

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Lista de abreviaciones.....	2
PARTE I: Revisión bibliográfica	3
Conocimientos actuales sobre la MAE	3
<i>Historia y epidemiología.....</i>	3
<i>Signos clínicos y diagnóstico.....</i>	4
<i>Alteraciones histopatológicas, bioquímicas y patogenia</i>	5
<i>Etiología.....</i>	6
<i>Prevención</i>	9
<i>Pronóstico.....</i>	9
<i>Tratamiento.....</i>	10
<i>Diagnóstico diferencial.....</i>	11
Posible presencia de la enfermedad en España	13
<i>Miopatías equinas descritas en España</i>	13
<i>Condiciones ambientales y presencia del agente etiológico de MAE en España</i>	14
<i>Casos clínicos descritos en España compatibles con MAE.....</i>	18
Parte II: ESTUDIO experimental	22
Justificación y objetivos.....	22
Metodología	22
Resultados y discusión.....	23
Conclusiones.....	25
Valoración personal	26
Bibliografía.....	27
Anexos	30
Anexo I. Organismos contactados para obtener muestras de sámaras de <i>A. pseudoplatanus</i>	30
Anexo II. Protocolo de determinación de hipoglicina A en las semillas de <i>A. pseudoplatanus</i>	31
Anexo III. Gráficos de absorción	33
Anexo IV. Cálculos para determinar el contenido en hipoglicina A.....	34
Agradecimientos.....	35

Resumen

Miopatía atípica equina – Conocimiento actual de la enfermedad

La miopatía atípica equina (MAE) es una enfermedad grave de curso agudo que afecta a los équidos en pastoreo, produciendo daño en los músculos posturales, respiratorios y cardíaco que conlleva a menudo la muerte. Investigaciones recientes muestran que se bloquea la oxidación de los ácidos grasos en las fibras de tipo I y destacan el papel de la hipoglicina A, una toxina contenida en las sámaras del sicómoro (*Acer pseudoplatanus*). El objetivo de este trabajo es revisar los conocimientos actuales acerca de esa enfermedad descrita en varios países del norte de Europa. Basándonos en el estudio de factores epidemiológicos así como en el análisis de casos clínicos publicados, se argumenta que la MAE podría estar presente en España, aunque subdiagnosticada. Además, esta posibilidad se apoya experimentalmente ya que comprobamos que los niveles de hipoglicina A en muestras de sámaras recogidas en España y en el norte de Europa son similares.

Abstract

Equine atypical miopathy – Current knowledge about the disease

Equine atypical miopathy (AM) is a severe, acute disease that affects grazing horses. It produces damages in postural, respiratory and cardiac muscles with a frequently fatal outcome. Recent studies show that the beta-oxidation of fatty acids is impeded in type I fibers and highlight the role of hypoglycin A, a toxin contained in sycamore (*Acer pseudoplatanus*) samaras. The aim of this work is to review the current knowledge about this disease, which is reported in various countries of Northern Europe. With support from the study of epidemiological factors as well as the analysis of published clinical cases, we argue that AM could be present in Spain, although underdiagnosed. Moreover, this possibility is sustained experimentally as far as we verify that the levels of hypoglycin A in samare samples collected in Spain and Northern Europe are similar.

INTRODUCCIÓN

La Miopatía Atípica Equina (MAE) es una enfermedad grave de curso agudo, estacional, que afecta a los caballos en pastoreo. Produce daño en los músculos cardíaco, respiratorios y posturales, con desenlace a menudo fatal. Desde hace años se describen casos esporádicos con un cuadro sintomático compatible, y la enfermedad como tal fue reconocida en los años 1980. A partir del 2000 aparecen brotes significativos en Bélgica y Francia. Los países más afectados parecen ser los países del norte de Europa (Reino Unido, Irlanda, Bélgica, Francia...). A día de hoy se han confirmado muy pocos casos en España (Palencia *et al.*, 2007 A), pero la enfermedad es todavía poco conocida y es posible que sea subdiagnosticada.

