

SÍNDROME ULCERATIVO GÁSTRICO EQUINO Y HELICOBACTERIOSIS, EN  
UNA POBLACIÓN DE EQUINOS DEL VALLE DE ABURRÁ Y MUNICIPIOS  
ALEDAÑOS (ANTIOQUIA)

Angélica María Zuluaga Cabrera MV

José Ramón Martínez Aranzales MVZ, MS, PhD

Tutor

Geraldo Eleno Silveira Alves MV, MS, PhD

Miembro del comité tutorial

Jorge Uriel Carmona MVZ, MS, PhD

Miembro del comité tutorial

Maestría en Ciencias Veterinarias:  
Línea de Investigación en Medicina y Cirugía Equina (LIMCE)  
Universidad de Antioquia

2016

*A Sigifredo, mi compañero de vida  
a quien le debo haber culminado este proceso*

### **Agradecimientos**

*Agradezco infinitamente a mi Prof. José Ramón Martínez Aranzales, quien pacientemente me acompañó tanto en el desarrollo de mi proyecto como en el proceso de formación posgradual.*

*Al médico veterinario Claudio Berrio, quien hizo que mantuviera firme el amor por la profesión y la medicina equina.*

*Al Prof. Geraldo E.S. Alves por haber facilitado mi estadía en Brasil y permitirme vivir una maravillosa experiencia académica en su país.*

*A los médicos veterinarios y propietarios que facilitaron los animales para el desarrollo del proyecto de investigación: Claudio Berrio, Esteban Buriticá, Wilson Echeverri, Pablo Neira, Luisa Arbeláez, Juan José Zuluaga, Juan Diego Vélez*

*A los funcionarios de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia: Diana Flórez, Dora Vahos, Amalia Gómez, Ángela Majerus, Ángela Agudelo, Arley Mazo.*

*A los estudiantes de medicina veterinaria y auxiliares veterinarios que apoyaron la realización de las endoscopias digestivas.*

*A Colciencias por su apoyo a través del programa “Jóvenes investigadores 2015” , al Fondo de Apoyo al Primer Proyecto de la Universidad de Antioquia y al Grupo de investigación CENTAURO, por facilitar los recursos para la realización de este trabajo.*

## Tabla de contenido

1. RESUMEN	12
2. INTRODUCCIÓN	15
3. MARCO TEÓRICO	
3.1 El Estómago equino	16
3.1.1 Histología	16
3.1.2 Irrigación	17
3.1.3 Inervación	18
3.1.4 Fisiología	18
3.1.5 Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica	20
3.1.6 Microbiota comensal	23
3.2 Síndrome Ulcerativo Gástrico Equino (SUGE)	
3.2.1 Definición	25
3.2.2 Fisiopatología de SUGE	25
3.2.2.1 Lesión gástrica relacionada con el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	27
3.2.2.2 Helicobacteriosis	28
3.2.3 Diagnóstico de SUGE	33
3.2.4 Epidemiología de SUGE	34
3.2.5 Manejo terapéutico de SUGE	36
4. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN: SÍNDROME ULCERATIVO GÁSTRICO EQUINO Y HELICOBACTERIOSIS, EN UNA POBLACIÓN DE EQUINOS DEL VALLE DE ABURRÁY MUNICIPIOS ALEDAÑOS (ANTIOQUIA).	
4.1 Objetivo general	38
4.2 Objetivos específicos	38
4.3 Materiales y métodos	38
4.3.1 Ubicación	38
4.3.2 Animales	40
4.3.3 Tipo de estudio	42

4.3.4	Esofago-gastro-duodenoscopia	42
4.3.5	Histopatología	43
4.3.6	Prueba Rápida de Ureasa (PRU)	44
4.3.7	Prueba del aliento - Urea Breath Test (UBT)	45
4.3.8	Encuesta	47
4.3.9	Análisis estadístico	49
4.4	Resultados	51
4.4.1	Frecuencia de SUGE	51
4.4.2	Hallazgos histopatológicos	55
4.4.3	Análisis estadístico	60
4.4.3.1	Análisis de asociación	60
4.4.3.2	Regresión logística	61
4.4.3.3	Sensibilidad y especificidad de las pruebas de actividad ureasa	65
4.5	Discusión	68
5	CONCLUSIONES GENERALES	81
6	REFERENCIAS	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

±=	Desviación estándar
AGD=	Arteria gástrica derecha
AGI=	Arteria gástrica izquierda
AGL=	Ácidos grasos libres
AINEs=	Antiinflamatorios no esteroides
ARNm=	ARN mensajero
C <sup>13</sup> =	Carbono de urea marcado radioactivamente
CagA=	Factor de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> (gen A asociado a la citotoxina)
CAT=	Catalasa
CCC=	Caballo Criollo Colombiano
Cl <sup>-</sup> =	Ion cloro
COR=	<i>Receiver Operating Characteristic</i> , o Característica Operativa del Receptor
COX=	Enzima ciclooxigenasa
CRF-2=	Hormona liberadora de corticotropina 2
Cx 32=	Conexina 32
EGFr=	Epidermal Growth Factor - factor de crecimiento epidermal
EP=	Receptores de prostaglandinas de la serie E
FISH=	Hibridización <i>In Situ</i>
GAP=	Unión intercelular. Unión estrecha o en hendidura
GSH=	Glutathiona Total

H&E=	Tinción hematoxilina y eosina
H <sup>+</sup> =	Ion hidrógeno
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> =	Ácido carbónico
HCl=	Ácido clorhídrico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> =	Ion bicarbonato
IC=	Intervalo de confianza
IFN-γ=	Interferón gamma
IGF -1=	Factor insulinoide tipo 1
IL-10=	Interleucina 10
K <sup>+</sup> =	Ion potasio
LPS=	Lipopolisacáridos
MDA=	Malonaldehído
MPO=	Mieloperoxidasa
MRS=	Agar Man Rogosa y Sharpe, para crecimiento de bacterias lacto-ácidas
MUC5AC=	Anticuerpo humano anti-mucina 5AC
NO=	Óxido Nítrico
OR=	Odds ratio
PCR=	Reacción en cadena de la polimerasa
PGE-2=	Prostaglandina de la serie E2
pH=	Potencial hidrogenión
Pic B=	Proteína producida por <i>Helicobacter pylori</i> , encargada de la inducción de interleucina 8

PRU=	Prueba Rápida de Ureasa
RFLP=	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
SME=	Síndrome Metabólico Equino
SOD=	Superóxido Dismutasa
<i>spp.</i> =	especies
SUGE=	Síndrome Ulcerativo Gástrico Equino
TFF=	Trefoil Factor Family
TGF $\alpha$ =	Tumoral Growth Factor alpha - factor de crecimiento tumoral alfa
Th1=	Respuesta inmune mediada por linfocitos T ayudadores tipo 1
TLR=	Receptores tipo "Toll"
UBT=	Urea Breath Test – Prueba del aliento
Urel=	Proteína interna de membrana de <i>Helicobacter pylori</i> , que participa en la resistencia a la disminución del pH externo.
VacA=	Proteína vacuolizante A, producida por <i>Helicobacter pylori</i>
$\Delta$ =	Delta

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Receptores EP presentes en el estómago del caballo y sus funciones en la digestión	22
<b>Tabla 2</b>	Especies de <i>Helicobacter</i> que infectan mucosa gástrica de animales y algunas de las actividades enzimáticas que las caracterizan	29
<b>Tabla 3</b>	Número de individuos estudiados, distribuidos según localización geográfica y condiciones medioambientales, en el departamento de Antioquia.	40
<b>Tabla 4</b>	Clasificación de las lesiones gástricas según MacAllister et al., (1997).	42
<b>Tabla 5</b>	Variables evaluadas y sus categorías, utilizadas durante el estudio.	48
<b>Tabla 6</b>	Frecuencia de lesiones ulcerativas, según porción gástrica y tipo de explotación, en el grupo de caballos evaluados en el estudio.	54
<b>Tabla 7</b>	Hallazgos de la evaluación histopatológica de biopsias obtenidas a través de endoscopio en el grupo de caballos evaluados durante el estudio.	58
<b>Tabla 8</b>	Diagnóstico histopatológico y clasificación macroscópica de lesiones gástricas según individuo y porción gástrica, en un subgrupo de caballos provenientes de la población de estudio.	59
<b>Tabla 9</b>	Asociación entre las variables sexo, raza, suministro de concentrado permanencia dentro de pesebrera, mecanismo de suministro de agua, disponibilidad de agua y SUGE, según porción gástrica del grupo de caballos de la población de estudio.	60
<b>Tabla 10</b>	Riesgo de desarrollar lesiones ulcerativas grado $\geq 2$ (severidad) en la mucosa glandular en la población de caballos del estudio. Análisis de regresión logística univariable.	61
<b>Tabla 11</b>	Riesgo de desarrollar lesiones ulcerativas grado $\geq 2$ (severidad)	62



en la mucosa escamosa en la población de caballos del estudio.  
Análisis de regresión logística univariable.

<b>Tabla 12</b>	Detalle de análisis de regresión logística para la variable “Dieta”, con relación a SUGE en mucosa escamosa de la población de caballos del estudio.	62
<b>Tabla 13</b>	Riesgo de desarrollar lesiones ulcerativas grado $\geq 2$ (severidad) en la región del <i>margo plicatus</i> de la población de caballos del estudio. Análisis de regresión logística univariable.	63
<b>Tabla 14</b>	Análisis de regresión logística multivariable para SUGE en <i>margo plicatus</i> .	63
<b>Tabla 15</b>	Detalle de análisis de regresión logística para la variable “Dieta”, con relación a SUGE en <i>margo plicatus</i> en la población de caballos del estudio.	64
<b>Tabla 16</b>	Riesgo de desarrollar lesiones ulcerativas grado $\geq 2$ (severidad) en el antro pilórico de la población de caballos del estudio. Análisis de regresión logística univariable.	64
<b>Tabla 17</b>	Área bajo la curva, error estándar e intervalo de confianza para dos pruebas de detección de actividad ureasa PRU y UBT.	66
<b>Tabla 18</b>	Resultados de reacción ureasa evaluada mediante PRU, UBT y agar urea, en 20 muestras de estómago provenientes de la porción glandular de un subgrupo de caballos elegidos a partir de la población de estudio.	66

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Localización de los caballos del estudio según su localización en el departamento de Antioquia.	39
<b>Figura 2.</b>	Distribución de los caballos estudiados, según tipo de explotación y raza.	41
<b>Figura 3.</b>	Distribución de los caballos estudiados, según tipo de explotación y actividad física.	41
<b>Figura 4.</b>	Imagen demostrativa de los resultados: negativo, positivo débil y positivo a la prueba rápida de la ureasa, a partir de biopsias gástricas de algunos caballos del estudio.	45
<b>Figuras 5 y 6.</b>	Imagen que evidencia el método para obtención de aliento en tubo de vidrio en un caballo participante en el estudio.	46
<b>Figura 7.</b>	Distribución de lesiones gástricas macroscópicas diferentes a úlceras gástricas activas , en cada uno de los subgrupos de caballos estudiados.	52
<b>Figura 8.</b>	Distribución de lesiones gástricas diferentes a úlceras en el total de caballos estudiados.	53
<b>Figura 9.</b>	Distribución de la proporción de lesiones gástricas $\geq 2$ (severidad), según porción del estómago de la población caballos del estudio.	53

<b>Figura 10.</b>	Fotografías de hallazgos macroscópicos (gastroscopia) y microscópicos (histopatología) de lesiones gástricas en algunos de los caballos estudiados.	56
<b>Figura 11.</b>	Curva COR para la evaluación de la sensibilidad y especificidad de dos pruebas para detección de actividad ureasa: PRU y UBT.	65
<b>Figura 12.</b>	Distribución de las lesiones gástricas según grado (severidad), porción gástrica y reacción a la prueba rápida de la ureasa, en el grupo de caballos de la población de estudio.	67

## 1. RESUMEN

El síndrome ulcerativo gástrico equino (SUGE) es una entidad multifactorial que afecta el estómago de equinos, ocasionando desde lesiones superficiales de la mucosa hasta úlceras profundas que comprometen la integridad del mismo. La aparición de SUGE ha sido asociada a factores como el tiempo de estabulación, el suministro de concentrado, el ejercicio, el estrés, uso de AINEs y microbiota (helicobacteriosis). **Objetivo:** Caracterizar la presentación de SUGE en una población de caballos del Valle de Aburrá y municipios aledaños, y determinar la presencia de *Helicobacter spp.* en la mucosa gástrica y su asociación con el síndrome. **Métodos:** Fueron evaluados 103 caballos con peso corporal de  $347,7 \pm 61,8$  Kg/pv, edad  $9 \pm 4,9$  años, de ambos sexos, tanto en pastoreo como estabulados, de razas diversas. Se realizó esófago-gastro-duodenoscopia. A través del endoscopio fueron tomadas muestras de las diferentes porciones del estómago y fueron sometidas a pruebas rápidas de ureasa (PRU), además de ser conservadas para análisis histopatológico. Adicionalmente, se adaptó y aplicó la prueba del aliento (UBT). Fueron obtenidos datos de hábitat y condiciones de manejo directamente del cuidador de cada animal. Se realizó estadística descriptiva, análisis de asociación y regresión logística. **Resultados:** El 69% de los animales estudiados presentaron al menos una lesión gástrica, 22.3% de los individuos presentaron lesiones en la mucosa escamosa, 39.2% en el *Margo plicatus* (MP) y 48.9% en la mucosa glandular y antro pilórico. Las pruebas de detección de actividad ureasa resultaron poco sensibles, tanto PRU como UBT. Se encontró que la dieta es un factor asociado a la presentación de úlceras grado  $\geq 2$  (severidad) para mucosa escamosa ( $p=0.003$ ). Con relación a la ulceración en MP se encontró que el suministro de concentrado está asociado ( $p=0.032$ ), además la dieta “forraje + concentrado” está fuertemente relacionada con la aparición de estas lesiones tanto en mucosa escamosa como en MP ( $p=0.003$ ). **Conclusión:** El SUGE se encuentra en la población equina estudiada con una frecuencia del 69%, su presentación se distribuye entre las mucosas escamosa

y glandular en porcentajes relevantes. Adicionalmente se determinó que la presencia de concentrado en la dieta es un factor crítico para el desarrollo de úlceras en estas dos porciones gástricas. No pudo ser establecida la correspondencia entre las pruebas de actividad ureasa y la presencia de *Helicobacter spp.*, además de su relación con SUGE. Se requiere de diagnóstico molecular para determinar presencia de *Helicobacter spp.* y su asociación con las lesiones ulcerativas del estómago.

### Summary

The Equine Gastric Ulcer Syndrome (EGUS) is a multifactorial entity that affects equine stomach; EGUS produces superficial lesions to deep ulcers in the mucosal layer, which involve loosing of stomach integrity. EGUS has been associated to duration of confinement, grain supplement, exercise, stress, non-steroidal anti-inflammatory drugs supply and microbiome of stomach (*Helicobacter*). **Objective:** To characterize the presentation of EGUS in a population of horses in Medellin and close towns, additionally, to determine the presence of *Helicobacter spp.* in the mucosal layer of the stomach of those animals, and the association with EGUS. **Methods:** 103 horses with a corporal weight of  $347.7 \pm 61.8$  Kg, mean of age  $9 \pm 4.9$  years old, both gender, were evaluated. Animals were confined or maintained at pasture. Gastric endoscopy was performed at each horse. Gastric biopsies were obtained through endoscopy and submitted to rapid urease test (RUT) and histopathological analysis. Additionally, environmental and management information of the studied population was obtained from handlers. Logistic regression, descriptive statistics and association analysis were performed. **Results:** The frequency of EGUS in a whole population was 69%, 22.3% of affected animals presented squamous gastric lesions, 39.2% at *Margo plicatus*, and 48.9% at glandular mucosa and pyloric antrum. Tests for urease activity detection had low sensitivity. Diet was found an associated factor in relation with squamous gastric ulcer grade  $\geq 2$  (severity) ( $p=0.003$ ). Grain supply was associated with *Margo plicatus* ulceration grade  $\geq 2$  (severity) ( $p=0.032$ ). Diet “forage + grain”

was strongly associated with gastric lesions in squamous and MP portions ( $p=0.003$ ). **Conclusion:** Frequency of EGUS in the equine studied population was 69%, its distribution was at squamous and glandular mucosal as well. Additionally, was determined the diet like critical factor for development of gastric ulcers at both portions. Tests for urease activity did not show correspondence with Helicobacter-like bacteria presence or EGUS. Is required molecular diagnosis of *Helicobacter spp.* to determine its presence and the association with EGUS.

## 2. INTRODUCCIÓN

El síndrome ulcerativo gástrico equino (SUGE), es una entidad multicausal que afecta el estómago del caballo. Su amplia variedad de presentación hace complejo su estudio, tratamiento y control. Este síndrome representa pérdidas económicas y disminución silenciosa del rendimiento físico de los caballos afectados, además de ser una de las complicaciones hospitalarias más comunes. El abanico de teorías acerca de la etiología del SUGE es amplio, desde la erosión química causada por el ácido clorhídrico, las alteraciones en la homeostasis iónica de las células epiteliales, e inclusive las interacciones microbianas que afectan el mantenimiento del pH intragástrico. Algunos autores afirman que al constituir varias lesiones detectables cuya fisiopatología difiere, la ulceración gástrica escamosa o la ulceración gástrica glandular son entidades diferentes (Merritt, 2009; Sykes y Jokisalo, 2014) y por tanto deben ser abordadas de manera independiente.

La información disponible sobre el SUGE en el contexto colombiano es poca. Es común el uso de información extrapolada desde la literatura extranjera para la comprensión y tratamiento del SUGE en el país. Aún no han sido publicados los factores asociados a SUGE en el contexto nacional, tampoco se conoce el comportamiento epidemiológico del mismo. Algunos autores han reportado casos puntuales de lesiones gastrointestinales causadas presuntamente por el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Cruz y Montoya, 2011), pero en ningún caso se ha publicado la dinámica de aparición de lesiones gástricas en caballos colombianos. Por otro lado, se han llevado a cabo estudios no aleatorizados que acercan a la investigación de este síndrome en Colombia (Cardona et al., 2015a; Cardona et al., 2015b).

Por esta razón, se llevó a cabo el estudio “Síndrome Ulcerativo Gástrico Equino y Helicobacteriosis, en una población de equinos del Valle de Aburrá y municipios aledaños (Antioquia)”, con el objetivo de determinar la presencia de *Helicobacter spp.* en la mucosa gástrica y su asociación con lesiones ulcerativas gástricas.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 El Estómago equino

##### 3.1.1 Histología

La porción escamosa o no glandular del epitelio gástrico consiste en cuatro capas celulares de un epitelio escamoso estratificado; la capa más externa o “estrato córneo” cumple una función de barrera contra el paso de sodio y ácido clorhídrico (HCl) a pH mayor de 4. Las capas intermedias son “estrato transicional” y “estrato espinoso”, las células superficiales de esta capa secretan bicarbonato, que se exterioriza hacia el estrato córneo. Finalmente se encuentra el “estrato basal”, cuya función es germinativa, no se ha demostrado su utilidad como barrera ante agentes dañinos (Andrews et al., 2005).

El epitelio de la mucosa glandular es de tipo columnar. Las glándulas contenidas en este epitelio (fundus), cuentan con células especializadas en la producción de moco ubicadas en el cuello de las glándulas, contienen adicionalmente células principales y parietales. Las glándulas contenidas en el antro pilórico son más profundas que las anteriores (Eurell, 2004).

Se ha demostrado la presencia de uniones GAP intercelulares en el epitelio gástrico equino. Mediante inmunohistoquímica y western blot se ha evidenciado la expresión de ARNm de la proteína conexina 32 (Cx 32), que es propia de las uniones tipo GAP. Mediante hibridización *in situ* de la mucosa, se encontró uniones GAP únicamente en las células de la región glandular (Fink et al., 2005), lo que podría explicar en parte su resistencia natural a la ulceración por efecto caustico del ácido clorhídrico, en comparación con la mucosa escamosa.

Jeffrey et al., (2011) evidenciaron la presencia del factor de crecimiento epidermal (EGFr) en el epitelio escamoso gástrico de las áreas de mayor proliferación celular, ubicadas en las capas basales del epitelio o inmediatamente adyacentes a los capilares. Cuando el epitelio gástrico es lesionado, primero se evidencia la



migración de células desde las glándulas gástricas y luego la proliferación de células progenitoras (horas después de la lesión) (Laine et al., 2008).

El reemplazo completo del epitelio gástrico de la mucosa escamosa toma entre 3 y 7 días, cuando se trata de la región glandular puede tomarse meses. La diferenciación celular a partir de células progenitoras se da por el estímulo de algunos receptores de membrana, allí arriban las señales de células mesenquimatosas y factores de crecimiento para convertirlas en células tipo epitelial adultas. En la proliferación celular gástrica están involucrados los factores de crecimiento EGF $\alpha$  (*Epidermal Growth Factor*), TGF $\alpha$  (*Tumoral Growth Factor alpha*) e IGF-1 (factor insulinoide tipo 1). El EGF $\alpha$  por sí mismo está ausente en el lumen gástrico, aparece originalmente en las glándulas salivares y esofágicas llegando al estómago a través de la deglución (Jeffrey et al., 2010).

### 3.1.2 Irrigación del estómago

Las funciones de la circulación sanguínea en el estómago son nutrición, suministro de oxígeno y remoción de toxinas. El antro pilórico es la región menos vascularizada del estómago equino en contraste con el cuerpo, sin embargo, hay más vasculatura en el cuerpo del estómago y el antro pilórico que en el fundus. El cuadrante pilórico tiene 1.75 veces más irrigación que la porción cárdica, se sugiere que este fenómeno se relaciona con: mayor distensión del fundus a causa de la formación del saco ciego, y mayor demanda de irrigación en el cuerpo estomacal y el antro pilórico por la presencia de glándulas (Da Silva, 2007).

El suministro sanguíneo del estómago equino está a cargo en mayor medida por las arterias celíaca y hepática, que se ramifican en arteria gástrica izquierda (AGI) y derecha (AGD) respectivamente. La AGI irriga la curvatura mayor del estómago, la AGD irriga la curvatura menor, sin embargo, esta última también recibe ramas de la AGI (Da Silva, 2007).

