje anal solo permite visualizar parcialmente el íleon. Un diagnóstico definitivo se ha de basar en la toma de biopsias de todas las porciones de intestino delgado (Casamian-Sorrosal et al., 2010). Sin embargo, a día de hoy, las limitaciones de la enteroscopia en el perro obligan a que la toma de biopsias tenga que realizarse mediante laparotomía exploratoria y no mediante endoscopia, siendo aquella mucho más invasiva y menos segura.

3.3.3. Complicaciones de la endoscopia convencional.

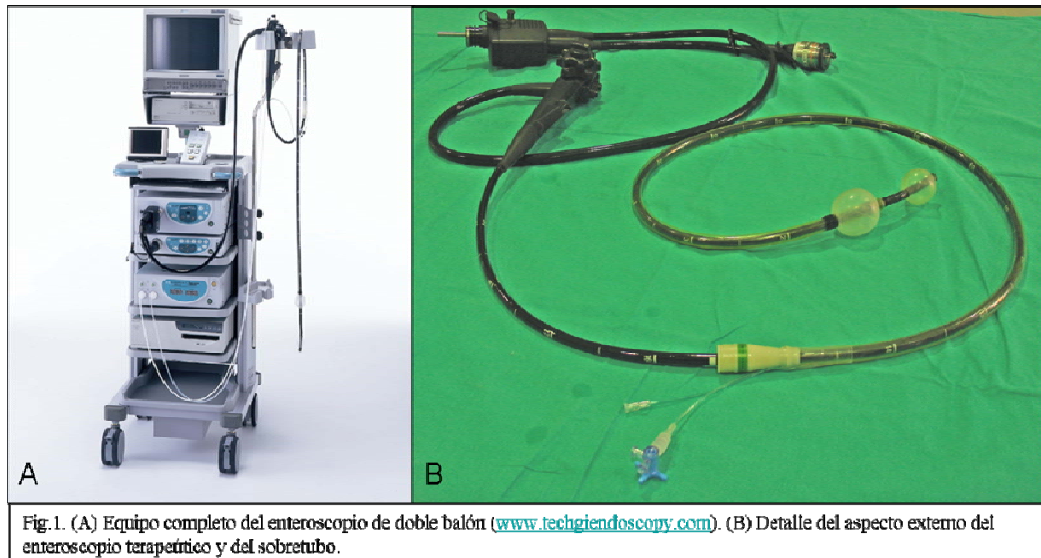
Las complicaciones asociadas a la técnica endoscópica son afortunadamente raras, incluyéndose hemorragia y perforación intestinal (Simpson, 2005).

3.4. ENTEROSCOPIA DE DOBLE BALÓN (EDB) EN MEDICINA HUMANA

A comienzos del año 2001 fue descrita la primera técnica endoscópica con visión directa inmediata capaz de explorar todo el intestino delgado (Yamamoto et al., 2001). Esta técnica denominada enteroscopia de doble balón (EDB) revolucionó la enteroscopia en medicina humana ya que permitió tanto el diagnóstico como la terapéutica de numerosas enfermedades. A pesar de que en los últimos años se han comercializado otros equipos para enteroscopia como el enteroscopio de balón simple (Olimpus®) o el spiral (SynMed®), la EDB es la técnica de mayor aceptación en los servicios de endoscopia digestiva hospitalaria (Lenz y Domagk, 2012). En este sentido, son varios los modelos de enteroscopios que se han comercializado para realizar EDB, sin embargo el más empleado es el terapéutico (EN-450T5, Fujinon, Japón).

3.4.1. Características del equipo EN-450T5.

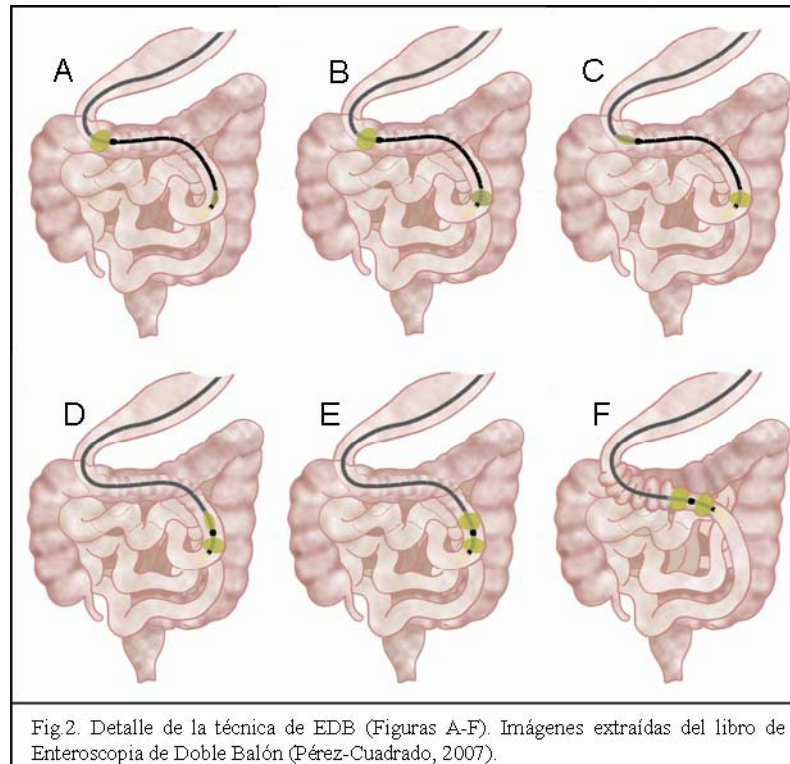
Se trata de un videoenteroscopio con una longitud de 2.000 mm y un diámetro exterior de 9.4 mm. El canal de biopsia es de 2.8 mm, lo que permite el uso de un gran variedad de accesorios terapéuticos. Sobre el endoscopio se desliza un sobretubo flexible (TS-13140, Fujinon, Japón) que tiene una longitud de 1.45 m y un diámetro externo de 13.2 mm. Entre el endoscopio y el sobretubo queda un espacio que permite el desplazamiento de uno sobre el otro. Tanto el endoscopio como el sobretubo poseen en su extremo distal un balón de látex de 0.1 mm de grosor cuya presión es controlada con aire insuflado mediante un equipo de manometría (PB-10, PB-20, Fujinon, Japón), que incorpora un sistema de seguridad acústico-visual en caso de sobrepresión (Shanabo et al., 2007) (Fig. 1).



3.4.2. Técnica endoscópica de doble balón.

La exploración comienza con la inserción del enteroscopia y el sobretubo, con los balones desinflados, hasta alcanzar la máxima profundidad posible en el duodeno. En este punto, el balón del sobretubo se infla para fijarlo al lumen y así poder deslizar el enteroscopia hasta su máximo alcance (Fig. 2A). A continuación se infla el balón del enteroscopia (Fig. 2B), y después se desinfla el balón del sobretubo (Fig. 2C) y se avanza sobre el enteroscopia hasta el punto de inserción máxima, situado en el punto 155 cm (marcado con una línea gruesa) (Fig. 2D). Alcanzado este punto, el balón del sobretubo se infla y, con ambos balones hinchados se inicia una maniobra de rectificación (Fig. 2E). Para ello, enteroscopia y sobretubo se retiran en bloque hacia fuera del paciente hasta notar resistencia a la tracción o una sobrepresión manométrica (Fig. 2F). Con la maniobra de rectificación, la parte del intestino ya explorada queda plegada por detrás del balón del sobretubo, lo que permite iniciar una nueva maniobra de avance. Se desinfla el balón de endoscopia y se avanza el tubo al máximo mientras se mantiene inflado el balón del sobretubo. Todas estas maniobras se repiten sucesivamente durante la exploración, de forma que cada maniobra de avance y la posterior rectificación constituyen un ciclo exploratorio. Tras varios ciclos se consigue

explorar gran parte del intestino delgado, quedando éste plegado detrás del balón del sobretubo. La explicación de la técnica puede ser consultada en numerosos artículos (Yamamoto et al., 2001; Latorre et al., 2007; Pérez-Cuadrado y Shanabo, 2007; Mönkemüller et al., 2008; Sunada et al., 2008).



3.4.3. Rutas de inserción.

La técnica de EDB puede realizarse tanto por vía oral como anal. Ocasionalmente, en la especie humana es posible la exploración de todo el intestino delgado -hasta el ciego- mediante la inserción por vía oral. Sin embargo, en la mayoría de los casos en los se requiere la observación de todo el intestino delgado es necesaria una combinación de ambas vías. Para ello, el marcaje con tinta china en la mucosa del punto de máxima inserción del endoscopio permite verificar una exploración completa cuando adicionalmente se utiliza la vía contraria a la inicial (Sunada et al., 2008). La elección de una u otra vía normalmente depende de la localización de la(s) lesión(es), de los signos clínicos, los resultados del laboratorio, la imagen radiológica o el vídeo de la

cápsula endoscópica (Mönkemüller et al., 2008). Según un estudio reciente, la exploración completa por combinación de ambas vías se consigue en un 44 % de los casos, mientras que si únicamente se usa la vía oral, el porcentaje desciende a 1.6 % (Xin et al., 2011). La longitud media de intestino delgado explorada por vía oral oscila entre 250-350 cm, todo ello en un tiempo medio aproximado de 60-125 min (Di Caro et al., 2005; Ell et al., 2005; May et al., 2005a; Pérez-Cuadrado et al., 2006; Lin et al., 2008; Messer et al., 2013). En cuanto a la vía anal, la distancia media explorada es menor (140-210 cm), aunque los tiempos medios de exploración son similares (60-90 min) (Di Caro et al., 2005; May et al., 2005a; Gross y Stark, 2008; Messer et al., 2013). El método más utilizado para estimar la profundidad de inserción del enteroscopio fue descrito por May et al. (2005b), y se basa en el sumatorio de los avances estimados en cada uno de los ciclos de exploración.

3.4.4. Utilidad clínica EDB.

Dos de las principales indicaciones de la EDB son el diagnóstico de la hemorragia digestiva de origen oscuro (HDOO) y la evaluación de sospecha de la enfermedad de Crohn. Por otro lado, se ha extendido cada vez más el uso de la técnica de doble balón para confirmar lesiones identificadas con cápsula endoscópica (Mönkemüller et al., 2008). Otras indicaciones diagnósticas son la sospecha de linfoma en enfermedad celíaca, poliposis y tumores. Por otro lado, la terapéutica más común utilizada con la técnica de doble balón consiste en: hemostasia (mediante electrocoagulación con argón plasma, colocación de hemoclips o inyección de adrenalina), resección (polipectomía y resección mucosa asistida), dilatación de estenosis con balón neumático, colocación de prótesis metálicas enterales autoexpandibles, extracción de cuerpos extraños, colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP) en pacientes con cirugía en Y de Roux, yeyunostomía percutánea

endoscópica entre otras (López y Esteban, 2007, Mönkemüller et al., 2008). Xin et al. (2011) en una amplia revisión a partir de los artículos publicados durante la última década concluyó que la principal indicación para la realización de la EDB es la sospecha de sangrado intestinal (62.5 %), seguido por síntomas/signos aislados (7.9 %), obstrucción intestinal y enfermedad de Crohn (5.8 % en ambos casos) y lesiones neoplásicas (4.6 %).