Este trabajo de fin de grado consiste principalmente en una revisión bibliográfica, y se organiza alrededor de dos ejes (Parte I):

- síntesis de los conocimientos actuales sobre la enfermedad (epidemiología, signos clínicos y diagnóstico, etiología y patogenia, pronóstico, tratamiento y prevención);
- estudio de la posible presencia de la enfermedad en España (revisión de casos clínicos descritos en España compatibles con MAE y análisis de factores epidemiológicos).

Se añade también una parte experimental (Parte II), en la que se realiza la determinación de la toxina hoy considerada como el probable agente etiológico de la enfermedad en muestras de vegetales recogidos en España, con el fin de comprobar si efectivamente se pueden dar casos de MAE en nuestro país.

LISTA DE ABREVIACIONES

CK: creatina kinasa

FAD: flavina-adenina dinucleótido

HPTLC: cromatografía sobre capa fina de alta resolución (High Performance Thin Layer Chromatography)

MADD: deficiencia múltiple de las acil-CoA deshidrogenasas (Multiple AcylCoA Deshydrogenase Deficiency)

MAE: miopatía atípica equina (atypical myopathy, AM)

MCPA: ácido metileno-ciclo-propil-acético

SPM: miopatía estacional del pasto (Seasonal Pasture Myopathy), equivalente americano de MAE

Conocimientos actuales sobre la MAE

Historia y epidemiología

Desde los años 1940 se describen casos de mioglobinuria y muerte súbita en caballos de pastoreo (Bowen, 1942). Décadas después, tras una serie de casos en Escocia se describe una nueva enfermedad (Anonymous, 1985) y se le denomina mioglobinuria atípica a esa patología que conocemos hoy bajo el nombre de Miopatía Atípica Equina (MAE). Desde entonces, se señalan periódicamente casos de MAE en Reino Unido. En 1995 se produce un brote importante en Alemania, con más de 100 caballos afectados, y en los años 2000 aparecen casos en Bélgica y Francia. Esto motivó la creación del Atypical Myopathy Alert Group (AMAG)¹, una red de epidemiovigilancia sobre la MAE que recibe desde 2006 notificaciones de varios países de Europa (principalmente Bélgica, Francia, Alemania, pero también Reino Unido, Irlanda, Noruega, Suecia, Letonia, Dinamarca, Países Bajos, Luxemburgo, Suiza, Austria, República Checa, Italia y España). Existe un cuadro muy similar en Canadá y Estados Unidos, llamado miopatía estacional del pasto (seasonal pasture myopathy, SPM), pudiéndose tratar de una misma entidad patológica.

La epidemiología de la MAE viene descrita en dos estudios retrospectivos realizados por la Universidad de Lieja sobre casos aparecidos entre 2000-2005 (Votion *et al.*, 2007) y 2006-2009 (van Galen *et al.*, 2012). La MAE es un tipo de miopatía que afecta a los équidos (caballos, asnos, cebras) en pastoreo, de ambos sexos y todas las edades. Están más en riesgo los caballos jóvenes (menores de 3 años) de condición corporal normal a baja que se encuentran bajo un régimen de entrenamiento bajo o nulo, y no hicieron ejercicio antes de la crisis.

En estos estudios se reporta que la enfermedad no es contagiosa. Se piensa que el agente etiológico se encuentra en el ambiente y que el desarrollo de la enfermedad resulta de la interacción del individuo con ese agente bajo condiciones ambientales determinadas. Eso explicaría que se producen “brotes” en áreas geográficas y períodos determinados, que a veces reaparecen casos en pastos donde ya se habían encontrado caballos muertos y/o diagnosticados con MAE, y que caballos que conviven con enfermos pueden enfermar a su vez o estar afectados de manera subclínica (siendo el daño muscular detectable por analítica bioquímica). Por otra parte, los caballos que sobreviven tras un episodio de MAE pueden volver a enfermar, lo que parece indicar que no se crea inmunidad frente a la enfermedad. No obstante, los caballos vacunados y desparasitados regularmente parecen menos propensos a padecer la enfermedad.