### 3.1.3 Inervación

La inervación gástrica modula acciones como la motilidad (incluyendo el tono del esófago bajo y el esfínter pilórico), secreción de ácido, liberación hormonal, irrigación local y mecanismos de defensa de la mucosa. La espina dorsal a nivel de la vértebra torácica 4 (T4) a la vértebra torácica 11 (T11) inerva al estómago vía nervio mesentérico y esplénico (Ekblad et al., 2000).

#### 3.1.3.1 Inervación intrínseca

Las fibras vagales eferentes son parasimpáticas preganglionares y se originan en el núcleo vagal dorsal medial. El blanco de estas neuronas preganglionares vagales es el ganglio mioentérico, a través del cual se da el control central de motilidad gástrica, vaciamiento, relajación y secreción. Hay más cantidad de ganglios mioentéricos que submucosos en el estómago (Ekblad et al., 2000).

Los vasos mucosos y submucosos son inervados por nervios sensoriales aferentes, que en el estrato basal forman plexos que se dirigen hacia la lámina propia y las células epiteliales. Las ramas apicales de los nervios censan la actividad del ácido gástrico y envían señales a las arteriolas para regular el flujo sanguíneo en la mucosa. Este estímulo lleva a la liberación de los neurotransmisores calcitonina y sustancia P, los cuales promueven la vasodilatación submucosa vía óxido nítrico (Laine et al., 2008).

### 3.1.4 Fisiología del estómago equino

El estómago durante el desarrollo embriológico es derivado del endodermo. La función digestiva de este órgano deriva de múltiples mecanismos endocrinos, mecánicos y nerviosos, entre los cuales se encuentran movimiento de trituración, secreción de ácido y enzimas, además de producción de neurotransmisores.

En el estómago equino se lleva a cabo un fenómeno digestivo a partir de gradientes de pH (Murray y Grodinsky, 1989). Como ejemplo, a la altura del *Margo plicatus* es posible encontrar un pH mayor al que se encuentra en la porción glandular y el jugo gástrico, esto con el objetivo de permitir que ciertos

microorganismos que llevan a cabo actividad fermentativa de los alimentos, puedan permanecer activos (Merritt, 2003).

Tal como sucede en otras especies monogástricas, la función digestiva de los alimentos en el estómago equino es llevada a cabo en gran medida por el ácido clorhídrico (HCl). La producción del HCl se obtiene a partir del intercambio de iones potasio ( $K^+$ ) e iones hidrógeno ( $H^+$ ) a través de la membrana celular de las células parietales; mientras que iones de  $K^+$  ingresan a la célula, iones de  $H^+$  se liberan al exterior de la misma; eventualmente, los iones de  $K^+$  salen de la célula acompañados de iones cloro ( $Cl^-$ ) haciendo posible su liberación extracelular y su conjugación con iones de  $H^+$ , esto es posible debido a la acción de la bomba  $H^+$ ,  $K^+$  ATPasa (bomba de protones), localizada en la superficie celular (Cunningham y Klein, 2009).

Cuando mecánicamente se estimula el sistema nervioso (por distensión), se produce la liberación de acetilcolina, que, a su vez, estimula las células G (antro pilóricas) y parietales (fúndicas) para la secreción de gastrina y HCl respectivamente. Por otro lado, la histamina, producida por las células tipo enterocromafines, estimula las células parietales que poseen además receptores para acetilcolina y gastrina; esto amplifica la producción de HCl por vía paracrina. Una vez el pH del contenido gástrico es suficientemente bajo y ha llegado al duodeno, este se encarga de producir secretina, la cual ejerce retroalimentación negativa sobre la producción de ácido gástrico (Cunningham y Klein, 2009). Además, como coadyuvante de la digestión, las células principales ubicadas en la base de las glándulas de la porción glandular del estómago, producen pepsinógeno (precursor de la pepsina). El antro pilórico contiene abundantes células D (productoras de somatostatina) y células G (productoras de serotonina) (Picavet, 2002). La somatostatina se encarga de suprimir la liberación de gastrina, regulando entonces la producción de HCl (Merritt, 2003).

Con una producción de aproximadamente 1.5 Lt de jugo gástrico por hora (Picavet, 2002), el contenido de HCl es potencialmente peligroso para el epitelio gástrico, en contraposición, es conocido un mecanismo mediante el cual el

estómago del caballo intenta equilibrar el pH; este es el caso de la formación de ion bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) intracelular mediante la disociación del ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) por acción de la anhidrasa carbónica (Cunningham y Klein, 2009).

Adicional a las funciones digestivas de los péptidos gástricos, se conoce que algunos de ellos están involucrados en el mantenimiento de la integridad gástrica, como ejemplo, la gastrina, es encargada de promover la multiplicación de las células del epitelio gástrico ante el estímulo de la ingesta, además, promueve la secreción de jugo pancreático y electrolitos hacia el lumen intestinal (Merritt, 2003).

Una vez los alimentos han sido digeridos química y mecánicamente, se da el vaciado gástrico. Este proceso depende de receptores que se encuentran al inicio del duodeno; estos receptores son activados en presencia de pH bajo, osmolalidad elevada o presencia de lípidos; este mecanismo es conocido como el reflejo entero-gástrico e implica el envío de señales nerviosas a través de fibras aferentes del nervio vago desde el duodeno hasta el tronco encefálico donde son procesadas y devueltas al estómago a través de fibras vagales eferentes (Cunningham y Klein, 2009).

### 3.1.5 Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica

Llama la atención la resistencia natural que tiene el estómago a la autodigestión, aun en contacto directo con sustancias como el HCl, enzimas como la pepsina y sales biliares como el colato y taurocolato. A pesar de dicha resistencia, algunos factores logran producir lesiones. La lesión tisular en el estómago tiene dos modalidades a conocer: 1. Mecanismos de defensa originalmente dañados, 2. Mecanismos de defensa que se afectan por factores externos.

Principalmente, es evidente el daño en los mecanismos de defensa por factores externos. Los sistemas de defensa permiten al aparato gastrointestinal funcionar, aun cuando existen condiciones adversas relacionadas con el pH, la osmolaridad o la temperatura. Se conocen dos tipos de mecanismos de defensa: locales y neuro hormonales.

Como primera línea de defensa se encuentra la barrera moco/bicarbonato/fosfolípido. Esta barrera se compone de gel de moco, bicarbonato y fosfolípidos surfactantes. A su vez, el gel de moco se compone en un 95% de agua y en un 5% de la glicoproteína mucina (Bullimore et al., 2001; Fink et al., 2005; Laine et al., 2008). El gel de moco es co-secretado con proteínas de bajo peso molecular TFF (por su nombre en inglés: *Trefoil Factor Family*) que tienen como función el empaquetamiento de la mucina en vesículas y el mantenimiento de la viscosidad de la capa de moco. Algunas hormonas como la gastrina, la secretina y la prostaglandina de la serie E2 (PGE-2) estimulan la secreción del moco; además se han descrito agentes colinérgicos que participan en este proceso (Laine et al., 2008). La capa de moco gástrico también aloja en su composición iones bicarbonato. A la célula secretora de moco llega bicarbonato, mediante el cotransporte baso-lateral del bicarbonato de sodio (Laine et al., 2008). Algunas sustancias que estimulan la secreción de bicarbonato en el moco gástrico son HCl luminal, factor liberador de corticotropina, melatonina, uroguanilina, y orexina A (Rodrigues de Morais, 2011).

Se presumió que la región no glandular del estómago equino carecía de moco, sin embargo, Bullimore et al., (2001), encontraron que la ausencia de esta sustancia en los cortes histológicos se debía a la dificultad para fijarla y teñirla. La región no glandular del estómago equino tiene moco de naturaleza neutra, esto fue posible determinarlo a través de inmuno-ensayos, facilitados por el hallazgo de un anticuerpo humano anti-mucina 5AC que tiene reacción cruzada con mucinas producidas por tejido gástrico equino. La homología genética para MUC5AC también se ha descrito en caninos, murinos y porcinos. A través de la evaluación histológica de las regiones del estómago se ha encontrado que la cantidad de glándulas de la región no-glandular no son suficientes para producir una capa de moco gástrico, de manera que se sugiere que este moco proviene de la región glandular y algunas pequeñas cantidades del tracto nasal, salivar y respiratorio vía esófago.

Las prostaglandinas también participan en la protección del epitelio gástrico, inhibiendo la activación de células mastocíticas y la adherencia plaquetaria y leucocitaria. PGE-2 junto a la gastrina, activa factores de crecimiento epitelial (EGFr); esta es una vía alterna a través de la cual PGE2 protege el epitelio gástrico (Jeffrey et al., 2010). Las prostaglandinas ejercen sus acciones biológicas a través del estímulo de los receptores EP (*Prostaglandin E2 Receptor*) (Tabla 1).

Tabla 1. Receptores EP presentes en el estómago del caballo y sus funciones en la digestión.

Receptor	Función al ser estimulado
EP-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Secreción de bicarbonato</li> <li>▪ Aumento del flujo sanguíneo de la mucosa</li> <li>▪ Disminución de la motilidad gástrica</li> </ul>
EP-3	Secreción de ácido clorhídrico
EP-4	Secreción de moco gástrico

Cuando la primera línea de defensa falla, los mecanismos secundarios son activados: neutralización intracelular del ácido, rápida reparación epitelial y mantenimiento y distribución del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (Fink et al., 2005; Laine et al., 2008).

Además de los mecanismos de protección gástrica anteriormente mencionados (moco, ion bicarbonato y prostaglandinas), existen otras sustancias que participan, como las proteínas de choque térmico (prevención de la desnaturalización de proteínas), las TFF (re-epitelización), las cateclinas y beta defensinas (prevención de colonización bacteriana). Además, la arquitectura del tejido epitelial gástrico protege el estrato basal, gracias a la existencia de las uniones intercelulares tipo GAP o uniones estrechas (Laine et al., 2008). Adicionalmente,

se ha evidenciado aumento en la producción de EGFr, en epitelios lesionados por úlceras (Jeffrey et al., 2010).

La vasodilatación también es un mecanismo de protección contra la lesión tisular. La vasodilatación es producida directamente por el óxido nítrico y las PGE-2, que además previenen la adhesión plaquetaria y leucocitaria. Cuando el pH gástrico disminuye la difusión ácido-base ocurre y la circulación incrementa con el fin de diluir los agentes dañinos (Laine et al., 2008). La falla en la microcirculación de la mucosa lleva a hipoxia, acumulación de agentes dañinos y malnutrición, provocando finalmente apoptosis o necrosis.

La regulación neuro-hormonal de la defensa de la mucosa gástrica, se da por la asociación del sistema nervioso central y algunos factores hormonales. La activación vagal aumenta la producción de moco y aumenta el pH intracelular; también se da la activación de receptores opioides centrales. La respuesta endocrina al estrés visceral regula la motilidad intestinal y la función de la mucosa. La producción de hormona liberadora de corticotropina 2 (CRF-2) previene la apoptosis, la ghrelina estimula la producción de óxido nítrico y los glucocorticoides mantienen la homeostasis de glucosa, el flujo sanguíneo y la secreción de moco.

Finalmente, el pastoreo y por tanto el consumo constante de forraje, permite mantener la estratificación de pH a la que se encuentra habituado el estómago, convirtiéndose en un mecanismo de protección contra ulceración gástrica producida por la corrosión química.

### 3.1.6 Microbiota comensal

En un estudio realizado con 5 estómagos equinos post mortem ulcerados, cultivaron fragmentos de mucosa tanto escamosa como glandular en medio para bacterias lacto-ácidas MRS, además obtuvieron información genética de las bacterias comensales utilizando PCR punto final para la amplificación del fragmento 16S del ADN ribosómico. Posteriormente se llevó a cabo polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). En este estudio fueron encontradas poblaciones bacterianas compatibles con microorganismos de los

géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Clostridium* en mucosa escamosa ulcerada (Jassim et al., 2008).

Específicamente han sido encontrados microorganismos productores de ureasa en estómago de equinos, tales como *Proteus miribialis*, *Pseudomona aureginosa* (Belli et al., 2003), *Klebsiella spp.* y *Yersinia spp.* (Cardona, 2009). Se ha encontrado *Lactobacillus salivarius* y *Sarcina ventriculi*, tanto en mucosa gástrica equina sana como en lesiones ulcerativas; la microbiota estomacal puede cambiar en momentos en los cuales existe ulceración, ya que se desarrolla disminución de la microflora comensal y los microorganismos oportunistas suelen colonizar y multiplicarse, es así como Husted et al., (2010), encontraron *Enterococcus faecium* y *Escherichia fergusonii* superficial e intraepitelial respectivamente en una lesión ulcerativa. Otros microorganismos encontrados tanto en mucosa gástrica sana como ulcerada corresponden al género *Helicobacter* (Bezdekova y Futas, 2009; Cardona et al., 2009; Contreras et al., 2007; Valenzuela y Luzio, 2004), entre ellos *H. equorum* (Moyaert et al., 2007). En otros reportes se encontró *Clostridium septicum* y *C. perfringens* en reflujo gastroduodenal; para el caso de la infección por *C. perfringens* fue notorio el daño en mucosa glandular con presencia de enfisema y necrosis tisular (Patton et al., 2009).

Un estudio realizado en dos grupos diferentes de caballos (6 individuos), que diferían en dieta, forma de obtención de la muestra de estómago (post mortem e *In vivo* a través de gastroscopia) y ayuno, encontró que la flora microbiana depende en gran medida del tipo de alimentación y método de obtención de la muestra. Fue utilizada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridización *In Situ* (FISH). Para el caso de las muestras obtenidas post mortem predominaron las bacterias del filo *Firmicutes*, mientras que para las muestras obtenidas a través de gastroscopia (*In vivo*) fueron evidentes las bacterias del filo *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Adicionalmente, fue notado diferencias individuales respecto de la población microbiana del estómago de estos individuos. Además este estudio no encontró *Helicobacter spp.* bajo ninguna de las técnicas empleadas (Perkins et al., 2012).



## 3.2. Síndrome Ulcerativo Gástrico Equino (SUGE)

### 3.2.1 Definición

El SUGE se caracteriza por la presentación de lesiones en la mucosa gástrica, que involucran pérdida en la continuidad del epitelio gástrico y la consecuente disfunción del órgano. Dichas lesiones evidencian severidad variable y causas múltiples. La ulceración gástrica está asociada con cólicos recurrentes, pérdida de peso, estereotipias y diarrea. Algunos autores afirman que el SUGE comprende varias patologías detectables, por tanto argumentan que la ulceración gástrica escamosa o la ulceración gástrica glandular son entidades diferentes, debido a la diferencia en su fisiopatología (Merritt, 2009; Sykes y Jokisalo, 2014).

### 3.2.2 Fisiopatología de SUGE

Moraes et al., (2008) reportaron que, los factores que predisponen a lesiones de la región transicional esófago-estómago son: disposición anatómica del estómago, manejo y tipo de alimento, ayuno prolongado, uso de antiinflamatorios no esteroides (AINEs) e intensidad del ejercicio, éste último entendido como un elevador de la línea de llenado gástrico. Sin embargo, se continúa considerando al HCl como sustancia lesiva principal de la mucosa gástrica; son múltiples las situaciones en las cuales HCl puede causar daños: cuando se secreta en grandes cantidades, cuando permanece mucho tiempo en el estómago (alteración del vaciamiento gástrico como la miasis cavitaria por *Gasterophilus spp.*) (Cardona et al., 2016) o cuando no puede ser contrarrestada por los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica.

En adición al HCl estomacal, los AGV (ácidos grasos volátiles), los cuales son subproductos de la fermentación de carbohidratos por bacterias residentes del estómago, actúan sinérgicamente para causar SUGE en caballos, los AGV comúnmente implicados son el butírico, propiónico, acético, isobutírico, valérico e isovalérico. Cuando el pH gástrico es menor que 4, los AGV empiezan a ser disociados (lípidos solubles) y penetran dentro de las células epiteliales de la

mucosa escamosa, resultando en acidificación celular, inhibición del transporte de sodio, edema celular y ulceración (Reese y Andrews, 2009; Valentine, 1998).

Otros mecanismos de lesión gástrica en el caballo involucran los factores hormonales implícitos en la digestión, como es el caso de la hipergastrinemia pos ejercicio, la cual ha sido asociada a SUGE por incrementar la producción de HCl (Andrews et al., 2005; Furr et al., 1994). Adicionalmente se ha reportado que el cortisol tiene participación en el SUGE; esta hormona disminuye la producción de PGE<sub>2</sub>, y es por esto que el estrés, el ejercicio y las patologías relacionadas con el incremento de cortisol (por ejemplo, Síndrome Metabólico Equino - SME) se consideran asociadas al desarrollo de SUGE (Malmkvist et al., 2012).

Mariella et al., (2013) relacionaron la disminución del flujo sanguíneo del estómago en potros, con la aparición de enfermedad ulcerativa gastroduodenal; se sugiere que la hipotensión e hipovolemia en potros, provocadas por sepsis y síndrome de asfixia perinatal están relacionadas con la aparición de lesiones gástricas. La aparición de úlceras gástricas por isquemia ocurren debido a la vasoconstricción; se han descrito algunas sustancias que estimulan la vasoconstricción como el leucotrieno C<sub>4</sub>, el tromboxano A<sub>2</sub> y la endotelina, que provocan los efectos deletéreos descritos anteriormente (Laine et al., 2008).

Se ha demostrado que las diferentes regiones del estómago presentan susceptibilidad variable al desarrollo de lesiones ulcerativas, puesto que la arquitectura intercelular difiere entre ellas, tal es el caso de la interacción entre las células del epitelio gástrico, se ha demostrado que la ausencia de uniones GAP intercelulares es uno de los factores responsables de la aparición de úlceras en la mucosa escamosa (Fink et al., 2005).

En humanos, la infección por *Helicobacter pylori* está asociada a la expresión aberrante de los genes de mucina (que es la sustancia encargada de conferir viscosidad al moco gástrico) y por esto se ha asociado a lesiones gástricas. En equinos, la expresión de genes que codifican para mucinas y la distribución de su producción no se han estudiado, tampoco se ha establecido la relación entre

Helicobacteriosis y SUGE, aunque existen reportes de hallazgos de bacterias curvo-espiraladas en úlceras gástricas de equinos por Cardona et al., (2009a), Cardona et al., (2009b) así como por Valenzuela y Luzio (2004).

### 3.2.2.1 Lesión gástrica relacionada con el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs inhiben la producción de prostaglandinas (incluyendo la PGE-2) vía inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COXs). Existen dos tipos de COX. COX-1 es producida por la mayoría de los tejidos del organismo, COX-2 se expresa poco en los tejidos, pero su producción es rápidamente inducida por factores de crecimiento o citosinas, promoviendo la adhesión neutrofílica. COX-1 es la encargada de mantener la integridad de la mucosa gastrointestinal, su inhibición produce lesión sobre esta superficie. Sin embargo, cuando se administra conjuntamente inhibidores de COX-1 y COX-2 se evidencia daño en la mucosa gástrica. Ambas enzimas representan un mecanismo de protección gástrica y su inhibición aumenta la posibilidad de encontrar lesiones en la mucosa. COX-1 también está relacionada con el mantenimiento del flujo sanguíneo de la capa mucosa del estómago; los eventos de isquemia-reperusión incrementan la producción de ARNm para COX-2 reduciendo la producción de óxido nítrico e incrementando la endotelina-1. La secuencia de eventos lesivos debido al uso de AINEs es: inhibición de la producción de prostaglandinas, inducción de la hiperomotilidad gástrica, disturbios microvasculares y activación neutrofílica. Otros mecanismos de lesión derivados de los AINEs son: inhibición de la fosforilación oxidativa, inhibición de quinasas (enzimas de fosforilación), activación de la apoptosis, y aumento en la producción de leucotrienos vía lipo-oxigenasa5. Todo lo anterior concluye que, puede encontrarse daño en la mucosa gástrica aun en ausencia de ácido (Takeuchi, 2012).

Morales et al., (2011) relacionaron lesiones hepáticas y renales con lesiones ulcerativas severas asociadas al uso de AINEs en caballos pura sangre,

sugiriendo que daños en otros sistemas que pudieran generar acumulación de toxinas, pueden estar relacionados con SUGE.

En un estudio experimental realizado en un grupo de 15 caballos, Martínez et al., (2014), encontraron que el suministro oral y continuo de fenilbutazona está relacionado con la producción de lesiones ulcerativas gástricas en equinos a través de mecanismos de estrés oxidativo. Fueron medidos los factores antioxidantes y pro-oxidantes, Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Óxido Nítrico (NO); Glutathione Total (GSH), Mieloperoxidasa (MPO) y Malonaldehído (MDA), además, fueron medidos los niveles de Prostaglandina E2 (PGE2). Estas mediciones fueron realizadas en contenido gástrico. Los hallazgos fueron contrastados con evaluación gastroscópica. La actividad de MPO, CAT y PGE2 no evidenció diferencias significativas entre grupos, a pesar de esto los niveles de PGE2 mostraron incremento en el tiempo para todos los grupos.

La SOD para el grupo experimental al cual le fue suministrada una dosis mayor de fenilbutazona, disminuyó fuertemente en comparación con los grupos de menor dosis y grupo control. El NO mostró disminución en el tiempo. Adicionalmente MDA evidenció aumento en el grupo de mayor dosis, y en todos los grupos al final del experimento. Todo esto indicando que existen otras vías a través de las cuales los AINEs pueden producir daño a la mucosa gástrica (Martínez et al., 2014).

#### 3.2.2.2 Helicobacteriosis

*Helicobacter* es una bacteria Gram negativa, microaerófila, espiralada, flagelada, clasificada inicialmente dentro del género *Campylobacter*, pero re-categorizada en 1989 gracias al estudio detallado de un microorganismo encontrado en antro pilórico de humanos con enfermedad gástrica, llamado desde entonces *Helicobacter pylori*. A pesar de que su forma más conocida es la espiral, también se le puede encontrar como un bacilo curvo, una esfera (cocoide), en forma de letra “V”, en forma de letra “U” e inclusive en formas rectas. Las formas cocoides parecen aparecer en condiciones de privación de nutrientes, exposición a antibióticos o tiempos prolongados de incubación. Se presume que estas formas

regresan a la presentación bacilar según condiciones ambientales especiales, retornando su capacidad infectiva (Bayona y Gutiérrez, 2013; Owen, 1998).

