

Determinación de los niveles de Zonulina sérica y fecal en la gastroenteritis canina causada por algunas enfermedades infecciosas y no infecciosas

Determination of serum and fecal Zonulin levels in canine gastroenteritis caused by selected infectious and non-infectious diseases

Deniz ŞARDAĞ¹ , Kerem URAL* , Deniz ALIC-URAL² , Serdar PASA¹ ,
Hasan ERDOĞAN¹ , Songul ERDOĞAN¹ 

¹Aydın Adnan Menderes University, Veterinary Faculty, Department of Internal Medicine, 09900, Aydın, Türkiye.

²Aydın Adnan Menderes University, Sultanhisar Vocational School, Department of Plant and Animal Production, 9740, Aydın, Türkiye.

*Correspondence author: uralkerem@gmail.com

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo determinar simultáneamente los niveles de zonulina en heces y sangre como un verdadero biomarcador para la detección y la gravedad del intestino permeable, que puede desarrollarse debido a diarrea infecciosa o no infecciosa de diversas causas etiológicas en perros. Cincuenta y cuatro perros, 45 con gastroenteritis y 9 perros sanos, fueron llevados a la clínica con antecedentes de diarrea de al menos un día de duración y fueron clasificados según su etiología según análisis clínicos de laboratorio. Los niveles de zonulina se determinaron a partir de muestras de sangre y heces mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo sano y todos los grupos en cuanto a zonulina sérica y fecal. Los niveles de zonulina fecal en el grupo enfermo difirieron significativamente entre el grupo con coronavirus y los grupos con giardia y parvovirus, mientras que los niveles séricos de zonulina también difirieron significativamente en el grupo con moquillo. Los hallazgos sugieren que los niveles de zonulina fecal y sérica pueden utilizarse como un biomarcador no invasivo de disfunción de la barrera hematoencefálica en perros con gastroenteritis.

Palabras clave: Permeabilidad intestinal; marcador intestinal; diarrea en perros; marcadores no invasivos; síndrome del intestino permeable.

ABSTRACT

This study aimed to simultaneously determine zonulin levels in feces and blood as a reliable biomarker for the detection and severity of intestinal permeability (“leaky gut”), which may develop due to infectious or non-infectious diarrhea of various etiologies in dogs. Fifty-four dogs, 45 with gastroenteritis and 9 healthy controls, were presented to the clinic with a history of diarrhea lasting at least one day and were classified according to etiology based on clinical laboratory analyses. Zonulin levels were measured in blood and fecal samples using enzyme-linked immunosorbent assay. Significant differences in both serum and fecal zonulin levels were found between the healthy group and all diseased groups. Fecal zonulin levels in the diseased dogs differed significantly between the coronavirus group and the giardia and parvovirus groups, while serum zonulin levels also differed significantly in the distemper group. These findings suggest that fecal and serum zonulin levels may serve as non-invasive biomarkers of blood–brain barrier dysfunction in dogs with gastroenteritis.

Key words: Intestinal permeability, intestinal biomarker; diarrhea in dogs; non-invasive markers; leaky gut syndrome.

INTRODUCCION

Las enfermedades gastrointestinales (GI) son comunes en los perros, siendo la diarrea la presentación clínica más común [1, 2]. El término «enfermedades GI» es amplio y abarca trastornos que pueden presentarse en cualquier parte del tracto digestivo. La similitud de los síntomas entre los trastornos GI dificulta el diagnóstico [3].

La zonulina es una proteína medible que refleja la permeabilidad intestinal, y el aumento de los niveles de zonulina se considera un indicador de una barrera intestinal comprometida [4, 5].

La zonulina es la contraparte eucariota de la toxina de la zonula occludens de *Vibrio cholerae* [6]. La zonulina se identifica con la prehaptoglobina-2 y se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico y al receptor 2 activado por proteasa en el epitelio intestinal. Este complejo inicia la fosforilación de las proteínas de la zonula occludens, lo que lleva a la apertura de las uniones estrechas del intestino delgado [7].