En concreto, los caballos afectados pastan más de 6 horas al día, pudiendo haber estado estabulados como mucho 4 días antes de desarrollar el cuadro (lo que correspondería a un período de latencia), reciben

1 Atypical Myopathy Alert Group 2015, *Myopathie atypique*. Available from: <<http://labos.ulg.ac.be/myopathie-atypique/>>. [15 april 2015].

poco o ningún alimento adicional (por ej. grano, ensilado, heno, paja, sal) ni agua de la red. Los pastos presentan por lo general una pendiente, hierba más bien corta, y en el 98% de los casos contienen o están rodeados por árboles (en particular el arce sicómoro, *Acer Pseudoplatanus*), con presencia en el pasto de madera, hojas muertas, ríos y zonas húmedas. La distribución de heno en el suelo y la repartición del estiércol en el pasto serían factores de riesgo, mientras que las prácticas agrarias tal como el laboreo, la siembra y la siega, serían factores protectores. Los brotes aparecen de manera estacional, en otoño y en primavera, cuando hay poca radiación solar, frío moderado, viento, precipitaciones y humedad, y el número de casos en la primavera parece estar relacionado con el número de casos en el otoño anterior, ambos siendo muy variables de un año al otro.

Signos clínicos y diagnóstico

La MAE se presenta bajo dos formas: una forma clínica y otra subclínica, en la que los caballos están aparentemente sanos mientras que la creatina quinasa (CK) sérica elevada revela cierto grado de daño muscular. En la forma clínica, los síntomas (Votion *et al.*, 2007; Combes, 2010; van Galen *et al.*, 2008 y 2012 B) resultan de los daños en los músculos posturales, respiratorios y cardíaco. Aparecen de repente y por lo general la muerte se produce rápidamente (la tasa de mortalidad, variable según el brote, es del 74% en un estudio de van Galen *et al.* (2012)).

Inicialmente el caballo muestra depresión, debilidad y rigidez. La orina es oscura, de color achocolatado debido a la mioglobinuria, pudiendo ser más o menos acusada. A menudo presenta taquicardia con mucosas congestivas. El cuadro evoluciona rápidamente hacia decúbito y dificultades respiratorias. La muerte ocurre por lo general antes de las 72h tras la aparición de los primeros síntomas.

A menudo se observan temblores y sudoración, sin embargo la temperatura rectal suele estar dentro de los límites normales (aunque el caballo también puede presentar hipo o hipertermia). La manifestación del dolor también es variable, desde leve a severo. A veces el caballo muestra signos cólicos como resultado de una materia fecal seca e impactación del colon. La palpación rectal revela a menudo una distensión vesical. Por lo general el apetito es normal o incluso mayor de lo normal; sin embargo, ciertos caballos presentan anorexia o disfagia. Puede haber signos de insuficiencia cardíaca o renal.

En cuanto a exámenes complementarios, el análisis de orina pone de manifiesto la presencia de mioglobina. Hay que tener en cuenta que la mioglobinuria es indistinguible de la hemoglobinuria/hematuria cuando simplemente se utiliza una tira de orina. En el perfil bioquímico de la sangre están aumentados los indicadores de destrucción muscular; sobre todo la creatina kinas (CK), pero también la aspartato amino transferasa (AST), la lactato deshidrogenasa (LDH) y la troponina I. En la mayoría de los casos la actividad de la CK alcanza cientos de miles, o incluso supera el millón de unidades internacionales por mL (normal: 50-200 UI/mL). Como veremos a continuación el nivel de acilcarnitinas está anormalmente alto. Ese parámetro es indicativo de MAE, sin embargo a día de hoy su determinación es

compleja y no se usa para fines diagnósticos. A menudo los lactatos están aumentados y aparecen trastornos ácido-básicos (acidosis láctica y alcalosis respiratoria), así como hipocalcemia e hipocloremia. Es frecuente observar hiperglicemia, hiperlipidemia y neutrofilia. Siempre que concuerden la historia, los signos clínicos y las pruebas laboratoriales, el diagnóstico definitivo de MAE proviene de una biopsia muscular (ver párrafo siguiente), preferentemente a nivel de los músculos del hombro.