3.4.5. Complicaciones de la EDB.

Las complicaciones son similares a las de la endoscopia convencional. Aunque la casuística es de baja incidencia (0.72%), las mayores complicaciones son: perforación, sangrado intestinal y pancreatitis post-EDB (Xin et al., 2011). La pancreatitis post-EDB afecta únicamente a un 0.3-0.5% de las exploraciones (Kopacova et al., 2010; Xin et al., 2011), sin embargo, dada su gravedad, es una complicación profusamente estudiada (Honda et al., 2006; Kopacova et al., 2007; Lo y Simpson et al., 2007; Matsushita et al., 2007; Mensik et al., 2008; Pata et al., 2010). Hasta el momento, el mecanismo causal de pancreatitis debido a la EDB no está claro. Lo y Simpson (2007) propusieron varios posibles mecanismos, entre los que incluyen una obstrucción del conducto pancreático debido a la presión de los balones (Honda, 2006), reflujo intestinal hacia el conducto pancreático debido a un incremento de la presión intraluminal (Groenen et al., 2006), y daño prolongado o isquemia en el páncreas debido a las maniobras exploratorias y/o la presión ejercida sobre el páncreas con el endoscopio y el sobretubo (Heine et al., 2006; May y Ell, 2006; Matsushita et al., 2007).

El amplio abanico de posibilidades tanto diagnósticas como terapéuticas de la enteroscopia de doble balón en medicina humana ha permitido avanzar en la patología clínica digestiva en los últimos años. La validación del empleo de esta técnica en el perro, podría permitir, de la misma forma, incrementar el conocimiento tanto

diagnóstico como terapéutico de enfermedades gastrointestinales de tramos profundos del intestino delgado del perro.

4. RELACIÓN DE ARTÍCULOS

1. López Albors, O, Rojo, D, Sarriá, R, Soria, F, Pérez Cuadrado, E, and Latorre, R. Morphometry of the canine intestine with reference to the use of double balloon endoscopy. *The Veterinary Journal* (2011); **190**, 113-118.
2. Sarriá, R, Latorre, R, Henroteaux, M, Henroteaux, N, Soria, F, Pérez-Cuadrado, E, and López Albors, O. Morphometric study of the layers of the canine small intestine at five sampling sites. *The Veterinary Journal* (2012); **192**, 498-502.
3. Sarriá, R, López Albors, O, Soria, F, Ayala, I, Pérez Cuadrado, E, Esteban, P, and Latorre, R. Characterization of oral double balloon endoscopy in the dog. *The Veterinary Journal* (2013); **195**, 331-336.
4. Sarriá, R, López Albors, O, Soria, F, Ayala, I, Pérez Cuadrado, E, Chacón, S, and Latorre, R. Characterization of anal double balloon endoscopy in the dog. *The Veterinary Journal* (2013); doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.020>.



4.1. ARTÍCULO 1

*THE VETERINARY JOURNAL***Morphometry of the canine intestine with reference to the use of double balloon endoscopy**

Double balloon endoscopy (DBE) enables the diagnosis and treatment of small intestinal disease. The dog is a potential animal model for DBE training and also a candidate for the clinical application of this technique. However, the anatomy of the canine small intestine may limit the use of DBE by restricting the push-and-pull manoeuvres required for DBE. To establish what these limitations are, the length and width of different portions of the small intestine as well as the mesenteric dependences were measured in 55 dogs. Several external parameters related to body size plus the age, weight, sex and breed were recorded. Potential restriction of the progress of the enteroscope due to narrow intestinal diameter is expected in the jejunum of mid- and small size dogs.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023310002911>



4.2. ARTÍCULO 2

*THE VETERINARY JOURNAL***Morphometric study of the layers of the canine small intestine at five sampling sites.**

The histology of the canine intestine has not been accurately defined. To establish the precise thickness of its different layers, whole wall samples of the small intestine were removed from 41 cadavers at five standardised sampling sites (duodenum, proximal jejunum, distal jejunum, proximal ileum and distal ileum). The total thickness was estimated by morphometry, as was the thickness of the mucosa, muscularis mucosae, submucosa and muscularis externa. In addition, the size of the lymphoid aggregates in the submucosa and the thickness of the circular and longitudinal layers within both the muscularis mucosae and the muscularis externa were estimated.

The total intestinal thickness depended very much upon the thickness of the mucosa and submucosa. The mucosa decreased progressively from proximal to distal parts of the small intestine (47% reduction). The thickness of the submucosa, however, changed little from the duodenum to the distal jejunum, but increased significantly in the ileum; this change was positively correlated with the amount of lymphoid tissue. Sex influenced the thickness of the intestinal wall, with males displaying higher thickness values along the small intestine. Conversely, no correlation between bodyweight and intestinal thickness was found for any of the five sampling sites. This study gives absolute and relative values for the thickness of the layers of the dog intestine which might help in the diagnosis of small intestinal pathology from postmortem samples and/or endoscopic biopsies.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023311002553>



4.3. ARTÍCULO 3

THE VETERINARY JOURNAL**Characterization of oral double balloon endoscopy in the dog.**

Exploration of the canine small intestine using conventional endoscopy is restricted to the duodenum and/or the ileum. Double balloon endoscopy (DBE) is a 'push and pull' technique that has been described in humans and permits a complete exploration of the small intestine. In this study, oral DBE was performed on 12 healthy dogs (10–34 kg) to characterize for the first time the efficiency, exploration dynamics and safety of the technique. DBE was successful in 83% of dogs; the average estimated insertion depth of the endoscope was 287 ± 36 cm, and the average duration of the exploration was 84 ± 8 min. No complications or relevant adverse clinical effects were observed, and there was no indication of post-procedure pancreatitis based on serology of two specific markers of pancreatitis (amylase and lipase) and the immediate nonspecific inflammatory mediator C-reactive protein. The study showed that oral DBE is viable and safe in the dog, allowing for the diagnosis and treatment of gastrointestinal diseases deep in the small intestine to an extent that has not previously been possible using conventional endoscopy.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023312002559>



4.4. ARTÍCULO 4

THE VETERINARY JOURNAL**Characterization of anal double balloon endoscopy in the dog.**

Retrograde (anal) exploration of the canine small intestine by conventional endoscopy is restricted to the ileum, but double balloon endoscopy (DBE) has recently been validated using the oral approach. In this study, anal DBE was performed on nine healthy dogs to characterize the efficiency, exploration dynamics and safety of the technique. DBE was successful in all dogs; the average estimated insertion depth of the endoscope was about 2 m and took approximately 1 h to achieve. No complications or related adverse clinical effects were observed, and pancreatitis did not occur following the procedure. Anal DBE is viable and safe in the dog within the limits of the study, and has the potential to facilitate the diagnosis and treatment of gastrointestinal diseases, not only in portions of the colon and ileum, but also in portions of the distal jejunum.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023313001913>

5. CONCLUSIONES

1. El estudio anatómico del intestino delgado ha permitido validar la especie canina como adecuada para la EDB siempre que se respeten las posibles limitaciones impuestas por el diámetro del lumen intestinal en animales de pequeño tamaño. La longitud del antebrazo fue el parámetro corporal con mayor asociación con el diámetro del intestino, y por ende el mejor estimador del tamaño mínimo requerido para la EDB en el perro.
2. Los resultados obtenidos sobre el rango de grosor normal de las diferentes tunicas a lo largo de todo el intestino delgado del perro constituyen la primera referencia publicada de estas características, con lo que ello puede suponer para el diagnóstico de patologías del intestino delgado a partir de de biopsias endoscópicas, ultrasonidos, muestras obtenidas por laparoscopia o postmortem. El sexo debe ser tenido en cuenta como fuente de variación del grosor de las tunicas intestinales.
3. Se ha demostrado que la EDB tanto por vía oral como anal es factible y segura en la especie canina. Los resultados aportados sobre la dinámica de exploración son importantes pues aportan valores de referencia para el empleo futuro de la EDB con fines diagnósticos o de tratamiento de enfermedades en porciones profundas del intestino delgado.
4. La exploración completa del intestino delgado del perro mediante EDB no ha sido posible ni por vía oral ni anal. Sin embargo, dado el interés que ello puede tener en el diagnóstico de algunas enfermedades del intestino delgado, serían necesarios nuevos estudios en los que se plantee la combinación de ambas vías.

6.RESUMEN GENERAL

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales representan un alto porcentaje de las patologías en el perro y el gato. En las dos últimas décadas, el auge de las técnicas de mínima invasión en medicina veterinaria ha permitido avanzar en el diagnóstico de muchas de estas enfermedades (Tams, 2003), sobre todo debido a la endoscopia flexible vía oral o anal. Un ejemplo claro son los procesos de diarrea crónica con origen tanto en intestino delgado como grueso (Tams, 2003, Casamian-Sorrosal et al., 2010). La ventaja de la endoscopia flexible, respecto a otros métodos diagnósticos como la radiología y sobre todo la ecografía, consiste en que no solo permite la visualización directa de la mucosa digestiva, sino que, además, permite la toma de muestras biológicas y microbiológicas de la mucosa intestinal (Tams, 2003). No obstante, la endoscopia flexible también tiene limitaciones, ya que en la clínica veterinaria la exploración del intestino delgado está limitada a una pequeña parte de su extensión, quedando al margen la mayor parte de yeyuno. Una exploración y toma de muestras restringida supone una gran limitación a la hora de obtener diagnósticos precisos en un órgano tan extenso como el intestino delgado. Actualmente, la realización de un estudio histopatológico del yeyuno solo es posible mediante laparotomía o laparoscopia, procedimientos con un mayor potencial de complicaciones que la endoscopia (Casamian-Sorrosal et al., 2010).

En el diagnóstico de las enteropatías es importante contemplar posibles variaciones en la morfología de las tunicas intestinales según la zona de muestreo. Aunque este aspecto, y más concretamente el grosor de la mucosa, submucosa y muscular puede ser relevante para la correcta interpretación de las biopsias o de la imagen ecográfica, de momento, la información en este sentido es poco precisa y limitada a ciertas partes del intestino delgado (Washabau et al., 2010).

Así pues, entre los principales retos actuales de la gastroenterología canina se encuentra la posibilidad de lograr una exploración endoscópica y biopsiado completo del intestino delgado, así como la posibilidad de disponer de un patrón estandarizado de la morfología intestinal a lo largo de toda su extensión.

En medicina humana, los avances en endoscopia en los últimos años han permitido alcanzar tramos profundos del intestino delgado e incluso la posibilidad de una exploración completa de todo el tracto gastrointestinal. Una de las primeras técnicas diseñada con este fin fue la cápsula endoscópica (Iddan et al., 2000), que, si bien supuso la primera posibilidad real de visualizar el intestino delgado completo, no permite terapéutica alguna. En el año 2001, Yamamoto y colaboradores presentaron la enteroscopia de doble balón (EDB), que revolucionó tanto el diagnóstico como la terapéutica de las enfermedades gastrointestinales del intestino delgado, extendiéndose pronto su empleo en la clínica hospitalaria de todo el mundo.