El perfil bioquímico más conocido entre el género *Helicobacter* es el de *H. pylori* cuya actividad enzimática más notable es la capacidad de hidrolizar la urea, además de poseer actividad fosfatasa alcalina, oxidasa y catalasa. Típicamente las bacterias de este género son positivas para fosfatasa ácida, leucina arilamidasa, naftol-AS-B1-fosfohidrolasa, esterases, gama-glutamyl-transpeptidasa. Por lo general son negativas para hidrólisis del hipurato, reducción de nitratos, formación de indol, arilsulfatasa e hidrólisis de indoxilacetato (Owen, 1998). A pesar de que se considera relativamente común entre especies de *Helicobacter* el perfil bioquímico mencionado, algunas de estas bacterias, encontradas principalmente en mucosa gástrica de animales difieren en su actividad enzimática, como se puede evidenciar en la tabla 2.

Tabla 2. Especies de *Helicobacter* que infectan mucosa gástrica de animales y algunas de las actividades enzimáticas que las caracterizan.

Especie	Animal afectado	Actividad ureasa	Hidrólisis de indoxil acetato	Reducción de nitratos
<i>H. pylori</i>	Humano, perro doméstico, cerdo doméstico,	+	-	-
<i>H. acinonyx</i>	Guepardo, tigre	+	-	-
<i>H. nemestrinae</i>	Macaco	+	-	-
<i>H. mustellae</i>	Hurón	+	+	+
<i>H. suis</i> *	Cerdo doméstico	+	-	-
<i>H. felis</i>	Gato doméstico	+	+	+
<i>H. bizzozeronii</i>	Perro doméstico	+	+	+
<i>H. heilmannii</i> ‡	Gato y perro doméstico	+	-	+
<i>H. equorum</i> **	Caballo	-	-	+

\*(Baele et al., 2008) \*\*(Moyaert et al., 2007) ‡(Smet et al., 2012). Adaptado de (Owen, 1998).

El crecimiento del *Helicobacter* en cultivo en agar sangre toma cerca de 5 días a una temperatura de incubación de 37°C, considerando que las colonias no soportan más de 5 subcultivos (Owen, 1998). *Helicobacter pylori* es un microorganismo fastidioso; sin embargo, se han desarrollado técnicas sencillas y económicas para su conservación y transporte, permitiendo crecimiento y conservación bacteriana hasta 4 horas antes de su procesamiento o almacenaje (-70°C) (Majalca et al., 2001).

Ha sido propuesto que la supervivencia de *Helicobacter spp.* en agua y superficies mucosas también es coadyuvada por la formación de una biopelícula; para el caso puntual de *H. pylori* se propuso la producción de un auto inductor de matriz extracelular como la acil-homoserinalactona (Bayona y Gutiérrez, 2013), la cual le permite permanecer protegido del medio externo y continuar multiplicándose.

También ha sido propuesto el diagnóstico molecular de *Helicobacter* con el fin de determinar con mayor precisión sus especies, utilizando fragmentos del ADN que codifican tanto para factores de virulencia como de supervivencia. Las proteínas más importantes para el diagnóstico molecular de *Helicobacter spp.* son CagA, Pic B, VacA, sin embargo, es también muy utilizada la región 16s del RNA ribosómico (Contreras et al., 2007; Recordati et al., 2007; Zhongming y Taylor, 1998).

#### *Epidemiología y diagnóstico de Helicobacter spp.*

La infección por *Helicobacter spp.* es una de las presuntas etiologías del Síndrome Ulcerativo Gástrico Equino (SUGE). La participación de esta bacteria en el SUGE aún no ha sido confirmada. Se conoce la presencia de lesiones ulcerativas gástricas y presencia de DNA de *Helicobacter spp.* o el microorganismo propiamente dicho, en mucosa gástrica de equinos de alto rendimiento deportivo (Contreras et al., 2007), hospitalizados (Bezdekova y Futas, 2009), equinos de abasto público (Cardona et al., 2009) y potros clínicamente sanos (Valenzuela y Luzio, 2004), inclusive se ha encontrado *Helicobacter equorum* en heces de caballos adultos sanos (Moyaert et al., 2007).

El *Helicobacter* spp. ha sido objeto de estudio en otras especies (caninos, suinos, humanos, entre otros) (Fox y Lee, 1997 ;Haesebrouck et al., 2009) por presumirse de su participación en la gastritis crónica, ulceración gástrica y carcinoma gástrico. Sin embargo, no se ha determinado con certeza la asociación entre estas patologías y la detección de este microorganismo en la mucosa gástrica del caballo.

Investigaciones en humanos han permitido detectar la bacteria en placa dental y saliva, lo que sugiere que el ambiente bucal puede representar una vía potencial para su supervivencia y transmisión. Se ha referido que el *H. pylori* puede estar presente en la cavidad bucal como consecuencia del reflujo gástrico, y que ésta se encuentre más como parte de la microbiota transitoria, que como un residente normal. Igualmente se ha reportado que en algunos pacientes la colonización bucal de la bacteria, podría representar un factor de riesgo para la reinfección gastrointestinal posterior a la terapia antibiótica (Adler et al., 2014).

El *Helicobacter* habita glándulas, células parietales y mucus del estómago (Valenzuela y Luzio, 2004). Puede vivir en ambientes ácidos gracias a su actividad ureasa positiva (para las especies ureasa positivas)(Belli et al., 2003).Las lesiones ocasionadas por la infección con *Helicobacter* incluyen hiperemia, edema antral, hipertrofia del esfínter pilórico, duodeno hiperémico, edematoso y friable, además de retardo en el vaciamiento gástrico. Puede haber pérdida de peso y enteropatía con pérdida de proteínas (Valenzuela y Luzio, 2004).

Debido a las vías de transmisión se considera que *Helicobacter* spp tiene potencial zoonótico (Dimola y Caruso, 1998; Carvalho et al., 2008).Se conocen tres vías de transmisión principales: oral-oral, fecal-oral, e iatrogénica (Valenzuela y Luzio, 2004), sin embargo también se considera vectores, agua y alimentos (Carvalho et al., 2008) como fuentes de contaminación.

Se ha reportado posible contagio entre animales y sus cuidadores (Dore et al., 1999), sugiriendo susceptibilidad a la infección por *Helicobacter* en las personas que mantienen estrecho contacto con los animales infectados. Se ha encontrado

evidencia a partir de cavidad oral y mucosa gástrica de *Helicobacter* en caninos (Recordati et al., 2007), situación que sugiere que debido a la estrecha relación entre perros y humanos es probable que exista transmisión horizontal de la bacteria. Por otro lado, la alta frecuencia en humanos, reportada por estudios en Latinoamérica sugiere que las vías de contagio, cualquiera que estas sean son altamente eficientes. En la ciudad de Medellín se ha reportado 77.2% de frecuencia de la infección en médicos, siendo un acercamiento a lo que sucede en la población general (Campuzano et al., 2007).

Considerando este panorama, se hace importante comprobar si la relación zootécnica que existe entre caballos y humanos, es fuente de una potencial zoonosis. Técnicas como test rápido de ureasa, e histopatología (tinción de Whartin Starry) son las mayormente utilizadas dentro de las técnicas invasivas, sin embargo están disponibles pruebas como PCR (Valenzuela y Luzio, 2004) e hibridización *in situ* (Husted et al., 2010). Otras técnicas, no invasivas, se han utilizado en humanos como el test del aliento con urea marcada (UBT) y la serología (Valenzuela y Luzio, 2004), con 100% y 90% de sensibilidad respectivamente (Campuzano, 2007; Campuzano, 2007a; Campuzano, 2011; Majalca et al., 2001).

*Helicobacter pylori* puede ser encontrado en fuentes de agua tratadas o no, principalmente cuando se ha conformado una biopelícula sobre agua estancada; su aislamiento mediante PCR, se ha relacionado con locaciones específicas donde las prácticas de mantenimiento de acueductos son ineficientes (Richards et al., 2015); esto puede representar una potencial vía de transmisión entre humanos, y entre humanos y animales.

#### *Helicobacter e inmunidad*

Un estudio encontró que un grupo de ratones tipo C3H/HeJ (los cuales tienen una mutación en el gen que codifica para TLR4) no desarrollaron gastritis en respuesta a la infección por *Helicobacter felis*, indicando un rol central de los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias en la gastritis producida por *Helicobacter*



en ratones; esto sugiere que se requiere que las bacterias activen macrófagos y células epiteliales a partir de TLR2 (Harbour y Sutton, 2008). Por otro lado, se ha evidenciado que la helicobacteriosis produce aumento en la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10, lo que lleva pensar que la respuesta inmune dirigida contra *Helicobacter* obedece a Th1 (Harbour y Sutton, 2008).

### 3.2.3 Diagnóstico de SUGE

Las lesiones macroscópicas son evaluadas a través de gastroscopia. Otras lesiones inflamatorias no evidentes a simple vista pueden ser evaluadas a través de estudios histopatológicos. La clasificación de las lesiones macroscópicas ha sido determinada por varios autores; es posible clasificar las lesiones en una escala simple entre 0 y 4 (Sykes et al., 2015) o a través de una escala más compleja que involucra número de lesiones y severidad de las mismas (MacAllister et al., 1997). Otros métodos descritos para el diagnóstico del SUGE son: respuesta al tratamiento, prueba de sangre oculta en heces, radiografía con medio de contraste para determinación de tiempo de vaciamiento gástrico (Cardona et al., 2012). Se han desarrollado pruebas que adicionalmente permiten evaluar la integridad y permeabilidad de la mucosa gástrica, como es el caso del test de detección de sacarosa en orina (O'conner et al., 2004), adicionalmente se ha evaluado la efectividad del test al ser realizado en suero, esto con el fin de disminuir el tiempo requerido para obtener una muestra de orina (Hewetson et al., 2006); otra prueba que ha sido implementada para fortalecer el diagnóstico de SUGE, es la detección de albúmina y hemoglobina utilizando anticuerpos monoclonales; esta prueba se realiza con el fin de diferenciar ulceración existente en el colon de la ulceración ocurrida en otra ubicación digestiva (Pellegrine, 2009).

Otra aproximación diagnóstica apoyada en el diagnóstico histopatológico es la medición de ARNm de citosinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IL13, cuya aparición ha sido correlacionada estadísticamente con la presencia de lesiones histopatológicas; en contraste, la aparición de TNF $\alpha$  e IL13 no se ha asociado al diagnóstico macroscópico de SUGE a través de endoscopia (Pietra et al., 2010).

La utilización de parámetros hematológicos no parece ser relevante al momento de determinar presencia de úlceras gástricas en caballos, sin embargo, algunos parámetros bioquímicos si pueden ser útiles para detectar procesos patológicos en el tubo digestivo como amilasa pancreática, bilirrubina, fosfatasa alcalina plasmática (fracción intestinal), gamma-glutamil-transpeptidasa y amiloide sérico A (Malblanc et al., 2009), y pueden utilizarse como parte de la aproximación diagnóstica para SUGE.

### 3.2.4 Epidemiología de SUGE

Aunque el SUGE está ampliamente descrito a nivel mundial, no cuenta con una caracterización homogénea en cuanto a distribución y factores de riesgo, puesto que estos aspectos difieren según localización geográfica, manejo y aptitud zootécnica de las poblaciones estudiadas.

En un estudio pos-mortem realizado en asnos en Egipto, se encontró 14.3% de lesiones ulcerativas en mucosa escamosa, y 100% de lesiones microscópicas de tipo inflamatorio en mucosa glandular (gastritis); sin embargo estas frecuencias resultaron de animales sometidos a algún proceso estresante como problemas ortopédicos (fracturas de miembros) (Al-Mokaddem et al., 2015). En una población asnal evaluada en planta de beneficio en Colombia, Cardona et al. (2015b) encontraron una frecuencia del 100% de lesiones gástricas pos-mortem, adicionalmente registraron hallazgos macroscópicos como edema antral (56,9%), parásitos (*Trichostrongylus axei*) (10,2%) e impacción (5,8%), además, se encontró *Hemomelasma gastric* (0,7%). Un estudio llevado a cabo en caballos destinados a la enseñanza deportiva universitaria, entre los cuales se encontraban cuarto de Milla, Pura sangre y cruces, encontró una frecuencia de 11% de lesiones ulcerativas en mucosa escamosa, adicionalmente determinó como factores significativamente asociados a SUGE la edad y el sexo de los animales (Chameroy et al., 2006).

En este sentido un estudio realizado en caballos de abasto en el estado de Minas Gerais, Brasil, encontró una frecuencia de 95.23% de lesiones gástricas,

independientemente de la porción del estómago evaluada, 61.91% presentaron lesiones simultáneamente en la mucosa escamosa y la mucosa glandular (De Souza et al., 2014). En contraste, un grupo de animales pertenecientes a la policía militar evaluados en la misma región geográfica presentaron una frecuencia del 43.8% de SUGE (37.5% mucosa escamosa y 6.3% mucosa glandular), no se encontró asociación con tipo de actividad o con historial de uso de antiinflamatorios (Aranzales et al., 2012); por otro lado un grupo de caballos Brasileiro de Hipismo presentó 45% de presentación de lesiones gástricas (Martinez et al., 2014b).

Otros estudios llevados a cabo en América del norte y Europa han mostrado frecuencias de presentación de SUGE variable; una población de yeguas purasangre en diferentes estados fisiológicos mostró ulceración gástrica principalmente en mucosa escamosa con una frecuencia del 70.9% (Le Jeune et al., 2009); por otro lado, 22% de una población de caballos purasangre y *standardbreed* mostraron ulceración moderada y 9% ulceración severa independientemente de la porción gástrica afectada (Orsini et al., 2009). Un estudio realizado en caballos estabulados no activos mostró ulceración >2 en el 53% del grupo (Luthersson y Nielsen, 2009). Cuando se evaluó la presentación de SUGE en un colectivo de caballos de enduro se evidenció una frecuencia de 93% de SUGE (Tamzali et al., 2011), en contraste, otro grupo de caballos también utilizados para competencia de enduro, mostró 67% de lesiones ulcerativas en la mucosa gástrica (Nieto et al., 2004).

Otras aproximaciones han reportado frecuencia de ulceración gástrica en caballos de vaquería, salto y doma pre competición del 17.4%, cuando se evaluaron pos competición se encontró que la frecuencia aumentó hasta el 56.5%. La localización más común fue el *margo plicatus* y curvatura mayor (38.5%). Siendo la incidencia pre y pos competición cerca del 45% (Hartmann y Frankeny, 2003; Tamzali et al., 2011). Por otro lado, Hartmann y Frankeny (2003) realizaron un estudio para establecer el efecto del ejercicio sobre la incidencia de SUGE, y fue posible determinar que la severidad de las lesiones, incrementa en un 47,4% pos-

competencia, siendo más frecuente la ulceración del *margo plicatus* y la porción escamosa.

El síndrome ulcerativo gástrico se distribuye ampliamente y no se ha relacionado directamente con la presentación de cólico. En una población de equinos hospitalizados se encontró 67.8% de prevalencia de ulceración gástrica en los caballos admitidos por cólico y 71.9% en los equinos que fueron admitidos por otro motivo de consulta (Rabuffo et al., 2009). Por su parte un estudio evidenció 40% de SUGE en equinos con signos clínicos compatibles con ulceración gástrica, en contraste se encontró 59% de SUGE en caballos clínicamente sanos (Niedźwiedź et al., 2013), situación que sugiere que la presentación clínica del SUGE no es la más frecuente.

No ha sido posible establecer la prevalencia real del SUGE en Colombia, puesto que los estudios realizados al respecto obedecen a muestreos por conveniencia, sin embargo, se ha encontrado frecuencias interesantes al respecto; como es el caso del estudio realizado en equinos de trabajo de la costa norte del país que encontró una frecuencia de 97.5% de SUGE, de las cuales 85.8% correspondían a lesiones de la mucosa escamosa y 46.9% a ulceración en la mucosa glandular. Este estudio fue llevado a cabo en planta de beneficio (Cardona et al., 2015a). Adicionalmente, Cardona et al. (2015b) reportaron 100% de frecuencia de lesiones gástricas en una población de 137 burros mestizos, cuyo factor asociado al daño de la mucosa glandular fue la edad.

### 3.2.5 Manejo terapéutico de SUGE

Tradicionalmente el objetivo principal del tratamiento para lesiones gástricas ha sido la supresión de la producción de ácido clorhídrico (Reese y Andrews, 2009), además de brindar soporte al proceso de cicatrización de úlceras gástricas (Birkmann et al., 2014; Murray y Eichorn, 1996; Sykes et al., 2014), en este sentido se hizo común el uso de antagonistas de los receptores de histamina H2 como la ranitidina y famotidina o inhibidores de la bomba de protones como el

omeprazol; agonistas de las prostaglandinas son utilizados en la terapia farmacológica de SUGE, sin embargo debido a sus restricciones de uso en hembras gestantes su utilización es menos frecuente. Por otra parte, el aumento artificial del pH también ha sido considerado como parte del tratamiento para la gastritis, de modo que se utilizan sustancias tales como el hidróxido de magnesio (Reese y Andrews, 2009), adicionado con protectores de mucosa como el sucralfato o subsalicilato de bismuto (Martínez y Silveira, 2014). Por otra parte, según la etiología de las lesiones gástricas puede requerirse aumentar la frecuencia de vaciamiento gástrico para evitar el contacto constante del jugo gástrico con la mucosa, para estos casos es utilizado el betanecol, mosaprida citrato o domperidona (Martínez y Silveira, 2014).

Como ya se ha mencionado, el estrés generado por el ejercicio y los cambios hormonales relacionados, son factores predisponentes para el SUGE, de ese modo es recomendado el pastoreo intermedio y la modificación de rutina de ejercicio con el fin de disminuir sus efectos deletéreos sobre la mucosa gástrica; adicionalmente, las prácticas de alimentación deben estar orientadas a aumentar la proporción de fibra en la ración y disminuir la cantidad de concentrado, acompañándolas de nutracéuticos como el aceite de maíz (Martínez et al., 2016) o suplementos cuya composición incluya carbonato de calcio (Reese y Andrews, 2009; Videla y Andrews, 2009); cabe anotar que algunos alimentos son ricos en calcio y funcionan como protectores de la mucosa gástrica, por ejemplo la zanahoria y la alfalfa (Nadeau et al., 2000; Videla y Andrews, 2009). El uso de antibióticos como penicilina, sulfas o estreptomina se ha reportado en casos de SUGE no responsivo a terapia convencional, suponiendo la presencia de bacterias que dificultan la cicatrización de las úlceras gástricas (Martínez y Silveira, 2014).

#### 4. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN: “SÍNDROME ULCERATIVO GÁSTRICO EQUINO Y HELICOBACTERIOSIS, EN UNA POBLACIÓN DE EQUINOS DEL VALLE DE ABURRÁ Y MUNICIPIOS ALEDAÑOS (ANTIOQUIA)”.

##### 4.1 Objetivo general

- Caracterizar la presentación de SUGE en una población de caballos del Valle de Aburrá y municipios aledaños.

##### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar la situación epidemiológica de SUGE utilizando esófago-gastro-duodenoscopia y clasificar las lesiones gástricas.
- Determinar las alteraciones microscópicas presentes en estómagos lesionados y sanos, utilizando estudio histopatológico.
- Determinar la presencia de *Helicobacter* spp. en estómago y su asociación con lesiones ulcerativas gástricas a través de dos pruebas de detección de actividad ureasa.
- Identificar factores asociados a SUGE y a la infección por *Helicobacter* spp. en una población de caballos de la ciudad de Medellín y municipios aledaños.

##### 4.3 Materiales y métodos

###### 4.3.1 Ubicación

Se emplearon 103 animales provenientes de 9 ubicaciones geográficas (condiciones medio-ambientales en tabla 3), 66 de ellos pertenecían al Valle de Aburrá y zona metropolitana, los restantes estaban distribuidos en municipios aledaños (San Pedro de los Milagros, Titiribí y Salgar). Todos los caballos estaban ubicados en el departamento de Antioquia. Los casos evaluados fueron divididos en *clusters* y les fue asignado un número para su identificación (figura 1 y tabla 3).

