



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

1.	RESUMEN	3
2.	ABSTRACT	4
3.	INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	5
3.1	OBSTRUCCIÓN RECURRENTE DE LAS VÍAS AÉREAS	5
3.2	MICROBIOTA.....	13
4.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
5.	METODOLOGÍA (MARCO EMPÍRICO)	21
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
7.	CONCLUSIONES	25
8.	VALORACIÓN PERSONAL.....	26
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
10.	ANEXOS	31

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

- Figura 1. Espirales de Curschmann.
- Figura 2. Efectos inmunorreguladores de la microbiota intestinal.
- Figura 3. Efectos inmunorreguladores de los helmintos sobre el sistema inmune.
- Gráfica 1. Proporción de microorganismos (filos) en la microbiota digestiva de caballos sanos.
- Gráfica 2. Cronograma de toma de muestras.

ABREVIATURAS

- | | |
|--|--|
| - AGCC: ácidos grasos de cadena corta. | - ORVA: obstrucción recurrente de las vías aéreas. |
| - FCT: factores de crecimiento transformantes. | - RAO: recurrent airway obstruction. |
| - IFN- γ : interferón- γ . | - SNC: sistema nervioso central. |
| - Ig: inmunoglobulina. | - Th: T helper (células). |
| - IL: interleuquina. | - Treg: T reguladoras (células). |
| - Nf- κ B: factor nuclear kappa B. | - UFC: unidades formadoras de colonias. |

1. RESUMEN

Título: “DISEÑO EXPERIMENTAL BASADO EN EL ESTUDIO DE CABALLOS CON OBSTRUCCIÓN RECURRENTE DE LAS VÍAS AÉREAS (ORVA) Y SU RELACIÓN CON LA MICROBIOTA”

Resumen:

La obstrucción recurrente de las vías aéreas (ORVA) es una enfermedad de etiología multifactorial que puede llegar a ocasionar grandes pérdidas económicas por causar una disminución del rendimiento deportivo en los animales. Hay una gran cantidad de factores y alérgenos que pueden inducir la aparición de esta patología, causando la activación del sistema inmune y dando lugar a una reacción inflamatoria que ocasiona la presentación de los signos clínicos.

La activación del sistema inmune puede verse modificada o modulada por la microbiota digestiva, que es el conjunto de microorganismos que residen de manera habitual en el aparato digestivo y que tiene influencia en muchos de los sistemas de los seres vivos. En los últimos años se ha demostrado que tiene una gran importancia para el organismo, hasta tal punto que llega a considerarse “el órgano desconocido”.

Teniendo en cuenta la relación de ambos, ORVA y microbiota, con el sistema inmune, el objetivo de este trabajo es realizar un diseño experimental cuya aplicación pudiese permitir comprobar si existe un vínculo entre esta patología y los microorganismos digestivos, estableciendo a la vez marcadores diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

Palabras clave: obstrucción recurrente de las vías aéreas, ORVA, microbiota.

2. ABSTRACT

Title: “EXPERIMENTAL DESIGN BASED ON THE STUDY OF HORSES WITH RECURRENT AIRWAY OBSTRUCTION (RAO) AND ITS RELATIONSHIP WITH THE MICROBIOTA”

Abstract:

Recurrent airway obstruction (RAO) is a multifactorial aetiology disease that can cause great economic losses because of the decreased athletic performance. There are many factors and allergens that can induce the occurrence of this pathology, causing the activation of the immune system and leading to an inflammatory reaction that brings on the clinical signs.

The activation of the immune system can be modified or modulated by the digestive microbiota, which is the set of microorganisms that live in the digestive tract and has influence in many of the systems of living beings. In recent years it has shown that it has great importance for the organism, to the point that it comes to be considered “the unknown organ”.

Given the relationship of both, RAO and microbiota, with the immune system, the aim of this work is to develop an experimental design whose application would allow to check whether there is a link between this disease and digestive microorganisms, while establishing diagnosis and prognosis markers of the disease.

Keywords: recurrent airway obstruction, RAO, heaves, microbiota.

3. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

En la sociedad actual, en muchas ocasiones los caballos no se crían como meros animales de compañía, sino que lo que se busca de ellos es que sean máquinas con una capacidad atlética insuperable que permita a sus propietarios ganar grandes cantidades de dinero, bien a través de las competiciones o bien con la venta de dichos animales, su semen o su descendencia.

Si en estos animales se presenta una enfermedad como es la obstrucción recurrente de las vías aéreas, el rendimiento deportivo disminuye. Puesto que es una condición de carácter crónico, no se va a poder realizar un tratamiento curativo, pero sí se pueden llevar a cabo tratamientos paliativos que reduzcan o eviten la aparición de signos clínicos. Cuanto antes se detecte la enfermedad -o incluso la predisposición a padecerla-, antes se podrán tomar medidas, principalmente ambientales y de manejo, en un intento de retrasar o evitar la aparición de dichos signos clínicos.

3.1 OBSTRUCCIÓN RECURRENTE DE LAS VÍAS AÉREAS

La obstrucción recurrente de las vías aéreas (ORVA) es una patología caracterizada por inflamación de las vías aéreas, exceso de producción y acumulación de mucus, incremento del grosor de las paredes bronquiales y obstrucción reversible, debida a una reacción de hipersensibilidad (Morán et al., 2006). Estas alteraciones dan lugar a la presentación de varios signos clínicos, entre los que se encuentran tos seca, disnea e intolerancia al ejercicio, pudiendo llegar a observarse, si la situación se vuelve crónica, la “línea del esfuerzo”, que se debe a la hipertrofia de los músculos rectoabdominales por el esfuerzo respiratorio (Morán et al., 2006).

Etiología

Esta patología, cuya causa inicial es la domesticación del caballo, se produce por la hipersensibilidad que presentan algunos miembros de esta especie a los alérgenos ambientales que se concentran en espacios cerrados como los establos. Entre los alérgenos que inician el proceso inflamatorio se encuentran el polvo del ambiente, partículas del heno y la paja de la cama, diversos microorganismos (mohos, bacterias y sus endotoxinas, entre otros) y el propio material de construcción de dichos establos. Concretamente, los principales agentes desencadenantes son *Aspergillus fumigatus*, *Thermoactinomyces vulgaris* y *Faenia rectivirgula* (Ainsworth et al., 2003). Las esporas de estos hongos se localizan en el heno y la paja almacenados con unos niveles de humedad entre el 20-30%. Asimismo, es importante destacar a los ácaros *Tyrophagus putrescentiae*, *Cheyletus eruditus*, *Acarus farris* y *Rhizoglyphus sp* como agentes potencialmente alergénicos para los caballos. Su presencia está relacionada con el número de esporas de hongos en el heno, ya que se alimentan de las mismas (Morán et al., 2006).

La existencia de todas las partículas proinflamatorias citadas anteriormente en los establos hace fundamental tener en consideración la ventilación de los mismos como un factor a tener en cuenta en el desarrollo de la enfermedad (Morán et al., 2006).

La sensibilidad a la inhalación de alérgenos, especialmente las esporas de los hongos, se ve incrementada en animales que han sufrido una infección viral previa, ya que los virus producen una alteración en el sistema mucociliar de las vías respiratorias, lo que favorece la penetración de dichas esporas en el sistema respiratorio (Morán et al., 2006).

Además de los factores ambientales, la enfermedad cuenta con una base genética que se pone de manifiesto al verse incrementada la prevalencia en familias en las que se ha presentado la patología anteriormente (Morán et al., 2006). Robinson (2001) demostró que hay genes inductores de inflamación que participan en los mecanismos de hipersensibilidad que tienen lugar tras la inhalación de antígenos. A su vez, Gerber (2009) observó la presencia de genes mayores para la ORVA, con herencia autosómica dominante en una de las familias estudiadas y autosómica recesiva en la otra. Además, reveló que la respuesta en IgE también se ve influenciada por factores genéticos y que la misma difiere entre familias con alta prevalencia de esta enfermedad.

Por último, hay que destacar que se han realizado estudios que demuestran que la prevalencia de ORVA se ve incrementada en relación a un descenso de carga parasitaria (huevos de strongílidos) y un aumento del riesgo de alergia cutánea (Pirie, 2013).

Epidemiología

En torno a un 12% de los caballos adultos presenta un cierto grado de inflamación de las vías aéreas inferiores por exposición a alérgenos, exacerbándose el proceso en invierno y primavera. La edad media a de presentación son los 9-12 años y afecta por igual a ambos sexos (House, 2009).

Aunque no se observa una predisposición por géneros, sí se aprecia -como se ha explicado anteriormente- que hay razas y familias con una mayor incidencia, lo que apoya la idea de que existe un componente hereditario en la presentación de la enfermedad (Morán et al., 2011). En cuanto a las razas, se ha visto que los caballos pura sangre ingleses tienen predisposición a padecer la ORVA (Pirie, 2013). Respecto a las familias, Scharrenberg (2010) sugiere que el riesgo de adquirir la enfermedad es mayor en descendientes de caballos afectados por la misma, y House (2009) indica que la incidencia en caballos con padres sanos es del 10%, frente al 44% en caballos con ambos progenitores afectados.

Como factores de riesgo que favorecen la presentación de la enfermedad cabe citar el envejecimiento, la exposición a paja o heno desde que los animales son jóvenes, las infecciones respiratorias y el ambiente urbano (Pirie, 2013).

Patogenia

Pese a la elevada incidencia de la enfermedad, su patogénesis es tan compleja que aún no se comprende en su totalidad.

La ORVA es una respuesta de hipersensibilidad por la que se produce un proceso inflamatorio con activación de diversos tipos celulares (neutrófilos, mastocitos, macrófagos) que liberan mediadores que ocasionan cambios fisiopatológicos en las vías aéreas (Godoy et al., 2014; Morán et al., 2006).