Por todo lo expuesto anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos, base de la siguiente tesis doctoral:

1. Evaluar de forma detallada la morfología del intestino delgado en el perro y su relación con las condiciones de seguridad necesarias para la aplicación de la EDB.
2. Contribuir a la caracterización de la histología normal del intestino del perro mediante la cuantificación sistemática del grosor de sus tunicas.
3. Evaluar la eficacia y seguridad de la técnica EDB en el perro tanto vía oral como vía anal.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño de la tesis se fundamenta en 2 fases experimentales, la primera en cadáveres de perro, y la segunda *in vivo*.

Un total de 55 cadáveres de perro procedentes del servicio de zoonosis del Ayuntamiento de Murcia, del servicio de animales de laboratorio (animalario) de la Universidad de Murcia y del hospital clínico veterinario de la Universidad de Murcia fueron empleados para el estudio anatómico/morfométrico del intestino delgado (objetivo 1, artículo 1). De esos 55 animales, 41 también fueron utilizados para el estudio histológico/morfométrico del intestino delgado (objetivo 2, artículo 2). La eutanasia de los perros, por sobredosis de pentobarbital sódico, no estuvo relacionada con enfermedades gastrointestinales sino que fue por causa ajena a este estudio.

Para la fase experimental *in vivo*, se emplearon un total de 21 perros sin historial de enfermedad digestiva, procedentes del animalario y del hospital clínico veterinario de la Universidad de Murcia. Las exploraciones enteroscópicas se realizaron con un enteroscopia terapéutico de doble balón (EN-450T5, Fujinón®) tanto por vía oral (objetivo 3, artículo 3), como anal (objetivo 4, artículo 4).

Artículo 1

Como ya se ha comentado, para este estudio fueron utilizados 55 cadáveres de perro (33 de raza cruzada y 22 de raza pura) de edades comprendidas entre 1 y 9 años, y un peso medio de 18 ± 0.95 kg (5-33) con una proporción de hembras de 28/55. Una vez eutanasiado el animal, se midieron los siguientes parámetros externos: peso, altura del miembro torácico, longitud del antebrazo, longitud del miembro pelviano, longitud de la nuca a la cola y longitud de la nuca a la nariz. Una vez posicionado el animal en decúbito lateral izquierdo, se realizó una laparotomía para la medición de parámetros

morfológicos del intestino delgado y del mesenterio. Los parámetros medidos en duodeno fueron: longitud, diámetro del duodeno craneal, descendente y ascendente, y longitud del mesoduodeno; en el yeyuno: longitud total y diámetro externo a 75, 150, 225, 300 y 375 cm de distancia desde la flexura duodenoyeyunal, así como longitud del mesoyeyuno proximal y distal; en el íleon: longitud total y diámetro externo de íleon proximal y distal; además también se cuantificó la longitud del ligamento hepatoduodenal y la longitud del pliegue duodenocólico. El diámetro externo del intestino delgado se estimó midiendo la distancia entre el borde mesentérico y antimesentérico con el intestino colocado en posición plana. La medición de los parámetros se realizó durante la primera hora tras el sacrificio para evitar cambios post-mortem. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 17.0. (SPSS, Inc[®]) ejecutando en primer lugar un estudio exploratorio de cada una de las variables con el fin de obtener sus estadísticos descriptivos, así como el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y de homocedasticidad de Levene. El análisis de varianza (ANOVA) y el test de Turkey post-hoc fueron realizados para analizar los cambios en el diámetro externo intestinal en cada una de las diferentes porciones del intestino delgado. Se analizaron las correlaciones bivariadas de todas las variables (coeficiente de Pearson), y se realizó un análisis de componentes principales para agrupar conceptualmente las fuentes de variación. Además, la posible dependencia entre los parámetros externos y las mediciones del intestino delgado se analizó para las variables más representativas mediante análisis de regresión lineal. Todos los test se realizaron para un nivel de significación de $p < 0,05$.

Artículo 2

Para este estudio fueron utilizados 41 cadáveres de perro (24 de raza cruzada y 17 de raza pura) de edades comprendidas entre 5 meses y 12 años, y un peso

comprendido de 5 a 33 kg, con una proporción de hembras de 20/41. Una vez eutanasiado el animal se posicionó en decúbito supino y con una incisión por línea alba se tomaron secciones completas de intestino delgado de 0.5 cm de longitud en cinco puntos definidos *a priori*: en la mitad de duodeno descendente (duodeno descendente), a 75 cm desde la flexura duodenoyeyunal (yeyuno proximal), 25 cm antes de íleon, tomando como referencia del comienzo del íleon el final de la rama ileal antimesentérica (yeyuno distal), 2 cm después del comienzo de íleon (íleon proximal) y unos dos centímetros antes del orificio ileal (íleon distal). Las muestras fueron fijadas en formol (10%), incluidas en parafina, cortadas y teñidas con hematoxilina-eosina, y posteriormente examinadas por dos anatomopatólogos para descartar cualquier proceso patológico que pudiera influir en el grosor de la pared intestinal. Con lupa (Stemi 2000, Zeiss) o microscopio óptico (Axioskop40, Zeiss) se capturaron imágenes digitales de la sección transversal completa de la pared intestinal, así como de sus diferentes tunicas. Posteriormente se midió el grosor (sección transversal, μm) de: pared intestinal, túnica mucosa (incluyendo el epitelio, la lámina propia y la muscular de la mucosa), muscular de la mucosa, túnica submucosa y túnica muscular. En la submucosa también se midió el área de los agregados linfoides (μm^2), y en muscular de la mucosa y la túnica muscular se midieron por separado la capa circular y la longitudinal. En cada una de las muestras se fotografiaron 3 campos histológicos con el fin de que el estudio morfométrico fuese representativo. La morfometría se realizó utilizando el programa Sigma Scan Pro 5.0 (Systat), siempre por la misma persona. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 17.0. (SPSS, Inc[®]) con un primer estudio exploratorio de cada una de las variables para obtener los estadísticos descriptivos, entre los que se incluyen los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene como pasos previos al análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$). Mediante el test de Tukey valoraron los

cambios en el grosor de las diferentes tunicas en función del punto de toma de muestras y del sexo. Finalmente, la correlación entre las variables fue estudiada mediante el análisis de las correlaciones bivariantes (coeficiente de Pearson).

Artículo 3

En este estudio se utilizaron 12 perros de diferentes razas procedentes del animalario y del hospital clínico veterinario de la Universidad de Murcia con un rango de peso entre 10 y 34 kg, sin ningún historial de enfermedad digestiva. A todos se les practicó una enteroscopia oral con un enteroscopio de doble balón terapéutico (EN-450T5, Fujinon). Los perros se mantuvieron en ayunas 36 horas antes de la enteroscopia y además fueron premedicados con una combinación de acepromacina (0.05 mg/kg) y butorfanol (0.3 mg/kg) administrado intramuscularmente. La anestesia fue inducida con una dosis de propofol 5 mg/kg por vía intravenosa hasta alcanzar el efecto; se intubaron orotraquealmente y fueron mantenidos con isoflurano (1-1.2x concentración alveolar mínima) y oxígeno 100% usando un sistema de respiración anestésico adaptado al tamaño del animal. Durante la enteroscopia se monitorizó la presión sanguínea, las frecuencia cardíaca y respiratoria, y la saturación de oxígeno. Las enteroscopias fueron llevadas a cabo por dos de los autores del artículo, con experiencia de más de 5 años en esta técnica. En cada caso, se contabilizó la duración de cada ciclo de empuje-rectificación y se estimó la distancia avanzada en cada ciclo, por consenso de dos de los autores. Los datos se anotaron en una hoja de trabajo según la metodología de May et al. (2005b). La estimación de la profundidad de la exploración se inició una vez que el enteroscopio había pasado por el píloro, y el final de la exploración se estableció después de 5-6 maniobras nulas, sin posibilidad de avanzar. En 3 animales la exploración fue supervisada por fluoroscopia (PHILIPS BV-300), lo que permitió

visualizar la punta del endotubo y del sobretubo en la cavidad abdominal. En 5 animales se tomaron muestras de sangre al comienzo y al final del procedimiento, así como a las 24 horas y 7 días después de la enteroscopia. A partir de la sangre se cuantificaron los niveles de proteína C reactiva (PCR) -indicador de inflamación-, y los de amilasa y lipasa, como marcadores de daño pancreático. Después de la anestesia y durante los 7 días posteriores al procedimiento los animales fueron examinados dos veces al día para descartar posibles complicaciones asociadas a la técnica. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 17.0. (SPSS, Inc[®]). Se analizaron los estadísticos descriptivos y los resultados del test de Shapiro-Wilks (normalidad) y el test de Levene (homocedasticidad). Los valores de las enzimas fueron evaluados por el análisis de varianza (ANOVA, modelo lineal de medidas repetidas) considerando el tiempo de obtención de la muestra de sangre como el factor inter-sujetos. Los valores de PCR fueron convertidos mediante transformación logarítmica para cumplir los requisitos del análisis. Los datos para el número de ciclos y el tiempo se representaron frente a la distancia explorada usando un análisis de regresión. Toda la estadística se realizó un nivel de significación menor a $p < 0.05$.

Artículo 4

Para el estudio de las EDB por vía anal se utilizaron 9 perros de raza American Foxhound procedentes del animalario de la Universidad de Murcia, exentos de cualquier tipo de enfermedad digestiva. Como en el caso anterior, se empleó el enteroscopia de doble balón terapéutico (EN-450T5, Fujinon). Los perros estuvieron en ayunas 48 horas antes del procedimiento y fueron premedicados con un laxante oral un día antes de la exploración. Además, 12 y 2 horas antes de la colonoscopia se les administró un enema. El protocolo pre-anestésico y anestésico fue el mismo que el descrito en el artículo 3.

Las variables caracterizadoras de la exploración fueron las mismas que en el artículo 3, con la particularidad de que la duración del procedimiento y la profundidad de exploración fueron medidas a partir del orificio ileal. En siete perros se tomaron muestras de sangre en los mismos tiempos descritos en el artículo de EDB oral, y de igual forma, los animales fueron observados durante siete días después del procedimiento. El planteamiento del análisis estadístico fue semejante al del artículo 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Artículo 1

El resultado obtenido para la longitud media total del intestino delgado fue de 400 ± 91.4 cm, correspondiendo aproximadamente el 10% a duodeno, el 85% a yeyuno y el 5% a íleon. La longitud intestinal ha sido muy documentada en la literatura (Nickel et al., 1979; Evans, 1993; Sandoval, 2000; Climent et al., 2005; Dyce et al., 2010), sin embargo, los datos aportados varían considerablemente, lo que se debe a las dificultades de medición en el animal vivo, y a los errores asociados a la relajación del intestino después de la muerte (Dyce et al., 2010). De forma estimada, la longitud total del intestino delgado se considera que alcanza entre 2 y 3 veces la longitud total del tronco (Dyce et al., 2010). Sin embargo, en el presente estudio la estimación se aproximó a 5 veces, de forma similar a lo referido por Williams (1935).