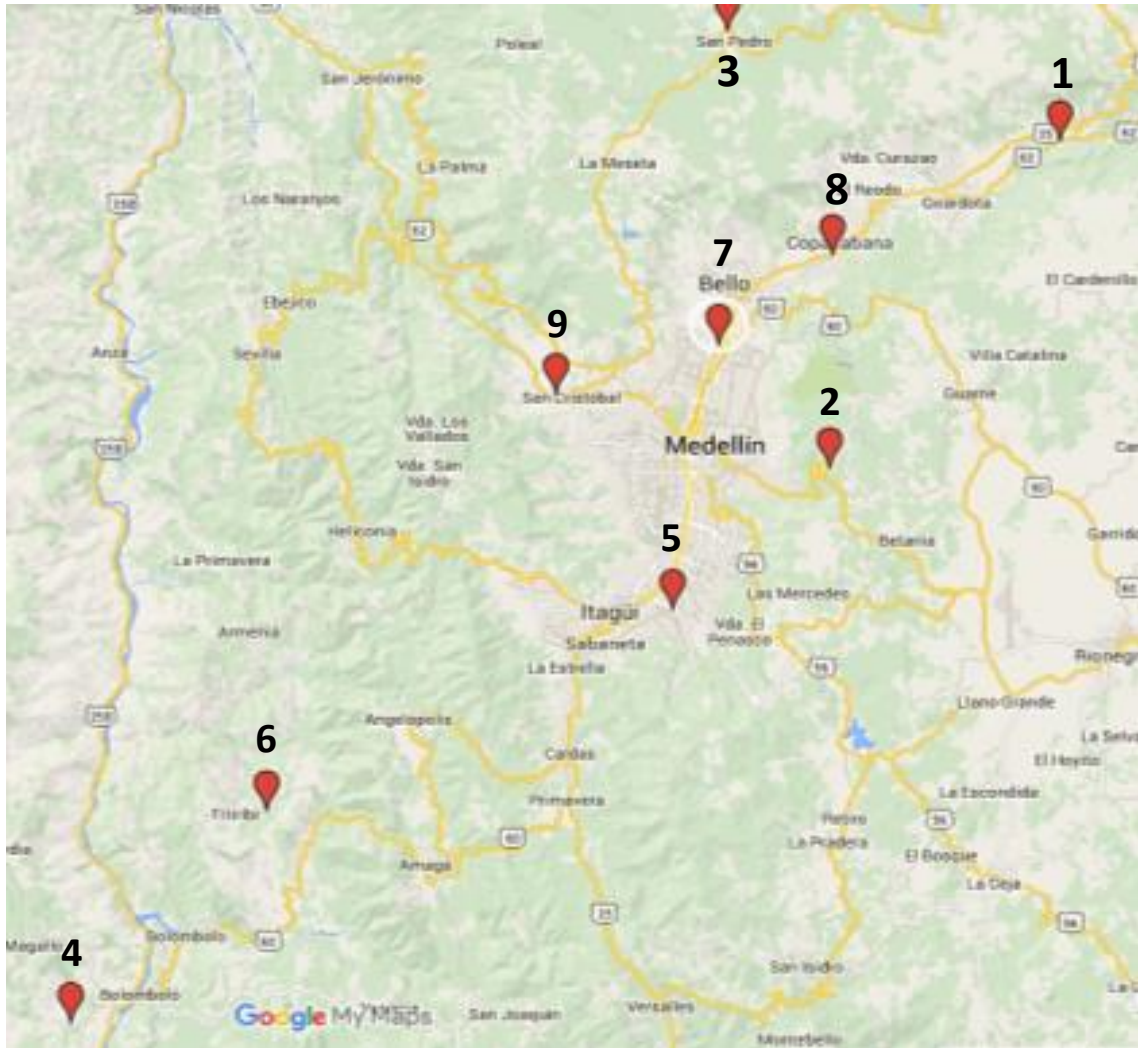


Figura 1. Localización de los caballos del estudio según su ubicación en el departamento de Antioquia.

Tabla 3. Número de individuos estudiados, distribuidos según localización geográfica y condiciones medioambientales, en el departamento de Antioquia.

	Número de individuos	Localización	Pluviosidad (mm/año)	Altura sobre el nivel del mar (m)	Temperatura ambiental (C°)	Coordenadas
<b>Cluster 1</b>	32	El Hatillo, Barbosa	2000	1300	25	6°26'15"N 75°19'50"O
<b>Cluster 2</b>	2	Santa Elena, Medellín	2200	2500	14,5	6°14'41"N 75°34'29"O
<b>Cluster 3</b>	14	San Pedro de los Milagros	1800	2468	14	6°27'34"N 75°33'28"O
<b>Cluster 4</b>	20	Salgar	2170	1250	19	5°57'50"N 75°58'39"O
<b>Cluster 5</b>	8	Envigado	2000	1575	22	6°10'19"N 75°34'49"O
<b>Cluster 6</b>	3	Titiribí	2285	1550	29	6°03'45"N 75°47'37"O
<b>Cluster 7</b>	3	Zona urbana, Medellín	1656	1495	22	6°14'41"N 75°34'29"O
<b>Cluster 8</b>	6	Copacabana	1604	1454	21	6°20'55"N 75°30'37"O
<b>Cluster 9</b>	15	San Cristóbal, Medellín	1656	1800	15	6°14'41"N 75°34'29"O

#### 4.3.2 Animales

El estudio fue aprobado por el Comité de ética en experimentación animal de la Universidad de Antioquia, mediante acta número 3082013.

La muestra fue seleccionada por conveniencia, según la disposición de los propietarios para permitir la realización de la evaluación gastroscópica. En total fueron evaluados 103 equinos de razas diversas (figura 2), con un peso corporal promedio de  $347,7 \pm 61,8$  Kg, edad promedio de  $9 \pm 4,9$  años, de ambos sexos (hembras: 59 (vacías: 58; gestantes: 1)), machos: 44 (enteros: 27; castrados: 17)), tanto en pastoreo (45) como estabulados (58) (figura 3). La condición corporal (cc) de los animales se distribuyó así: 9 animales tenían cc baja (entre 1/9 y 4/9), 90 animales tenían cc ideal (entre 5/9 y 7/9) y 7 animales tenían cc alta (entre 8/9 y 9/9) (Hennecke et al., 1983).



Los animales estabulados fueron alojados en pesebreras individuales, con cama de viruta de madera y abrevadero individual. Los animales en pastoreo fueron alimentados con grama natural, no fueron suplementados con concentrado en ninguno de los casos.

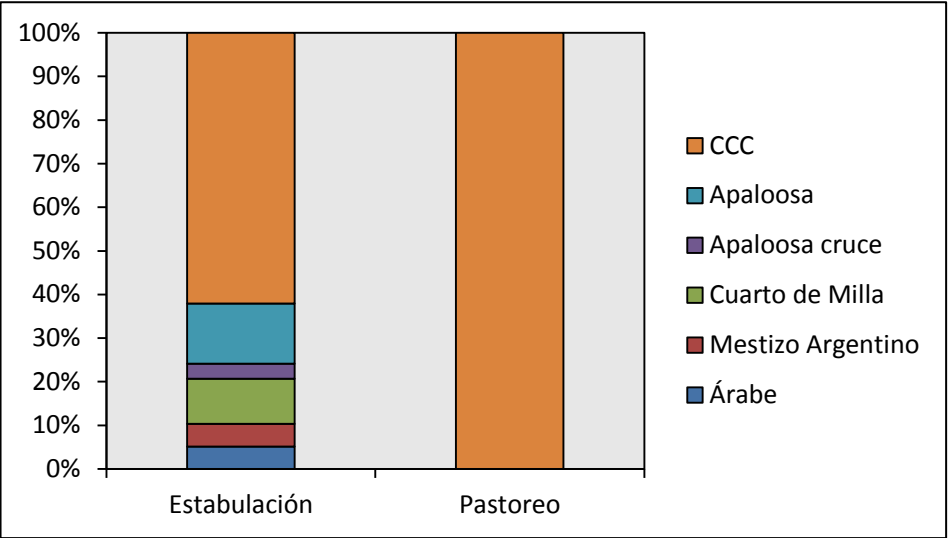


Figura 2. Distribución de los caballos estudiados, según tipo de explotación y raza. CCC= Caballo Criollo Colombiano.

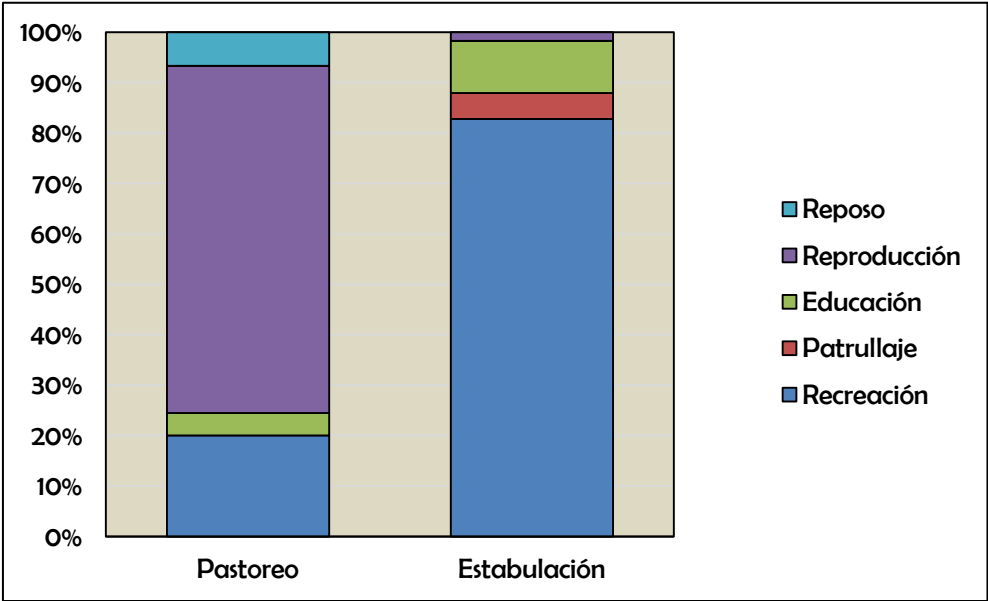


Figura 3. Distribución de los caballos estudiados, según tipo de explotación y actividad física

#### 4.3.3 Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo descriptivo prospectivo de corte transversal, a través de un muestreo por conveniencia.

#### 4.3.4 Esofago-gastro-duodenoscopia

Se realizó endoscopia de tracto digestivo anterior, previo ayuno de 12 y 4 horas para alimentos sólidos y líquidos, respectivamente. Se realizó sedación con xilacina al 10% (Anased®, laboratorios Lloyd, Iowa, EEUU) (0,5mg/kg/IV). Posteriormente, se realizó la endoscopia mediante un sistema de video endoscopio (PortaScope®, 1800PVS, Bradenton, FL, USA) de 300 cm de longitud y 12 mm de diámetro externo. Los hallazgos macroscópicos fueron grabados en video y clasificados según la escala de clasificación del grado de lesiones gástricas propuesto por MacAllister et al.,(1997) (tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de las lesiones gástricas según MacAllister et al.,(1997).

<b>Grado</b>	<b>Descripción</b>
<i>Según el número de lesiones</i>	
0	No se evidencian lesiones
1	1 a 2 lesiones localizadas
2	3 a 5 lesiones localizadas
3	6 a 10 lesiones
4	Mayor a 10 lesiones o lesiones difusas (o de gran tamaño)
<i>Según severidad de las lesiones</i>	
0	No se evidencian lesiones
1	Apariencia superficial (solo pérdida de la mucosa)
2	Estructuras más profundas involucradas (más profundas con relación al grado 1)
3	Lesiones múltiples y de severidad variable (1,2 y/o 4)
4	Similar al grado 2 y con apariencia activa (lesión activa= cráter hiperémico y/u oscurecido)
5	Similar al grado 4 además de hemorragia activa o coágulo adherido a la lesión

El procedimiento endoscópico inició con el examen de faringe y se continuó con el esófago insuflando eventualmente la luz, con el fin de examinar el estado de la mucosa. Seguidamente, se examinó el cardias, previamente al ingreso al estómago. Una vez posicionada la sonda en el estómago, se realizó insuflación del mismo hasta lograr la distensión suficiente para examinar la mucosa gástrica. El recorrido en estómago comprendió la evaluación del saco ciego gástrico en la porción correspondiente a mucosa escamosa a lo largo de la línea de la curvatura mayor, simultáneamente se examinó el *Margo plicatus*; luego se evaluó la mucosa glandular en su porción fúndica hasta lograr retornar en retroflexión y evaluar de esta manera el cardias y la curvatura menor, tanto en mucosa escamosa como glandular. Finalmente, la sonda se dirigió hacia el antro pilórico y píloro. En algunos casos fue posible ingresar a la primera porción del duodeno (Murray, 2002).

Durante el recorrido se instiló agua para mejorar la visualización de la mucosa gástrica. Una vez realizada la evaluación gastroscópica y clasificación de lesiones, se tomaron biopsias de la mucosa gástrica a través de la inserción (por el canal de trabajo) de una pinza flexible para biopsias con puntas ovales y mandíbulas articuladas para aprisionamiento y corte por tracción de muestras de aproximadamente de 3x3mm. Se tomaron biopsias provenientes de mucosa escamosa (saco ciego), *Margo plicatus* (curvatura mayor), mucosa glandular (fundus) y antro pilórico. Se tomaron 3 biopsias de cada porción descrita, para la realización de prueba rápida de ureasa (PRU), análisis histopatológico y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (estudio posterior), siendo para esta última conservadas en nitrógeno líquido.

#### 4.3.5 Histopatología

Las muestras obtenidas fueron fijadas con solución tamponada de formol al 10%. Luego fueron procesadas según técnicas convencionales de inclusión en parafina y cortadas a 5µm. Las muestras fueron teñidas con coloración de hematoxilina y eosina (H&E) y coloración especial de Wright- Giemsa, con el fin de resaltar la presencia de bacterias espiraladas compatibles con *Helicobacter* spp. Las lesiones

encontradas fueron clasificadas según Martineau et al., (2009). Las muestras fueron evaluadas en el laboratorio de Patología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia.

No fueron sometidas a evaluación histopatológica la totalidad de las muestras debido a que solo algún porcentaje de ellas resultó apto para la fijación en parafina, una vez que la dimensión de la pinza de biopsia no sobrepasaba los 3mm y la naturaleza del tejido no permitieron su procesamiento.

#### 4.3.6 Prueba Rápida de Ureasa (PRU)

Para realizar la prueba rápida de ureasa, se elaboró un caldo de urea modificado (Ortíz et al., 2007), compuesto por agua destilada 500 ml, urea 100% (Merck, Darmstadt, Germany) 10 g, rojo fenol 0.005 g, ácido clorhídrico al 97% 0.2 ml; el pH resultante fue 7. El caldo fue alicuotado en volúmenes de 0.5 ml, y depositado en crioviales de 2 ml; cada biopsia tomada fue sumergida completamente en el caldo y rotulada según el paciente y la porción del estómago correspondiente. Las muestras en el caldo se incubaron a temperatura ambiente durante 12 horas, momento hasta el cual se realizó lectura de la reacción.

La reacción de ureasa consistió en disponer un medio rico en urea que además contenía un indicador de pH, en este caso rojo fenol. Cuando se sumergió una fuente de la enzima ureasa (en este caso microorganismos con actividad ureasa), ésta se encargó de hidrolizar la urea presente en el medio; la liberación de amonio y dióxido de carbono resultantes de la reacción alcalinizó el medio y produjo cambio de color desde el amarillo (negativo) hacia el rojo-fucsia intenso, indicando reacción positiva a la actividad ureasa (figura 4).

Con el fin de validar la efectividad del caldo se utilizó un inóculo de un microorganismo con actividad ureasa positiva (*Proteus* spp.). Se tomaron veinte muestras de mucosa glandular por duplicado para ser sometidas a caldo urea y agar urea, con el fin de validar el resultado entre ambos medios.

El agar urea fue compuesto por un gel base (Urea agar Base Christensen® Merck Millipore, MA, USA) 3.6 g, Sal de urea (Carlo Erba Reagents SAS, Chaussée du Vexin, FR) 7.5 g, y 5 gotas de ácido clorhídrico al 97%.

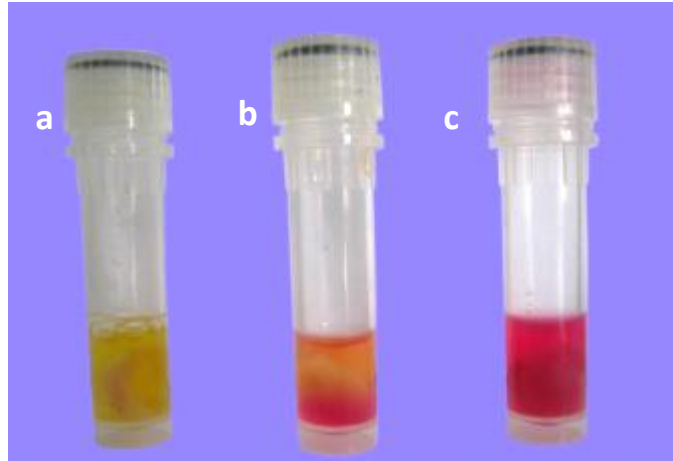


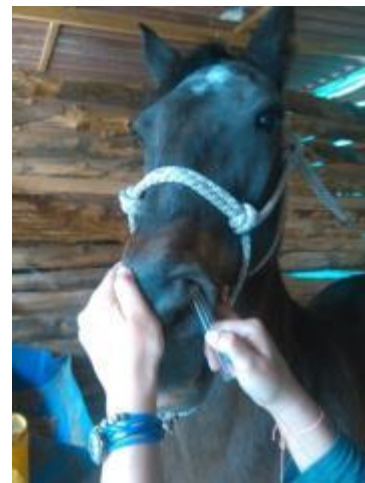
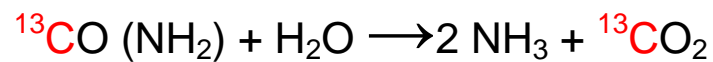
Figura 4. Imagen demostrativa de los resultados: negativo, positivo débil y positivo a la prueba rápida de la ureasa, a partir de biopsias gástricas de algunos caballos del estudio. a= reacción negativa; b=reacción positiva débil; c=reacción positiva

#### 4.3.7 Prueba del aliento (Urea Breath Test - UBT)

La prueba de aliento con urea marcada consiste en la cuantificación de las copiosas cantidades de ureasa producida por *Helicobacter* spp. (originalmente diseñada para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*); este último es encargado de hidrolizar la urea para formar amoníaco y dióxido de carbono soluble, los cuales son exhalados en el aliento. El marcaje de la urea con el isótopo permite su detección en el aliento. Cuando *H. pylori* está presente, la cantidad relativa de  $\text{CO}_2^{13}$  incrementa considerablemente, y a menudo excede a la medida del standard, el cual resulta en la expresión del “exceso” de  $\text{CO}_2$  excretado (Logan, 1998).

Se tomó aliento basal de cada equino, introduciendo un tubo de vidrio (Exetainer® Vial for  $^{13}\text{C}$  breathTesting, Labco limited, UK) en un ollar, se ocluyó simultáneamente el ollar contralateral, cuando el individuo espiró se cerró el tubo inmediatamente (figuras 5 y 6). Posteriormente, se suministró a cada individuo a través del canal de trabajo de la sonda del endoscopio, 50 mg de urea  $\text{C}^{13}$  (Lote U23001) diluida en 5 ml de agua aplicada directamente contra la mucosa gástrica. Seguidamente, 10 minutos después de suministrar el reactivo, se tomó el aliento en otro frasco de vidrio.

Cada tubo se leyó en espectrómetro de masas de relación isotópica (ABCA2 Automated Breath  $\text{CO}_2$  Analyser, Sercon® limited, UK). Se consideró positivo aquel resultado que evidenció cociente entre gases, mayor a  $2 \Delta$  (delta). La reacción química esperada es representada en la siguiente ecuación:



Figuras 5 y 6. Imagen que evidencia el método para obtención de aliento en tubo de vidrio en un caballo participante en el estudio.

La lectura de las pruebas de aliento fue llevada a cabo por el Laboratorio Clínico Hematológico en la ciudad de Medellín.

#### 4.3.8 Encuesta

La información de la anamnesis y de manejo fue obtenida a través de una encuesta personal con el cuidador de cada animal. Por otro lado, la información sobre presencia o ausencia del SUGE se obtuvo a través de la evaluación endoscópica. Con este fin fue elaborado un formulario en el software *Microsoft Access*® 2013. Las variables incluidas en el estudio obtenidas tanto a través de la encuesta como de la evaluación endoscópica y pruebas diagnósticas, fueron condensadas en la tabla 5.

Tabla 5. Variables evaluadas y sus categorías, utilizadas durante el estudio.

1. Caracterización	2. Medicación e historial médico	3. Actividad física	4. Alimentación
a. Edad (años) b. Raza c. <b>Sexo</b> d. <b>Peso calculado (Kg)</b> e. Condición fisiológica <i>Hembra vacía</i> <i>Hembra gestante</i> <b>Macho entero</b> <b>Macho castrado</b>  f. Condición corporal (Hennecke et al., 1983)  g. Hallazgos examen clínico	a. Tipo de cólico padecido recientemente <i>Resolución médica</i> <i>Resolución médica reincidente</i> <i>Resolución quirúrgica</i>  b. Uso de antiinflamatorios no esteroides (AINEs) c. Duración último tratamiento con AINEs (semanas)	a. Frecuencia actividad física (veces/día) b. Frecuencia actividad física (veces/semana) c. Aptitud zootécnica <i>Recreación</i> <i>Educación</i> <i>Reproducción</i> <i>Patrullaje</i> <i>Reposo</i>  d. Duración Actividad física (horas/actividad) e. Número de horas de permanencia dentro de pesebrera	a. Dieta <i>Forraje</i> <i>Forraje + concentrado</i> <i>Forraje + concentrado + heno</i>  b. Número de raciones/día c. Suministro de suplementos d. Disponibilidad agua <i>(Ad libitum/según ración)</i>  e. Mecanismo de suministro de agua <i>(abrevadero/automatizado/manual)</i>  f. Volumen de concentrado suministrado (Kg/día)
5. Clasificación de lesiones ulcerativas en estómago (MacAllister et al., 1997)	6. Pruebas diagnósticas de actividad ureasa		
a. Mucosa escamosa b. Mucosa glandular c. <i>Margo plicatus</i> d. Antro pilórico e. Hallazgos macroscópicos	a. Prueba rápida de la ureasa (PRU) <i>Positivo</i> <i>Negativo</i>  b. Prueba de aliento con úrea C <sup>13</sup> marcada (UBT) <i>Positivo</i> <i>Negativo</i>  c. Histopatología (Martineau et al., 2009)		



#### 4.3.9 Análisis estadístico

##### *Estadística descriptiva*

Se realizó estadística descriptiva (frecuencia absoluta y relativa, gráficos de distribución en barras y circular) para las variables edad, raza, sexo, tipo de actividad física, histopatología y las variables del grupo “Clasificación de lesiones ulcerativas en estómago”, utilizando *Microsoft Office Excel*<sup>®</sup> 2013.

##### *Análisis de asociación*

Las variables fueron re-categorizadas, posteriormente fueron sometidas a análisis de asociación. El análisis fue realizado para determinar los factores asociados con la presentación de ulceración grado  $\geq 2$  (severidad) en cada una de las porciones del estómago, clasificadas según MacAllister et al., (1997). Este análisis fue realizado con el software *STATA 13*<sup>®</sup>. En la construcción de las tablas cruzadas se tuvo en cuenta que cuando algunas de las casillas contenían menos de 5 observaciones se realizó test de Fisher, por el contrario, cuando todas las casillas contenían más de 5 observaciones se llevó a cabo test de chi cuadrado de Pearson.

##### *Sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas*

Para determinar la capacidad de las pruebas diagnósticas para detectar verdaderas reacciones ureasa positiva se realizó una comparación de curvas COR, entre PRU, UBT y agar urea (*gold standard*). Este análisis fue realizado con el software *EPIDAT*<sup>®</sup> V 3.1.