Se considera que en esta patología se producen dos tipos de reacción de hipersensibilidad; el tipo I, de reacción inmediata mediada por la inmunoglobulina E (IgE), y el tipo III, caracterizado por la formación de inmunocomplejos. La reacción de hipersensibilidad tipo III conlleva la activación de la cascada del complemento, con síntesis de los péptidos quimiotácticos C5a y C3a que dan lugar a la acumulación de neutrófilos en el árbol bronquial (Godoy et al., 2014; Morán et al., 2006).

En el momento en el que los alérgenos se introducen en las vías respiratorias, estimulan a las células B gracias a las células presentadoras de antígeno, y estas células B sintetizan IgE específicas de antígeno con intervención de linfocitos T helper (Th). Las IgE se unen a los mastocitos y basófilos mediante receptores presentes en sus membranas de forma que, cuando los antígenos se ponen en contacto nuevamente con los mastocitos sensibilizados, provocan su degranulación, liberando mediadores que causan los signos y procesos típicos de una reacción de hipersensibilidad tipo I¹. La vida media sérica de la IgE es de 2,5 días, pero los mastocitos quedan sensibilizados durante varias semanas. Aunque el papel de la IgE sigue siendo controvertido por los diferentes resultados obtenidos en numerosos estudios, se ha visto que los caballos con ORVA cuentan con un número significativamente mayor de mastocitos quimasa positivos en las paredes bronquiales que los caballos control (Pirie, 2013).

La modulación de la respuesta inmune se debe a las células T auxiliares o T helper, de las cuales existen dos subpoblaciones distintas: las células Th1 y las células Th2. Las células Th1 producen interleuquina-2 (IL-2) e interferón- γ (IFN- γ) en respuesta a la estimulación por la IL-12, y una de sus principales funciones es actuar como células auxiliares en la respuesta inmune celular, como la que se produce en las reacciones de hipersensibilidad retardada, en las que es fundamental la activación de los macrófagos (Morán et al., 2006). Las células Th2 secretan las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que favorecen la proliferación de las células B y la liberación de inmunoglobulinas, entre ellas la IgE (Godoy et al., 2014). Las citoquinas tienen funciones proinflamatorias, ya que intervienen en la quimiotaxis, modulan la respuesta inmune, inducen la secreción de otras citoquinas y pueden causar apoptosis. Las citoquinas involucradas en la inflamación alérgica pulmonar son las que producen las células Th2 y, más

¹ Edema, broncoespasmo, vasodilatación o anafilaxia (Godoy et al., 2014).

concretamente, en el caso de ORVA es la IL-8 (Morán et al., 2006). La subpoblación de células Th2 está vinculada a la inmunidad humoral y a las reacciones de hipersensibilidad tipo I (Morán et al., 2006). Se ha intentado categorizar el perfil de citoquinas en predominantemente Th1 o Th2, pero no se ha llegado a una conclusión. Algunos estudios han demostrado una predominancia de Th2 con un incremento de IL-4 e IL-5, otros han observado un incremento de IFN- γ que equivaldría a una respuesta predominantemente Th1, y otros estudios han llegado a la conclusión de que la respuesta que se produce es mixta, caracterizada con un incremento de IL-4, IL-13 e IFN- γ (Pirie, 2013).

En lo que respecta a la formación de inmunocomplejos, éstos pueden desencadenar diversos procesos, entre ellos la interacción con el sistema complemento, que conlleva la liberación de factores C3a y C5a, con propiedades anafilotóxicas y quimiotácticas, dando lugar a la liberación de aminas vasoactivas y basófilos, el incremento de la permeabilidad vascular y la atracción de neutrófilos. Estos neutrófilos atraídos liberan enzimas lisosómicos y radicales libres que causan inflamación y destrucción tisular. Por otra parte, pueden producirse interacciones con las plaquetas, provocando la agregación de las mismas y la formación de microtrombos.

Algunas remodelaciones tisulares asociadas a la inflamación crónica se deben a una señalización anómala de los factores de crecimiento transformantes (FCT). El incremento del FCT-beta 1 provoca una fuerte quimiotaxis de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos, produciendo fibrosis alveolar. Asimismo, Morán y Folch (2011) sugieren que el incremento del grosor de la musculatura lisa podría deberse a la hiperplasia de sus células. Junto a esta hiperplasia muscular se puede encontrar un engrosamiento del epitelio bronquiolar y la submucosa, debido a la pérdida de células ciliadas y a su sustitución por células indiferenciadas que dan lugar a una hiperplasia epitelial. Esto, unido al exceso de mucus y a la infiltración peribronquiolar de linfocitos origina la aparición de enfisemas (Pirie, 2013).

Signos clínicos

Las manifestaciones más frecuentes que presentan los caballos afectados de ORVA son la tos, presente en un 85% de los animales (Morán et al., 2006), la reducción del rendimiento deportivo -en ocasiones es el único signo que se presenta- y la disnea espiratoria debida a la broncoconstricción que se produce por la liberación de histamina. Estos signos son visibles incluso en reposo.

Para compensar el deficiente intercambio gaseoso, se crean capilares desde las arterias bronquiales, especialmente en el lóbulo diafragmático, pero la fragilidad de los mismos da lugar a su rotura por el incremento de presión durante el ejercicio, produciéndose de este modo hemorragias pulmonares inducidas por el esfuerzo (Morán et al., 2006).

Por otro lado, la descarga nasal no es tan frecuente como cabría esperar teniendo en cuenta la hipersecreción mucosa, ya que gran parte de la secreción es deglutida.

Adicionalmente, la obstrucción de las vías aéreas hace que se altere el patrón respiratorio. En casos moderados puede observarse un incremento del aleteo nasal y del componente abdominal en la espiración. Además, en casos severos, el esfuerzo que se produce en la respiración puede incrementar las necesidades de oxígeno y energía, dando lugar en casos crónicos a caquexia (Pirie, 2013).

Con respecto a la auscultación torácica pueden escucharse crepitaciones al inicio de la inspiración por apertura de las vías aéreas que se colapsan durante la espiración, y sibilancias al final de la espiración debidas al estrechamiento de las vías aéreas.

Los signos remiten cuando se evita la fuente de la inflamación (alérgenos), aunque se ha visto que, caballos mantenidos en un ambiente sin polvo, aunque no presenten signos, tienen una inflamación persistente de las vías aéreas (Pirie, 2013).

Diagnóstico diferencial

Enfermedad pulmonar obstructiva asociada al pasto de verano

También conocida como “obstrucción recurrente de vías aéreas asociada al pasto de verano”, esta enfermedad se produce por una reacción de hipersensibilidad a los alérgenos de los pastos, el polen y los mohos, y se manifiesta en caballos con 5 años o más, durante el verano.

Los animales presentan tos seca, producción de mucus, inflamación y obstrucción de vías aéreas e intolerancia al ejercicio, aun en reposo. Son signos que podrían asociarse a la ORVA.

Como se puede observar, prácticamente parece que sean la misma enfermedad, pero con circunstancias de presentación diferentes.

Enfermedad inflamatoria de vías aéreas (EIVA) (Couëtil et al., 2016)

Esta patología se puede presentar en caballos de todas las edades y, a diferencia de lo que ocurre con la ORVA y con la ORVA asociada al pasto de verano, los signos clínicos que manifiestan los animales afectados son leves y no se presentan en reposo.

La EIVA y la ORVA se engloban dentro de las enfermedades inflamatorias crónicas de las vías aéreas del caballo. También se pueden clasificar como diferentes grados de síndrome de asma equina, siendo la EIVA la forma leve-moderada y la ORVA la forma severa.

En el diagnóstico de esta enfermedad, la citología del fluido obtenido por lavado broncoalveolar muestra un escaso incremento de neutrófilos, eosinófilos y/o células metacromáticas, mientras que la citología de la ORVA permite observar un gran incremento de neutrófilos. Otra de las diferencias con la ORVA es la posibilidad de mejora espontánea, en ocasiones incluso sin tratamiento, y el bajo riesgo de recurrencia.

Diagnóstico

El diagnóstico de la ORVA suele ser sencillo, siendo suficiente la presencia de signos clínicos unida a la historia de exposición a alérgenos (alimentación con heno, estabulación, mantenimiento del animal en ambientes cargados de polvo). Pese a esta facilidad para reconocer la enfermedad, el uso de métodos auxiliares permite reforzar el diagnóstico y, por tanto, es recomendable.

Lavado broncoalveolar

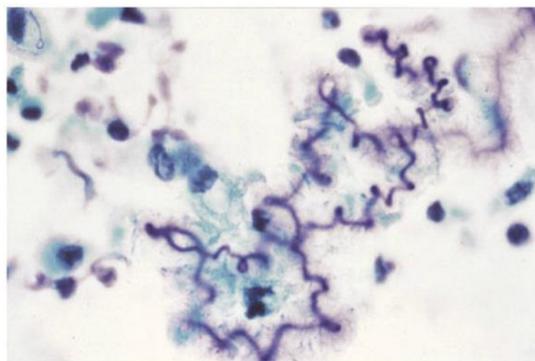
El examen citológico del fluido procedente de las vías respiratorias bajas que se obtiene por esta técnica es el principal medio de confirmación de la inflamación de las vías respiratorias inferiores asociada a la ORVA. De hecho, los recuentos celulares que se obtienen a partir del lavado broncoalveolar están correlacionados con la obstrucción y capacidad de respuesta de las vías aéreas. Recuentos de neutrófilos superiores normalmente al 25% son uno de los principales elementos que caracterizan esta enfermedad (Pirie, 2013).

Examen endoscópico

La endoscopia permite apreciar el incremento de exudado, que suele ser mucopurulento y se extiende desde la tráquea hasta ambos pulmones. Tal como indica Pirie (2013), se ha visto que este hallazgo está correlacionado con la presencia de inflamación de las vías respiratorias inferiores, por lo que se emplean puntuaciones de acumulación de mucus para evaluar los casos de ORVA. Puesto que dicha acumulación se produce también en otras patologías como la enfermedad inflamatoria de las vías aéreas, el mismo autor apunta que no debe considerarse de forma aislada como un indicador de ORVA.