El diámetro del intestino en diferentes puntos es la variable más importante para asegurar el paso del enteroscopia a través del lumen intestinal. Su valor fue máximo en duodeno descendente (2.5 cm) y mínimo en yeyuno (2.1 cm). Los valores de diámetro en íleon proximal y distal fueron ligeramente mayores a 2 cm pero sin presentar diferencias significativas con las porciones de yeyuno. Tomando como referencia el diámetro externo del enteroscopia, un grosor intestinal menor a 2 cm pensamos que

dificultaría el paso del endoscopio. Por ello, el duodeno presentaría la menor dificultad al paso del enteroscopia de doble balón, mientras que en el yeyuno las dificultades para progresar el enteroscopia serían más probables, ya que en más de un 50% de los perros el calibre fue menor a 2 cm; y en más del 40% de los casos, el yeyuno distal e íleon también fueron menores a 2 cm. En un estudio previo en el que se realizaron estimaciones del diámetro intestinal en el perro (Laganiere et al., 1984), sólo se consideraron 8 animales y los valores de diámetro se tomaron en un solo punto de cada porción intestinal.

Casi todos los valores del diámetro externo intestinal y de los parámetros corporales externos mostraron índices de correlación positivos, a excepción del diámetro externo del yeyuno a 375 cm, lo que probablemente se debió al bajo número de individuos con dicha longitud de intestino. La máxima asociación ocurrió entre el diámetro externo del yeyuno a 225 cm y la longitud del antebrazo. El análisis de regresión entre estos dos parámetros nos permitió concluir que los perros con una longitud de antebrazo menor a 19 cm podrían tener un diámetro externo intestinal menor a 2 cm en un 61% de los casos.

En lo referente a las mediciones del mesenterio, las correlaciones entre la longitud del mesenterio y los parámetros corporales externos no fueron del todo consistentes. Las longitudes del mesoduodeno y mesoyeyuno distal mostraron un alto grado de correlación con la longitud nariz-cola y la altura del miembro torácico, mientras que fue mucho menor frente a la longitud del mesoyeyuno proximal. El hecho de que el mesoduodeno sea bastante amplio en el perro (18 ± 3.6 cm) podría contribuir al rápido progreso del endoscopio en esta porción.

Artículo 2

El valor de grosor de la sección transversal de la pared del duodeno (2.99 mm) fue significativamente mayor al resto de porciones: íleon distal (2.54 mm), yeyuno proximal (2.52 mm), yeyuno distal (2.16 mm) e íleon proximal (2.38 mm). Estos datos coinciden con las descripciones generales de los libros clásicos de anatomía e histología (Banks, 1993; Sandoval, 2000), y el hecho de procesar en cada animal cinco muestras tomadas de forma estandarizada a lo largo del intestino aporta un valor añadido respecto a estudios previos en los que el muestreo fue menor y sin estandarizar (Paulsen et al., 2003; Baum et al., 2007; Kleinschmidt et al., 2008).

La proporción entre el grosor de las diferentes tunicas de la pared intestinal varió según la porción estudiada. Las tunicas que mostraron mayor variación fueron la mucosa y submucosa. El grosor de la túnica mucosa decreció significativamente desde porciones proximales a distales del intestino delgado. Esta disminución progresiva se relaciona con una menor cantidad de glándulas intestinales y de tejido linfoide (Paulsen et al., 2003). A excepción de las dos porciones estudiadas en el íleon, la mucosa siempre aportó más del 50 % del grosor de la pared intestinal. Valores similares han sido descritos en un estudio ecográfico en cachorros (Stander et al., 2010), aunque otros autores, en una serie de 9 Beagles, indicaron que la mucosa aporta menos del 40 % del grosor total (Paulsen et al., 2003). El máximo grosor de la túnica mucosa encontrado en el duodeno es atribuido al mayor tamaño de las vellosidades, la presencia de glándulas duodenales y la presencia de tejido linfoide en la lámina propia (Banks, 1993).

La muscular de la mucosa mostró una tendencia similar a la túnica mucosa, excepto en el íleon, donde se mostró más gruesa. Las dos capas que conforman esta lámina se apreciaron sin interrupción en todo el intestino. La capa circular interna fue aproximadamente la mitad de gruesa que la externa. Evans (1993) indicó que la lamina

muscular de la mucosa en el perro tiene un grosor tres veces mayor que en otras especies, aunque sin aportar datos numéricos. En nuestro estudio el mayor grosor de la lámina muscular de la mucosa se encontró en el duodeno, pudiendo esto explicarse por la necesidad de facilitar una mayor agitación de las vellosidades para favorecer el contacto de las enzimas digestivas con el quimo y así incrementar el contacto entre el epitelio y el contenido luminal (Young y Heath, 2002).

Contrariamente a la mucosa, la túnica submucosa aumentó su grosor en las porciones distales de intestino delgado (íleon), relacionándose este aumento con un aumento significativo del porcentaje de tejido linfoide en íleon distal respecto al duodeno y yeyuno.

Con respecto al grosor de la túnica muscular, decreció progresivamente desde el duodeno hasta yeyuno distal, pero se incrementó en el íleon, siendo mayor en el íleon distal. Este aumento podría estar relacionado con la proximidad del músculo esfínter ileal. En cada una de las cinco porciones de intestino analizadas, la capa circular fue el doble de gruesa que la longitudinal, lo que coincide con la información aportada por Sandoval (2000). En el íleon, el grosor de la túnica muscular ha sido utilizado como criterio estructural diferencial con el yeyuno (Williams y Warwick, 1995; Sandoval, 2000), sin embargo, en nuestro estudio la túnica muscular no incrementó significativamente entre dichas porciones. La transición entre ellas estuvo más relacionada con el incremento de agregados linfoides en la submucosa que con el grosor de la túnica muscular. Esta túnica sólo fue significativamente mayor en relación con el orificio ileal.

El grosor de la pared intestinal presentó diferencias significativas entre machos y hembras, siendo en aquello mayor a lo largo de todo el intestino delgado, excepto en el íleon distal. En concreto, los resultados mostraron diferencias con valores de un 19.4 %

en duodeno, 20.7 % en yeyuno proximal, 19.3 % en yeyuno distal y un 18.9 % en íleon proximal. En cambio, en ninguna de las cinco porciones se encontró correlación entre el grosor intestinal y el peso. En estudios previos no se encontró correlación entre el sexo y el grosor de la pared intestinal (Goggin et al., 2000), aunque en dichos trabajos el estudio estadístico pudo estar limitado por la no uniformidad entre machos y hembras. En cambio, nuestros resultados contrastan con otros estudios (Delaney et al, 2003; Baum et al., 2007) que citan valores mayores del grosor en duodeno y yeyuno en animales de mayor edad.

Artículo 3

De los 12 animales preseleccionados, en 10 de ellos la exploración EDB no presentó ninguna dificultad, alcanzándose una profundidad media de inserción de 287 ± 36 cm (144-495) y una duración media de 84 ± 8 min (54-125). La eficiencia de la exploración expresada en número de ciclos, mostró que el primer ciclo es el más eficaz (valor medio de 35 cm), decreciendo progresivamente hasta valores inferiores a 10 cm al final de la exploración. Para la exploración del primer metro se necesitaron 5 ciclos, para el segundo metro 8 ciclos adicionales (13 en total) y para el tercer metro 9 ciclos más (22 ciclos en total). La media de ciclos por procedimiento fue de 21.5 ciclos. En cuanto a la dinámica de exploración en función del tiempo se encontró que, para la exploración del primer metro fueron necesarios 20 min, para la exploración del segundo metro 30 min adicionales (50 en total) y para el tercer metro, 50 min adicionales (100 min en total). Según Nickel et al, (1979) una profundidad de 3 m se corresponde aproximadamente con el 60 % de la longitud del intestino delgado. Según esto, y a tenor de nuestros resultados, con una EDB oral de hora y media se podría explorar todo el duodeno y la mayor parte de yeyuno. Estos resultados son similares a los publicados en

diferentes series de enteroscopias en la especie humana (Araki et al, 2006; Pérez-Cuadrado et al, 2006; Lin et al., 2008; Hedge et al., 2010).

En 2 perros no fue posible concluir la EDB de forma exitosa ya que poco después de haber explorado el duodeno descendente se encontró una imposibilidad de avance del endoscopio. En medicina humana, la imposibilidad para avanzar en una EDB se ha relacionado con la formación de bucles, la excesiva acumulación de aire detrás del balón del sobretubo, la inexperiencia del endoscopista y posibles restricciones anatómicas individuales (Mehdizadeh et al., 2006; Pérez-Cuadrado et al., 2007; Sunada y Yamamoto, 2008). En los perros, la formación de bucles parece ser más frecuente que en humanos, lo cual podría explicarse por la laxitud y mayor longitud del mesoduodeno en el perro. A pesar de que los bucles pueden identificarse por palpación y de que en la mayoría de los casos es suficiente con cambios en la posición del perro para resolverlos, la fluoroscopia se mostró de gran utilidad para la orientar las maniobras requeridas.

En ningún caso se observaron alteraciones en los parámetros clínicos monitorizados durante la enteroscopia (presión sanguínea, frecuencia cardíaca y respiratoria, y saturación de oxígeno). La ingesta de comida fue normal desde el día siguiente al estudio, y no se observaron signos clínicos de dolor abdominal, vómitos, diarrea o alteración en el comportamiento. En cuanto al seguimiento bioquímico, no se obtuvieron cambios significativos en los niveles de amilasa y lipasa ni durante ni hasta los 7 días posteriores a la EDB. En cuanto a la proteína C reactiva, se apreció un aumento a las 24 horas y también a los 7 días de la exploración, aunque los valores no alcanzaron nivel de significación ($p>0.05$). La proteína C reactiva no es un indicador específico de pancreatitis, pero se ha sugerido que la PCR es útil como indicador de daño en la mucosa gastrointestinal en perros (Bayramli y Ulutas, 2008). Los efectos iatrogénicos de la técnica -compresión de la mucosa, plegamiento del intestino detrás de

los balones y tensión en mesenterio- podrían ser una de las causas del aumento de PCR. En medicina humana el diagnóstico de pancreatitis implica que cursen dos de las tres condiciones siguientes: dolor abdominal, niveles elevados de amilasa y/o lipasa tres veces superior al basal, y hallazgos compatibles con medios diagnósticos de tomografía computerizada o de imagen de resonancia magnética (Bollen et al., 2008). Ninguno de estos signos se apreció en los perros.

En cuanto a la utilidad clínica de la EDB en el perro, consideramos que puede ser de gran valor para el diagnóstico de lesiones localizadas en yeyuno, en patologías difusas o que cambian de grado dependiendo de la porción de intestino delgado (Tams, 2003; Casamian-Sorrosal et al., 2010; Ayala et al., 2011), así como en las linfangiectasia (Tams, 2003). Finalmente añadir, que dado que en la mucosa ileal se detectan más anormalidades que en el duodeno (Casamian-Sorrosal et al., 2010) consideramos de gran utilidad valorar las posibilidades de la EDB anal en el perro. Además, la combinación de ambos abordajes –oral y anal- con mucha probabilidad podría permitir una exploración completa del intestino delgado, tal y como se describe en humana (Kita et al., 2005; Mönkemüller et al., 2008; Xin et al., 2011).