La liberación de zonulina es un mecanismo fisiológico que regula la colonización microbiana del intestino delgado [8, 9]. Por lo tanto, un sistema de zonulina desregulado se considera la causa de la disbiosis intestinal [10, 11].

Este estudio tuvo como objetivo determinar simultáneamente los niveles de zonulina en heces y sangre como un verdadero biomarcador para la detección y la gravedad del síndrome del intestino permeable en perros (*Canis lupus familiaris*) debido a diarrea infecciosa o no infecciosa de diversas etiologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En el estudio se incluyeron perros de ambos sexos, con edades comprendidas entre 1 y 5 años, pertenecientes a diferentes razas. La población estudiada estuvo compuesta por 25 machos y 22 hembras, e incluyó las siguientes razas: Pastor Alemán (n = 1), Cane Corso (n = 1), Doberman (n = 2), French Bulldog (n = 3), Golden Retriever (n = 1), Kangal (n = 5), Labrador Retriever (n = 2), Maltipoo (n = 2), mestizos (n = 19), Pitbull (n = 3), Pug (n = 2), Rottweiler (n = 4) y Terrier (n = 2). Aunque la giardiasis y la enteritis por parvovirus canino se observan con mayor frecuencia y gravedad en perros jóvenes, en el presente estudio también se incluyeron perros adultos que presentaban signos clínicos compatibles y resultados diagnósticos positivos.

Los diagnósticos etiológicos fueron establecidos mediante evaluación clínica, hallazgos laboratoriales y pruebas diagnósticas específicas para cada enfermedad. Los casos de enteritis por parvovirus canino y coronavirus canino fueron confirmados mediante pruebas rápidas comerciales de detección de antígenos fecales (Diagen, Türkiye), junto con signos clínicos compatibles como diarrea hemorrágica, vómito, depresión y deshidratación. Los casos de giardiasis fueron diagnosticados mediante examen coproparasitológico y pruebas rápidas comerciales para *Giardia* spp. (Diagen, Türkiye). Los perros con moquillo canino fueron diagnosticados considerando signos

clínicos sistémicos y neurológicos compatibles, junto con pruebas rápidas de detección antigénica (Diagen, Türkiye).

Los casos incluidos en el grupo no infeccioso fueron determinados a partir de la ausencia de agentes infecciosos detectables, evaluación clínica integral y resultados laboratoriales compatibles. Se incluyeron en el estudio un total de 54 animales, incluyendo aquellos con enfermedades relacionadas con las diversas etiologías enumeradas en la TABLA I y controles sanos. Los perros con diarrea se dividieron en cinco grupos según diferentes enfermedades. El grupo control sano consistió en nueve perros seleccionados entre perros sanos, vacunados y considerados libres de la enfermedad.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional de la Universidad Adnan Menderes de Aydın con el número 64583101/2020/045.

TABLA I
Perros incluidos en el estudio y sus grupos

Grupos incluidos en el estudio y número de casos (n)	Distribución en grupos infecciosos y no infecciosos
Grupo I (n = 9)	Giardiasis
Grupo II (n = 9)	Coronavirus
Grupo III (n = 9)	Moquillo
Grupo IV (n = 9)	Enteritis parvoviral
Grupo V (n = 9)	Diarrea no
Grupo VI (n = 9)	

Análisis de zonulina

Se extrajeron 2 mL de sangre de la vena cefálica antebraquial de todos los perros incluidos en el estudio y se colocaron en tubos sin anticoagulante. Debido a las condiciones clínicas variables de los pacientes con gastroenteritis, no fue posible estandarizar el ayuno previo en todos los animales. Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas inmediatamente después de la recolección (Hettich, Germany) a 1000 G durante 15 min. Las muestras de suero obtenidas fueron almacenadas en un congelador a -80 °C (Nüve, Türkiye) hasta su análisis.