La realización de citologías a partir de muestras obtenidas por endoscopia permite observar que las células predominantes en estas secreciones son neutrófilos no degenerados. No suelen encontrarse bacterias, mientras que sí se pueden apreciar partículas de polen, hifas fúngicas y unos tapones mucosos denominados “espirales de Curschmann” (Ainsworth, 2011).

Figura 1. Espirales de Curschmann.



Fuente: Vezza y Montgomery. *The New England Journal of Medicine* (1998); vol. 339, pág. 1043.

Evaluación de la funcionalidad pulmonar

El método más usado tradicionalmente para evaluar el grado de obstrucción de las vías respiratorias es la medición de los cambios en la presión transpleural, tanto de forma aislada como en combinación con la medición neumotacográfica del flujo de aire. Permite calcular varios índices de funcionalidad pulmonar, entre los que se encuentran la resistencia pulmonar y el esfuerzo respiratorio, que se ven incrementados, y la distensibilidad pulmonar, que se reduce. Debido a la escasa sensibilidad de esta técnica, en los últimos años se ha pasado a emplear otro método, la oscilometría de impulso, cuya sensibilidad es notablemente mayor (Pirie, 2013).

El test de funcionalidad pulmonar incluye la evaluación de la reactividad pulmonar mediante la inhalación de dosis crecientes de histamina o metacolina. En caballos afectados, dicha reactividad se incrementa, en ocasiones incluso en los periodos de remisión de los signos clínicos (Pirie, 2013).

Otras pruebas de imagen

A pesar de que pueden aportar información, estas pruebas no suelen realizarse en casos de campo. En caballos con ORVA, la ecografía torácica muestra un incremento del campo pulmonar con pequeñas áreas hipoeoicas en la superficie del pulmón, pero no se aprecia como tal la inflamación de las vías aéreas. Las radiografías, a su vez, son útiles para confirmar el diagnóstico, reflejando un patrón broncointersticial con presencia de bronquiectasias y permitiendo descartar otras alteraciones que podrían dar lugar a confusión (Ainsworth, 2011).

Test intradérmico

Puesto que la ORVA es una patología mediada por IgE, al inocular a un caballo un antígeno para el que previamente se ha sensibilizado debería observarse una reacción. Este es el fundamento que hace que algunos veterinarios apoyen este test como método de diagnóstico de la ORVA.

Sin embargo, las respuestas que produce la administración de antígenos no son las que cabría esperar. Hay estudios en los que caballos sin signos tienen respuestas positivas, mientras que, en caballos afectados, en algunas ocasiones no hay respuesta y, en otras, la respuesta de los caballos afectados sobrepasa la de los controles. En resumen, los test intradérmicos no siempre permiten identificar caballos afectados o, al menos, la partícula que causa la inflamación (Ainsworth, 2011).

Test de las precipitinas

Al realizar este test, muchas veces se observa que tanto los animales sanos como los afectados por esta patología presentan una respuesta positiva frente a antígenos fúngicos y actinomicetos termofílicos, de manera que podría considerarse esta prueba como un reflejo del nivel de exposición a dichos antígenos (Ainsworth, 2011).

Hemograma y perfil bioquímico

Estas pruebas suelen dar resultados dentro de la normalidad, lo que sugiere que la respuesta inflamatoria que se produce en esta enfermedad está limitada a los pulmones (Ainsworth, 2011).

Tratamiento

Manejo del ambiente

Para tratar la ORVA, lo más importante es evitar que el animal afectado permanezca en contacto con los alérgenos que desencadenan el proceso, teniendo en cuenta que las modificaciones ambientales que se realicen deben mantenerse de por vida, ya que la enfermedad es crónica.

En el caso de caballos afectados de forma leve a moderada puede ser suficiente con el manejo ambiental para tratar la patología, sin necesidad de recurrir a terapia farmacológica (House, 2009).

Cuando la ORVA se asocia a la estabulación del animal, éste debe ser trasladado a una zona de pastoreo, y viceversa. Si el caballo se mantiene en estabulación, el ambiente debe estar limpio y bien ventilado. Hay que evitar realizar tareas como barrer cuando un animal afectado de ORVA se encuentra en el establo, ya que el polvo del ambiente se moviliza y puede repercutir en la salud de dicho animal.

En lo que respecta a la cama, es fundamental evitar materiales como la paja, pudiendo ser sustituidos por papel picado, viruta de madera o cartón triturado.

Para alimentar a los caballos con ORVA, si la afección es moderada se puede mojar el heno en agua, pero, en casos severos, esto puede exacerbar los signos respiratorios. En estos casos se puede eliminar el heno de la dieta, pasando a dar una alimentación en formato de pellets (House, 2009).

Hay que tener en cuenta que estos cambios deberían realizarse en todas las cuadras que compartan el mismo ambiente para que se produzca el efecto deseado.

Terapia farmacológica

El principal objetivo del tratamiento médico es combatir la inflamación, ya que de ella derivan las manifestaciones de la enfermedad (Pirie, 2013). Para lograrlo, los fármacos que se emplean son los corticosteroides. La prednisolona y la dexametasona, administradas tanto por vía oral como parenteral, parecen ser efectivas, especialmente en combinación con una mejora de las condiciones ambientales.

En los últimos años se ha observado que la administración de corticosteroides inhalados (dipropionato de beclometasona y propionato de fluticasona) produce un fuerte efecto antiinflamatorio a nivel de las vías aéreas y se reducen los efectos secundarios sistémicos (House, 2009; Pirie, 2013).

La administración de broncodilatadores junto a los corticoides está indicada tanto como tratamiento de rescate como para favorecer la penetración de otros fármacos inhalados. En casos agudos y severos de obstrucción de las vías aéreas se recomienda el uso de albuterol, de acción rápida, mientras que en casos moderados se pueden emplear otros fármacos de acción prolongada como el clenbuterol (House, 2009) que, junto a su acción broncodilatadora, tiene efecto antiinflamatorio.

Otra familia de fármacos que puede ser empleada por su acción broncodilatadora es la de los anticolinérgicos como el bromuro de N-butilescopolamina y el bromuro de ipratropio, ya que el tono del músculo liso bronquial se ve muy influenciado por la inervación parasimpática (Pirie, 2013).

A pesar de todas estas opciones de tratamiento para la ORVA, la posibilidad de llevar a cabo un diagnóstico y pronóstico más eficaz de la enfermedad favorecería finalmente un tratamiento también más efectivo y a una edad más temprana. Dado que la ORVA es una enfermedad en la que la inflamación juega un papel fundamental, nuestra hipótesis se basa en estudiar la microbiota en los animales afectados, puesto que la misma se encuentra estrechamente relacionada con el sistema inmune. La caracterización de esta relación sistema inmune-microbiota en animales que padecen ORVA puede conducir a la identificación de nuevos marcadores moleculares que permitan un diagnóstico y pronóstico tempranos de la enfermedad. A continuación, se detalla una breve revisión sobre la microbiota y su importancia en la especie equina.

3.2 MICROBIOTA

Qué es la microbiota y qué especies la conforman en el caballo

La microbiota es el conjunto de poblaciones microbianas que habitan los diferentes ecosistemas del cuerpo, estableciendo una relación de simbiosis con los mismos. En el caso de ecosistema digestivo, la microbiota residente es una de las más complejas, densas y dinámicas del planeta. El estado de salud de cualquier animal depende del funcionamiento adecuado del intestino y la microbiota, que es muy sensible a los cambios (Costa et al., 2012). Como describen McLoughlin y Mills (2011), se ha sugerido que una microbiota sana existe cuando hay un balance entre simbiosites, microorganismos comensales y patobiontes². Las alteraciones en este balance dan lugar a una disbiosis, que está implicada en muchas patologías³ y puede llegar a provocar la muerte. Tal es su importancia que en ocasiones se le denomina “el órgano olvidado” y, en el caso de la especie humana, se ha sugerido que el ambiente microbiano es

² Microorganismos que no causan enfermedad bajo condiciones normales (equilibrio entre poblaciones microbianas) pero que, en un momento dado (disbiosis), pueden causarla.

³ En la especie humana, se ha visto que la disbiosis puede dar lugar a multitud de enfermedades, desde intestinales como el cáncer colorrectal a sistémicas como la diabetes, incluyendo enfermedades neurológicas como el Alzheimer o la esclerosis múltiple (Ghaisas et al., 2015).

una composición de los genes del genoma humano combinados con los de los microorganismos intestinales, a los que se llama “microbioma” (McLoughlin et al., 2011). Esta sugerencia podría extrapolarse al resto de especies.