Artículo 4

En todos los perros la EDB vía anal fue exitosa. La distancia media de inserción del endoscopio fue de 212 ± 12 cm, y el tiempo medio de 61 ± 6 min. En cuanto a la dinámica de exploración referida en ciclos, el primer ciclo fue el más efectivo, con una media de inserción de 54 cm. A lo largo de la exploración, la eficiencia decreció progresivamente, alcanzando valores inferiores a 10 cm por ciclo al final del procedimiento. Por otro lado, se observó que para alcanzar el primer metro fueron necesarios 4 ciclos mientras que para el segundo metro se requirieron 13 ciclos

adicionales (17 en total). Así pues, mediante una EDB vía anal en el perro se necesitaría una hora para la exploración completa del íleon y de gran parte del yeyuno. A pesar de que según Ruaux (2013) la prevalencia en enfermedades de yeyuno es escasa, la práctica de la EDB podría ser relevante para el diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal y el linfoma gastrointestinal.

En cuanto a los parámetros monitorizados (presión sanguínea, frecuencia cardíaca y respiratoria, y saturación de oxígeno) no se encontraron cambios significativos asociados a la exploración. De forma similar a lo encontrado en trabajos de EDB oral en perros (Latorre et al., 2007; Ayala et al., 2011; Sarriá et al., 2012) no se observaron limitaciones con el instrumental utilizado, ni complicaciones asociadas con el procedimiento, ya que todos los perros se recuperaron completamente y sin complicaciones después de las 24 horas.

Los niveles de amilasa, lipasa y PCR han sido utilizados como indicadores para el diagnóstico de cuadros de pancreatitis post-EDB en humanos (Kopacova et al., 2010), en cerdos (Latorre et al., 2012) y en perros (Sarriá et al., 2012). En este estudio el seguimiento bioquímico de dichos marcadores no mostró aumentos de amilasa y lipasa ni durante ni después de la EDB. La PCR se incrementó significativamente a las 24 horas de la exploración, pero como éste es un marcador inespecífico de inflamación, (Bayramli y Ulutas, 2008), el incremento podría estar relacionado con los efectos iatrogénicos de la técnica. Además, si nos atenemos a las referencias en la especie humana, la mayoría de los casos de pancreatitis post-EDB en humanos ocurren con la ruta oral (Kopacova et al., 2010).

CONCLUSIONES

1. El estudio anatómico del intestino delgado ha permitido validar la especie canina como adecuada para la EDB siempre que se respeten las posibles limitaciones impuestas por el diámetro del lumen intestinal en animales de pequeño tamaño. La longitud del antebrazo fue el parámetro corporal con mayor asociación con el diámetro del intestino, y por ende el mejor estimador del tamaño mínimo requerido para la EDB en el perro.
2. Los resultados obtenidos sobre el rango de grosor normal de las diferentes tunicas a lo largo de todo el intestino delgado del perro constituyen la primera referencia publicada de estas características, con lo que ello puede suponer para el diagnóstico de patologías del intestino delgado a partir de de biopsias endoscópicas, ultrasonidos, muestras obtenidas por laparoscopia o postmortem. El sexo debe ser tenido en cuenta como fuente de variación del grosor de las tunicas intestinales.
3. Se ha demostrado que la EDB tanto por vía oral como anal es factible y segura en la especie canina. Los resultados aportados sobre la dinámica de exploración son importantes pues aportan valores de referencia para el empleo futuro de la EDB con fines diagnósticos o de tratamiento de enfermedades en porciones profundas del intestino delgado.
4. La exploración completa del intestino delgado del perro mediante EDB no ha sido posible ni por vía oral ni anal. Sin embargo, dado el interés que ello puede tener en el diagnóstico de algunas enfermedades del intestino delgado, serían necesarios nuevos estudios en los que se plantee la combinación de ambas vías.

7. EXTENDED SUMMARY

INTRODUCTION

The small intestinal diseases represent a high percentage of the common clinical problems in dogs and cats. In the last two decades, the upgrade of the minimally invasive techniques in veterinary medicine has produced important advances (Tams, 2003), especially concerning the flexible endoscopy by oral and/or anal approaches. A clear example is the processes of chronic diarrhoea with origin in either the small or large intestine (Tams, 2003; Casamian-Sorrosal et al., 2010). When comparing flexible endoscopy with other diagnostic methods such as radiology and mainly ultrasonography the advantage is that endoscopy not only allows visualization but also sampling of the mucosa (Tams, 2003). However, flexible endoscopy has also limitations since most of jejunum, the longest part of the small intestine is hardly explored, which is a disadvantage for a definitive diagnosis. In fact, nowadays the histopathology of the jejunum is only feasible after sampling by laparotomy and laparoscopy, both procedures potentially more risky than endoscopy (Casamian-Sorrosal et al., 2010).

On the other hand, in the diagnosis of enteropathies it is important to consider potential morphological changes in the intestinal layers according to the sampling area. Although this aspect, especially the thickness might be relevant for a correct interpretation of the biopsies or the ultrasonographic image, up to now such information is rather inaccurate and scarce (Washabau et al., 2010).

Hence, the complete endoscopic approach to the small intestine and having a standardized morphological pattern of the intestinal layers all along their length are among the main current challenges in canine gastroenterology.

In human medicine, the recent advances in endoscopy have allowed the complete exploration of the small intestine. The first technique designed for this

purpose was the endoscopic capsule (Iddan et al., 2000) which allows a complete visualization of the small intestine, although delayed on time and without therapeutic options. In 2001, Yamamoto and colleagues presented the double balloon enteroscopy (DBE), and this technique rapidly boosted the diagnostic and therapeutic possibilities in the gastrointestinal tract.

For these reasons, the main objectives of this PhD Thesis are:

1. To study in detail the morphology of the small intestine in the dog so as to evaluate whether it accomplishes the security conditions required for the double balloon enteroscopy.
2. To contribute to characterize the normal histology of the dog's small intestine by quantifying the thickness of its layers.
3. To characterize the efficiency and safety of the double balloon enteroscopy in the dog by both the oral and anal approaches.

MATERIAL AND METHODS

This work was carried out in two experimental phases. The first one in cadavers and the second in vivo.

55 dog cadavers were obtained from the local pound (Local Zoonoses of Murcia), the Animal House and the Veterinary Hospital of the University of Murcia. All the cadavers were used for anatomical (morphometric) study (objective 1, article 1), while 41 of them were used for histological (morphometric) study of the small intestine (objective 2, article 2). Euthanasia of the dogs was done with overdose of sodium pentobarbital for reasons others than gastrointestinal disorders.

For the in vivo experimental phase (DBE), 21 dogs without history of digestive diseases were used. The dogs came from the Animal House and Veterinary Hospital of

the University of Murcia. DBE were carried out with a therapeutic enteroscope (EN-450T5, Fujinon®) either by the oral (objective 3, article 3) and the anal approaches (objective 4, article 4).

Article 1

Fifty-five dog cadavers (33 mixed breed, 22 pure breed) were used in this study. Dogs were aged 1-9 years, the average weight was 18.0 ± 0.95 Kg (5-33) and the number of female 28 (27 males). After euthanasia, the following body parameters were recorded: weight, forelimb height, forearm length, leg length, nape-tail length and nape-nose length. The dogs were then positioned in left lateral recumbency, the abdomen was opened and the following morphological parameters of the small intestine and the mesentery were carefully measured: duodenal length, cranial duodenal width, descending duodenal width, ascending duodenal width, mesoduodenum length, jejunum length, jejunum width 75, 150, 225, 300 and 375 cm ahead from the duodenojejunal flexure, proximal mesojejunum length, distal mesojejunum length, ileum length, proximal ileum width, distal ileum width, small intestine length, hepatoduodenal ligament length and duodenocolic ligament length. The width of the small intestine was determined by measuring the distance between the mesenteric and anti-mesenteric borders when the intestine was placed in a flat position. All parameters were measured within the first hour from the euthanasia to minimise the impact of post-mortem changes. All data were included in a datasheet and analysed with the statistic package SPSS 17.0. Descriptive statistics were obtained and all the variables tested for normality (Kolmogorov-Smirnov test) and Levene test. One-way ANOVA and post hoc Tukey tests were performed for the intestinal width at different portions of the small intestine. Bivariate correlations were established for all the variables and factor analysis

(Principal Component Analysis) was used to reduce redundant information. Additionally, a series of linear regressions were established to investigate dependence between external parameters and intestinal width. All statistics were performed using a significance level of $p < 0.05$.

Article 2

Forty-one dog cadavers (24 mixed breed; 17 pure breed) were used in this study. The age range was 5 months to 12 years, the weight range 5-33 Kg and the number of females 20 (21 males). After euthanasia, dogs were placed in supine recumbency and the abdomen was opened at the level of the linea alba. Complete sections (0.5 cm) of the intestine at five defined sites were obtained: midpoint of the descending duodenum (descending duodenum), 75 cm distal to the duodenojejunal flexure (proximal jejunum), 25 cm before the ileum (end of the ileal antimesenteric branch) (distal jejunum), 2 cm from the beginning of ileum (proximal ileum) and 1-2 cm before the ileal orifice (distal ileum). The samples were fixed in 10% formalin, paraffin embedded, sectioned and stained with haematoxylin and eosin. All the samples were evaluated histologically by two pathologists to rule out any pathological process that could influence the normal thickness of the intestinal wall. Digital pictures of the whole intestinal wall and its different layers were obtained with a magnifying glass (Stemi 2000, Zeiss) or optical microscope (AxiosKop 40, Zeiss). The measured intestinal parameters were the total thickness of the intestinal wall, the thickness of the mucosa, including the epithelium, lamina propria and muscularis mucosae, the thickness of the muscularis mucosa, the submucosa, and the muscularis externa. In the submucosa, the size of the lymphoid aggregates was measured and, in the lamina muscularis mucosae and muscularis externa, both the circular and longitudinal layers were measured. Three random pictures were taken from each histological sample so as to obtain average representative values

for each measured parameter per dog. Morphometry was performed with the Sigma Scan Pro 5.0 package (Systat), always by the same person. Statistical analysis was carried out with the SPSS 17.0 software. Descriptive statistics were obtained and all the variables tested for normality (Kolmogorov-Smirnov test). One-way analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$) and post-hoc Tukey tests were performed to analyse the thickness of the different intestinal layers related to sex (fixed factor). The relationship among the variables was studied by bivariate correlations (Pearson's coefficient).