##### *Regresión logística*

Las variables de los grupos caracterización, actividad física y alimentación fueron sometidas al análisis de regresión logística, considerando como variable respuesta la presencia de lesiones ulcerativas grado  $\geq 2$  (severidad) según MacAllister et al., (1997), para cada una de las porciones de estómago que fueron seleccionadas. Con el fin de determinar el riesgo dentro de los grupos de individuos de una misma

ubicación geográfica, fueron divididos en *clusters* (Figura 1). Para la realización de este análisis fue utilizado el software *STATA 13*<sup>®</sup>.

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Frecuencia de SUGE

El 69% de los animales estudiados presentó al menos una lesión compatible con SUGE, en al menos una porción gástrica. Se encontró una amplia variedad de lesiones a la endoscopia en los animales estabulados, la gastritis fue el hallazgo más frecuente con un 36%, seguida de la hiperqueratosis del MP con un 25% y la hiperemia de esta misma región con un 17%. Para los animales en pastoreo fue llamativa la ausencia de lesiones en el 49% de las observaciones, mientras que respecto a las lesiones encontradas en este grupo de animales la hiperqueratosis del MP fue frecuente en un 38%. Los resultados de las evaluaciones gastroscópicas se presentan en las figuras 7, 8 y 9. Durante el examen endoscópico no se encontraron lesiones que comprometieran el esófago de los caballos evaluados.

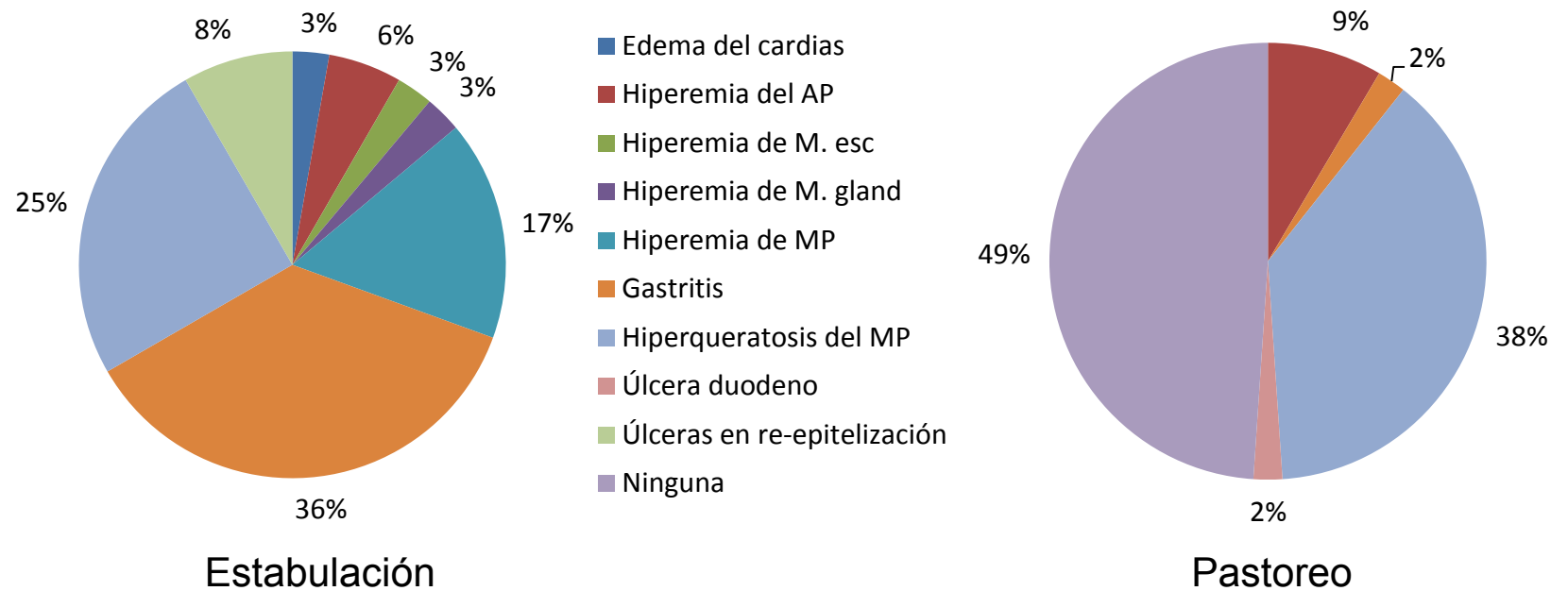


Figura 7. Distribución de lesiones gástricas macroscópicas (gastroscopia) diferentes a úlceras gástricas activas, en cada uno de los subgrupos de caballos estudiados en el presente trabajo. AP= Antro pilórico; M. esc= mucosa escamosa; M. gland= mucosa glandular; MP= Margo plicatus.

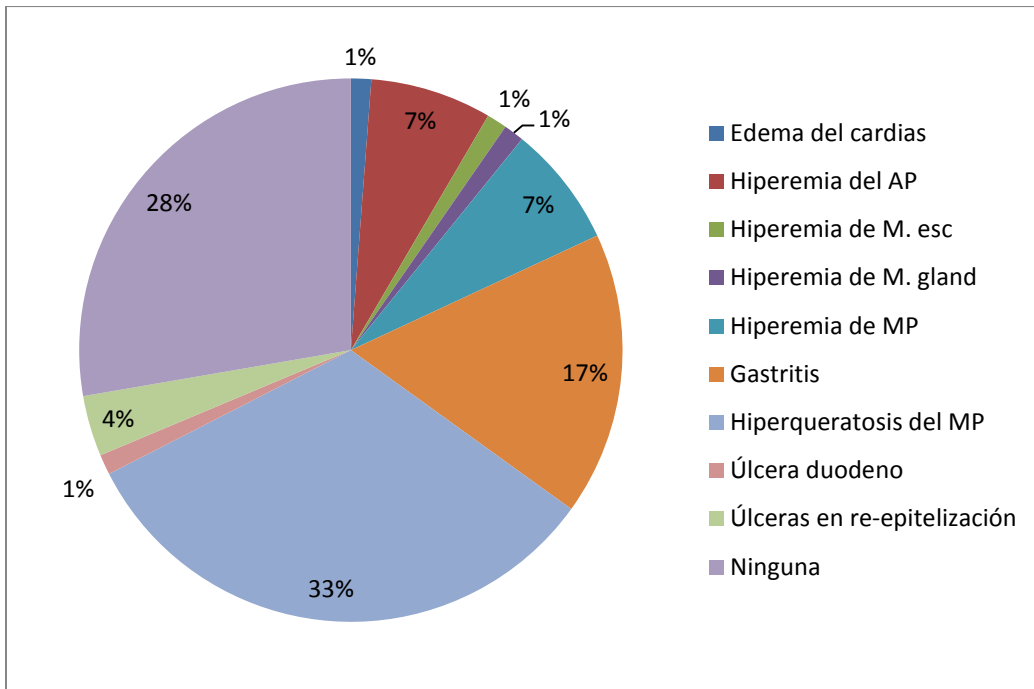


Figura 8. Distribución de lesiones gástricas diferentes a úlceras gástricas activas en el total de caballos estudiados. AP= Antro pilórico; M. esc= mucosa escamosa; M. gland= mucosa glandular; MP= Margo plicatus.

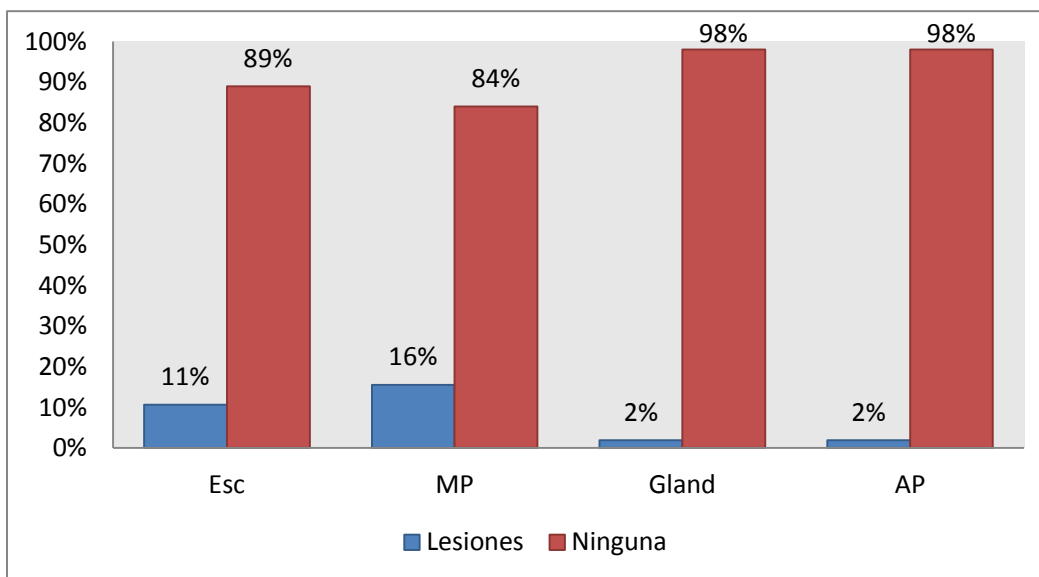


Figura 9. Distribución de la proporción de lesiones gástricas  $\geq 2$  (severidad), según porción del estómago de la población de caballos del estudio. Esc= Mucosa escamosa; MP= *Margo plicatus*; Gland= Mucosa glandular; AP= Antro pilórico.

La tabla 6 muestra la distribución de la frecuencia de lesiones según tipo de explotación y porción gástrica, sin embargo, cabe anotar que estas frecuencias no se encuentran agrupadas considerando presentación de lesiones simultáneas en más de una porción gástrica.

Tabla 6. Frecuencia de lesiones ulcerativas, según porción gástrica y tipo de explotación, en el grupo de caballos evaluados en el estudio.

	<b>Porción gástrica</b>	<b>n</b>	<b>Número de individuos afectados</b>	<b>%</b>	<b>DP</b>
<b>General</b>	al menos una porción involucrada	103	71*	69	-
<b>Población</b>	M. esc	103	23	22.3	-
	MP	102	40	39.2	1
	M. gland	103	19	18.6	-
	AP	76	23	30.3	27
<b>Pastoreo</b>	M. esc.	45	4	8	-
	MP	45	22	48.8	-
	M. gland.	45	7	15.5	-
	AP	31	11	35.5	14
<b>Estabulados</b>	M. esc.	58	19	32.7	-
	MP	57	18	31.6	1
	M. gland.	58	12	21	-
	AP	45	12	37.5	13

\*= al menos 1 porción gástrica afectada, independientemente del grado de lesión.

M. esc= mucosa escamosa; MP= *Margo plicatus*; M. gland= mucosa glandular; AP= Antro pilórico; DP= Datos perdidos

#### 4.4.2 Hallazgos histopatológicos

##### *Correspondencia entre hallazgos histológicos y endoscópicos*

En el lado izquierdo de la figura 10, se observa la apariencia macroscópica de las lesiones gástricas encontradas a través de gastroscopia, al lado derecho se encuentra el resultado del estudio histopatológico realizado a la misma porción. Como puede notarse a simple vista la severidad de las lesiones evidenciadas microscópicamente no reflejan estrictamente los hallazgos macroscópicos (gastroscopia) (figura 10); se encontró un comportamiento similar cuando se comparó el diagnóstico histopatológico, la presencia de infiltrado leucocitario y la evaluación macroscópica de cada individuo y porción gástrica (tabla 7).

El servicio de patología animal de la Universidad de Antioquia recomendó utilizar la coloración Wright-giemsa para mejorar la visualización de cambios en el tejido gástrico además de enfatizar la presencia de bacterias curvo-espinaladas, sin embargo, la literatura indica la utilización de la tinción Warthin-starry para este fin (Cardona et al., 2009b).

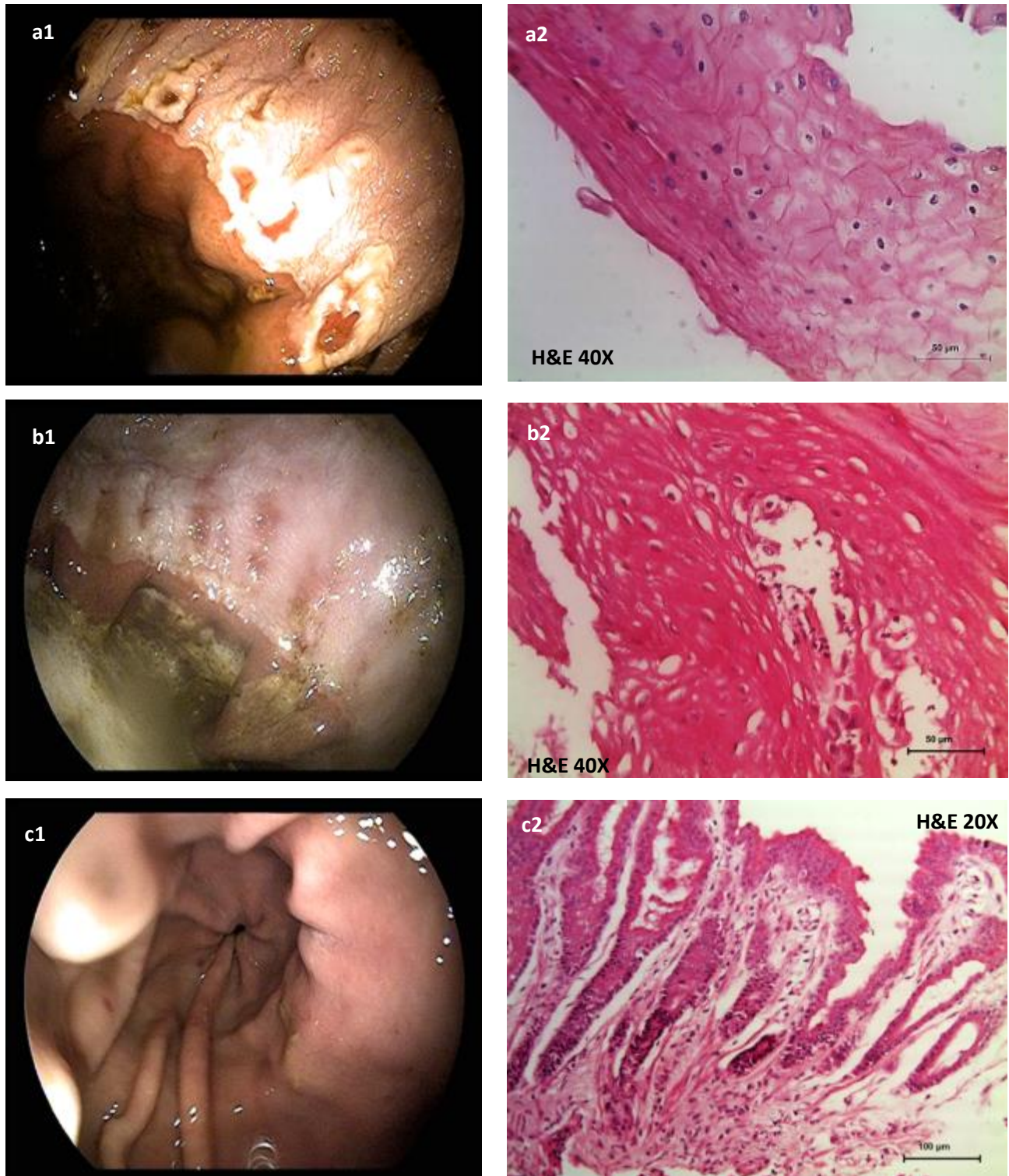


Figura 10. Fotografías de hallazgos macroscópicos (gastroscopia) y microscópicos (histopatología) de lesiones gástricas en algunos de los caballos estudiados. a1=



úlceras gástricas grado 4/5 (severidad) en *Margo plicatus* porción escamosa. a2= apariencia microscópica de una porción de tejido gástrico tomado del estómago que aparece en a1. El epitelio se evidencia intacto, no es posible observar lámina propia. b1=úlceras gástricas grado 1/5 (severidad) en *Margo plicatus* porción escamosa. b2= apariencia microscópica de una porción de tejido gástrico tomado del estómago que aparece en b1. Es evidente la degeneración balonoide (o hidrópica, que consiste en acumulación de agua en el citoplasma que desplaza las organelas hacia la periferia de las células, dándole la apariencia de encontrarse separado el núcleo de la membrana) del epitelio gástrico, además de la presencia de abundantes leucocitos polimorfonucleares. c1= Lesiones ulcerativas grado 1/5 (severidad) en antro pilórico. c2= apariencia microscópica de una porción de tejido gástrico tomado del estómago que aparece en c1. Se evidencia importante hiperplasia glandular, presencia de fibrosis, dilatación glandular eventual, células germinales abundantes y presencia de leucocitos mononucleares.

Se sometió a análisis histopatológico 34 biopsias provenientes de 23 animales. Se distribuyeron según porción del estómago como sigue: Mucosa escamosa =7, *Margo plicatus*= 11, Mucosa glandular= 11, Antro pilórico= 5. Se encontró que, en ocasiones a pesar de no resultar diagnóstico final, algunas muestras evidenciaron procesos inflamatorios, infecciones leves, o incluso degeneración del epitelio gástrico (Tabla 7).

Cuando se confrontaron los diagnósticos histopatológicos con los hallazgos a la gastroscopia, se encontró que aquellos estómagos que fueron clasificados con lesiones  $\geq 2$  (severidad), no evidenciaron en su mayoría lesiones histológicas, en contraste con aquellos estómagos cuya clasificación macroscópica no superaba el grado 1, para los cuales fue notoria la cantidad de hallazgos anormales a la histopatología (tabla 8).

Tabla 7. Hallazgos de la evaluación histopatológica de biopsias obtenidas a través de endoscopio en el grupo de caballos evaluados durante el estudio.

Muestra	Células inflamatorias			Cambios reactivos		Agentes infecciosos o folículos linfoides	Diagnóstico	Otros hallazgos
	Tipo	Densidad	Localización	Escamosa	Glandular			
Mucosa escamosa				hiperplasia			ninguno	
Paciente 1							ninguno	
Paciente 2							ninguno	
Paciente 3							ninguno	
Paciente 4						Levaduras escasas en la luz	ninguno	
Paciente 5				hiperqueratosis		Levaduras	gastritis crónica hiperplásica	espongiosis marcada
Paciente 6				paraqueratosis			ninguno	degeneración balonoide severa
Paciente 7							ninguno	espongiosis / degeneración balonoide
Mucosa glandular							ninguno	
Paciente 1	linfo/macro/neut	leve	difuso				ninguno	
Paciente 4					hiperplasia		gastritis crónica	
Paciente 5	macro/eos	leve					ninguno	focos de fibrosis
Paciente 6							linfaedema	edema y linfangiectasia
Paciente 8							ninguno	edema moderado
Paciente 9	linfocitos	leve					ninguno	núcleos pignóticos y citoplasma eosinófilico
Paciente 10	linfocitos	leve					ninguno	
Paciente 11					hiperplasia	Bacterias Gram negativas	gastritis crónica	edema
Paciente 12	linfo/macro/neut	leve	difuso		fibrosis e hiperplasia		gastritis crónica activa (leve)	
Paciente 13	linfo	leve	difuso		hiperplasia	Bacterias Gram negativas en luz glandular	gastritis crónica	edema
Paciente 14	mono/eos	leve	difuso		hiperplasia		gastritis crónica	fibrosis discreta
Margó plicatus								
Paciente 7	mono/eos	leve				Cocos y bacilos no espiralados	gastritis no exudativa	linfangiectasia y edema
Paciente 10						Bacterias Gram negativas en luz glandular	ninguno	
Paciente 11	mononuclear	Moderado	difuso			Bacterias Gram negativas en luz glandular	ninguno	
Paciente 12					hiperplasia	Bacterias Gram negativas en luz glandular	gastritis crónica activa	edema
Paciente 14							ninguno	
Paciente 15					erosión		gastritis crónica	
Paciente 16	neut/linf/plasmoc	leve			erosión/hiperplasia		gastritis crónica	degeneración balonoide y pústulas
Paciente 17					paraqueratosis		gastritis crónica	degeneración balonoide y congestión leve
Paciente 19	linfo/macro/neut/eos	leve	difuso		hiperqueratosis/acantosis	hiperplasia	gastritis crónica hiperplásica	espongiosis leve
Paciente 20	macro/neut	leve				hiperplasia	ninguno	cambios vacuolares
Paciente 21	mononuclear	leve			hiperplasia		ninguno	degeneración vacuolar
Antro pilórico								
Paciente 5	macro/eos	leve					ninguno	
Paciente 7							ninguno	
Paciente 19	mononuclear	leve					ninguno	
Paciente 22							ninguno	fibrosis discreta
Paciente 23					hiperplasia		gastritis crónica	

Neut= neutrófilos; linfo= linfocitos; macro= macrófagos; mono= mononuclear; eos= eosinófilos; plasmoc= plasmocitos

Tabla 8. Diagnóstico histopatológico y clasificación macroscópica de lesiones gástricas según individuo y porción gástrica, en un subgrupo de caballos provenientes de la población de estudio.