En la necropsia, se observa sobre todo pigmenturia. Aparecen también decoloraciones en los músculos respiratorios (músculos intercostales y diafragma) y a menudo, pero no siempre, en los músculos posturales (en concreto, en los músculos del cuello y hombro) y cardíaco. En el cadáver también se puede hacer una biopsia muscular, preferentemente en los músculos intercostales, para llegar al diagnóstico definitivo.

Alteraciones histopatológicas, bioquímicas y patogenia

Cassart *et al.* identificaron las lesiones histopatológicas asociadas a la MAE en el 2007. Los músculos locomotores, con mayoría de fibras de tipo II (glicolíticas), no suelen presentar lesiones, mientras que los músculos posturales, respiratorios y a veces cardíaco, con fibras tipo I (oxidativas) muestran una degeneración hialina de Zenker, multifocal, con diámetro aumentado de las fibras, sarcoplasma muy eosinofílico, pérdida de la estriación miofibrilar, y necrosis segmental. Sobre todo, con una tinción Oil Red O (ORO) se aprecian acúmulos lipídicos en forma de vesículas intracelulares, cuya presencia se considera bastante típica de MAE (Figura 1). Por microscopía electrónica se observan además alteraciones mitocondriales : fragmentación de la cresta, hinchamiento y rotura de la mitocondria. En un mismo campo coexisten fibras sanas y fibras degeneradas. Las tinciones histoquímicas para ATPasa de músculo indican que dentro del músculo están afectadas sobre todo las fibras de tipo I. No se aprecian acúmulos de glicógeno ni calcio en la tinción del ácido peryódico de Schiff (PAS). En general no hay respuesta celular, aunque a veces sí se observan macrófagos y raramente neutrófilos.

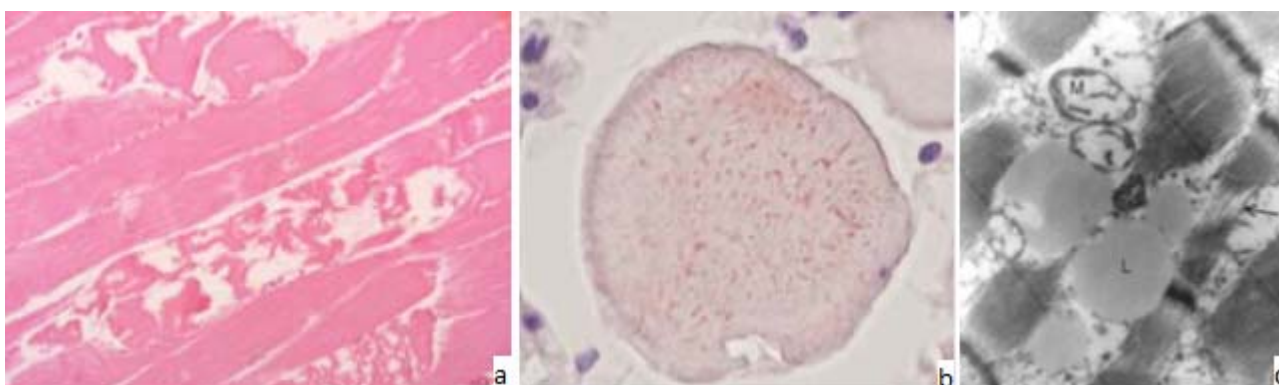


Figura 1. Cortes histológicos de músculo de caballos diagnosticados con MAE (Cassart et al., 2007)

a) Necrosis segmental multifocal (músculo intercostal, tinción H&E, x200); b) Gotitas lipídicas (en rojo) en las fibras musculares (músculo subescapular, tinción ORO, x800); c) Ultraestructura. M: desintegración mitocondrial, L: gotita lipídica, Flecha: desorganización miofibrilar (Músculo intercostal, MET, x16.000).