Article 3

Twelve dogs from the animal house of the University of Murcia with a range of 10-34 Kg and no history of digestive diseases were used. DBE was done with a therapeutic enteroscope (EN-450T5, Fujinon). Dogs were fasted 36 hours before enteroscopy and premedicated with a combination of 0.05 mg/kg acepromazine and 0.3 mg/kg butorphanol, administered intramuscularly. Anaesthesia was induced with a dose of 5 mg/kg propofol, administered intravenously to effect, and after orotracheal intubation the animals were maintained with isoflurane (1-1.2x minimum alveolar concentration) and 100% oxygen, using an anaesthetic breathing system adapted to their size. During the enteroscopy, blood pressure, heart rate, respiratory rate and oxygen saturation were monitored. Enteroscopies were carried out by two of the authors who have routinely performed DBE for more than 5 years. During each procedure, the distance advanced for each push and pull cycle and the time taken for the exploration were recorded in a worksheet (May et al., 2005). Exploration depth was measured from just after the pylorus while the end of procedure was established after the repetition of 5-6 unsuccessful push and pull manoeuvres (no advance of the endoscope). In three animals, the progress of the endoscope was surveyed by fluoroscopy (PHILIPS BV-300). This allowed visualizing the position of the tip of the endoscope and the overtube

within the abdominal cavity. In five dogs, blood samples were obtained at the beginning and end of DBE, and at 24 hours and 7 days after procedure. Serum concentrations of CRP, amylase and lipase were used as indicators of potential inflammation and/or pancreatic damage. After recovery, the dogs were examined twice a day for up to 7 days so as to rule out any complication related to technique. All data were included in a worksheet and statistical analysis was performed using SPSS 17.0. (SPSS, Inc®). Descriptive statistics including the Shapiro-Wilks test for normality and Levene test for homogeneity of variance were initially obtained for all experimental variables. Enzyme values were evaluated by analysis of variance (ANOVA, linear model with repeated measures), considering the timing of blood sampling as a within-subject factor. CRP values were subjected to a logarithmic transformation to comply with the assumptions of the analysis. Data for the number of cycles and time were plotted against the explored distance using regression analysis. All statistics were performed using a significance level of $p < 0.05$.

Article 4

Nine American Foxhound dogs from the animal facility of the University of Murcia without history of digestive disease were used for anal DBE (EN-450T5, Fujinon). The dogs were fasted for 48 hours before enteroscopy and premedicated with an oral laxative (X-Prep R; Viatrix Pharmaceuticals) 24 hours before exploration. Two warm water enemas (Enema Casen; Laboratoris Casen-Fleet; approximately 33mL/Kg) were administered 12 and 2 hours before colonoscopy. Pre-anaesthetic and anaesthetic protocols have been described in article 3. The outcome of the study was evaluating the same variables reported in article 3, except that the duration of procedure and the exploration depth were both measured from just after the ileal orifice. All dogs were supervised twice each day for up to 7 days. In seven dogs amylase, lipase and C-

reactive protein were sampled as referred in article 3. Statistics were the same as in article 3.

RESULTS AND DISCUSSION

Article 1

The mean total length of the small intestine was 400 ± 91.4 cm, approximately 10% corresponded to duodenum, 85% to jejunum and 5% to ileum. Small intestine length has been well documented in the literature (Nickel et al., 1979; Evans, 1993; Sandoval, 2000; Climent et al., 2005; Dyce et al., 2010), but the quoted figures vary considerably. This was probably due to the formidable difficulties of measurement in live dogs and the errors associated with relaxation of the gut after death (Dyce et al., 2010). Also, the total length of the small intestine has been estimated by multiplying by 2-3 times the total body length (Climent et al., 2005). In the present study the estimation was 5 x times this parameter, similarly to what was reported by Williams (1935).

The width of the different portions of the small intestine is critical for the progress of the endoscope through the intestinal lumen. The average width of the intestine was at its maximum in the descending portion of the duodenum (2.5 cm) and at its minimum at the approximate midpoint of the jejunum (2.1 cm). The average jejunum width was always lower than 2 cm, whereas the proximal and distal parts of the ileum displayed average values slightly higher than 2 cm. Based on the assumption that intestinal widths lower than 2 cm might give excessive mechanical resistance to the progress of the endoscope it is likely that the duodenum is the less risky portion of the small intestine for DBE exploration. Conversely, more difficulties are expected in the jejunum and ileum, since more than 50 % of the sampled dogs had less than 2 cm of

average jejunal width and more than 40 % had distal jejunum and ileum lower than 2 cm.

A positive correlation was found among almost all the intestinal width measurements and the external parameters, with the exception of the jejunal width³⁷⁵ which was probably due to the low number of dogs with such an intestinal length. The maximal association corresponded to jejunum²²⁵ and forearm length such that a linear model suggested that dogs with forearm length lower than 19 cm would have jejunal width lower than 2 cm in 61 % of the cases ($p < 0.05$).

Concerning the mesentery measurements, the correlations with the external parameters was not totally consistent. The mesoduodenum and distal mesojejunum showed high significant correlations with nape-tail length and forelimb height. The fact that the dog's mesoduodenum is very broad (18 ± 3.6 cm) might contribute to a rapid progress of the endoscope through this part of the intestine.

Article 2

The total thickness of the intestinal wall was higher in the duodenum (2.99 cm) than in other portions of the small intestine: distal ileum (2.54 cm), proximal jejunum (2.52 cm), distal jejunum (2.16 cm) and proximal ileum (2.38 cm). These data coincided with the average figures given in classical anatomy and histology books (Banks, 1993; Sandoval, 2000), however, in the present work sampling was defined at five different sites which adds value compared to previous studies in cadavers where sampling was not so extensive or standardised (Paulsen et al., 2003; Baum et al., 2007; Kleinschmidt et al., 2008),.

The proportion between the thickness of the different layers changed according to the portion of the small intestine (sampling site). Layers with the highest variation were the mucosa and submucosa. The maximum thickness of the mucosa was found in

the duodenum. Then, it decreased progressively from this site which was probably due to the lack of intestinal glands and the minimum amount of lymphoid tissue found in the jejunum (Paulsen et al., 2003). Apart from the ileum, the mucosa always accounted for more than 50% of the total thickness. This value was also observed by ultrasonography in a series of puppies (Stander et al., 2010), however in another work carried out in a series of nine Beagles, the mucosa accounted for less than 40% of the total thickness (Paulsen et al., 2003). The mucosa in the duodenum is particularly high because of the size of the villi, the presence of duodenal glands and the lymphoid tissue in the lamina propria (Banks, 1993).

The lamina muscularis mucosae followed the same tendency that the mucosa, except in the ileum where it increased. Two well differentiated layers of circular and longitudinal smooth muscle fibres were observed in the muscularis mucosae all along the small intestine. The inner circular layer was approximately half the thickness of the outer longitudinal layer. Evans (1993) observed that the lamina muscularis mucosae in the dog is up to three times thicker than in any other species. In our study, the greatest thickness of the lamina muscularis mucosae was found in the duodenum. This might be related to its role in agitating the villi and emptying the secretion of the crypts to promote enzymatic attack on the chime and increase the contact between the epithelium and the luminal contents (Young and Heath, 2002).

Contrary to the mucosa, the submucosa increased markedly in the ileum, appearing to be directly related to the percentage of lymphoid tissue, which was highest in the distal ileum and lowest in the duodenum and jejunum.

The muscularis externa was thickest in the distal ileum which was probably related with the proximity of the muscle sphincter ilearis. The circular layer was on average more than twice the thickness of the longitudinal layer. This occurred at all the

five sampling sites and was in accordance with Sandoval (2000). In the ileum, the thickness of the muscularis externa has been used as a structural criterion to differentiate this segment from the jejunum (Williams and Warwick, 1995; Sandoval, 2000), however, in our study the thickness of the muscular layer did not increase significantly between the jejunum and proximal ileum. Thus, the transition between these two intestinal portions is more likely related with an increase in lymphoid aggregates in the ileal submucosa. In fact, the muscularis layer was only significantly thicker in relation with the ostium ilearis.

The thickness of the intestinal wall showed significant differences according to sex, such that males had higher values than females all along the small intestine except for the distal ileum. This resulted in a 19.4 % lower thickness in females in the duodenum, 20.7 % in the proximal jejunum, 19.3 % in the distal jejunum and 18.9 % in the proximal ileum. Conversely, no correlation between the intestinal thickness and body weight was found for any of the five sampling sites. No previous studies have found a correlation between intestinal thickness and sex, although a non-uniform distribution of males and females might have been the cause of that (Goggin et al., 2000). On the other hand, our results differ from those of Delaney et al. (2003) and Baum et al. (2007) who found an increase in the duodenal and jejunal thickness related to ageing.

Article 3

In ten out of the twelve dogs, the oral DBE was successfully. The average insertion depth was 287 ± 36 cm (144-495) and the average duration of the procedure was 84 ± 8 min (54-125). The exploration efficiency, expressed as advanced distanced per cycle, showed that the first push manoeuvre was the most effective with an average value of 35 cm. Then efficiency decreased progressively until values of 10 cm per cycle

at the end of procedure. To cover the first metre of small intestine five complete cycles were necessary, the second metre was explored after eight additional cycles (13 cycles in total) and the third metre after nine more cycles (22 cycles in total). The average number of cycles per procedure was 21.5 cycles. Regarding the exploration dynamics, 20 min were necessary to reach 1 metre of insertion, 30 additional min to reach 2 metres (50 min in total) and 50 additional min to reach 3 metres (100 min in total). According to Nickel et al. (1979) a total insertion depth of 3 m might refer to approximately 60% of the total small intestinal length. Thus, it can be concluded that a typical oral DBE in the dog takes approximately 1.5 h to explore the duodenum and almost half of the jejunum. These figures are quite similar to those published in humans for oral DBE (Araki et al., 2006; Pérez-Cuadrado et al., 2006; Lin et al., 2008; Hegde et al., 2010).

In two dogs, the procedure was aborted soon after having passed the duodenum because the endoscope could not progress despite of many attempts. In literature for DBE in humans the impossibility of progressing has been related with the formation of endoscope loops, the excessive accumulation of air bubbles behind the overtube's balloon, the endoscopist's lack of experience and potential anatomical restrictions such as adhesions or congenital small bowel rotations (Mehdizadeh et al., 2006; Pérez Cuadrado et al., 2007; Sunada and Yamamoto, 2008). In dogs, the formation of endoscope loops was quite frequent and this could be related with the anatomy of the dog's duodenum and the large and flexible mesoduodenum. The loops were easily verified by abdominal palpation and in most cases solved by changing the dog's recumbency. When fluoroscopy was available it proved helpful to guide the required manoeuvres.

In all dogs, none of the parameters monitored during the procedure (blood pressure, heart rate, respiratory rate and oxygen saturation) showed any significant

alteration. Food intake was normal the day after procedure, and no clinical signs of abdominal pain, vomiting, diarrhoea or altered sensory behaviour were observed. Regarding the biochemical assays amylase and lipase levels did not change significantly during or after the procedures. Serum CRP increased at 24 h and 7 days post DBE, although these changes did not achieve statistical significance ($p > 0.05$). CRP is not a specific indicator of pancreatitis, but rather a non-specific marker of acute inflammation, and a recent study suggested that CRP is a useful indicator of gastrointestinal mucosal injury in dogs (Bayramli and Ulutas, 2008). The iatrogenic effects of the technique – mucosa compression, intestine folding behind the balloons and mesentery strengthening – are likely the cause of the increased CRP levels. In humans, the diagnosis of pancreatitis requires accomplishing two of these three conditions: upper abdominal pain, amylase and/or lipase levels more than 3 times the upper normal limit and CT or MRI findings compatible with pancreatitis (Bollen et al., 2008). Referred to the two former conditions none of them were observed in the dogs.

DBE could be helpful in diagnosing localized lesions in the jejunum or pathologies that are diffuse or change depending on the portion of the small intestine, such as the irritable bowel diseases (Tams, 2003; Casamian-Sorrosal et al., 2010; Ayala et al., 2011) or lymphangiectasia (Tams, 2003). Besides, as in the dog histological abnormalities are sometimes more readily detected in the ileal mucosa than in the duodenum (Casamian-Sorrosal et al., 2010), the retrograde approach by DBE could be an interesting field for future investigation. The combined oral and anal approaches could probably allow a complete exploration of the small intestine, which has proved very useful in human medicine (Kita et al., 2005; Mönkemüller et al., 2008; Xin et al., 2011).