Asimismo, se recogieron muestras fecales mediante hisopos estériles y se colocaron en tubos de recolección fecal. Las muestras fecales fueron almacenadas en etanol al 70 % y conservadas a una temperatura constante de 4 °C (Vestel, Türkiye) hasta su análisis. Los niveles séricos y fecales de zonulina se determinaron mediante un kit ELISA comercial (MyBioSource, San Diego, CA, USA).

Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios y el error estándar de los datos de zonulina en heces y sueros de perros con diarrea. Las pruebas de homogeneidad y normalidad de los datos se llevaron a cabo mediante Shapiro-Wilk, mostrando que los datos no seguían una distribución normal y que, incluso después de transformaciones logarítmicas, aún existían conjuntos de datos que no mostraban normalidad. En este caso se utilizaron métodos estadísticos no paramétricos para comparar grupos.

Para comparar grupos en muestras fecales y séricas se aplicó la prueba de varianza de Kruskal-Wallis y para comparar zonulina fecal y sérica en el mismo grupo se aplicó la prueba de Wilcoxon. Además, para la correlación entre muestras fecales y séricas

dentro de cada grupo se aplicó la correlación de Spearman.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa SPSS versión 26.0 (IBM, Estados Unidos), y se consideró estadísticamente significativo una $P < 0,05$. El presente estudio fue financiado por la Unidad de Financiación de la Investigación de la Universidad Aydin Adnan Menderes (ADU-BAP) con el proyecto n.º VTF-21031.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los pacientes sometidos a análisis de heces, se encontraron diferencias significativas entre el grupo sano y todos los grupos. También se observaron diferencias significativas entre el grupo con coronavirus y el grupo con giardia, y entre los grupos con coronavirus y parvovirus. En los pacientes con niveles séricos de zonulina, se encontraron diferencias significativas entre el grupo sano y todos los grupos. También se observaron diferencias significativas entre el grupo con coronavirus y los grupos con giardia, moquillo y parvovirus. En las comparaciones fecales y séricas, todos los grupos dentro del mismo grupo, excepto giardia, presentaron diferencias entre sí (FIG. 1; TABLA II).

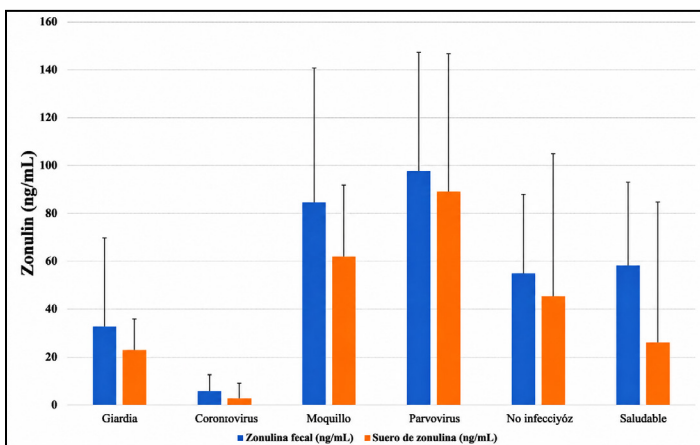


FIGURA 1. Valores medianos, mínimos y máximos de las concentraciones séricas y fecales de zonulina en perros con giardiasis, coronavirus, moquillo, enteritis por parvovirus, diarrea no infecciosa y en el grupo control sano. Los valores se expresan en ng/mL

Se observaron aumentos significativos en ambos parámetros, especialmente en infecciones virales como coronavirus, parvovirus y moquillo. En el grupo de Giardia, la correlación sérico-fecal de zonulina fue débil y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en algunas comparaciones.