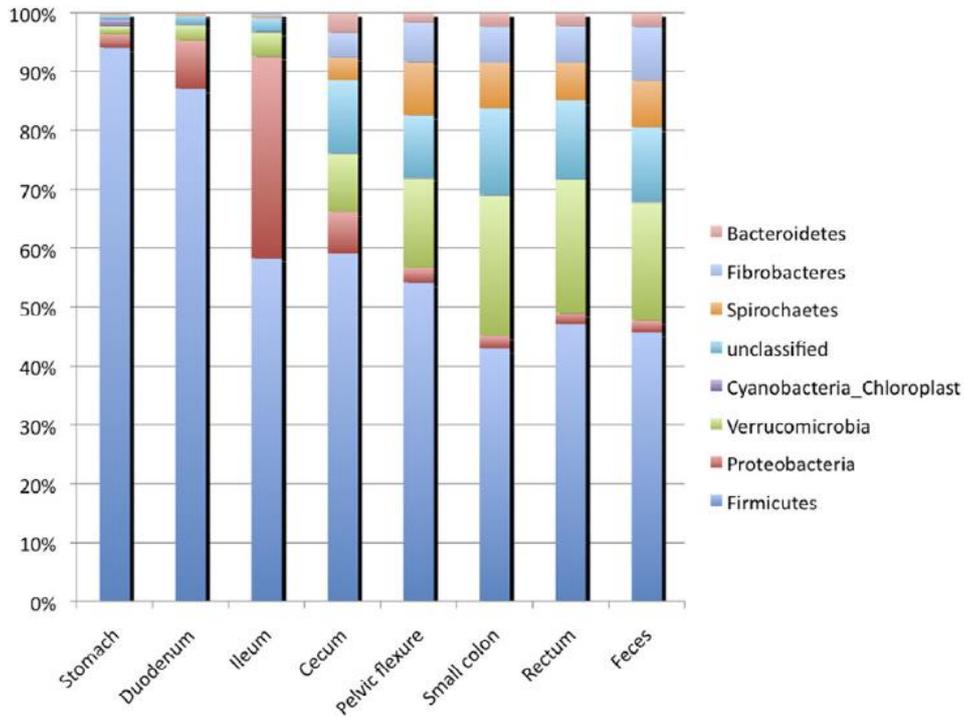
Puesto que muchos de los microorganismos del tracto digestivo no son cultivables (*Clostridium sordellii*, por ejemplo), se han adaptado métodos moleculares para estudiar la composición de la microbiota intestinal basados en PCR para el gen que codifica el rRNA 16S, presente en todos los procariotas (Schoster et al., 2013).

Los microorganismos que habitan las distintas partes del aparato digestivo varían. Lo que está claro es que la diversidad de especies es indicadora de una microbiota intestinal sana, aunque hay unas especies más importantes que otras en el mantenimiento de la homeostasis. La densidad tampoco es constante a lo largo del aparato digestivo. El estómago es el lugar donde se encuentra una menor concentración de unidades formadoras de colonias⁴ (UFC), mientras que el intestino grueso es el que más microorganismos alberga. Por otra parte, el ácido gástrico y las secreciones biliares y pancreáticas, junto con el rápido tránsito, podrían dificultar la proliferación de UFC en el intestino delgado (Øyri et al., 2015). Sin embargo, Schoster et al. (2013) muestran que el bicarbonato y la bilis neutralizan el ácido clorhídrico favoreciendo la proliferación de bacterias ácido-tolerantes.

En los caballos no hay una gran variabilidad intraespecífica en lo que respecta a la microbiota, al menos a nivel de filo. De forma general, en caballos sanos, el filo más representado es el de Firmicutes, seguido de Bacteroidetes. La gran abundancia de Firmicutes puede deberse a que son bacterias fibrolíticas, y el intestino grueso, que es el que más microorganismos alberga, está diseñado para fermentar la fibra (Costa, 2012). Las familias predominantes pertenecen al orden Clostridiales y son *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* (Rodríguez et al., 2015). Tal como expone Costa (2012), hay una gran cantidad y diversidad de clostridios en los animales sanos, por lo que el tratamiento con metronidazol en animales con colitis clostridial o idiopática podría llegar a ser perjudicial, alterando aún más la microbiota intestinal ya perturbada.

⁴ Bacterias con capacidad de multiplicarse en un medio dando lugar a colonias.

Gráfica 1. Proporción de microorganismos (filos) en la microbiota digestiva de caballos sanos.



Fuente: Costa et al. (2015). Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *The Veterinary Journal*, 205, 74-78; pág. 77, fig. 2.

De un modo más detallado, en la cavidad oral se puede encontrar *Staphylococcus* spp. como microorganismo predominante, seguido de *Streptococcus* spp (Santos et al, 2014). En el esófago, por otra parte, los microorganismos que se pueden identificar son *Actinobacillus equuli*, *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp. y estreptococos. Algunos de ellos son anaerobios facultativos⁵ y otros anaerobios estrictos (Dicks et al., 2013). Las bacterias más abundantes en el estómago son las del género *Lactobacillus* (*L. agilis*, *L. crispatus*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* y otros), seguidas de *Streptococcus* spp., con una concentración de 10^8 - 10^9 UFC/ml en la zona del fundus (Dicks et al., 2013). En intestino delgado, la concentración es de 10^6 - 10^7 UFC/ml, teniendo actividad proteolítica la mayoría de las bacterias, aunque en otros estudios se han hallado concentraciones superiores de anaerobios (10^6 - 10^9 UFC/ml), especialmente estreptococos. En menores concentraciones se han aislado *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* spp. y *Candida* (Dicks et al., 2013).

Por otro lado, el ciego contiene 10^9 bacterias por gramo de ingesta, entre las que se encuentran especies proteolíticas, amilolíticas, celulolíticas, glucolíticas, hemicelulolíticas y fermentadoras de

⁵ Microorganismos con la capacidad de desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

lactato, con predominancia de bacterias proteolíticas⁶ como *Streptococcus lutetiensis*, *Streptococcus equinus* y *Bacteroides* spp. Las bacterias utilizadoras de lactato, con concentraciones entre 10^5 y 10^6 UFC/ml sumando ciego y colon, son *Megasphaera* spp. y *Veillonella* spp. A su vez, las celulolíticas más representadas son *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus*. Cabe decir que la proporción de bacterias celulolíticas respecto al total de anaerobias es mayor en ciego que en el resto de intestino grueso⁷ (Santos et al., 2010). También se han aislado anaerobios fúngicos en concentraciones de 10^1 - 10^4 zoosporas/ml, principalmente *Trichosporon cutaneum* y *Cryptococcus neoformans*. Este último, aun siendo patógeno, se ha encontrado en animales sanos, por lo que se cree que el caballo supone una forma de transmisión del mismo (Dicks et al., 2013).

En colon se alcanzan concentraciones de 10^5 - 10^8 bacterias viables por ml. Algunas de ellas son *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Campylobacter lanienae*, *Clostridium barati*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Streptococcus lutetiensis*. Además, se pueden encontrar bacterias acidolácticas del género *Lactobacillus* (Dicks et al., 2013).

Finalmente, las bacterias aisladas en recto son *Enterococcus*, *Rhodococcus equi* y *Helicobacter equorum* (Dicks et al., 2013).

Desarrollo de la microbiota y factores que afectan a la misma

La composición de la microbiota intestinal está muy influenciada por el hospedador y por los factores ambientales de los primeros meses de vida (McLoughlin et al., 2011). La genética también juega un papel importante, pero es el entorno el que tiene mayor relevancia (Bendtsen et al., 2015).

El feto es estéril hasta el parto, momento en el cual se coloniza por microorganismos. Entre otros factores, el modo de nacimiento afecta a la microbiota, de forma que los nacidos por cesárea presentan durante la lactancia menor densidad de bacterias intestinales y menos especies en comparación con los nacidos a través del canal del parto. Estudios realizados en ratones muestran que estas diferencias en la microbiota no se aprecian cuando los animales llegan a la edad adulta, pero sí se ha observado que los nacidos por cesárea tienen durante la madurez una menor población de células dendríticas tolerogénicas y células T reguladoras (Treg), así como una menor expresión de IL10 en los linfonodos mesentéricos y el bazo (Bendtsen et al., 2015).

En humanos se ha visto que en piel, boca y meconio de niños nacidos a través del canal del parto se pueden aislar los mismos microorganismos de la vagina y las heces de la madre (Øyri et al.,

⁶ Pese a ser las bacterias predominantes en el intestino grueso, sólo un 20% son proteolíticas, ya que la digestión de las proteínas tiene lugar principalmente en el intestino delgado (Dicks et al., 2013).

⁷ 43×10^6 UFC/ml de bacterias celulolíticas viables en ciego y 7×10^6 UFC/ml en colon terminal.

2015). La colonización durante el parto se inicia con bifidobacterias, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, proteobacterias y actinobacterias. En caso de cesárea, se incrementan *E. coli* y *Clostridium*, especialmente *Clostridium difficile*, y se reducen *Bacteroides* y bifidobacterias. También se pueden apreciar diferencias en la microbiota en función del modo de alimentación del lactante. Una vez se pasa a alimentación sólida, proliferan microorganismos asociados al uso de carbohidratos, proteínas y grasas, así como a la síntesis de vitaminas. Un claro ejemplo lo encontramos en Firmicutes, sintetizador de butirato, que incrementa su número en el colon. Este cambio es necesario, ya que los ácidos grasos de cadena corta son la principal fuente de energía de las células epiteliales del colon (Ghaisas et al., 2015).

En adultos, algunos de los factores que afectan a la microbiota son la dieta, el uso de antibióticos y las infecciones. Muchos estudios han demostrado que un cambio en la dieta supone un cambio en la microbiota. Si se proporciona a los caballos una dieta rica en almidón, parte del mismo pasa a intestino grueso, se incrementan las bacterias anaeróbicas, especialmente *Lactobacillus* spp., y se elevan las concentraciones de ácido láctico y ácidos grasos volátiles. La alteración en la proporción de propionato y acetato da lugar a un cambio en las bacterias celulolíticas y protozoos, provocando una alteración en la actividad fibrolítica de los microorganismos. Para mantener una microbiota intestinal balanceada, especialmente en situaciones de estrés, se ha visto que se pueden proporcionar fructooligosacáridos de cadena corta (Dicks et al., 2013).

Respecto a los antibióticos, además del problema que se presenta de las resistencias, hay que tener en cuenta las disbiosis que originan, reduciendo la fermentación de hidratos de carbono y provocando un incremento excesivo de oportunistas patógenos. Por otro lado, algunas de las bacterias que causan infecciones alteran la composición microbiana por la respuesta inflamatoria que producen.

Efectos de la microbiota en el organismo

Inicialmente se pensaba que la única función de los microorganismos intestinales era la de controlar la población de bacterias patógenas. Ahora se sabe que la relación establecida entre el hospedador y la microbiota es de simbiosis, de forma que ambos se ven beneficiados con la presencia del otro, y que son muchas las funciones de estos microorganismos.