Esos hallazgos hacen pensar que la oxidación de los ácidos grasos estaría impedida mientras que la vía glucolítica quedaría intacta. Los estudios bioquímicos realizados por Westermann *et al.* (2007, 2008 y 2011) destacan una deficiencia múltiple de las acilcoenzima A deshidrogenasas (Multiple AcylCoA Deshydrogenase Deficiency, MADD). Ciertas deshidrogenasas mitocondriales que usan el flavina-adenina dinucleótido (FAD) como cofactor se ven inhibidas, lo que bloquea el metabolismo aerobio y la beta-oxidación de los ácidos grasos, causando un desequilibrio energético. La MADD se traduce en alteraciones bioquímicas en orina y sangre. Concretamente ciertos ácidos orgánicos, carnitinas, y conjugados de la glicina se ven a menudo aumentados en caso de MAE (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros bioquímicos a menudo aumentados en caballos con MAE

	Sangre	Orina
Ácidos orgánicos	Ácido láctico	
Carnitinas		Ácido etil-malónico Ácido 2-metil-succínico
	Carnitina libre Acil-carnitinas (conjugadas con C2, C3, C4, C5, C6, C8, C8:1, C10:1, C10:2)	
Conjugados de la glicina		Butiril-glicina (Iso)-valeril-glicina Hexanoil-glicina

Etiología

En el hombre existe un trastorno de origen genético que provoca MADD; sin embargo, se piensa que las alteraciones bioquímicas observadas en el caballo resultan más bien de la acción de una toxina que inhibe las deshidrogenasas mitocondriales. A lo largo de los años se estudiaron muchos tóxicos como posible agente etiológico de MAE (Combes, 2010; Votion, 2012). Se han descartado ciertos contaminantes (fertilizantes, pesticidas o antibióticos) y toxinas naturales, en particular de origen fúngico. No se consiguió aislar en los pastos de los caballos con MAE una toxina vegetal conocida por ser capaz de producir rhabdomiólisis en animales, en particular en la especie equina. También se descartaron hipótesis de deficiencia nutricional, por ejemplo en riboflavina (Westermann *et al.*, 2008).

En el 2010 un equipo de investigación de la Universidad de Berna (Suiza) estudió la posible implicación de la bacteria *Clostridium sordellii* en la patogenia de la MAE (Unger-Torroledo *et al.*, 2010). Se trata de una bacteria ubicuitaria, presente en el suelo y en el tracto digestivo de animales, siendo patógenas solo ciertas cepas que producen una toxina letal (TcsL). En un estudio previo se habían detectado pequeñas cantidades de esa bacteria en el contenido digestivo de caballos con MAE. La toxina letal inhibe a GTPasas, lo que conduce a una desorganización del citoesqueleto y degeneración mitocondrial, con acúmulo de ácidos grasos intracelulares y muerte celular. La toxiinfección por *C. sordellii* provoca en el ratón daños en el

músculo esquelético y cardíaco, así como en endotelios. En ese estudio se analizan muestras provenientes de siete casos confirmados de MAE y cuatro caballos sanos. Los autores observan lesiones compatibles con una toxiinfección por *C. sordellii* bajo microscopía óptica y electrónica y detectan la toxina letal por inmunofluorescencia en el músculo esquelético de todos los enfermos pero en ningún sano. No se sabe si esa bacteria podría ser un factor predisponente o desencadenante, o incluso una consecuencia de la MAE, por lo que se requieren más investigaciones. Según Dominique Votion, investigadora en la Universidad de Lieja, los hallazgos histopatológicos presentados por el equipo suizo podrían resultar de artefactos (comunicación personal). Otro estudio pone de manifiesto la presencia de esporas de *C. sordellii* en el músculo esquelético de caballos sanos (Vengust *et al.*, 2003).

En el 2007, un estudio de Votion *et al.* destaca que una especie de arce, el sicómoro (*Acer pseudoplatanus*, Familia Aceraceae, Orden Sapindales) está presente en los pastos de los 57 caballos con MAE del estudio. En 2010, van der Kolk *et al.* de la Universidad de Utrecht estudian la posible implicación del hongo *Rhizyctis acerinum* que coloniza a las hojas del arce sicómoro en el desarrollo de MAE. Sin embargo, no se pudo relacionar *R. acerinum* con los trastornos bioquímicos (MADD) observados en caballos con MAE.