Article 4

All anal DBE were successful. The average insertion depth was 212 ± 12 cm and the average duration of the procedure was 61 ± 6 min. The exploration efficiency expressed as the advanced distanced per cycle, showed that the first pushing manoeuvre was the most effective with an average value of 54 cm. Then it decreased progressively up to values lower than 10 cm per cycle by the end of the procedure. Approximately 4 cycles were necessary to cover the first metre of small intestine, while the second metre was explored after 13 additional cycles (17 cycles in total). Thus, a typical anal DBE in the dog takes approximately 1 hour to explore the ileum and a large portion of the jejunum. Reports concerning the prevalence of jejunal diseases are scarce in veterinary literature (Ruaux, 2013), although this might change with the increasing availability of DBE in canine practice and could be particularly relevant for the diagnosis of inflammatory bowel diseases and the gastrointestinal lymphoma.

The parameters monitored during the procedure (blood pressure, heart rate, respiratory rate and oxygen saturation) did not showed any significant alteration. As with the oral DBE in dogs (Latorre et al., 2007; Ayala et al., 2011; Sarriá et al., 2012), no limitations associated with the instrument or post-procedure complications after 24 hours were observed.

Amylase, lipase and CRP have been monitored as indicators of post-DBE pancreatitis in humans (Kopacova et al., 2010), pigs (Latorre et al., 2012) and dogs (Sarriá et al., 2012). In the present study, no significant increases in amylase or lipase levels were found during or after the procedures. CRP values increased 24 hours after DBE, but as CRP is a non-specific marker of acute inflammation (Bayramli and Ulutas, 2008), the increase could be related to the iatrogenic effects of the technique. Besides,

post-DBE pancreatitis in humans have uniquely been described after the oral approach (Kopacova et al., 2010).

CONCLUSIONS

1. Validation of the dog as a candidate for DBE has been obtained after a thorough anatomical study of the small intestine. However, when planning DBE caution should be taken in small dogs due to potential limitations imposed by the width of the intestine. The length of the forearm showed the highest association with the diameter of the intestine so that it is the best body parameter to define the minimum body size necessary for a secure DBE in the dog.
2. The results for the thicknesses of the different layers of the small intestine given in this study are a novelty and might serve to assist the diagnosis of enteropathies by endoscopic biopsies, ultrasounds, laparoscopy and postmortem sampling. The sex should be considered as a major source of variation in intestinal thickness in the dog.
3. It has been demonstrated that both the oral and anal DBE is feasible and safe in the dog. The results for the exploration dynamics of the procedure might serve as reference values for future diagnosis and treatment of diseases in deep portions of the small intestine.
4. The complete exploration of the small intestine by DBE has not been achieved yet in the dog. Further studies with a combination of the oral and anal approaches might facilitate this goal, which could be useful for a accurate diagnosis of some enteropathies.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akerman, PA (2013): Spiral enteroscopy versus double-balloon enteroscopy: Choosing the right tool for the job. *Gastrointestinal Endoscopy* **77**, 252-254.
- Akerman, PA, Cantero, D, Avila, J, y Pangtay, J (2008): A Pilot Study of Spiral Enteroscopy Using a New Design 48F Discovery SB Overtube and the Fujinon 200 cm × 9.4 mm Enteroscope. *DDW Abstract Issue 2008, Digestive Disease Week 2008* **67**, AB264-AB264.
- Araki, A, Tsuchiya, K, Oshima, S, Okada, E, Kanai, T, y Watanabe, M (2006): Double-Balloon Enteroscopy: First One Year Experience and Modified Technique (Double-Over Tube Method). *Gastrointestinal endoscopy* **63**, AB186-AB186.
- Ayala, I, Latorre, R, Soria, F, Carballo, F, Lopez-Albors, O, Buendia, AJ, y Perez-Cuadrado, E (2011): A case of lymphocytic-plasmacytic jejunitis diagnosed by double-balloon enteroscopy in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* **47**, 262-267.
- Bacha, WJ, y Bacha, LM (2000): Digestive system. En: Bacha, W.J.; Bacha, L.M. (Eds.), *Color Atlas of Veterinary Histology*, Second edition. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 119-161.
- Banks, WJ (1993): *Digestive system I - Alimentary canal*. En: *Banks, W.J. (Ed.), Applied Veterinary Histology*. Mosby-Year Book (St. Louis), Missouri (U.S.A.), pp. 350-353.
- Baum, B, Meneses, F, Kleinschmidt, S, Nolte, I, y Hewicker-Trautwein, M (2007): Age-related histomorphologic changes in the canine gastrointestinal tract: a histologic and immunohistologic study. *World journal of gastroenterology : WJG* **13**, 152-157.
- Bayramli, G, y Ulutas, B (2008): Acute phase protein response in dogs with experimentally induced gastric mucosal injury. *Veterinary Clinical Pathology* **37**, 312-316.
- Bollen, TL, Van Santvoort, HC, Besselink, MG, Van Leeuwen, MS, Horvath, KD, Freeny, PC, and Gooszen, HG (2008): The Atlanta Classification of acute pancreatitis revisited. *British Journal of Surgery* **95**, 6-21.
- Buendía, AJ, Durán, E, Gázquez, A, Gómez, S, Méndez, A, and Navarro, JA (2004): Aparato digestivo. En: Gázquez, A. y Blanco, A. (Eds.) *Tratado de Histología Veterinaria*. Masson, Barcelona, pp. 239-280.
- Casamian-Sorrosal, D, Willard, MD, Murray, JK, Hall, EJ, Taylor, SS, y Day, MJ (2010): Comparison of Histopathologic Findings in Biopsies from the Duodenum and Ileum of Dogs with Enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **24**, 80-83.
- Climent, S, Sarasa, M, Munies, P, y Latorre, R (2005): Intestino delgado y grueso. En:

- Climent, S., Sarasa, M., Muniesa, P., Latorre, R. (Eds.), Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos. Cabeza, aparato respiratorio, aparato digestivo y aparato urogenital. Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 195-220.
- Delaney, F, O'Brien, RT, y Waller, K (2003): Ultrasound evaluation of small bowel thickness compared to weight in normal dogs. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* **44**, 577-580.
- Di Caro, S, May, A, Heine, D, Fini, L, Landi, B, Petruzzello, L, Cellier, C, Mulder, C, Costamagna, G, Ell, C, y Gasbarrini, A (2005): The European experience with double-balloon enteroscopy: indications, methodology, safety, and clinical impact. *Gastrointest Endosc* **62**, 545-50.
- Dyce, KM, Sack, WO, y Wensing, CJG (2010): The Abdomen of the Dog and Cat. En: Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G. (Eds.). Text Book of Veterinary Anatomy. Cuarta edición. Ed. Saunders., St. Louis Missouri E.U.A., pp. 444-446.
- Ell, C, May, A, Nachbar, L, Schneider, M, Gasbarrini, A, di Caro, S, Cellier, C, y Landi, B (2005): Prospective European Multicenter Trial for Evaluation of Push-and-Pull Enteroscopy in Patients with Small Bowel Diseases. *Gastrointestinal Endoscopy* **61**, AB105-AB105.
- Evans, HE (1993): The digestive apparatus and abdomen. En: Evans, H.E. (Ed.), Miller's Anatomy of the Dog. Saunders, Pennsylvania, USA, pp. 385-462.
- Goggin, JM, Biller, DS, Debey, BM, Pickar, JG, y Mason, D (2000): Ultrasonographic measurement of gastrointestinal wall thickness and the ultrasonographic appearance of the ileocolic region in healthy cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* **36**, 224-228.
- Granados, JR (2010): Esofagoscopia. En: Endoscopia en el Aparato Digestivo. *Canis et felis* **18**, 7-12.
- Groenen, MJM, Moreels, TGG, Orlent, H, Haringsma, J, y Kuipers, EJ (2006): Acute pancreatitis after double-balloon enteroscopy: An old pathogenetic theory revisited as a result of using a new endoscopic tool. *Endoscopy* **38**, 82-85.
- Gross, SA, y Stark, ME (2008): Initial experience with double-balloon enteroscopy at a U.S. center. *Gastrointestinal Endoscopy* **67**, 890-897.
- Gualtieri, M (2010): Gastroduodenoscopia. *Canis et felis* **18**, 13-23.
- Hegde, SR, Iffrig, K, Li, T, Downey, S, Heller, SJ, Tokar, JL, y Haluszka, O (2010): Double-balloon enteroscopy in the elderly: safety, findings, and diagnostic and therapeutic success. *Gastrointestinal Endoscopy* **71**, 983-989.
- Heine, G, Hadithi, M, Groenen, M, Kuipers, E, Jacobs, M, y Mulder, C (2006): Double-balloon enteroscopy: indications, diagnostic yield, and complications in a series

- of 275 patients with suspected small-bowel disease. *Endoscopy* **38**, 42-8.
- Henroteaux, M (2010): Colonoscopia. *Canis et felis* **18**, 24-30.
- Honda, K, Itaba, S, Mizutani, T, Sumida, Y, Kanayama, K, Higuchi, N, Yoshinaga, S, Akiho, H, Kawabe, K, Arita, Y, Ito, T, Nakamura, K, y Takayanagi, R (2006): An increase in the serum amylase level in patients after peroral double-balloon enteroscopy: An association with the development of pancreatitis. *Endoscopy* **38**, 1040-1043.
- Iddan, G, Meron, G, Glukhovsky, A, y Swain, P (2000): Wireless capsule endoscopy. *Nature* **405**, 417-418.
- Kamiya, S, Suzuki, Y, y Sugimura, M (1983): Polyglucosan Bodies in the Digestive Tract of the Aged Dog. *Acta Neuropathologica* **60**, 297-300.
- Kita, H, Yamamoto, H, Nakamura, T, Shirakawa, K, Terano, A, y Sugano, K (2005): Bleeding polyp in the mid small intestine identified by capsule endoscopy and treated by double-balloon endoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy* **61**, 628-629.
- Kleinschmidt, S, Meneses, F, Nolte, I, y Hewicker-Trautwein, M (2008): Distribution of mast cell subtypes and immune cell populations in canine intestines: Evidence for age-related decline in T cells and macrophages and increase of IgA-positive plasma cells. *Research in Veterinary Science* **84**, 41-48.
- Kopacova, M, Tacheci, I, Rejchrt, S, Bartova, J, y Bures, J (2010): Double balloon enteroscopy and acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology* **16**, 2331-2340.
- Kopacova, M, Rejchrt, S, Tachecí, I, y Bures, J (2007): Hyperamylasemia of uncertain significance associated with oral double-balloon enteroscopy. *Gastrointest Endosc* **66**, 1133-8.
- Laganiere, S, Berteloot, A, y Maestracci, D (1984): Digestive and absorptive functions along dog small intestine: comparative distributions in relation to biochemical and morphological parameters. *Comparative biochemistry and physiology.A, Comparative physiology* **79**, 463-472.
- Larson, MM, y Biller, DS (2009): Ultrasound of the gastrointestinal tract. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* **39**, 747-759.
- Latorre, R, Ayala, I, Soria, F, Carballo, F, Ayala, MD, y Pérez-Cuadrado, E (2007): Double-balloon enteroscopy in two dogs. *The Veterinary record* **161**, 587-590.
- Latorre, R, Soria, F, López-Albors, O, Sarriá, R, Sánchez-Margallo, F, Esteban, P, Carballo, F, y Pérez-Cuadrado, E (2012): Effect of double-balloon enteroscopy on pancreas: An experimental porcine model. *World Journal of Gastroenterology* **18**, 5181-5187.
- Lenz, P, y Domagk, D (2012): Double- vs. single-balloon vs. spiral enteroscopy. *Best*