	Individuo	Diagnóstico histopatológico	Otros hallazgos microscópicos	Clasificación de lesiones		Observaciones a los hallazgos gastroscópicos
				Número	Severidad	
Mucosa escamosa	Paciente 1	ninguno		0	0	Ninguna
	Paciente 2	ninguno		0	0	Ninguna
	Paciente 3	ninguno		0	0	Ninguna
	Paciente 4	ninguno		2	1	Ninguna
	Paciente 5	gastritis crónica hiperplásica	espongiosis marcada	0	0	Ninguna
	Paciente 6	ninguno	degeneración balonoide severa	1	1	Úlcera en re-epitelización
	Paciente 7	ninguno	espongiosis / degeneración balonoide	0	0	Ninguna
Mucosa glandular	Paciente 1	ninguno		0	0	Ninguna
	Paciente 4	gastritis crónica		0	0	Ninguna
	Paciente 5	ninguno	focos de fibrosis	0	0	Gastritis
	Paciente 6	linfaedema	edema y linfangiectasia	0	0	Ninguna
	Paciente 8	ninguno	edema moderado	1	1	Ninguna
	Paciente 9	ninguno	núcleos pignóticos y citoplasma eosinofílico	2	1	Ninguna
	Paciente 10	ninguno		0	0	Ninguna
	Paciente 11	gastritis crónica	Edema	0	0	Ninguna
	Paciente 12	gastritis crónica activa (leve)		0	0	Ninguna
	Paciente 13	gastritis crónica	Edema	1	1	Ninguna
Paciente 14	gastritis crónica	fibrosis discreta	1	1	Ninguna	
Margo plicatus	Paciente 7	gastritis no exudativa	linfangiectasia y edema	3	3	Ninguna
	Paciente 10	ninguno		2	2	Ninguna
	Paciente 11	ninguno		2	2	Ninguna
	Paciente 12	gastritis crónica activa	Edema	1	2	Ninguna
	Paciente 14	ninguno		0	0	Ninguna
	Paciente 15	gastritis crónica		0	0	Ninguna
	Paciente 16	gastritis crónica	degeneración balonoide y pústulas	0	0	Ninguna
	Paciente 17	gastritis crónica	degeneración balonoide y congestión leve	0	0	Ninguna
	Paciente 19	gastritis crónica hiperplásica	espongiosis leve	1	1	Hiperqueratosis
	Paciente 20	ninguno	cambios vacuolares	0	0	Ninguna
	Paciente 21	ninguno	degeneración vacuolar	0	0	Hiperqueratosis
Antro pilórico	Paciente 5	ninguno		2	1	Ninguna
	Paciente 7	ninguno		2	1	Ninguna
	Paciente 19	ninguno		1	2	Ninguna
	Paciente 22	Ninguno	fibrosis discreta	0	0	Ninguna
	Paciente 23	gastritis crónica		0	0	Ninguna

#### 4.4.3 Análisis estadístico

##### 4.4.3.2 Análisis de asociación

Las variables que contaron con dos categorías fueron sometidas a análisis de asociación: sexo (hembra o macho), raza (caballo criollo colombiano u otra), disponibilidad de agua (*ad libitum* o según ración), suministro de concentrado (mayor o igual a 4 kg/día y menor a 4 kg/día), número de horas de permanencia dentro de pesebrera (mayor o igual a 12 horas y menor a 12 horas), mecanismo de suministro de agua (manual y automático). Las variables sexo y raza fueron aplicadas a todos los individuos, las restantes fueron aplicadas únicamente a los animales en estabulación. Los resultados de este primer análisis se consignan en la tabla 9.

Tabla 9. Asociación (valor p) entre las variables sexo, raza, suministro de concentrado, permanencia dentro de pesebrera, mecanismo de suministro de agua, disponibilidad de agua y SUGE, según porción gástrica del grupo de caballos de la población de estudio.

Variable	SUGE	SUGE	SUGE	SUGE
	Esc	MP	Gland	AP
Sexo	0.522	0.157	*	*
Raza	0.698	0.353	*	1
Suministro de concentrado	0.650	<b>0.032</b>	0.293	*
Permanencia dentro de pesebrera	0.725	26.94	*	1
Mecanismo de suministro de agua	0.706	1	*	0.511
Disponibilidad de agua	0.106	14.28	*	1

SUGE Esc= Lesiones gástricas con grado de severidad  $\geq 2$  localizadas en la mucosa escamosa; SUGE MP= Lesiones gástricas con grado de severidad  $\geq 2$  localizadas en el *margo plicatus*; SUGE Gland= Lesiones gástricas con grado de severidad  $\geq 2$  localizadas en la mucosa glandular; SUGE AP= Lesiones gástricas con grado de severidad  $\geq 2$  localizadas en antro pilórico. \* = Variables que por ausencia de observaciones en alguna de las casillas de la tabla cruzada no fueron analizadas.

El suministro de concentrado parece ser un factor asociado a la presentación de lesiones ulcerativas grado  $\geq 2$  (severidad) en el *margo plicatus* ( $p=0.032$ ).

En el análisis de correlación se encontró las variables sexo y condición fisiológica comportarse de manera similar ( $r=0.95$ ), por lo tanto, se eligió la variable condición fisiológica para llevar a cabo los análisis de regresión logística.

#### 4.4.3.2 Regresión logística

##### *Regresión logística univariable (ante)*

Cada variable sometida a análisis fue ajustada según el riesgo por *cluster*, tanto para la mucosa glandular como la mucosa escamosa, conforme se indica en las tablas 10 y 11 respectivamente.

Tabla 10. Riesgo de desarrollar lesiones ulcerativas grado  $\geq 2$  (severidad) en la mucosa glandular en la población de estudio. Análisis de regresión logística univariable.

	OR	Valor p	IC (95%)	
			Liminf	Limsup
<b>Aptitud zootécnica</b>	2,353	<b>0,085</b>	0,888	6,233
<b>Edad</b>	0,446	0,494	0,044	4,507
<b>Sexo</b>	*	*	*	*
<b>Raza</b>	1,37e+09	0,997	*	*
<b>Condición fisiológica</b>	0,572	0,524	0,102	3,191
<b>Condición corporal</b>	30,002	<b>0,025</b>	1,525	590,444
<b>Disponibilidad agua</b>	3,69e-09	0,996	*	*
<b>Dieta</b>	5,911	0,254	0,279	125,021

\* = Variables que por contener muy bajo número de observaciones, no fueron analizadas por el software.

Cuando se evaluaron las variables de interés y su efecto sobre la aparición de SUGE en mucosa glandular se encontró que la aptitud zootécnica y la condición corporal son factores candidatos a convertirse en factores asociados ( $p < 0.25$ ); cuando se realizó el análisis multivariante para SUGE en mucosa glandular y las dos variables significativas, la condición corporal continuó siendo significativa ( $p = 0.025$ ).

Tabla 11. Riesgo de desarrollar lesiones ulcerativas grado  $\geq 2$  (severidad) en la mucosa escamosa en la población de caballos del estudio. Análisis de regresión logística univariable.

	OR	Valor p	IC (95%)	
			Lim inf	Lim sup
Aptitud zootécnica	0,712	0,466	0,285	1,776
Edad	1,615	0,283	0,673	3,876
Sexo	0,709	0,634	0,173	2,914
Raza	1,652	0,615	0,234	11,660
Condición fisiológica	0,947	0,838	0,559	1,602
Condición corporal	3,283	0,278	0,384	28,091
Disponibilidad agua	0,237	0,100	0,043	1,320
Dieta	5,759	<b>0,001</b>	2,020	16,419

Se encontró que la dieta es un factor presuntamente asociado con la presentación de lesiones ulcerativas grado  $\geq 2$  (severidad) en la mucosa escamosa. Cuando se evaluó en detalle el riesgo de desarrollar SUGE en mucosa escamosa según tipo de dieta, se evidenció que es significativamente asociado el suministro de forraje y concentrado ( $p=0.003$ ) en comparación con las dietas que suministran únicamente forraje o adicionan heno. Los resultados de este análisis se describen en la tabla 12.

Tabla 12. Detalle de análisis de regresión logística para la variable “Dieta”, con relación a SUGE en mucosa escamosa de la población de caballos del estudio.

	OR	Valor p	IC	
			Lim inf	Lim sup
<b>Forraje+concentrado+heno</b>	4.51	0.186	0.48	42.10
<b>Forraje+concentrado</b>	29.3	<b>0.003</b>	3.14	274.2

Para el caso de las lesiones ulcerativas de importancia clínica localizadas en el *margo plicatus*, se evidenció que la condición corporal y la dieta, son factores presuntamente asociados (tabla 12). Con el fin de confirmar los resultados del

modelo univariable, se realizó regresión logística multivariable para las variables encontradas como asociadas a SUGE en *margo plicatus* (Tabla 14).

Tabla 13. Riesgo de desarrollar lesiones ulcerativas grado  $\geq 2$  (severidad) en la región del *margo plicatus* de la población de caballos del estudio. Análisis de regresión logística univariable.

	OR	Valor p	IC (95%)	
			Liminf	Limsup
<b>Aptitud zootécnica</b>	0,739	0,465	0,328	1,663
<b>Edad</b>	1,130	0,745	0,537	2,383
<b>Sexo</b>	1,180	0,780	0,353	3,982
<b>Raza</b>	1,812	0,496	0,328	10,010
<b>Condición fisiológica</b>	1,175	0,486	0,747	1,849
<b>Condición corporal</b>	6,459	<b>0,069</b>	0,865	48,258
<b>Disponibilidad agua</b>	0,606	0,502	0,140	2,620
<b>Dieta</b>	2,619	<b>0,012</b>	1,233	5,562

Tabla 14. Análisis de regresión logística multivariable para SUGE en *margo plicatus*.

	OR	Valor p	IC (95%)	
			Liminf	Limsup
<b>Condición corporal</b>	3,51	0,196	0,52	23,58
<b>Dieta</b>	2,13	<b>0,067</b>	0,95	4,78

Se encontró que la dieta impactó la aparición de lesiones ulcerativas en el *margo plicatus*. Con el fin de esclarecer en qué grado, cada dieta está involucrada con el SUGE en MP, se llevó a cabo la regresión logística en detalle para esta variable (Tabla 15).

Tabla 15. Detalle de análisis de regresión logística para la variable “Dieta”, con relación a SUGE en *margo plicatus* en la población de caballos del estudio.

Dieta	OR	Valor p	IC (95%)	
			Liminf	Limsup
<b>Forraje+concentrado+heno</b>	3,70	0,063	0,930	14,77
<b>Forraje+concentrado</b>	6,99	<b>0,016</b>	1,429	34,29

En comparación con el consumo único de forraje, el consumo de dietas que contengan concentrado promueve la aparición de lesiones ulcerativas grado  $\geq 2$  (severidad) en el *margo plicatus*, siendo mayor el riesgo de desarrollarlas en aquellos animales que no son alimentados con heno o forraje únicamente. No fue encontrada ninguna relación entre las variables descritas y la aparición de úlceras grado  $\geq 2$  (severidad) en el antro pilórico (tabla 16).

Tabla 16. Riesgo de desarrollar lesiones ulcerativas grado  $\geq 2$  (severidad) en el antro pilórico de la población de caballos del estudio. Análisis de regresión logística univariable.

	OR	Valor p	IC	
			Liminf	Limsup
<b>Aptitud zootécnica</b>	0,63	0,601	0,112	3,56
<b>Edad</b>	1,802	0,449	0,392	8,280
<b>Sexo</b>	2.35e-08	0,996	*	*
<b>Raza</b>	1,548	0,727	0,133	17,940
<b>Condición fisiológica</b>	*	*	*	*
<b>Condición corporal</b>	0,999	1,000	0,022	46,506
<b>Disponibilidad agua</b>	2	0,577	0,175	22,886
<b>Dieta</b>	0,711	0,699	0,127	3,993

\* = Variables que por contener muy bajo número de observaciones, no fueron analizadas por el software.



#### 4.4.3.3 Sensibilidad y especificidad de las pruebas de actividad ureasa

Con el fin de evaluar la sensibilidad de las pruebas para detección de actividad ureasa, se comparó los resultados de 20 muestras de estómagos sometidas a PRU y agar urea, adicionalmente se realizó UBT en los animales de los cuales provenían tales muestras. La figura 11, muestra que no se evidencia una distancia significativa entre la línea patrón (diagonal) y las curvas de PRU y UBT evaluadas, lo que indica que los resultados son atribuibles al azar y no a la correspondencia con el *gold standard* (prueba  $\chi^2=0,1728$ ; valor  $p=0,6777$ ). El análisis de curva COR, demostró que ni PRU y UBT son sensibles para la detección de actividad ureasa (tabla 16), cuando se les comparó con el *gold standard* (agar urea) utilizado en el laboratorio de microbiología veterinaria de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia.

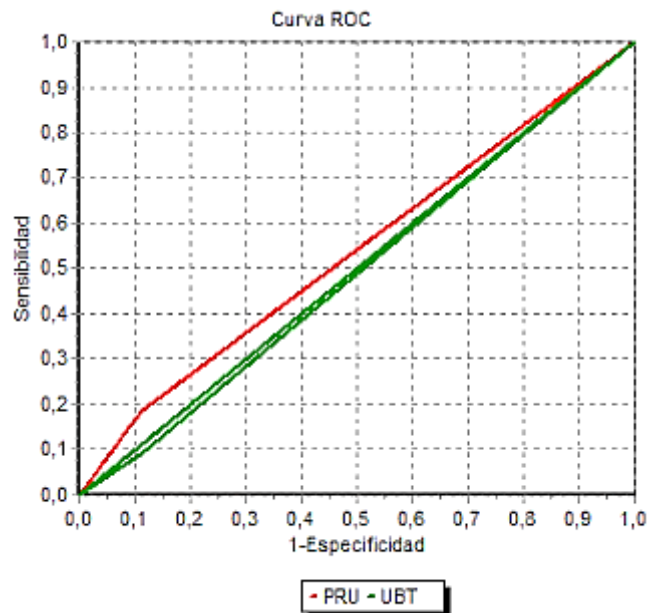


Figura 11. Curva COR para la evaluación de la sensibilidad y especificidad de dos pruebas para detección de actividad ureasa: PRU y UBT. Nivel de confianza: 95%

Tabla 17. Área bajo la curva, error estándar e intervalo de confianza para dos pruebas de detección de actividad ureasa PRU y UBT.

Curva	Área COR	EE (DeLong)	IC (95%)	
PRU	0,5354	0,0825	0,3737	0,6970
UBT	0,4899	0,0718	0,3492	0,6306

La tabla 18 muestra en detalle los resultados para cada una de las pruebas realizadas, según individuo. Cabe anotar que se eligió fragmentos de la mucosa glandular, puesto que se considera que es la porción donde se lleva a cabo principalmente la infección por *Helicobacter spp.* No fue posible establecer una relación entre las pruebas PRU y UBT, tampoco entre cada una de ellas y la reacción ureasa en agar urea.

Tabla 18. Resultados de reacción ureasa evaluada mediante PRU, UBT y agar urea, en 20 muestras de estómago provenientes de la porción glandular de un subgrupo de caballos elegidos a partir de la población de estudio.

Muestra	M. Glandular (PRU)	M. Glandular (AGAR UREA)	UBT
1	Positivo débil	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	Positivo	Positivo	Negativo
5	Negativo	Positivo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Positivo
7	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo
10	Positivo	Positivo débil	Positivo
11	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Positivo	Negativo
13	Negativo	Positivo	Negativo
14	Negativo	Positivo débil	Negativo
15	Negativo	Positivo	Negativo
16	Negativo	Positivo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Positivo débil	Negativo
19	Negativo	Positivo débil	Negativo
20	Negativo	Positivo débil	Negativo

Cuando se evaluó la capacidad de PRU para predecir la ulceración gástrica, fue evidente que en ninguna circunstancia la frecuencia de positivos se inclinó hacia aquellos individuos que presentaron ulceración  $\geq 2$  (severidad). La mayor frecuencia de reacciones ureasa positivas para las porciones mucosa escamosa y antro pilórico se concentró en aquellas lesiones clasificadas como grado 0 (severidad), en contraste con las porciones *Margo plicatus* y mucosa glandular en las cuales la mayor frecuencia de reacciones ureasa fueron negativas para las lesiones clasificadas como grado 0 (severidad) (Figura 12).

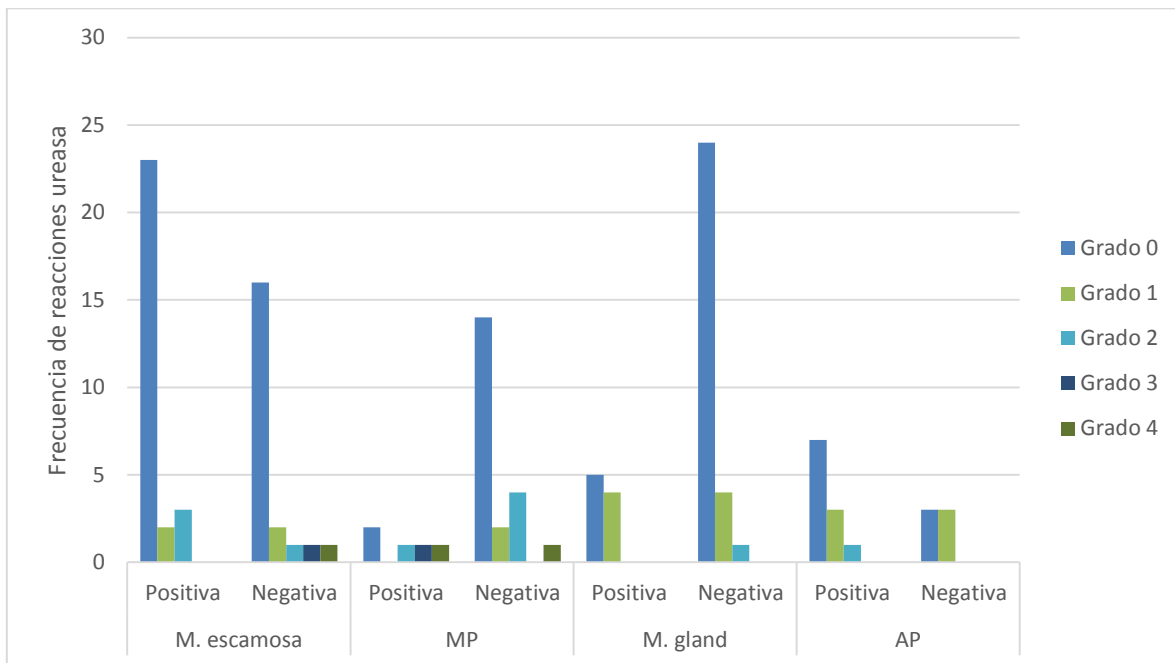


Figura 12. Distribución de las lesiones gástricas según grado (severidad), porción gástrica y reacción a la prueba rápida de la ureasa, en el grupo de caballos de la población de estudio.

#### 4.5 Discusión

El presente estudio permitió conocer la situación del SUGE en una población de equinos de la región Valle de Aburrá y municipios aledaños. Esta información no se encontraba disponible hasta ahora, por lo tanto los resultados del estudio son de gran utilidad en la medicina veterinaria aplicada a los equinos de nuestro contexto. Adicionalmente, fue posible aplicar algunas técnicas de diagnóstico microbiológico para *Helicobacter* spp. que son utilizadas de manera rutinaria en humanos.

##### *SUGE*

Algunas variables fueron eliminadas del análisis estadístico puesto que no eran conocidas a plenitud por los cuidadores de los animales. Tales variables fueron las correspondientes al grupo “medicación e historial médico”, y otras como: “frecuencia de actividad física”, “duración de actividad física”, “suministro de suplementos”. Por otro lado, la variable “Número de raciones al día” no tuvo ninguna variación en animales estabulados, siempre correspondió a 3. “Hallazgos al examen clínico” y “peso” fueron utilizadas para establecer la viabilidad de la sedación, y posterior realización de la endoscopia.

El protocolo de sedación a base de xilacina al 10%, fue efectivo en todos los estudios gastroscópicos, una vez que permitió a los animales permanecer en estación y permitió además la realización de todos los procedimientos, sin reportarse efectos adversos antes, durante y después del examen. Lo anterior evidenció el uso alternativo de xilacina a la detomidina recomendada en la mayoría de trabajos de la misma naturaleza, considerando que en el país es de fácil acceso en comparación con la detomidina.

El tiempo de ayuno utilizado coincidió con el tiempo recomendado por la literatura (Murray, 2002), sin embargo, se evidenció que algunos animales requerían mayor tiempo e incluso lavado gástrico previo a la gastroscopia; esta situación puede interferir en la evaluación de la superficie gástrica y conllevar a perder datos importantes para el análisis estadístico, adicionalmente, implica no llevar a término

la evaluación gastroscópica en un paciente para el cual podría ser de relevancia médica.

Las úlceras más severas fueron encontradas adyacentes al MP justo como se reporta en la literatura adyacente a la curvatura menor (Camacho y Andrews, 2015; MacAllister et al., 1997; Murray y Eichorn, 1996). También fueron comunes las lesiones ulcerativas en la mucosa escamosa. Aunque la frecuencia de SUGE en MP para animales en pastoreo fue superior, cabe anotar que la clasificación de las mismas no superó el grado 2 (severidad), mientras que algunas de las lesiones halladas en MP de animales estabulados fueron clasificadas como grado 4 (severidad).

Las úlceras gástricas grado 2 o mayores (severidad) implican pérdida de la capa mucosa del estómago, esta situación conduce a exposición de tejido muscular, que no está especializado en soportar condiciones químicas irritantes como las que posee el jugo gástrico y el reflujo duodenal, conllevando a potencial pérdida de tejido muscular y predisponiendo al estómago a sufrir ruptura gástrica; por las razones expuestas las lesiones gástricas clasificadas según su severidad como grado  $\geq 2$  se consideraron de importancia clínica.

Llama la atención la frecuencia de lesiones gástricas encontrada por este trabajo en comparación con otros estudios de naturaleza similar; esta situación puede estar influenciada por la dificultad que en ocasiones se presenta para evaluar la porción más caudal del estómago (mucosa glandular y antro pilórico) haciendo que la evaluación no se lleve a término y la frecuencia sea subestimada; Luthersson et al., (2011) encontraron úlceras gástricas grado  $\geq 2$  en mucosa glandular en dos poblaciones de equinos: 54.6% de un grupo de 97 caballos daneses y 45.6% en una población de 25 caballos pura sangre español, en contraste el presente trabajo encontró 48.9% de lesiones gástricas en mucosa glandular y AP independiente del grado; aunque las frecuencias descritas no corresponden al mismo grado de daño según su severidad, si dan cuenta de una participación protagónica del SUGE en estas porciones del estómago, diferente a lo que convencionalmente se ha discutido.

La comparación de frecuencias se dificulta entre estudios puesto que los sistemas de clasificación difieren entre ellos. En el caso del presente trabajo, se utilizó un sistema detallado y por tanto la información se hizo densa al momento de procesar el análisis estadístico. Este sistema se consideró importante para estudios de investigación, pero complejo para evaluaciones clínicas de rutina, prefiriéndose en los casos clínicos el uso de los sistemas más simples para la determinación de la extensión, intensidad e características de las lesiones ulcerativas.