Años después, un equipo de la Universidad de Minnesota (Valberg *et al.*, 2013) aisló al metabolito de una toxina vegetal, la hipoglicina A, en el suero y la orina de caballos con miopatía estacional del pasto (SPM) en Estados Unidos. Ese metabolito se denomina ácido metileno-ciclo-propil-acético (MCPA). Estudios anteriores muestran que la hipoglicina A se metaboliza a MCPA en la matriz mitocondrial, con especial rapidez en las fibras musculares esqueléticas. El MCPA, además de inducir una modificación covalente del FAD, con la consiguiente alteración del metabolismo de los aminoácidos, es capaz de inhibir de manera irreversible ciertas deshidrogenasas mitocondriales FAD-dependientes. También, mediante el secuestro de la coenzima A y la carnitina, ese compuesto impide el paso de los ácidos grasos de cadena larga del citosol a la mitocondria. Todo ello lleva al bloqueo de la beta-oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, que se acumulan en la mitocondria y el citosol. La hipoglicina A está presente en la fruta de *Blighia sapida*, especie exótica que produce la enfermedad del vómito jamaicano en el humano. Valberg *et al.* aislaron también esa toxina en las semillas del arce negundo (*Acer negundo*), árbol difundido en América y presente en el pasto de todos los casos de SPM del estudio.

En el 2014, Votion *et al.*, tras observar que el suero de caballos afectados por MAE es capaz de inhibir la respiración mitocondrial en cultivos celulares de mioblastos equinos con un efecto dosis-dependiente, detectaron MCPA en la sangre de caballos afectados por MAE pero no en la sangre de caballos sanos. Confirmaron también la presencia de hipoglicina A en sámaras y plántulas del arce sicómoro (*Acer pseudoplatanus*), común en Europa. *A. pseudoplatanus*, cuyas semillas contienen hipoglicina A que se metaboliza a MCPA, se establece entonces como probable agente etiológico de la MAE en Europa. Ese árbol fue introducido desde Europa en Canadá y Estados Unidos, donde se difundió hasta ser considerado una

planta invasiva², lo que deja pensar que el sicómoro podría ser también, junto con *Acer negundo*, un responsable de los casos de SPM en América.

Asumiendo que la hipoglicina A es el desencadenante de la MAE, las condiciones exactas de aparición de la enfermedad y eventuales causas predisponentes no se conocen muy bien. Patarin *et al.* (2014) observan una recrudescencia de los casos de MAE en Europa a lo largo de los 15 últimos años, que se podría explicar por modificaciones en el manejo de los caballos y/o cambios de factores ambientales. Cabe destacar que el contenido en hipoglicina A parece muy variable entre las sámaras de un mismo árbol y de un árbol al otro (Gillman *et al.*, 2014). En el caso de *Blighia sapida*, el contenido en hipoglicina A baja con el grado de madurez de la fruta. Es muy probable que el metabolismo de la semilla del arce influya en su contenido en hipoglicina A a lo largo del tiempo. Tampoco se sabe si las hojas de *A. pseudoplatanus*, u otras especies arbóreas como el fresno podrían contener hipoglicina A.

Luego queda por determinar cómo se intoxican los caballos. Es probable que ingieran hipoglicina A; sin embargo, su apetencia por las hojas, plántulas y sámaras de *A. pseudoplatanus* es baja. La escasez de hierba en el pasto podría aumentar el consumo de esos recursos. Las sámaras también podrían ser ingeridas mezcladas con otros vegetales. No es necesaria la presencia de un sicómoro en el pasto para que se dé un caso de MAE ya que el viento dispersa las sámaras a distancias superiores a 100 metros. Aún más, si la hipoglicina A difunde en el medio, en particular en el agua, podrían darse intoxicaciones independientemente de la presencia de sámaras en el pasto, tras la ingestión de vegetales o agua contaminados. Recíprocamente, ciertos caballos conviven con arces sicómoros sin enfermar (ello se podría explicar en parte por el hecho de que solo los árboles hembras llevan sámaras).