- Practice and Research: Clinical Gastroenterology* **26**, 303-313.
- Lin, TK, Balint, JP, y Erdman, SH (2008): Double-Balloon Enteroscopy: A Pediatric Experience. *DDW Abstract Issue 2008, Digestive Disease Week 2008* **67**, AB252-AB252.
- Lo, SK, y Simpson, PW (2007): Pancreatitis associated with double-balloon enteroscopy: how common is it. *Gastrointestinal Endoscopy* **66**, 1139-1141.
- López, A, y Esteban, P (2007): Indicaciones. Lesiones elementales. En: Pérez-Cuadrado E. (Ed.), *Enteroscopia de doble balón*. Ed. Entheos, Madrid, pp. 87-99.
- Matsushita, M, Shimatani, M, Uchida, K, y Okazaki, K (2007): Mechanism of acute pancreatitis after peroral double-balloon enteroscopy [7]. *Endoscopy* **39**, 480.
- May, A, y Ell, C (2006): Push-and-pull enteroscopy using the double-balloon technique/double-balloon enteroscopy. *Digestive and Liver Disease* **38**, 932-938.
- May, A, Nachbar, L, y Ell, C (2005a): Double-balloon enteroscopy (push-and-pull enteroscopy) of the small bowel: feasibility and diagnostic and therapeutic yield in patients with suspected small bowel disease. *Gastrointest Endosc* **62**, 62-70.
- May, A, Nachbar, L, Schneider, M, Neumann, M, y Ell, C (2005b): Push-and-pull enteroscopy using the double-balloon technique: Method of assessing depth of insertion and training of the enteroscopy technique using the Erlange endotrainer. *Endoscopy* **37**, 66-70.
- Mehdizadeh, S, Ross, A, Gerson, L, Leighton, J, Chen, A, Schembre, D, Chen, G, Semrad, C, Kamal, A, Harrison, EM, Binmoeller, K, Waxman, I, Kozarek, R, y Lo, SK (2006): What is the learning curve associated with double-balloon enteroscopy? Technical details and early experience in 6 U.S. tertiary care centers. *Gastrointestinal Endoscopy* **64**, 740-750.
- Mensink, PB, Haringsma, J, y Kuipers, EJ (2008): Low Incidence of Hyperamylasemia After Proximal Double Balloon Enteroscopy: Adjustment of Insertion Technique. *Gastrointestinal Endoscopy* **67**, AB286.
- Messer, I, May, A, Manner, H, y Ell, C (2013): Prospective, randomized, single-center trial comparing double-balloon enteroscopy and spiral enteroscopy in patients with suspected small-bowel disorders. *Gastrointestinal Endoscopy* **77**, 241-249.
- Moore, LE (2003): The advantages and disadvantages of endoscopy. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* **18**, 250-253.
- Mönkemüller, K, Bellutti, M, Fry, LC, y Malfertheiner, P (2008): Enteroscopy. *Gastrointestinal Endoscopy* **22**, 789-811.
- Nickel, R, Schummer, A, y Seiferle, E (1979): The alimentary canal. En: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (Eds.), *The Anatomy of the Domestic Animals*. The

- Viscera of the Domestic Mammals. Verlag Paul Parey, Berlín, Germany, pp. 99-203.
- Nickel, R, Schummer, A, y Seiferle, E (1981): Arteries. En: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (Eds.), *The Anatomy of the Domestic Animals. The Circulatory System, the Skin, and the Cutaneous Organs of the Domestic Mammals*. Verlag Paul Parey, Berlin, pp. 170-173.
- Pata, C, Akyüz, U, Erzin, Y, Mutlu, N, Mercan, A, y Dirican, A (2010): Post-procedure elevated amylase and lipase levels after double-balloon enteroscopy: Relations with the double-balloon technique. *Digestive Diseases and Sciences* **55**, 1982-1988.
- Paulsen, DB, Buddington, KK, y Buddington, RK (2003): Dimensions and histologic characteristics of the small intestine of dogs during postnatal development. *American Journal of Veterinary Research* **64**, 618-626.
- Pérez-Cuadrado, E, Latorre, R, Carballo, F, Pérez-Miranda, M, Martín, AL, Shanabo, J, Esteban, P, Torrella, E, Mas, P, y Hallal, H (2007): Training and new indications for double balloon endoscopy (with videos). *Gastrointestinal Endoscopy* **66**, S39-S46.
- Pérez-Cuadrado, E, Más, P, Hallal, H, Shanabo, J, Muñoz, E, Ortega, I, López Martín, A, Torrella, E, López Higuera, A, Martín, A, y Carballo, F (2006): Double-balloon enteroscopy: A descriptive study of 50 explorations. *Enteroscopia de doble balón: Estudio descriptivo de 50 exploraciones* **98**, 73-81.
- Pérez-Cuadrado, E, y Shanabo, JA (2007): Técnica endoscópica. En: Pérez-Cuadrado (Ed.), *Enteroscopia de doble balón*. Ed. Entheos, Madrid, pp. 53-78.
- Ruau, C (2013): Enteroscopy of the canine gastrointestinal tract: A push to go deeper. *The Veterinary Journal* **195**, 267-268.
- Sandoval, J Cavidad y vísceras abdominales. En: Sandoval, J.(Ed.), *Tratado de Anatomía Veterinaria. Tomo III: Cabeza y Sistemas Viscerales*. Imprenta Sorles, León, pp. 267-316.
- Sarriá, R, López Albors, O, Soria, F, Ayala, I, Pérez Cuadrado, E, Esteban, P, y Latorre, R (2013): Characterization of oral double balloon endoscopy in the dog. *The Veterinary Journal* **195**, 331-336.
- Shanabo, JA, Párraga, J, Valverde, A, Franco, MJ, Medina, MA, Artiga, A, Baeza, A, y Sáez, MD (2007): Equipamiento. En: Pérez-Cuadrado E. (Ed.) *Enteroscopia de doble balón*. Ed. Entheos, Madrid, pp. 47-52.
- Simpson, JW (2005): Gastrointestinal endoscopy. En: Hall, E.J., Simpson, J.W., Williams, D.A. (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology*. British Small Animal Veterinary Association, England, pp. 34-49.
- Stander, N, Wagner, WM, Goddard, A, y Kirberger, RM (2010): Normal canine

- pediatric gastrointestinal ultrasonography. *Veterinary Radiology and Ultrasound* **51**, 75-78.
- Stinson, AW, y Calhoun, ML (1993): Sistema digestivo. En: Dellmann H.D. (Ed.) *Histología Veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 203-209.
- Sunada, K, y Yamamoto, H (2008): Double Balloon Enteroscopy: Techniques. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy* **10**, 46-53.
- Takano, N, Yamada, A, Watabe, H, Togo, G, Yamaji, Y, Yoshida, H, Kawabe, T, Omata, M, y Koike, K (2011): Single-balloon versus double-balloon endoscopy for achieving total enteroscopy: A randomized, controlled trial. *Gastrointestinal Endoscopy* **73**, 734-739.
- Tams, RT (2003): Endoscopy and laparoscopy in veterinary gastroenterology. En: Tams, R.T. (Ed.), *Handbook of Small Animal Gastroenterology*, Second Ed. Saunders, Philadelphia, pp. 97-110.
- Tsujikawa, T, Saito, Y, y Fujiyama, Y (2008): Single Balloon Enteroscopy: Is It Feasible? *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy* **10**, 62-65.
- Usón, J, y Tejedo, V (1985): Fibroscopios de visión axial, lateral, angular y mixta. En: Usón, J., Tejedo, V. (Eds.) *Fibroendoscopia digestiva veterinaria y medicina experimental en pequeños animales*. Ed. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Zaragoza, pp. 19-24.
- Washabau, RJ, Day, MJ, Willard, MD, Hall, EJ, Jergens, AE, Mansell, J, Minami, T, and Bilzer, TW (2010): Endoscopic, Biopsy, and Histopathologic Guidelines for the Evaluation of Gastrointestinal Inflammation in Companion Animals. *Journal Veterinary International Medicine* **24**, 10-26.
- Williams, PL, and Warwick, R (1995): *Intestino delgado*. En: Williams, P.L., Warwick, R. (Eds.), *Gray Anatomía. Tomo II*. Editorial Salvat, Barcelona, pp. 1472-1481.
- Williams, T (1935): The anatomy of the digestive system of the dog. *Veterinary Medicine* **30**, 442-444.
- Xin, L, Liao, Z, Jiang, YP, y Li, ZS (2011): Indications, detectability, positive findings, total enteroscopy, and complications of diagnostic double-balloon endoscopy: A systematic review of data over the first decade of use. *Gastrointestinal Endoscopy* **74**, 563-570.
- Yamamoto, H, Sekine, Y, Sato, Y, Higashizawa, T, Miyata, T, Iino, S, Ido, K, y Sugano, K (2001): Total enteroscopy with a nonsurgical steerable double-balloon method. *Gastrointestinal Endoscopy* **53**, 216-220.
- Young, B, and Heath, JW (2002): Aparato gastrointesinal. En: Young, B., Heath, J.W. (Eds.). *Wheater's Histología funcional (texto y atlas en color)*. Harcourt, Madrid, pp. 249-273.

9. APÉNDICE

ÍNDICE DE IMPACTO



2011 JCR SCIENCE EDITION

| Mark | Rank | Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i> | ISSN | JCR Data ¹ | | | | | | Eigenfactor [®] Metrics ¹ | |
|--------------------------|------|---|-----------|-----------------------|---------------|----------------------|-----------------|----------|-----------------|---|--------------------------------------|
| | | | | Total Cites | Impact Factor | 5-Year Impact Factor | Immediacy Index | Articles | Cited Half-life | Eigenfactor [®] Score | Article Influence [®] Score |
| <input type="checkbox"/> | 8 | VET.J | 1090-0233 | 3945 | 2.239 | 2.372 | 0.789 | 266 | 4.2 | 0.01225 | 0.652 |

2012 JCR SCIENCE EDITION

| Mark | Rank | Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i> | ISSN | JCR Data ¹ | | | | | | Eigenfactor [®] Metrics ¹ | |
|-------------------------------------|------|---|-----------|-----------------------|---------------|----------------------|-----------------|----------|-----------------|---|--------------------------------------|
| | | | | Total Cites | Impact Factor | 5-Year Impact Factor | Immediacy Index | Articles | Cited Half-life | Eigenfactor [®] Score | Article Influence [®] Score |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4 | VET.J | 1090-0233 | 4990 | 2.424 | 2.656 | 0.569 | 357 | 4.6 | 0.01366 | 0.677 |