La compleja microbiota intestinal del caballo influye en un gran número de procesos, como la digestión de alimentos y la absorción de nutrientes, la síntesis de metabolitos esenciales y la protección frente a patógenos, entre otros (Schoster et al., 2013). La resistencia a la colonización por agentes patógenos se debe a la competencia por territorio y alimento con los microorganismos comensales y a la producción por parte de los mismos de componentes que pueden dañar a los microorganismos invasores (bacteriocinas, ácidos grasos de cadena corta...) (Øyri et al., 2015).

Esta microbiota contribuye, además, en el mantenimiento de la arquitectura del aparato digestivo degradando glicoproteínas producidas por el epitelio y previniendo de esta forma su acumulación, además de promover la diferenciación de dicho epitelio. Øyri et al. (2015) indican en uno de sus artículos más recientes que la microbiota podría estar relacionada con el desarrollo cerebral y la señalización del sistema nervioso central (SNC). De igual forma, promueve el desarrollo del sistema inmune intestinal favoreciendo la maduración del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), con la formación de centros germinales que contienen células B secretoras de inmunoglobulinas A (McLoughlin et al., 2011), y contribuye en el establecimiento de la inmunotolerancia.

Uno de los productos generados por los microorganismos digestivos son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que alcanzan en colon concentraciones de 150 milimoles y afectan a muchos de los procesos llevados a cabo por el organismo. Las enzimas implicadas en su síntesis varían en función de las especies bacterianas (Kim et al., 2014). En cuanto a las funciones, el butirato, por ejemplo, tiene una acción preventiva frente al cáncer de colon, pudiendo inducir la apoptosis de los colonocitos con división rápida. Además, incrementa las propiedades antioxidantes de la glutatión-S-transferasa. También se ha visto que estos AGCC, especialmente el ácido isovalérico, influyen en los neurotransmisores, de forma que, en humanos, un incremento en los niveles de este ácido puede alterar la liberación de neurotransmisores en el SNC, produciendo depresión (Ghaisas et al., 2015).

La microbiota y el sistema inmune

La microbiota proporciona una gran cantidad de antígenos que deben ser ignorados o tolerados para mantener el estado de salud. Esto depende de la inmunotolerancia, que se define como la capacidad del organismo de distinguir antígenos inocuos y evitar la activación de una respuesta inmune hacia ellos. La microbiota se localiza en lugares en los que no produce respuesta inmune y, además, es capaz de inducir la inmunotolerancia de forma activa mediante interacciones con el sistema inmune innato o modulación del sistema inmune adaptativo, siendo este último el que interviene en el reconocimiento de antígenos. La inmunotolerancia sistémica, que actualmente se sabe que depende de los mecanismos que regulan la tolerancia a la microbiota, es fundamental en la protección frente a enfermedades autoinmunes y alérgicas (McLoughlin et al., 2011) (Anexo I).

Muchos constituyentes del sistema inmune innato están asociados con la microbiota intestinal. Estos microorganismos modulan el desarrollo de las células presentadoras de antígeno y las células dendríticas, entre otras. Asimismo, son capaces de regular la respuesta inflamatoria, tanto incrementándola como disminuyéndola (Øyri et al., 2015). Tal como hacen con el sistema inmune innato, estos microorganismos interactúan con el sistema inmune adaptativo, influyendo en la diferenciación de las células Treg del intestino, a través de la activación de células dendríticas tolerogénicas. La diferenciación de estas células tiene especial importancia en el mantenimiento de la

tolerancia inmune. Si no se consigue y mantiene una adecuada inmunotolerancia, se incrementa el riesgo de desarrollo de enfermedades alérgicas, inflamatorias y autoinmunes (McLoughlin et al., 2011).

Hua y colaboradores (2015) describen, en la especie humana, que las diferencias en la microbiota intestinal contribuyen al riesgo de alergias y que la riqueza en microorganismos fecales está negativamente relacionada con estas patologías. Así, niños con mayor concentración de *Clostridium difficile* y *Escherichia coli* en heces presentan mayor riesgo de desarrollar alergias en el futuro. En uno de los estudios que describen se mostró que una baja diversidad microbiana fecal un mes después del nacimiento era suficiente para predecir la presentación de eccema y asma cuando los niños alcanzaban los dos años, pero no rinoconjuntivitis, eccema o atopia cuando llegaban a los siete años. También observaron que la composición de la población microbiana fecal estaba significativamente alterada con todas las alergias salvo el asma.

Microbiota, metabolitos y células T reguladoras

Las hormonas, las vitaminas y los AGCC producidos por el organismo y la microbiota influyen en la síntesis, la circulación, la función y la supervivencia de las células Treg que, a su vez, son fundamentales para mantener el balance metabólico del organismo y la homeostasis de la microbiota. Zeng y Chi (2014) sugieren que las células Treg podrían servir de enlace entre inmunidad y metabolismo.

La variedad de especies que conforman la microbiota se ve influenciada por las células Treg, que promueven la síntesis de inmunoglobulina A en las placas de Peyer. La diversidad en esta inmunoglobulina mantiene la heterogeneidad microbiana en el intestino, necesaria para la maduración del sistema inmune de la mucosa.

Las vitaminas A, B₃, B₉ y D se asocian a la biología de las células Treg. El ácido retinoico, derivado de la vitamina A, produce una gran cantidad de efectos en el sistema inmune, entre los que se encuentran la promoción de la función efectora de las células T CD4⁺ y de la generación de células B secretoras de IgA en el tejido linfoide asociado al intestino, el control del balance entre células linfoides innatas 2 y 3, la regulación del desarrollo de órganos linfoides secundarios y la determinación de la especificidad de células T y B intestinales. El ácido fólico, a su vez, incrementa la población de células Treg inhibiendo su apoptosis, y se ha podido observar que su deficiencia causa un incremento de colitis. En ratones con una insuficiencia de ácido fólico en la dieta se ha encontrado una reducción de células Treg intestinales. La niacina (ácido nicotínico) es un nutriente esencial que incrementa la síntesis de células Treg colónicas y mantiene la homeostasis del colon. El calcitriol, por su parte, inhibe la proliferación de células T y la producción de citoquinas, además de inducir la expresión de la proteína Foxp3 y promover la actividad supresora de las células Treg. También puede inducir a las células dendríticas tolerogénicas, que favorecen la generación de células Treg. En la especie humana, se ha visto que la vitamina D₃ es necesaria para la activación de las células T (Zeng et al., 2014). La leptina, conocida

como la “hormona del apetito” es sintetizada por los adipocitos y por las células Treg, y entre sus funciones se encuentra la de restringir la proliferación y función de las mismas.

Entre las funciones de los AGCC relativas al sistema inmune están la de controlar la diferenciación y función de las células T y la de ayudar a mantener la homeostasis inmune en el colon (Kim et al., 2014; Zeng et al., 2014). Otras funciones de estos ácidos grasos volátiles son la quimiotaxis de neutrófilos, el control de su degranulación y la regulación de macrófagos y células dendríticas. También suprimen el factor nuclear kappa B (Nf-κB)⁸ y la producción de citoquinas inflamatorias, mientras que incrementan la producción de IL-10⁹ en las células T activadas. En lo que respecta a la inflamación, los AGCC pueden regular las respuestas inflamatorias en algunas condiciones, reduciendo o exacerbando dichas respuestas (Kim et al., 2014).

Metabolismo de la microbiota y células Treg

Las células Treg, como se ha mencionado anteriormente, son necesarias para mantener la inmunotolerancia intestinal (Kim et al., 2014; Zeng et al., 2014). Muchos microorganismos son capaces de inducir la proliferación de este tipo de células, que ocurre específicamente en la lámina propia del colon. Zeng y Chi (2014) describen que algunos clusters de *Clostridia* pueden hacerlo mediante su unión a las células del epitelio colónico, a las que activan para que produzcan FCT-β, una citoquina que promueve la diferenciación de células Treg. Los clostridios también influyen en esta diferenciación estimulando a las células T convencionales, que producen IL-2, con la misma función que el FCT-β.

Bacteroides fragilis produce un polisacárido A que tiene funciones inmunorreguladoras importantes. Esta molécula se une a los receptores tipo Toll 2 de las células Treg, lo que promueve la generación de este tipo de células en el GALT a partir de células T CD4⁺ inmaduras y estimula la producción de citoquinas como IL-10 y FCT-β2 por parte de las Treg. El reconocimiento de la microbiota por los receptores tipo Toll es necesario para la proliferación de células epiteliales, permitiendo una rápida reparación de la mucosa intestinal en caso de lesión, y para inhibir la inflamación. La señalización de estos receptores, presentes en las células del sistema inmune innato, es importante para la protección frente a infecciones y para la inmunotolerancia a los microorganismos comensales. Cuando estos receptores reconocen algún agente patógeno, se activa el Nf-κB, se incrementa la producción de citoquinas y se activan las células T (Thakur et al., 2014).

⁸ Factor de transcripción con importancia en las respuestas celulares a estímulos externos. Interviene en las respuestas inmunes e inflamatorias, en el crecimiento celular y la apoptosis.

⁹ Es la citoquina antiinflamatoria por excelencia, inhibiendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias por parte de las células T y los macrófagos.

Zeng y Chi (2014) sugieren que los diferentes tipos de células T pueden reconocer los antígenos de los distintos microorganismos digestivos. Las células dendríticas intestinales presentan antígenos de bacterias filamentosas segmentadas para la diferenciación de las células Th17, habiendo que destacar que la colección de receptores de las células Th17 está prácticamente limitada a estos antígenos, lo que implica que el destino de las células T específicas de antígeno podría estar marcado por la microbiota.

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El conocimiento que se tiene hasta ahora de la obstrucción recurrente de las vías aéreas no permite establecer un diagnóstico hasta que se presentan los signos clínicos. Debido a ello, el tratamiento se realiza también en fases más avanzadas de la enfermedad, cuando ya se han producido cambios histológicos que son irreversibles.