TABLA II

Concentraciones de zonulina fecal y sérica en perros con gastroenteritis infecciosa y no infecciosa, y en el grupo control sano

Grupos	Zonulina fecal (ng/mL)	Zonulin sérica (ng/mL)	Valor P
	Media ± EE	Media ± EE	
Giardiasis	41,66 ± 4,36 ^{bc}	63,27 ± 42,68 ^{bc}	NS
Coronavirus	19,59 ± 4,35 ^b	7,19 ± 1,41 ^b	0,008
Moquillo	75,31 ± 41,06 ^b	20,34 ± 4,29 ^{bc}	0,012
Parvovirus	86,48 ± 49,45 ^{bc}	20,98 ± 5,13 ^{bc}	0,012
no infecciosa	23,88 ± 6,29 ^b	9,38 ± 2,51 ^b	0,008
Control saludable	3,76 ± 0,25 ^a	1,89 ± 0,10 ^a	0,008

NS: no significativo. Letras diferentes (a, b, c) en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0,05$)

La zonulina es una proteína que regula las uniones estrechas entre las células epiteliales intestinales y un aumento en su nivel indica una alteración de la permeabilidad intestinal [4]. Se ha informado que las proteínas asociadas a la zonulina aumentan la permeabilidad al modular reversiblemente las uniones estrechas en el epitelio del intestino delgado y que esta característica podría servir como un biomarcador no invasivo que refleja la actividad de la enfermedad [12].

También existen hallazgos que respaldan esta idea en estudios en humanos. Por ejemplo, Caviglia y col. [13] evaluaron los niveles séricos y fecales de zonulina en individuos con enfermedad inflamatoria intestinal; observaron que los niveles séricos de zonulina fueron significativamente más altos en pacientes con enfermedad de Crohn en comparación con individuos sanos (34,5 ng/mL frente a 8,6 ng/mL frente a 6,5-12,0 ng/mL, $P < 0,001$) [13].

Sin embargo, no se encontró correlación significativa entre los niveles séricos y fecales de zonulina ($R = 0,15$, $P = 0,394$). De igual manera, Vanuytsel y col. [14] informaron que los niveles de zonulina aumentaron con la respuesta de fase aguda; Malíčková y col. [15] informaron que los niveles séricos y fecales de zonulina fueron significativamente más altos en pacientes con enfermedad de Crohn, pero este aumento no se observó en individuos con colitis ulcerosa [14, 15].

Estudios Veterinarios sugieren que la zonulina podría desempeñar un papel similar. Dinesh y col. [16] observaron un aumento significativo de los niveles séricos de zonulina en perros con enteropatía crónica, lo que sugiere que la zonulina podría considerarse un posible biomarcador en las clínicas Veterinarias. [16].

De igual manera, el presente estudio identificó correlaciones significativas entre los niveles séricos y fecales de zonulina, particularmente en grupos con giardia ($P = 0,004$), coronavirus ($P < 0,001$), parvovirus ($P = 0,013$) y agentes no infecciosos ($P < 0,001$). Se sabe que la zonulina se asocia con una mayor permeabilidad intestinal y está regulada por procesos inflamatorios. En un estudio de Rossi y col. [17], se incluyeron los niveles séricos y fecales de zonulina entre diversos biomarcadores examinados para evaluar la gravedad de la enfermedad en perros con linfangiectasia intestinal [17].

Se informó que todos los marcadores, excepto la citrulina sérica, presentaban diferencias significativas entre individuos enfermos y sanos. Este hallazgo sugiere que el aumento de los niveles de zonulina podría ser especialmente pronunciado en enfermedades caracterizadas por inflamación sistémica y afectación transmural.

Además, los niveles significativamente elevados de zonulina observados en nuestro estudio en infecciones virales sugieren que la zonulina podría ser un biomarcador asociado no solo con enfermedades inflamatorias, sino también con el aumento de la permeabilidad intestinal provocado por la infección. Estudios en pacientes con COVID-19 también han reportado que los niveles de zonulina se asocian con la gravedad de la enfermedad y la mortalidad [18]. Asimismo, la observación de un aumento de zonulina con lipopolisacárido en estos pacientes sugiere que la inflamación se desencadena por la transición del intestino a la circulación sistémica [19].