Un estudio llevado a cabo en caballos destinados a la enseñanza deportiva universitaria encontró una frecuencia de 11% de lesiones ulcerativas en mucosa escamosa, adicionalmente determinó como factores significativamente asociados la edad y el sexo de los animales (Chameroy et al., 2006). En contraste, el presente estudio encontró 22.3% de lesiones en mucosa escamosa y 39.2% en *margo plicatus*, además no se encontró asociación entre sexo y presentación de lesiones en la mucosa escamosa ( $p=0.522$ , según test de Fisher) o el *margo plicatus* ( $p=0.157$ , según Test de  $\chi^2$ ) (tabla 9). Cabe resaltar que la caracterización deportiva de los animales evaluados por Chameroy et al. (2006), incluyó segmentación por tipo de actividad reportando mayor severidad de lesiones en aquellos animales que se utilizaron para el polo; por otro lado, se encontró que la mucosa escamosa fue la menor agredida en comparación con el presente estudio, sugiriendo que la actividad física en las diferentes poblaciones susceptibles de estudio es determinante para el patrón de aparición de SUGE. El estudio desarrollado en equinos de deporte universitario mostró que la edad estuvo asociada con la aparición de SUGE en esta población de estudio, sin embargo cabe anotar que los rangos de edad fueron muy amplios, agrupando todos los animales muy jóvenes y adultos jóvenes en el mismo grupo (animales en entrenamiento o deporte activo) y animales gerontes, lo que pudo llevar a cargar el grupo de animales jóvenes como el mayormente afectado.

Un estudio realizó un modelo de regresión logística lineal similar al del presente trabajo, para explorar los factores que presuntamente explicaron la aparición de SUGE en un grupo de caballos atletas no activos en Dinamarca; sus resultados

coincidieron cuando se encontró que la dieta es el factor determinante en la presentación de SUGE en la mucosa escamosa (tablas 11 y 12) (Luthersson et al., 2009b; Luthersson y Nielsen, 2009) tal y como se encontró en este estudio. Cabe anotar que ambos estudios utilizaron el mismo criterio de “caso” y la misma escala de clasificación de lesiones gástricas, lo que hace a este hallazgo mayormente comparable.

La presencia de alimento concentrado en la dieta de los caballos se ha considerado como factor predisponente para la ulceración gástrica puesto que su inclusión en la alimentación está relacionada con altos y constantes niveles de gastrina en sangre, adicionalmente, por contener altas cantidades de carbohidratos no estructurales es un sustrato potencial para fermentación por parte de bacterias residentes en el estómago del caballo; esta situación lleva a disminución del pH gástrico que combinado con altos niveles de AGV llevan a ulceración (Andrews et al., 2005). Según los hallazgos estadísticos, cuando se comparó el riesgo de desarrollar úlcera gástrica  $\geq 2$  (severidad) en mucosa escamosa, se encontró que aquellos animales cuya dieta incluía concentrado están mayormente a riesgo en comparación con aquellos que consumen únicamente forraje. Dietas que a pesar de contener concentrado, están adicionadas con heno, previenen el desarrollo de úlceras en comparación con dietas que no lo incluyen (Tabla 15) (Nadeau et al., 2000). Esto probablemente debido a la producción de saliva estimulada por la masticación de este alimento fibroso (heno), saliva que al ser deglutida a su vez, actúa como sustancia tampón en el estómago (Merritt, 1999), además de contener EGF salival que favorece la re-epitelización rápida de la mucosa.

Es bien conocido que cambios en la proporción de AGV adicional a una disminución en pH gástrico son factores ulcerogénicos debido a la alteración en el transporte de sodio desde las células del epitelio gástrico, causando edematización (Nadeau et al., 2000). Sin embargo, también ha sido descrita la participación de las sales biliares provenientes del reflujo duodenal, en la homeostasis electrolítica del epitelio gástrico, coadyuvando a la aparición de

úlceras, principalmente de la porción escamosa (Berschneider et al., 2010). Durante este estudio fue posible evidenciar reflujo duodenal en el antro pilórico de todos los individuos, encontrando inclusive tal cantidad en algunos de ellos, que dificultaba la observación de la mucosa glandular y del mismo antro pilórico, por esa razón en la tabla 6 se registraron algunos datos perdidos en esta región del estómago; es probable que este mecanismo de ulcerogénesis latente, también esté participando en los caballos evaluados en este trabajo.

Hubiese sido de impacto conocer en detalle la composición de las dietas de los animales de estudio, puesto que algunos individuos consumían ingredientes adicionales a los reportados por los propietarios (evidenciados durante la endoscopia) que pudieron influir sobre el estado de la mucosa gástrica, este es el caso de la suplementación con zanahoria, la cual contiene altos niveles de calcio y técnicamente es protectora para la mucosa escamosa (Nadeau et al., 2000; Craig, 2007; Videla y Andrews, 2009; Reese y Andrews, 2009), conforme otros autores lo han confirmado con el uso de nutraceuticos para la prevención y tratamiento del SUGE (Andrews, 2005). Andrews et al., (2005), afirmaron que las dietas protectoras para el desarrollo de úlceras son aquellas que están compuestas por altos niveles de proteína y calcio.

Considerando la secreción constante tanto de HCl como de sales biliares en el caballo, es importante considerar el ayuno dentro de los factores predisponentes a SUGE (Murray y Eichorn, 1996). Modelos experimentales usaron periodos prolongados de ayuno y suministro de AINEs con el fin de producir úlceras gástricas, los resultados sugieren que el ayuno actúa de forma sinérgica junto a los AINEs para producir daño de la mucosa gástrica (Martínez et al., 2014b; Zuluaga et al., 2016), esto probablemente debido al daño permanente del HCl en presencia de las sales biliares, en conjunto con depleción de mecanismos de citoprotección derivados de prostaglandinas y al aumento de estrés oxidativo. Aunque en el presente estudio no se evaluó el efecto del ayuno sobre la aparición de úlceras gástricas, si fue posible determinar que en caballos estabulados existe al menos intervalos entre raciones de 8 horas, mientras que los caballos en



pastoreo no sufrieron restricciones de este tipo, evidenciando menor prevalencia de lesiones ulcerativas y menor variedad de las mismas en comparación con los caballos en estabulación.

Es probable que el estómago en ayuno colapse y ponga en estrecho contacto la mucosa escamosa con el antro pilórico y el reflujo duodenogástrico, que a su vez contiene altas cantidades de enzimas. El reflujo duodenogástrico está influenciado por la motilidad duodenal, es importante entonces evaluar el tipo de dieta y otras condiciones químicas y nerviosas que afecten la peristalsis de éste (Merritt, 1999) y su relación con la aparición de SUGE. De similar forma es importante evaluar el tiempo de vaciamiento gástrico, puesto que ya se conoce que factores como el ejercicio submáximo o máximo lo retardan, y por tanto se le asocia con la aparición de lesiones ulcerativas (Camacho y Andrews, 2015). Infortunadamente, en el presente estudio no fue posible determinar la relación entre la actividad física y SUGE debido a la ausencia de información confiable como se mencionó anteriormente.

Otro efecto mecánico dilucidado y estudiado en caballos atletas de alto rendimiento, es el aumento de la presión abdominal durante la actividad física, lo que conlleva a mayores prevalencias de SUGE en el área escamosa de la mucosa (Lorenzo-Figueras et al., 2002). Posiblemente, la menor prevalencia de ulceraciones en este estudio comparadas con la literatura internacional, obedeció al tipo de actividad desarrollada por estos animales. Sin embargo, esta prevalencia fue mayor a la descrita para caballos que realizaban otras actividades físicas como recreación, show y patrullaje policial (Aranzales et al., 2012; Martínez et al., 2014; McClure et al., 1999; Wiedner et al., 2008); indicando la necesidad de evaluar factores propios de la raza y el tipo e intensidad del andar de los ejemplares que son objeto de investigación.

Se halló que la condición corporal está asociada con la aparición de lesiones ulcerativas en mucosa glandular ( $p=0.025$ ), en este caso es probable que la relación exista debido a que SUGE genera disminución de peso por producir enteropatía con pérdida de proteínas. Por otro lado, aunque no se encontró

factores asociados a la aparición de lesiones ulcerativas en AP, es importante tener presente que algunos datos como el uso de AINEs no fueron obtenidos en el presente estudio. Por otro lado, la correlación de signos clínicos e intensidad de úlcera es variable (Murray y Grodinsky, 1989), por consiguiente, la manifestación clínica puede estar ausente.

Tal como encontraron Al-mokaddem et al., (2014), el hallazgo macroscópico más importante fue la hiperqueratosis del *margo plicatus* con un 34% de los animales afectados, hallazgo similar para este estudio en el cual se encontró 33% de hiperqueratosis en la población general (25% en animales estabulados y 38% en animales en pastoreo). Adicionalmente, cuando se examinaron microscópicamente los estómagos en su porción escamosa, se evidenció acantosis con formación de “clavos” dirigiéndose hacia la lámina propia y degeneración vacuolar (37%) (Al-mokaddem et al., 2014). En contraste con otros autores, en el presente estudio no se evidenció erosión y ulceración en los cortes histológicos, esto probablemente debido a que no fueron realizadas biopsias múltiples de cada porción gástrica.

En comparación con los hallazgos de Al-mokaddem et al., (2014), no se encontró infiltrado leucocitario en las muestras de mucosa escamosa, sin embargo, el 50% de los fragmentos de mucosa glandular de este estudio evidenciaron algún tipo de infiltrado leucocitario compatible con procesos inflamatorios crónicos (mononucleares), cifra bastante similar a la encontrada en el estudio de asnos egipcios (49%). Por otro lado, fue evidente que los hallazgos histológicos y las lesiones macroscópicas no mostraron correspondencia, algunos fragmentos sin hallazgos anormales correspondían a porciones gástricas leve o severamente lesionadas macroscópicamente, y por el contrario aquellas porciones que a la endoscopia no evidenciaron lesiones serias fueron las que contaron con mayor número de hallazgos histológicos correspondientes a procesos de degeneración o inflamatorios; este hallazgo coincide con el estudio de Pietra et al., (2010), a partir del cual se determinó correlación entre hallazgos microscópicos de daño tisular y aparición de citocinas pro inflamatorias, correlación que no se repitió con el

diagnóstico macroscópico de SUGE; esto sugiere que a pesar de que macroscópicamente no se evidencie SUGE, se están llevando a cabo lesiones pre ulcerosas que al ser tempranamente analizadas podrían indicar daño próximo del epitelio y aparición de lesiones gástricas.

No fueron sometidas a evaluación histopatológica la totalidad de las muestras debido a que solo algún porcentaje de ellas resultó apto para la fijación en parafina, una vez que la dimensión de la pinza de biopsia no sobrepasaba los 3mm y la naturaleza del tejido no permitieron su procesamiento.

En el presente estudio no fueron encontrados parásitos gástricos, en comparación con otros estudios (Al-Mokaddem et al., 2015; Cardona et al., 2015b; Cardona et al., 2016), esto se debió posiblemente a que el método de exploración de los estómagos de otros autores incluían la eutanasia y la extracción del estómago, lo que facilitaba una inspección más detallada. Lo que podría considerarse dentro las limitantes de la evaluación gastroscópica descritas en equinos (Rodriguez et al., 2009). Por otro lado, el contexto en que habitan los caballos evaluados, se caracteriza por realizar frecuente suministro de antiparasitarios, con el fin de mantener una adecuada condición corporal; este aspecto puede estar asociado con la ausencia de parásitos gástricos en este grupo de animales. La ausencia de parásitos gástricos fue corroborada por la ausencia de polimorfonucleares eosinófilos en el análisis histológico de las piezas gástricas.

#### *Diagnóstico de Helicobacter spp.*

No se realizó PRU a todas las regiones del estómago de todos los animales, se consideró principalmente para aquellos que evidenciaban lesiones gástricas grado  $\geq 2$  (severidad). Tal como se evidenció en la figura 11 y la tabla 17, las pruebas de detección de actividad resultaron ser poco sensibles con respecto a la prueba de oro elegida (agar urea). Algunos resultados “positivo débil” en PRU también fueron positivos débiles para UBT, esto se explica en la helicobacteriosis, debido a que *Helicobacter pylori* al producir una lesión severa, tiende a disminuir la actividad

ureasa; este comportamiento de la prueba UBT se evidencia en humanos que aun siendo positivos y evidenciando cuadro clínico compatible con Helicobacteriosis, resultan positivos dudosos a UBT. Es posible que las pruebas de detección de actividad ureasa funcionen mejor en lesiones superficiales, debido a que a ese nivel no se ha producido disbiosis de los microorganismos comensales, en contraste, cuando existe lesión severa el sustrato para los microorganismos desaparece y estos finalmente disminuyen o mueren. Se ha reportado que la insuflación temporal del estómago durante la endoscopia interfiere con UBT debido a que la oxigenación artificial afecta la actividad ureasa, además, el pobre ayuno hace que exista interferencia entre los restos de alimento y la actividad ureasa (Campuzano, 2007), el volumen de reactivo utilizado pudo haber interferido en el desempeño de esta técnica puesto que no fue ajustado al volumen y superficie del estómago equino, además la ausencia de temperatura de incubación recomendada (37°C) (Campuzano, 2007); estos factores pueden explicar la aparición de posibles falsos negativos a UBT. La prueba UBT, en seres humanos ha mostrado una alta eficiencia en el diagnóstico de *Helicobacter pylori* (Campuzano, 2007a). Sin embargo, la utilización de la UBT en el equino no mostró resultados similares; además, existen factores químicos y microbiológicos que hacen que la evaluación de la actividad ureasa en estómago equino no sea una herramienta diagnóstica de helicobacteriosis y a su vez de SUGE. Como primera medida, no está claro cuál es la cantidad propicia de caldo urea y consecuentemente la cantidad mínima de unidades formadoras de colonia (UFC) de un microorganismo ureasa positivo para lograr reacción positiva en el tiempo que se tiene estipulado para su lectura; esta incertidumbre hace que se haga necesario un acercamiento diferente a esta prueba en campo. Sin embargo, Valenzuela y Luzio (2004), sugieren una cantidad mínima de  $10^5$  bacterias por test para evidenciar reactividad durante las siguientes 48 horas; de cualquier manera, no se menciona la cantidad óptima de caldo urea para que esta premisa se cumpla.

Por otra parte, se conoce que existen otros microorganismos productores de ureasa en estómago de equinos tales como *Proteus miribialis*, *Pseudomona*

*aureginosa* (Belli et al., 2003), *Klebsiella spp* y *Yersinia spp* (Cardona, 2009) que pueden confundir los resultados de los test de actividad ureasa y por tanto los hace poco concluyentes para la determinación de *Helicobacter spp*.(Cardona et al., 2009).Se ha encontrado *Lactobacillus salivarius* y *Sarcina ventriculi*, tanto en mucosa gástrica equina sana como en lesiones ulcerativas, además, en una lesión ulcerativa se encontró *Enterococcus faecium* y *Escherichia fergusonii* superficial e intraepitelial respectivamente (Husted et al., 2010).

Por otro lado, *H. equorum*, que ha sido aislado específicamente de equinos, tanto sanos como enfermos, no cuenta con actividad ureasa (Hepburn, 2004), lo que sugiere que algunos de estos microorganismos pueden participar en la fisiopatología de SUGE y no ser encontrados utilizando pruebas de detección de actividad ureasa.

Otro problema con las pruebas de ureasa es la eventual acidez gástrica presente en pacientes con SUGE, esto se explica debido a la curva pH gástrico/actividad de la ureasa de *Helicobacter*, el pico de actividad ureasa ocurre a pH gástrico de 7.5, no hay actividad perceptible por debajo de pH 4.5 y a pH 4 la inactivación es irreversible (Hepburn, 2004) lo que significa que en aquellos individuos donde se presumió pH gástrico igual o menor a 4 la prueba pudo resultar falsamente negativa a *Helicobacter*, en el caso del presente estudio no fue medido el pH en las diferentes porciones del estómago, por lo tanto esta información no pudo ser corroborada. Es ideal, verificar el pH gástrico, y relacionarlo con la aparición de úlceras en las diferentes regiones gástricas, además de su correspondencia con actividad ureasa (Camacho y Andrews, 2015).

Además, se ha encontrado que algunos factores epigenéticos (níquel como apoenzima) y genéticos como capacidad de ARNm de traducir suficientemente las órdenes de los genes reguladores de la producción de ureasa, influyen en la sensibilidad de las pruebas de detección de ureasa. La actividad ureasa intrabacterial del *Helicobacter* es regulada en por lo menos 3 vías: primero, una respuesta rápida vía activación de Urel; segundo, una respuesta más lenta basada en el incremento de la activación enzimática y tercero, una respuesta crónica de

RNA mensajero estimulando la síntesis de nueva ureasa; todos estos factores sugieren que es posible que existan microorganismos ureasa positivos como *Helicobacter* spp., inclusive participando en el SUGE, pero que podrían no ser fácilmente detectados por las pruebas de detección de ureasa.

Sería factible de considerar repetir las pruebas en condiciones idénticas para determinar su variabilidad y reproducibilidad (Riegelman y Hirsch, 1992) , o por ejemplo llevar a cabo análisis por duplicado. La variabilidad de una prueba también está dada por el estadio de la infección que cursa el paciente (Riegelman y Hirsch, 1992) y por el pH de la muestra *per sé* que puede retardar la reacción del rojo fenol; de modo que algunos falsos positivos y falsos negativos pueden encontrarse durante el desarrollo de las pruebas y la combinación de signos clínicos y evidencias paraclínicas recopiladas, son la mejor conducta para el diagnóstico de Helicobacteriosis en caballos. Además, se considera el diagnóstico molecular como instrumento clave al momento de esclarecer la presencia de *Helicobacter spp* en la mucosa gástrica de estos equinos.

Las dificultades para realizar aislamiento de *Helicobacter* spp para confirmar su participación en SUGE, hace que el estudio presente error tipo II, es decir, afirmar que el microorganismo no está relacionado con la presencia de lesiones gástricas cuando realmente si está asociado; sin embargo, la participación de otros microorganismos ureasa positivos, puede llevar a cometer errores de tipo I, asociando positividad con presentación de SUGE, cuando realmente su causalidad no es cierta. Sin embargo, varios trabajos han reportado la presencia de microorganismos compatibles con especies de *Helicobacter* tanto en mucosa gástrica intacta como ulcerada e inflamadas (Contreras et al., 2007), lo que ha generado controversia respecto de su participación en el SUGE. Por consiguiente, se continúa requiriendo estudios moleculares para determinar su relevancia en la patología gástrica de equinos, como es claro en seres humanos.

En este sentido, un estudio realizado en animales de abasto público en Chile encontró 65% de reacción ureasa positiva y la observación de bacterias curvo-espinaladas tipo *Helicobacter* en un grupo de estómagos ulcerados en fundus y

antro pilórico (Cardona et al., 2009a), mostrando mayores reacciones en el fundus, lo que difiere con lo reportado para otras especies. En contraste, el presente estudio evidenció actividad ureasa positiva en lesiones mayor o igual a 2 grados en el 6% de las mucosas escamosas, 4% en el *margo plicatus*, 6% en el antro pilórico y 0% en la mucosa glandular. Posiblemente esta diferencia obedeció a que no se consideró la discriminación de la mucosa escamosa en el trabajo de Cardona et al., (2009a). Estos hallazgos incentivan a más estudios específicos para la plena identificación de los microorganismos involucrados en estas reacciones.

Cardona et al., (2009b) establecieron que de los estómagos con úlceras superficiales el 17,5% presentaron gastritis crónica considerando que fueron positivos para por lo menos una prueba de actividad ureasa, mientras que para estómagos ulcerados grados 3 y 4 la presentación de gastritis crónica fue del 40%. A pesar de que en el presente trabajo los individuos cuyas biopsias fueron sometidas a PRU y agar urea no fueron los mismos individuos cuyas muestras resultaron aptas para estudio histopatológico, fue posible determinar que en el 83% de los individuos cuyo diagnóstico histológico fue gastritis crónica, el grado de ulceración no superó el grado 1 (severidad), mientras que solo el 17% de estos animales evidenciaron lesiones grado 2 (severidad) (tabla 8). Esto sugiere que en contraste con lo que encontró Cardona et al., (2009), los animales de este trabajo evidenciaron gastritis crónica más rápidamente; vale la pena considerar que los animales del presente trabajo no eran destinados al consumo y por tanto, no experimentaron periodos de ayuno o estrés muy prolongados. Por otro lado, no fue posible establecer correspondencia entre la presentación de infiltrado inflamatorio con el hallazgo de bacterias, tan solo el 20% de las muestras que mostraron algún grado de inflamación presentaron bacterias; ninguna de estas bacterias pareció ser del tipo espiralado, sin embargo, cabe recordar que *Helicobacter spp.* es pleomórfico y puede presentarse como un bacilo Gram negativo.

Aunque parece constante la presentación de gastritis crónica, se hace difícil establecer su relación con la actividad ureasa y por supuesto es más ambiguo el dato sobre su correspondencia con helicobacteriosis; adicionalmente, cabe anotar que Cardona et al., (2009a) no discriminó la actividad ureasa por mucosa considerando que hipotéticamente *Helicobacter* spp., tiene relevancia en la mucosa glandular, lo que coincidió con Bezdekova y Futas (2009), pero contrario a lo encontrado por Belli et al., (2003) y el presente trabajo, donde se obtuvieron reacciones positivas en la mucosa escamosa solamente. Estos hallazgos y la determinación de microorganismos compatibles con especies de *Helicobacter* sin correlación con cambios histopatológicos (Ekman et al., 2012) y tanto en mucosa ulcerada como no ulcerada, incentivan futuros estudios para dilucidar su participación, por ser un reconocido problema de salud pública en países en vías de desarrollo.