El objetivo fundamental de este trabajo es la realización del diseño de un protocolo experimental para identificar nuevos marcadores de la ORVA en la especie equina que puedan permitir un diagnóstico e incluso un pronóstico tempranos. Para la consecución de este objetivo principal, es necesario plantear los siguientes objetivos específicos:

- Por un lado, identificar aquellos marcadores moleculares y microbiológicos en la microbiota que puedan estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad.
- Por otro lado, detectar nuevos marcadores moleculares en sangre, relacionados con la microbiota, que permitan establecer un pronóstico más temprano de enfermedad.

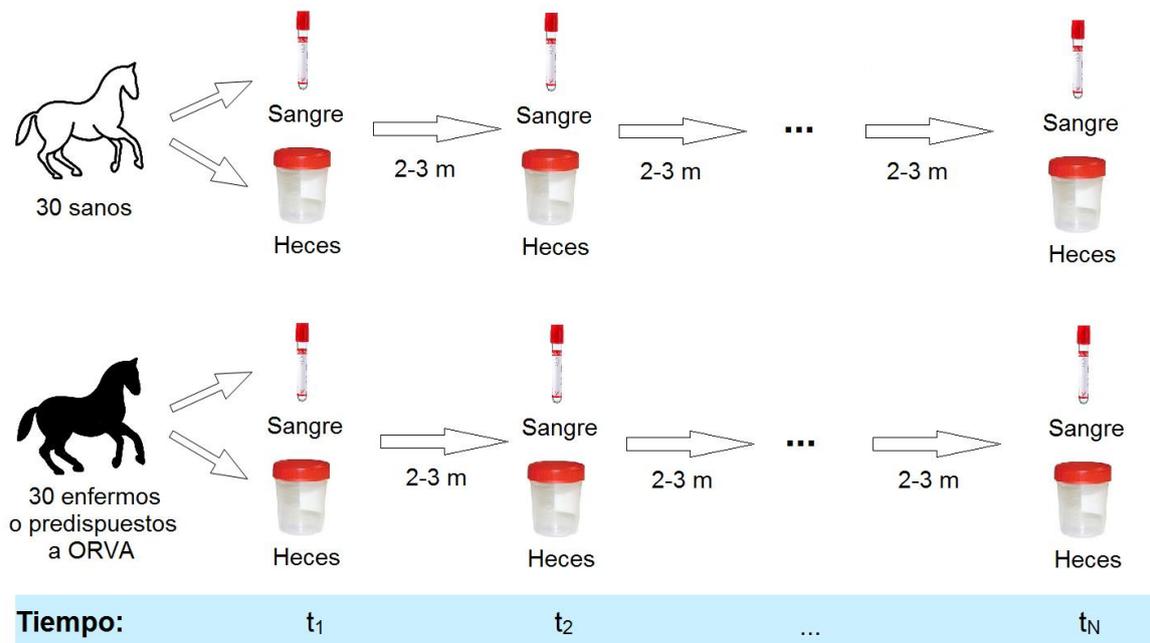
5. METODOLOGÍA (MARCO EMPÍRICO)

Durante el año 2006, Gill y sus colaboradores emplearon análisis de secuenciación metagenómica para estudiar las poblaciones bacterianas del último tramo del intestino a partir de heces en la especie humana, permitiendo definir el contenido genético del microbioma intestinal de personas sanas. En los últimos años se han realizado nuevos estudios en la especie humana, como el que describen Dave y colaboradores (2012), en el que se utilizó la plataforma Illumina de análisis del genoma para comparar la microbiota de personas sanas, con sobrepeso, obesas y con enfermedad inflamatoria intestinal. En la especie que nos ocupa también se ha realizado secuenciación metagenómica para analizar la microbiota, de modo que es la técnica que se ha escogido para este diseño. Por su parte, para identificar los marcadores moleculares se ha elegido la citometría de flujo, ya que se ha podido ver su utilidad en varios ensayos realizados en la especie equina. Dos ejemplos de estos trabajos se basan en la observación de la apoptosis de neutrófilos y macrófagos en animales afectados de ORVA (Niedzwiedz et al., 2014) y en el estudio de la participación de células Treg en la ORVA a partir de fluido broncoalveolar y sangre periférica (Henríquez et al., 2013).

El protocolo experimental que se llevaría a cabo para conseguir la identificación de estos nuevos marcadores se detalla a continuación.

En primer lugar, se seleccionarían dos grupos de animales: uno de los grupos estaría compuesto por caballos sanos cuyas características raciales y genéticas permiten clasificarlos como animales sin predisposición a padecer ORVA. El segundo grupo de animales correspondería a animales enfermos o propensos a padecer la enfermedad, debido a la presentación de la misma en sus progenitores o a ser de una raza predispuesta como, por ejemplo, pura sangre inglés. Dado que la edad de presentación media de la enfermedad son los 9-12 años y que se manifiesta tanto en machos como en hembras, para llevar a cabo el estudio se reclutarían caballos de unos 8 años de ambos sexos. Cada una de las poblaciones estaría formada por 30 animales, de los que se obtendrían muestras seriadas con el adecuado consentimiento firmado de los propietarios.

Gráfica 2. Cronograma de toma de muestras.



Fuente: elaboración propia.

En una primera etapa, cada animal de cada grupo se comenzará a monitorizar a la edad de 8 años, de forma que se obtengan muestras seriadas de sangre y heces cada 2-3 meses, comenzando a esta edad y hasta que la patología alcance la fase más severa en el grupo de animales enfermos.

En las muestras de heces se analizarán las poblaciones y la proporción de bacterias de la microbiota en animales con ORVA y se compararán con las poblaciones bacterianas detectadas en

animales sanos. Para ello se realizará un análisis de secuenciación metagenómica¹⁰ a través de una empresa externa que permita un examen completo y simultáneo de todas las muestras que se obtengan en cada tiempo de extracción programado. Paralelamente al análisis seriado de muestras de heces, en los mismos animales y tiempos se llevará a cabo la obtención seriada de muestras de sangre, en las que se comprobarán los niveles de los linfocitos Treg mediante citometría de flujo¹¹.

Además de las muestras seriadas de heces y sangre, los animales se monitorizarán desde el punto de vista clínico, complementando de esta forma los análisis obtenidos de forma poco invasiva, a lo largo del progreso de la enfermedad.

Al finalizar esta etapa, se determinará qué población o poblaciones de bacterias están más estrechamente relacionadas con el progreso de la enfermedad y cómo afecta este progreso a la población de linfocitos Treg en sangre. Teniendo en cuenta que esta población específica de linfocitos está regulada directamente por la acción inmunomoduladora de la microbiota, los resultados que se obtengan en esta etapa podrán esclarecer si una alteración en la microbiota puede estar relacionada con la ORVA. Por otro lado, la composición específica de bacterias de la microbiota y los niveles monitorizados de linfocitos Treg podrían identificarse como marcadores diagnóstico de la enfermedad.

En una segunda etapa, se incluirán dos nuevos grupos de animales: caballos sanos (n = 30) y caballos enfermos o propensos a padecer ORVA (n = 30), de ambos sexos. En esta etapa, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la anterior, se llevará a cabo la extracción seriada de muestras de sangre en ambos grupos de animales comenzado a la edad de 8 años y tomando una muestra cada 4-6 meses, hasta alcanzar la fase aguda de la enfermedad en los caballos afectados o predispuestos a padecer la patología. En estas muestras, habiendo confirmado la posible relación entre la microbiota y la ORVA, se medirán, mediante kits ELISA, los niveles de interleuquinas IL2 e IFN- γ (provenientes de las células Th1), e IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13 (provenientes de las células Th2), con el fin de determinar qué citoquina o citoquinas pueden estar más relacionadas con el progreso de la enfermedad. Paralelamente, se analizarán también los niveles en sangre de la población de linfocitos Treg en todas las muestras seriadas mediante citometría de flujo y se seguirá un estricto control de los animales desde el punto de vista clínico para completar el estudio. Aquellas citoquinas que se correlacionen con un progreso más

¹⁰ Actualmente, los análisis de secuenciación metagenómica se están empleando en la especie humana tanto para el estudio de la influencia de la microbiota en enfermedades como la esclerosis múltiple y en la esquizofrenia, como para analizar la microbiota vaginal de mujeres gestantes, entre otros.

¹¹ La citometría de flujo se está utilizando en nuestra especie, entre otras funciones, para investigar si las células inmunes se pueden emplear para predecir la respuesta a tratamientos farmacológicos en distintas enfermedades (enfermedad de Crohn e Infliximab, por ejemplo), para analizar la respuesta al tratamiento con células Treg e IL-2 autólogos en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y para ver qué respuesta se produce frente a la inmunoterapia en niños con rinitis alérgica.

rápido o más lento de la enfermedad y que puedan relacionarse con una alteración en la población de linfocitos Treg podrían convertirse en buenos marcadores pronóstico de la ORVA en la especie equina.

Los resultados que se obtengan en esta fase permitirán finalmente la identificación de nuevos marcadores moleculares en sangre, fácilmente monitorizables y de forma poco invasiva, y que permitan un pronóstico temprano.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde que el epidemiólogo David Strachan propuso en 1989 la hipótesis de la higiene, es posible pensar que el incremento de la incidencia de enfermedades alérgicas pueda deberse a un inadecuado desarrollo del sistema inmune por una exposición reducida a microorganismos en los primeros años de vida. En particular, los helmintos actúan sobre el sistema inmune innato y sobre el adaptativo (Anexo II). Respecto al innato, provocan un incremento de las células dendríticas tolerogénicas y los macrófagos tipo 2, a la vez que disminuyen las células linfoides innatas tipo 2. En cuanto al sistema inmune adaptativo, incrementan las células Th2, las Treg y las B reguladoras, al mismo tiempo que reducen la población de células Th1 y Th17 (Versini et al., 2015). Es interesante resaltar que, además de actuar directamente sobre el sistema inmune, los helmintos también regulan la composición de la microbiota, incrementando la población de microorganismos considerados “probióticos” (Versini et al., 2015).