Estos hallazgos sugieren que los aumentos de zonulina fecal en los grupos con infección viral de nuestro estudio también podrían ser significativos a nivel sistémico. De hecho, el impacto de la infección por SARS-CoV-2 en el epitelio intestinal se asoció con una mayor permeabilidad a través de la zonulina, lo que contribuyó a la exacerbación de las respuestas inflamatorias [18, 19].

De igual manera, un estudio en perros demostró niveles plasmáticos significativamente elevados de zonulina en infecciones por el virus del moquillo [20]. Estos hallazgos respaldan una tendencia general hacia el aumento de los niveles de zonulina durante las infecciones virales.

Por otro lado, la menor correlación entre la zonulina sérica y fecal en el grupo de *Giardia* sugiere que el efecto de las infecciones parasitarias sobre los niveles de zonulina podría ser más limitado. De acuerdo con la hipótesis propuesta por Fasano [21], la zonulina sérica podría reflejar principalmente la inflamación sistémica y los procesos de translocación, mientras que la zonulina fecal reflejaría la permeabilidad intestinal local.

CONCLUSION

Este estudio demuestra que las infecciones gastrointestinales virales pueden afectar la permeabilidad intestinal, y la zonulina es un posible biomarcador que puede aumentar tanto en niveles séricos como fecales. Sin embargo, dado que diferentes fuentes biológicas pueden estar involucradas en la zonulina sérica y fecal, se recomienda evaluar estos parámetros conjuntamente e interpretarlos en el contexto de la inflamación sistémica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Oficina de Traducción Ortaç por el apoyo lingüístico brindado durante la preparación de la versión en español del manuscrito. Todos los animales inscritos fueron sometidos al tratamiento con comprimidos Metabolique de Pet Clinique® (Antalya, Turquía) debido al bienestar animal.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Financiación

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional de la Universidad Adnan Menderes de Aydın con el número 64583101/2020/045. El presente estudio fue financiado por la Unidad de Financiación de la Investigación de la Universidad Aydın Adnan Menderes (ADU-BAP) con el proyecto n° VTF-21031.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

- [1] Candellone A, Cerquetella M, Girolami F, Badino P, Odore R. Acute diarrhea in dogs: Current management and potential role of dietary polyphenols supplementation. *Antioxidants*. [Internet]. 2020; 9(8):725. doi: <https://doi.org/g5sg37>
- [2] Hubbard K, Skelly B, McKelvie J, Wood J. Risk of vomiting and diarrhoea in dogs. *Vet. Rec.* [Internet]. 2007; 161(22):755–757. doi: <https://doi.org/d3f95s>
- [3] Lenox CE. Nutritional management for dogs and cats with gastrointestinal diseases. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.* [Internet]. 2021; 51(3):669–684. doi: <https://doi.org/rcrk>
- [4] Fasano A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* [Internet]. 2012; 1258(1):25–33. doi: <https://doi.org/f36c2p>
- [5] Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, Lampis R, Kryszak D, Carteni M, Generoso M, Iafusco D, Prisco F, Laghi F, Riegler G, Carratu R, Counts D, Fasano A. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*. [Internet]. 2006; 55(5):1443–1449. doi: <https://doi.org/b54jwn>
- [6] Fasano A. Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* [Internet]. 2000; 915(1):214–222. doi: <https://doi.org/fr6vj>
- [7] Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, Antalis TM, Vogel SN, Zhao A, Yang S, Arrietta MC, Meddings JB, Fasano A. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* [Internet]. 2009; 106(39):16799–16804. doi: <https://doi.org/dhz4qn>
- [8] El Asmar R, Panigrahi P, Bamford P, Berti I, Not T, Coppa GV, Catassi C, Fasano A. Host-dependent zonulin secretion causes impairment of the small intestinal barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*. [Internet]. 2002; 123(5):1607–1615. doi: <https://doi.org/d45fpm>
- [9] Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: The biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol. Rev.* [Internet]. 2011; 91(1):151–175. doi: <https://doi.org/d62qsb>
- [10] Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*. [Internet]. 2016; 4(4):e1251384. doi: <https://doi.org/rcrm>
- [11] Miranda-Ribera A, Ennamorati M, Serena G, Cetinbas M, Lan J, Sadreyev RI, Jain N, Fasano A, Fiorentino M. Exploiting the zonulin mouse model to establish the role of primary impaired gut barrier function on microbiota composition and immune profiles. *Front. Immunol.* [Internet]. 2019; 10:2233. doi: <https://doi.org/gk8btd>
- [12] Szymanska E, Wierzbicka A, Dadalski M, Kierkus J. Fecal zonulin as a noninvasive biomarker of intestinal permeability in pediatric patients with inflammatory bowel diseases—correlation with disease activity and fecal calprotectin. *J. Clin. Med.* [Internet]. 2021; 10(17):3905. doi: <https://doi.org/rcrp>