El presente estudio no determinó correspondencia entre lesiones gástricas y actividad ureasa (figura 12), es muy importante considerar que estos resultados son ambiguos debido a que las pruebas utilizadas (PRU y UBT) son poco sensibles en comparación con el agar urea (*gold standard*). Por lo tanto, no es adecuado referirse a la “prueba rápida de la ureasa” como “prueba diagnóstica” para *Helicobacter* spp., hace falta corroborar todo su perfil bioquímico y molecular para su correcta identificación, así como hace falta determinar el tiempo óptimo entre la colecta de la muestra y la introducción en el caldo urea. Además, faltan estudios sobre la determinación de zonas predilectas de crecimiento de bacterias espiraladas en la superficie gástrica del caballo para su aislamiento, conforme los hallazgos encontrados y reportados por otros autores.

El estudio histopatológico no reveló presencia de bacterias espiraladas, sin embargo, es preciso determinar si las formas bacterianas visualizadas corresponden bioquímica y genéticamente al género *Helicobacter*, puesto que ya es conocido que bajo condiciones particulares la forma de estas bacterias puede cambiar, mostrándose inclusive como bacilos o cocos (Owen, 1998). También es importante considerar que la literatura recomienda la tinción de Whartin Starry



como la más sensible para la detección de bacterias espiraladas como *Helicobacter* spp., por lo que la sensibilidad de otras tinciones como la utilizada en el presente trabajo (Wright-giemsa) disminuye la observación de estos microorganismos.

#### LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Los animales fueron seleccionados por conveniencia, debido a la prevención encontrada por parte de propietarios y cuidadores en permitir la realización de la evaluación gastroscópica. Por tanto, la aleatoriedad no se realizó, esto puede llevar a sesgo sistemático, y consecuentemente hace que el presente estudio deba ser interpretado y extrapolado con cuidado; por consiguiente, se debe considerar la realización de estudios aleatorizados, donde se pueda desestimar el valor de la variación individual.

#### 5. CONCLUSIONES GENERALES

- El SUGE se encuentra presente en el contexto colombiano con unas características similares a los reportes realizados a partir de animales utilizados en actividades de recreación.
- El factor de manejo mayormente asociado con la ulceración gástrica escamosa en el grupo de caballos estudiado es la dieta, con la participación del suministro de concentrado como punto crítico.
- Las pruebas de detección de actividad ureasa para el diagnóstico de *Helicobacter* spp. en caballos son ambiguas, y fácilmente interferidas por condiciones como pobre ayuno y presencia de microorganismos comensales con perfiles bioquímicos similares, no deben ser utilizadas para diagnosticar helicobacteriosis, para este fin es recomendable realizar diagnóstico molecular.
- El diagnóstico histopatológico debe estar apoyado en un muestreo múltiple en cada porción gástrica con el fin de lograr una mejor caracterización de los hallazgos, así como una prueba más específica como la tinción de Whartin Starry, que ayuda a resaltar la bacteria tiñéndola de marrón.

- Es recomendable realizar exámenes endoscópicos seriados, así mismo realizar análisis histopatológico consecutivo con el fin de evaluar la evolución de lesiones pre-ulcerosas que no son evidenciables macroscópicamente.

## 6. REFERENCIAS

- Adler I, Muiño A, Aguas S, Harada L, Diaz M, Lence A, Labbrozzi M, Muiño JM, Elsner B, Avagnina A, Denninghoff V. *Helicobacter pylori* and oral pathology: relationship with the gastric infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20(29):9922–35.
- Al-Mokaddem AK, Ahmed KA, Doghaim RE. Pathology of gastric lesions in donkeys: A preliminary study. *Equine Veterinary Journal*. 2015; 47(6):684–8.
- Andrews FM, Buchanan BR, Elliot SB, Clariday NA, Edwards LH. Gastric ulcers in horses. *Journal of Animal Science*. 2005; 83(13): SE18–21.
- Aranzales JRM, Cassou F, Andrade BSC, Alves GE. Presence of gastric ulcer syndrome in equine from the military police. *Archivos de Medicina veterinaria*. 2012; 44(2): 185-189.
- Baele M, Decostere A, Vandamme P, Ceelen L, Hellemans A, Mast J, Chiers K, Ducatelle R, Haesebrouck F. Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008; 58(6):1350–8.
- Bayona M, Gutiérrez A. Biopelícula: un mecanismo de supervivencia de *Helicobacter pylori*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2013; 16(2): 335-342.
- Belli C, Fernandes W, Silva L. Teste de urease positivo em equino adulto com úlcera gástrica-*Helicobacter* sp?. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2003; 70(1): 17-20.
- Berschneider H, Blikslager A, Roberts M. Role of duodenal reflux in nonglandular gastric ulcer disease of the mature horse. *Equine Veterinary Journal*. 2010; 31(S29): 24–29.
- Bezdekova B, Futas J. *Helicobacter* species and gastric ulceration in horses: a clinical study. *Veterinarni Medicina*. 2009; 54(12): 577–582.
- Bullimore S, Corfield P, Hicks S, Goodall C, Carrington S. Surface mucus in the non-glandular region of the equine stomach. *Research in Veterinary Science*. 2001; 70(2): 149–55.
- Camacho P, Andrews F. *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine*. St. Louis: Elsevier; 2015.
- Campuzano G. Diagnóstico no-invasivo de *Helicobacter pylori*: ¿serología, prueba de aliento con 13 C-urea o antígenos de *Helicobacter pylori* en materia fecal? *Medicina & Laboratorio*. 2007; 13(5-6): 211–231.
- Campuzano G. An optimized 13C-urea breath test for the diagnosis of *H. pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2007a;13(41):5454-64.
- Campuzano G. Pruebas de aliento basadas en sustratos marcados con carbono 13. *Medicina & laboratorio*. 2011; 17(1-2): 39 – 79.
- Campuzano G, Hoyos D, Calvo V, Suárez O, Lizcano D, Rojas C. Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en médicos de Medellín, Colombia. *Acta*

- gastroenterológica Latinoamericana. 2007; 37:99-103.
- Cardona J, Paredes H, Fernández H. Determinación de *Helicobacter spp.*, en úlceras gástricas en caballos. Revista MVZ Córdoba. 2009a; 14(3):1831-1839.
- Cardona A, Paredes H, Fernández H. Characterization histopatological of gastritis associated to *Helicobacter spp.* presence in stomachs of horses. Revista MVZ Córdoba. 2009b; 14(2): 1750–1755
- Cardona J, Alvarez J, Castaño L. Conceptos generales sobre ulceración gástrica de los caballos. Parte 1. Revista Colombiana Ciencias Animales. 2012; 4(1): 233–266.
- Cardona J, Vargas M, Blanco R. Frecuencia de patologías gástricas en caballos de trabajo (*Equus caballus*) en Córdoba, Colombia. Revista Científica. 2015a; 1(1): 386–394.
- Cardona Álvarez JA, Arroyave Vanegas V, Zapata Gil AF. Frecuencia de patologías gástricas en burros (*Equus africanus asinus*) en Córdoba, Colombia. Revista de Medicina Veterinaria. 2015b;(31): 23-34.
- Cardona JÁ, Álvarez A, Paredes E. Ocurrencia de miasis cavitaria equina (*Gasterophilus spp.*) y su relación con las úlceras gástricas secundarias en la mucosa escamosa en Temuco, Chile. Revista CES de medicina veterinaria y zootecnia. 2016; 11 (1): 78-87.
- Carvalho GD, Pinto PS, Viloria M, Nero LA. Aspectos Zoonóticos de *Helicobacter spp.* Bioscience Journal. 2008; 24(4): 121-130.
- Chameroy KA, Nadeau JA, Bushmich SL, Dinger JE, Hoagland TA, Saxton AM. Prevalence of non-glandular gastric ulcers in horses involved in a university riding program. Journal of Equine Veterinary Science. 2006; 26(5): 207–211.
- Contreras M, Morales A, García M, De Vera M, Bermúdez V, Gueneau P. Detection of Helicobacter-like DNA in the gastric mucosa of Thoroughbred horses. Letters in Applied Microbiology. 2007; 45(5): 553–7.
- Couroucé-Malblanc A, Maliverney C, Launois T, van Erck E, Pitel P, Fortier G. Haematology and biochemistry in horses with gastric ulcers: experimental study on 66 horses. Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association; 2009 Sept 24 – 27; Guarujá, SP, Brazil.
- Crayg TL. Gastric ulcer syndrome in exercising horses fed different types of hay. [Tesis de maestría]. Texas: Texas A & M University; 2007.
- Cruz JM, Montoya LM. Toxicity with phenylbutazone in a horse: a case report. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2011; 6(1):65–71.
- Cunningham J, Klein B. Fisiología veterinaria. Barcelona: Elsevier; 2009.
- Da Silva L. Macroscopic and microscopic aspects of the blood vascular system in equine stomachs [tesis doctoral]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
- De Souza MV, Bueno Martins da Costa M, De Oliveira Pinto J, Pereira da Silva JC, Dantas Ribeiro Filho J, Lopes Moreira JC. Lesões gástricas em equinos de

- abatedouro: avaliação macroscópica e histológica. *Ciência Rural*. 2014; 44(9): 1622–1628.
- Dimola S, Caruso M. *Helicobacter pylori* in animals affecting the human habitat through the food chain. *Anticancer Research*. 1998; 19(5B):3889-94.
- Dore MP, Bilotta M, Vaira D, Manca A, Massarelli G, Leandro G, Atzei A, Pisanu G, Graham D, Realdi G. High Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Shepherds. *Digestive Diseases and Sciences*. 1999; 44(6):1161–1164.
- Ekblad E, Mei Q, Sundler F. Innervation of the gastric mucosa. *Microscopy Research and Technique*. 2000; 48(5):241–57.
- Eurell JA. *Histology*. Jackson, Wyoming: Teton New Media; 2004.
- Fink C, Hembes T, Brehm R, Weigel R, Heeb C, Pfarrer C, Bergmann M, Kressin M. Specific localisation of gap junction protein connexin 32 in the gastric mucosa of horses. *Histochemistry and Cell Biology*. 2005; 125(3):307–313.
- Fox J, Lee A. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. *Laboratory Animal Science*. 1997; 47(3):222-55.
- Furr M, Taylor L, Kronfeld D. The effects of exercise training on serum gastrin responses in the horse. *The Cornell Veterinarian*. 1994; 84(1): 41–5.
- Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B, Chiers K, Baele M, Meyns T, Decostere A, Ducatelle R. Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009; 22(2):202–23.
- Harbour S, Sutton P. Immunogenicity and pathogenicity of *Helicobacter* infections of veterinary animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008; 122(3-4): 191–203.
- Hartmann AM, Frankeny RL. A preliminary investigation into the association between competition and gastric ulcer formation in non-racing performance horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2003; 23(12):560–561.
- Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*. 1983;15(4): 371–372.
- Hepburn R. Investigation into the Presence of *Helicobacter* in the equine stomach by urease testing and polymerase chain reaction and further investigation into the application of the <sup>13</sup>C-urea blood test to the horse. [tesis maestría]. Leesburg: Virginia Polytechnic Institute and State University; 2004.
- Hewetson M, Cohen N, Love S, Buddington RK, Holmes W, Innocent GT, Roussel A. Sucrose Concentration in Blood: A New Method for Assessment of Gastric Permeability in Horses with Gastric Ulceration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2006;20:388–394.
- Husted L, Jensen T, Olsen S, Mølbak L. Examination of equine glandular stomach lesions for bacteria, including *Helicobacter* spp by fluorescence in situ hybridisation. *BMC Microbiology*. 2010; 19:10-84.

- Jassim R, McGowan T, Andrews FM, McGowan CM. Gastric Ulceration in Horses The role of bacteria and lactic acid. Barton: Rural Industries Research and Development Corporation; 2008.
- Jeffrey SC, Murray MJ, Eichorn ES. Distribution of epidermal growth factor receptor (EGFr) in normal and acute peptic-injured equine gastric squamous epithelium. *Equine Veterinary Journal*. 2010; 33(6): 562–569.
- Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*. 2008; 135(1): 41–60.
- Le Jeune SS, Nieto JE, Dechant JE, Snyder JR. Prevalence of gastric ulcers in Thoroughbred broodmares in pasture: a preliminary report. *Veterinary Journal*. 2009; 181(3): 251–5.
- Logan RP. Urea breath tests in the management of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1998; 43 (S1): 47–50.
- Lorenzo-Figueras M, Jones G, Merritt AM. Effects of various diets on gastric tone in the proximal portion of the stomach of horses. *American Journal of Veterinary Research*. 2002, 63:1275-1278.
- Luthersson N, Harris P, Poulsen J, Soendergaard E, Malmkvist J, Parkin T. High prevalence of glandular ulcer within two large farms in two different countries. In: proceedings 10th International Equine Colic Research Symposium; July 26-28th 2011.
- Luthersson N, Nielsen K. The prevalence and anatomical distribution of equine gastric ulceration syndrome (EGUS) in 201 horses in Denmark. *Equine Veterinary Journal*. 2009; 41(7):619-24.
- Luthersson N, Nielsen KH, Harris P, Parkin TDH. Risk factors associated with equine gastric ulceration syndrome (EGUS) in 201 horses in Denmark. *Equine Veterinary Journal*. 2009; 41(7): 625–30.
- MacAllister CG, Andrews FM, Deegan E, Ruoff W, Olovson SG. A scoring system for gastric ulcers in the horse. *Equine Veterinary Journal*. 1997; 29(6):430-3.
- Majalca C, Rivera J, Ochoa S, Giono S. Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica*. 2001; 26(4): 85-89.
- Malmkvist J, Poulsen JM, Luthersson N, Palme R, Christensen JW, Søndergaard E. Behaviour and stress responses in horses with gastric ulceration. *Applied Animal Behaviour Science*. 2012; 142(3-4):160–167.
- Mariella J, Castagnetti C, Peli, A., Morini, M., Sorteni, C., Bettini, G., & Pietra, M. Mucosal mRNA cytokines' profile of gastric wall in neonatal foals: comparison with endoscopy and histology. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2013; 33(11): 977–983.
- Martineau H, Thompson H, Taylor D. Pathology of gastritis and gastric ulceration in the horse. Part 2: A scoring system. *Equine Veterinary Journal*. 2009; 41(7): 646–651.
- Martínez JR, Cândido de Andrade BS, Silveira Alves GE. Orally administered phenylbutazone causes oxidative stress in the equine gastric mucosa. *Journal*

- of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2014; 38(3):257-64.
- Martinez JR, De Marval CA, Silveira Alves GE. Ulcerative gastric lesions in Brasileiro de Hipismo horses. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2014; 27(3): 211–219.
- Martinez JR, Silveira GE. Equine gastric ulcer syndrome: risk factors and therapeutic aspects *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2014; 27:157-169.
- Martínez JR, **Zuluaga AM**, Silveira GE. Effects of corn oil on the gastric mucosa of horses with induced ulcer. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2016; 29:138-148.
- McClure SR, Glickman L, Glickman N. Prevalence of gastric in show horses. *American Veterinary Medical Association*. 1999; 215:1130-1133.
- Merritt A. Normal equine gastroduodenal secretion and motility. *Equine Veterinary Journal*. 1999; 29(29), 7–13.
- Merritt A. Applied equine gastrointestinal physiology. *Proceedings of the Annual Seminar of the Equine Branch of the New Zealand Veterinary Association*; 2003 january; New Zealand.
- Merritt AM. Appeal for proper usage of the term “EGUS”: Equine gastric ulcer syndrome. *Equine Veterinary Journal*. 2009; 41(7):616–616.
- Moraes PT, Silva LC, Bombonato PP, Hernández FJ, Lima EM. Análise morfológica da transição esôfago-gástrica de eqüinos submetidos a diferentes manejos alimentares e atividade física. [tesis maestría]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2006.
- Morales BA, García F, Bermúdez V, Sogbe E, Perdigón M. Lesiones gástricas, hepáticas y renales en el síndrome de úlceras gástricas en equinos pura sangre de carrera. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2011; 22(2): 133–137.
- Moyaert H, Decostere A, Vandamme P, Debruyne L, Mast J, Baele M, Ceelen L, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Helicobacter equorum* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from horse faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007; 57(Pt 2):213-8.
- Murray M. How to perform gastroduodenoscopy. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*; 2002 Dec 4 - 8; Orlando, USA.
- Murray MJ, Eichorn ES. Effects of intermittent feed deprivation, intermittent feed deprivation with ranitidine administration, and stall confinement with *ad libitum* access to hay on gastric ulceration in horses. *American Journal of Veterinary Research*. 1996; 57(11): 1599–603.
- Murray MJ, Grodinsky C. Regional gastric pH measurement in horses and foals. *Equine Veterinary Journal*. 1989; (Suppl 7): 73–6.
- Nadeau JA, Andrews FM, Mathew AG, Argenzio RA, Blackford JT, Sohtell M, Saxton AM. Evaluation of diet as a cause of gastric ulcers in horses. *American*

- Journal of Veterinary Research. 2000; 61(7): 784–90.
- Niedźwiedz A, Kubiak K, Nicpoń J. Endoscopic findings of the stomach in pleasure horses in Poland. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2013; 55(1): 45.
- Nieto JE, Snyder JR, Beldomenico P, Aleman M, Kerr JW, Spier SJ. Prevalence of gastric ulcers in endurance horses – a preliminary report. *The Veterinary Journal*. 2004; 167(1): 33–37.
- O’Conner M, Steiner J, Roussel A, Williams D, Meddings J, Pipers F, Cohen N. Evaluation of urine sucrose concentration for detection of gastric ulcers in horses. *American Journal of Veterinary Research*. 2004; 65:31–39
- Orsini JA, Hackett ES, Grenager N. The Effect of Exercise on Equine Gastric Ulcer Syndrome in the Thoroughbred and Standardbred Athlete. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2009; 29(3):167–171.
- Ortíz J, Santacruz JJ, Álvarez A, Reinoso EC, Meissel E, Salazar F, López HS. Estudio comparativo de dos pruebas rápidas de ureasa elaboradas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Tecnológica de Pereira frente a una comercial para detección de *H. pylori* en biopsia gástrica. *Revista Médica de Risaralda*. 2007; 13(1): 1-9.
- Owen RJ. *Helicobacter* - species classification and identification. *British Medical Bulletin*. 1998; 54(1): 17–30.
- Patton K, Wright A, Kuroki K, Beard L. Hemorrhagic Gastritis Associated with Renal Failure, Hemoglobinuria, and Isolation of *Clostridium perfringens* in a Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2009; 29(8): 633-38.
- Pellegrini F. A novel antibody test can help to differentiate gastric from colonic ulcers in horses. *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association*; 2009 Sept 24 – 27; Guarujá, SP, Brazil
- Perkins GA, den Bakker HC, Burton AJ, Erb HN, McDonough SP, McDonough PL, Parker J, Rosenthal RL, Wiedmann M, Dowd SE, Simpson KW. Equine stomachs harbor an abundant and diverse mucosal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012; 78(8):2522–32.
- Picavet M. Equine gastric ulcer syndrome. *Proceedings of the first European Equine Nutrition & Health Congress*; 2002 Feb 9; Antwerp, Belgium.
- Rabuffo TS, Hackett ES, Grenager N, Boston R, Orsini JA. Prevalence of Gastric Ulcerations in Horses with Colic. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2009; 29(6): 540–546.
- Recordati C, Gualdi V, Tosi S, Vailati R, Pengo G, Luini M, Simpson K, Scanziani E. Detection of *Helicobacter spp.* DNA in the oral cavity of dogs. *Veterinary Microbiology*. 2007; 119: 346–351.
- Reese RE, Andrews FM. Nutrition and dietary management of equine gastric ulcer syndrome. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 2009; 25(1): 79–92.
- Richards CL, Broadaway SC, Eggers MJ, Doyle J, Pyle BH, Camper AK, Ford TE. Detection of Pathogenic and Non-pathogenic Bacteria in Drinking Water and



- Associated Biofilms on the Crow Reservation, Montana, USA. *Microbial Ecology*. 2015; 1-12.
- Riegelman RK, Hirsch RP. *Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica*. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 1992.
- Rodrigues de Morais G. Atividade gastroprotetora de *Combretum duarteanum* CAMBESS, (Combretaceae) em modelos animais. [Tesis de maestría]. Joao Pessoa: Universidade Federal da Paraiba; 2011.
- Rodrigues NL, Dore M, Doucet M. Validation of a transendoscopic glandular and Non-glandular gastric biopsy technique in horses. *Equine Veterinary Journal*. 2009; 41:631-635.
- Smet A, Flahou B, D'Herde K, Vandamme P, Cleenwerck I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck, F. *Helicobacter heilmannii* sp. Nov. isolated from feline gastric mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2012; 62(Pt 2): 299–306.
- Sykes BW, Hewetson M, Hepburn RJ, Luthersson N, Tamzali Y. European College of Equine Internal Medicine Consensus Statement - Equine Gastric Ulcer Syndrome (EGUS) in Adult Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2015; 29(5): 1288–1299.
- Sykes BW, Jokisalo JM. Rethinking equine gastric ulcer syndrome: Part 1 - Terminology, clinical signs and diagnosis. *Equine Veterinary Education*. 2014; 26(10): 543–547.
- Takeuchi K. Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: Importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World Journal of Gastroenterology*. 2012; 14(18): 2147-2160.
- Tamzali Y, Marguet C, Priymenko N, Lyazrhi F. Prevalence of gastric ulcer syndrome in high-level endurance horses. *Equine Veterinary Journal*. 2011;43(2): 141–4.
- Valentine BA. Dietary control of exertional rhabdomyolysis and gastric ulcer in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1998; 18 (7): 450.
- Valenzuela O, Luzio Á. Detección de organismos espiroidales gástricos en estómago de potrillos clínicamente sanos. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2004; 19(1-2): 40-45.
- Videla R, Andrews FM. New perspectives in Equine Gastric Ulcer Syndrome. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 2009; 25:283-301.
- Wiedner EB, Schmitt DL, Kiso W, Kinchen K, Lindsay WL. Gastroscopy of 30 circus horses. *Proc. 10th International Congress of World Equine Veterinary Association (WEVA) 2008; Jan 28 – Feb 1, Moscow: Russia*.
- Zhongming G, Taylor D. *Helicobacter pylori* - molecular genetics and diagnostic typing. *British Medical Bulletin*. 1998; 54 (1): 31-38.
- Zuluaga AM**, Silveira GE, Martínez JR. Nitric oxide and malondialdehyde in gastric contents and blood in an equine model of gastric ulcer induced by

phenylbutazone. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2016; 29:43-50.