Tal como describen McLoughlin y Mills (2011), la hipótesis de la higiene se adaptó, en 1998, a la hipótesis de la microbiota. Según esta hipótesis, el desarrollo de la tolerancia inmune se ve afectado por las alteraciones en la microbiota causadas por el modo de vida en los primeros años del individuo, de forma que las respuestas inmunes que se producen no son las adecuadas. Nuestra hipótesis sobre el posible papel de la microbiota en el inicio y progreso de la ORVA tiene como punto de partida precisamente las hipótesis de la microbiota y la hipótesis de la higiene. En este sentido, y dado que la ORVA es una enfermedad en la que la respuesta inflamatoria se origina como consecuencia de la exposición a alérgenos, el organismo de aquellos animales que posean una composición de microbiota más adaptada a la exposición de agentes patógenos será capaz de llevar a cabo una respuesta inmunomoduladora más eficaz y, por tanto, los mismos podrán sobrellevar el progreso de la enfermedad de forma menos severa o agresiva que aquellos animales que carezcan de las poblaciones bacterianas que propicien una buena inmunomodulación.

Con el diseño del protocolo experimental se pretende conseguir, por un lado, la identificación de aquellas poblaciones bacterianas de la microbiota que influyen en la población de linfocitos Treg y que pueden estar más relacionadas con el progreso de la enfermedad y, por otro lado, se intenta encontrar qué citoquinas se pueden correlacionar con un mayor progreso de la enfermedad. Los resultados que se obtengan pueden permitir la identificación de nuevos marcadores diagnóstico y pronóstico de enfermedad, fácilmente monitorizables junto con los datos clínicos y de forma poco

invasiva, lo que puede permitir un buen seguimiento en el tiempo y un posible tratamiento más especializado. Asimismo, si se obtuvieran resultados concluyentes, podría realizarse una extrapolación a la especie humana, en la que se presenta la “enfermedad pulmonar obstructiva crónica”, una patología de características similares.

En este diseño también existen una serie de limitaciones, siendo la principal el coste económico que puede suponer llevar a cabo cada etapa, no sólo por monitorizar y tomar muestras a los animales, sino también por los análisis moleculares, especialmente el estudio de metagenómica, con el que se determinarían las poblaciones bacterianas de la microbiota en cada animal. Por otro lado, a pesar de que la toma de muestra es poco invasiva, este diseño supone un periodo largo de tiempo para una monitorización adecuada, lo que favorece que el coste del diseño sea elevado. En este sentido, ajustar el número de animales en cada grupo resulta relevante para poder realizar completamente este estudio.

A pesar de estas limitaciones, en caso poder poner en práctica este diseño, se conseguiría un gran avance en el conocimiento de la ORVA además de la identificación de nuevos marcadores que permitan un diagnóstico y pronóstico tempranos y consecuentemente, se podrían plantear nuevas terapias, incluso más eficaces, que reviertan en menos tiempo los signos clínicos de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

El objetivo de este estudio es hallar un vínculo entre la microbiota y la obstrucción recurrente de las vías aéreas, además de encontrar aquellas interleuquinas que se relacionan con dicha enfermedad y se modifican en función de la microbiota.

Si se consiguieran alcanzar estos objetivos, propondríamos la ejecución del mismo estudio con un tamaño de población mayor para confirmar los resultados obtenidos, al mismo tiempo que se presentaría un nuevo ensayo con el fin de encontrar un tratamiento que modificara la microbiota e indirectamente afectase al patrón de interleuquinas, y que redujera o retrasara los signos de enfermedad.

Conclusions

The aim of this study is to find a link between microbiota and recurrent airway obstruction, in addition to find which are the interleukins that relate to the disease and are modified depending on the microbiota.

If these goals were achieved, we would suggest the execution of the same study with a larger population size to confirm the results, while a new study would be presented with the aim of finding a treatment to modify the microbiota and indirectly affect the pattern of interleukins and reduce or delay the signs of disease.

8. VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo de fin de grado abarca dos campos de dedicación de la veterinaria la clínica y la investigación, lo cual hace que haya sido especialmente interesante su realización, aunque podría serlo todavía más si se pudiese ejecutar de forma práctica en un futuro.

Durante la elaboración del mismo he podido darme cuenta de algo, y es que además de los cinco años que dedicamos a formarnos, intentando adquirir los máximos conocimientos posibles de esta profesión, siempre es necesario seguir aprendiendo para abordar situaciones más específicas y de mayor complejidad. Debido a ello, puedo decir sin ninguna duda que la preparación del diseño, aun siendo más breve que la revisión bibliográfica, ha sido la parte más difícil para mí.

La temática escogida me ha permitido ampliar los conocimientos que tenía sobre la patología equina, el sistema inmune, tan complejo que casi me daba miedo cuando empecé a realizar este trabajo, y las técnicas de análisis laboratorial, y aprender muchas cosas nuevas acerca de algo tan importante y desconocido para mí como es la microbiota.

Teniendo en cuenta la cantidad de bibliografía a consultar, la elaboración de este diseño experimental ha requerido un gran esfuerzo, pero considero que el mismo ha dado sus frutos y estoy muy satisfecha con el trabajo realizado.

Por último, me gustaría mencionar las dificultades asociadas a la necesidad de seguir la estructura impuesta y al número de páginas límite que se nos establece.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth, D. M., Grünig, G., Matychak, M. B., Young, J., Wagner, B., Erb, H. N., y Antczak, D. F. (2003). Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- γ and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96(1–2), 83-91. doi: 10.1016/S0165-2427(03)00142-9
- Bendtsen, K. M., Fisker, L., Hansen, A. K., Hansen, C. H., y Nielsen, D. S. (2015). The influence of the young microbiome on inflammatory diseases-lessons from animal studies. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 105(4), 278-295. doi: 10.1002/bdrc.21116
- Bründler, P., Frey, C. F., Gottstein, B., Nussbaumer, P., Neuhaus, S., y Gerber, V. (2011). Lower shedding of strongylid eggs by warmblood horses with recurrent airway obstruction compared to unrelated healthy horses. *The Veterinary Journal*, 190(2), e12-e15. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.12.029
- Bullone, M. y Lavoie J. -P. (2015). Asthma “of horses and men”—How can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences?. *Molecular Immunology*, 66, 97-105. doi: 10.1016/j.molimm.2014.12.005
- Butel, M. -J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine Et Maladies Infectieuses*, 44(1), 1-8. doi: 10.1016/j.medmal.2013.10.002
- Clinical Trials. Estados Unidos. <https://clinicaltrials.gov/>
- Cordeau, M., Joubert, P., Dewachi, O., Hamid, Q., y Lavoie, J. (2004). IL-4, IL-5 and IFN- γ mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 97(1–2), 87-96. doi: 10.1016/j.vetimm.2003.08.013
- Costa, M. C., Arroyo, L. G., Allen-Vercoe, E., Stampfli, H. R., Kim, P. T., Sturgeon, A., y Weese, J. S. (2012). Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PloS One*, 7(7), e41484. doi: 10.1371/journal.pone.0041484
- Costa, M. C., Silva, G., Ramos, R. V., Staempfli, H. R., Arroyo, L. G., Kim, P., y Weese, J. S. (2015). Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *The Veterinary Journal*, 205(1), 74-80. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.03.018

- Couëtil, L. L., Cardwell, J. M., Gerber, V., Lavoie, J. -P., Léguillette, R., y Richard, E. A. (2016). Inflammatory airway disease of horses-Revised consensus statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(2), 503-515. doi: 10.1111/jvim.13824
- Cunningham, F. M., y Dunkel, B. (2008). Equine recurrent airway obstruction and insect bite hypersensitivity: Understanding the diseases and uncovering possible new therapeutic approaches. *The Veterinary Journal*, 177(3), 334-344. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.10.005
- Dicks, L. M. T., Botha, M., Dicks, E., y Botes, M. (2014). The equine gastro-intestinal tract: An overview of the microbiota, disease and treatment. *Livestock Science*, 160, 69-81. doi: 10.1016/j.livsci.2013.11.025
- Dubuc, J., y Lavoie, J. -P. (2014). Airway wall eosinophilia is not a feature of equine heaves. *The Veterinary Journal*, 202(2), 387-389. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.08.020
- Franzosa, E. A., Huang, K., Meadow, J. F., Gevers, D., Lemon, K. P., Bohannon, B. J. M., y Huttenhower, C. (2015). Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), E2930-E2938. doi: 10.1073/pnas.1423854112
- Garrett, L. A., Brown, R., y Poxton, I. R. (2002). A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. *Veterinary Microbiology*, 87(1), 81-88. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00018-4
- Ghaisas, S., Maher, J., y Kanthasamy, A. (2016). Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacology y Therapeutics*, 158, 52-62. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.11.012
- Godoy, A. y Dörner, C. (2014). Hipersensibilidad en equinos: mecanismos inmunológicos de cuadros clínicos prevalentes. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 29, 1-14. Recuperado de: <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/viewFile/32403/34193>
- Henríquez, C., Perez, B., Morales, N., Sarmiento, J., Carrasco, C., Morán, G., y Folch, H. (2014). Participation of T regulatory cells in equine recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 158(3-4), 128-134. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.12.005
- Horohov, D. W. The equine immune responses to infectious and allergic disease: a model for humans?. *Molecular Immunology*, 66, 89-96. doi: 10.1016/j.molimm.2014.09.020