- [13] Caviglia GP, Dughera F, Ribaldone DG, Rosso C, Abate ML, Pellicano R, Smedile A, Saracco M, Astegiano M. Serum zonulin in patients with inflammatory bowel disease: A pilot study. *Minerva Med.* [Internet]. 2019; 110(2):95–100. doi: <https://doi.org/gh8tcd>
- [14] Vanuysel T, Vermeire S, Cleynen I. The role of haptoglobin and its related protein, zonulin, in inflammatory bowel disease. *Tissue Barriers.* [Internet]. 2013; 1(5):e27321. doi: <https://doi.org/rcrq>
- [15] Malíčková K, Francová I, Lukáš M, Kolář M, Králíková E, Bortlík M, Ďuricová D, Štěpánková L, Zvolská K, Pánková A, Zima T. Fecal zonulin is elevated in Crohn's disease and in cigarette smokers. *Pract. Lab. Med.* [Internet]. 2017; 9:39–44. doi: <https://doi.org/gb4wgj>
- [16] Dinesh N, Slovak JE, Kogan C, Kopper JJ. Preliminary evaluation of serum zonulin in canine chronic enteropathies. *J. Small Anim. Pract.* [Internet]. 2022; 63(9):679–685. doi: <https://doi.org/rcrs>
- [17] Rossi G, Gavazza A, Vincenzetti S, Mangiaterra S, Galosi L, Marchegiani A, Pengo G, Sagratini G, Ricciutelli M, Cerquetella M. Clinicopathological and fecal proteome evaluations in dogs with chronic diarrhea associated with lymphangiectasia. *Vet. Sci.* [Internet]. 2021; 8(10):242. doi: <https://doi.org/rcrt>
- [18] Giron LB, Dweep H, Yin X, Wang H, Damra M, Goldman AR, Gorman N, Palmer CS, Tang HY, Shaikh MW, Forsyth CB, Balk RA, Zilberstein NF, Liu Q, Kossenkov A, Keshavarzian A, Landay A, Abdel-Mohsen M. Plasma markers of disrupted gut permeability in severe COVID-19 patients. *Front. Immunol.* [Internet]. 2021; 12:686240. doi: <https://doi.org/gkgzg8>
- [19] Oliva A, Cammisotto V, Cangemi R, Ferro D, Miele MC, De Angelis M, Cancelli F, Pignatelli P, Venditti M, Pugliese F, Mastroianni CM, Violi F. Low-grade endotoxemia and thrombosis in COVID-19. *Clin. Transl. Gastroenterol.* [Internet]. 2021; 12(6):e00348. doi: <https://doi.org/gkfz9r>
- [20] Çöllü EM, Özalp T, Erdoğan S, Ural K, Erdoğan H. Investigation of zonulin levels in dogs infected with canine distemper virus. *Bozok. Vet. Sci.* [Internet]. 2024; 5(2):55–61. doi: <https://doi.org/rcrv>
- [21] Fasano A. Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: Living life on the edge of the wall. *Am. J. Pathol.* [Internet]. 2008; 173(5):1243–1252. doi: <https://doi.org/b5bwnr>