- House, A. M. (2012) Understanding recurrent airway obstruction (RAO) in the horse. University of Florida. IFAS Extension.
- Hua, X., Goedert, J. J., Pu, A., Yu, G., y Shi, J. (2016). Allergy associations with the adult fecal microbiota: Analysis of the american gut project. *Ebiomedicine*, 3, 172-179. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.038
- Kahn, C. (Ed.). (2007). Manual Merck de Veterinaria, 6ª ed., Barcelona, España: Océano.
- Kim, C. H., Park, J. y Kim, M. (2014). Gut microbiota-derived short-chain fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Network*, 14(6), 277-288. doi: 10.4110/in.2014.14.6.277
- McLoughlin, R. M., y Mills, K. H. G. (2011). Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(5), 1097-1107. doi: 10.1016/j.jaci.2011.02.012
- Morán, G. y Folch, H. (2011). Recurrent airway obstruction in horses – an allergic inflammation: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(1), 1-13. Recuperado de: <http://vri.cz/docs/vetmed/56-1-1.pdf>
- Morán, G., Araya, O., y Folch, H. (2006). Obstrucción recurrente de las vías aéreas en el caballo. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 38(3), 207-217. Recuperado de: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000300003
- Neuhaus, S., Bruendler, P., Frey, C. F., Gottstein, B., Doherr, M. G., y Gerber, V. (2010). Increased parasite resistance and recurrent airway obstruction in horses of a high-prevalence family. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(2), 407-413. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0465.x
- Øyri, S. F., Múzes, G., y Sipos, F. (2015). Dysbiotic gut microbiome: A key element of crohn's disease. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 43, 36-49. doi: 10.1016/j.cimid.2015.10.005
- Pirie, R. S. (2014). Recurrent airway obstruction: A review. *Equine Veterinary Journal*, 46(3), 276-288. doi: 10.1111/evj.12204
- Santos, A. S., Rodrigues, M. A. M., Bessa, R. J. B., Ferreira, L. M. y Martin-Rosset, W. (2010). Understanding the equine cecum-colon ecosystem: current knowledge and future perspectives. *Animal Journal*, 5, 48-56. doi: 10.1017/S1751731110001588
- Scharrenberg, A., Gerber, V., Swinburne, J. E., Wilson, A. D., Klukowska-Rötzler, J., Laumen, E., y Marti, E. (2010). IgE, IgGa, IgGb and IgG(T) serum antibody levels in offspring of two sires affected with

equine recurrent airway obstruction. *Animal Genetics*, 41, 131-137. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02122.x

Schleuniger, P. N., Frey, C. F., Gottstein, B., Swinburne, J. E., Dolf, G. y Gerber, V. (2011). Resistance against strongylid nematodes in two high prevalence equine recurrent airway obstruction families has a genetic basis. *Pferdeheilkunde*, 27(6), 664-669. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/286157919_Resistance_against_strongylid_nematodes_in_two_high_prevalence_Equine_Recurrent_Airway_Obstruction_families_has_a_genetic_basis

Schoster, A., Arroyo, L. G., Staempfli, H. R. y Weese, J. S. (2013). Comparison of microbial populations in the small intestine, large intestine and feces of healthy horses using terminal restriction fragment length polymorphism. *BMC: Research Notes*, 6(91). doi: 10.1186/1756-0500-6-91

Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal*, 299(6710), 1259-1260. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1838109/pdf/bmj00259-0027.pdf>

Tahon, L., Baselgia, S., Gerber, V., Doherr, M. G., Straub, R., Robinson, N. E., y Marti, E. (2009). In vitro allergy tests compared to intradermal testing in horses with recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127(1-2), 85-93. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.09.021

Thakur, A. K., Shakya, A., Husain, G. M., Emerald, M. y Kumar, V. (2014). Gut-microbiota and mental health: current and future perspectives. *Journal of Pharmacology & Clinical Toxicology*, 2(1): 1016. Recuperado de: <http://www.jsimedcentral.com/Pharmacology/pharmacology-2-1016.php>

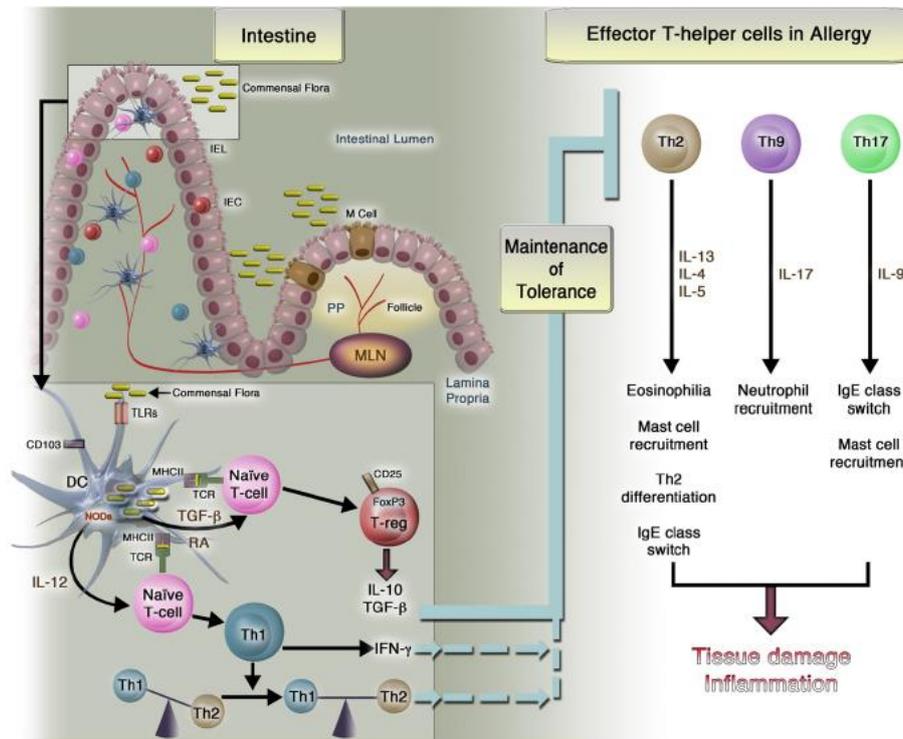
van der Haegen, A., Künzle, F., Gerber, V., Welle, M., Robinson, N. E., y Marti, E. (2005). Mast cells and IgE-bearing cells in lungs of RAO-affected horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(3-4), 325-334. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.06.005

Versini, M., Jeandel, P. -Y., Bashi, T., Bizzaro, G., Blank, M. y Shoenfeld, Y. (2015). Unraveling the hygiene hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications. doi: 10.1186/s12916-015-0306-7

Zeng, H. y Chi, H. (2014). Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trend in Immunology*, 36(1), 3-12. doi: 10.1016/j.it.2014.08.003

ANEXO I

Figura 2. Efectos inmunorreguladores de la microbiota intestinal.

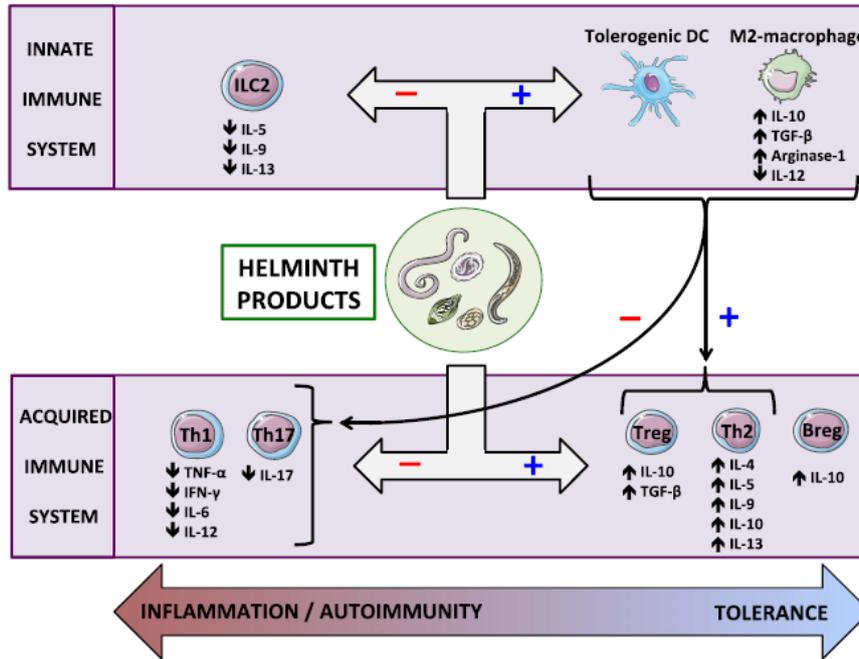


Fuente: McLoughlin y Mills (2011). Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127, 1097-1107, pág. 1101, fig. 2.

Las células dendríticas presentan los antígenos a las células T indiferenciadas, que pasan a diferenciarse en células T efectoras o células T reguladoras, en función de las citoquinas producidas por dichas células dendríticas. La microbiota induce la diferenciación de células Th1, necesaria para establecer un balance entre las respuestas inmunes Th1 y Th2. El mantenimiento de la inmunotolerancia depende, en gran medida, de las subpoblaciones de células Treg del intestino, del mismo modo que lo hacen las enfermedades alérgicas y autoinmunes.

ANEXO II

Figura 3. Efectos inmunorreguladores de los helmintos sobre el sistema inmune.



Fuente: Versini et al. (2015). *Unraveling the Hygiene Hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications*, pág. 5, fig. 1.

Las funciones inmunorreguladoras de los helmintos se deben a su actuación sobre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. En lo que respecta al innato, favorecen la proliferación de células dendríticas tolerogénicas y macrófagos, a la vez que impiden la proliferación de ILC2. El sistema inmune adquirido se ve afectado directamente por los helmintos y por su efecto en las células dendríticas y macrófagos, de forma que se ven incrementadas las poblaciones de células Th2, Treg y Breg, mientras que se reducen las de Th1 y Th17. Tal como explican los autores, los helmintos son capaces de crear un ambiente de inmunotolerancia que les beneficia a ellos mismos, pero que también protege al hospedador impidiendo el surgimiento de fenómenos autoinmunes y respuestas inflamatorias exacerbadas.