Con respecto a la metabolización de la hipoglicina A a MCPA y/o sensibilidad frente al MCPA, hay variabilidad individual: determinados caballos ingieren sámaras y muestran cierto nivel de hipoglicina A en sangre sin enfermar. A modo de ejemplo, un caballo con balance energético negativo movilizándolo sus reservas grasas, cuando se ve expuesto a una determinada dosis de hipoglicina A será probablemente más propenso a enfermar que un caballo cuyas necesidades energéticas se cubren adecuadamente, en la medida que la vía glucolítica no podrá compensar las deficiencias del metabolismo lipídico. También queda por saber que especies animales, a parte del hombre y el caballo, podrían ser afectadas. En el ratón, la dosis máxima tolerada en hipoglicina A es de 1,5 mg/kg/día (Blake *et al.*, 2006). Dado que los órganos dianas y signos clínicos son bastante variables según la especie, es poco probable que esa cifra tenga alguna validez en équidos.

En los países europeos más afectados por MAE, donde el impacto económico de esa enfermedad puede ser importante, el mundo ecuestre se conmocionó tras los hallazgos sobre el papel del sicómoro, desencadenando cortes de árboles sin fundamento y demandas de peritación por parte de los seguros en

2 United States Department of Agriculture 2015 “*Acer pseudoplatanus*”, *Plants database*. Available from: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ACPS>. [2 may 2015]

pastos donde habían aparecido casos de MAE. Ello demuestra que hay que ir con cautela a la hora de publicar conclusiones relativas a la etiología de MAE. En cualquier caso, los conocimientos nuevos acerca de la hipoglicina A abren perspectivas para un diagnóstico más rápido y fiable (por ejemplo por la determinación de hipoglicina A y/o MCPA en orina y/o sangre), un tratamiento etiológico, y en primer lugar una prevención eficaz de la MAE.

Prevención

Los hallazgos recientes acerca de la etiología de MAE indican que se debe evitar la ingestión directa de sámaras de *Acer pseudoplatanus*. Sin embargo, con todos los asuntos que quedan por conocer con respecto a la etiopatogenia de la enfermedad (posible difusión en el ambiente y condiciones de toxicidad de la hipoglicina A) ello no es suficiente. A día de hoy las medidas de prevención útiles provienen de los datos epidemiológicos establecidos por Votion *et al.* (2007) y van Galen *et al.* (2012).

Esas medidas deben ser aplicadas con prioridad a los caballos en riesgo (jóvenes menores de 3 años de condición corporal normal a baja). El aspecto más importante consiste en estabular o por lo menos reducir el tiempo de pastoreo (<6h diarias) en período de riesgo (otoño o primavera, cuando las condiciones climáticas son favorables a un brote de MAE (viento, frío moderado, precipitaciones), o en caso de brote) y ofrecer alimento adicional rico en carbohidratos. A no ser posible estabular, por lo menos se deberían evitar los pastos en los que aparecieron casos previos de MAE, así como los pastos con poca vegetación, pendiente y árboles en su vecindad, en particular de la especie *Acer pseudoplatanus*. Además, se recomiendan ciertas prácticas agrarias (laboreo, siembra, eliminación de la madera y hojas muertas etc.) así como el acondicionamiento del pasto (con buen drenaje, bebedero con agua de red, comedero para el heno). Por último, los caballos sanos deberían ser vacunados y desparasitados regularmente, y sometidos a un cierto régimen de ejercicio.

Los équidos conviviendo con un caballo enfermo se ven probablemente expuestos al agente etiológico de la MAE, y podrían estar padeciendo la enfermedad en su forma subclínica. Es recomendable estabular esos caballos, ofrecerles alimento adicional y reducir la demanda energética a nivel de músculo evitando cualquier fuente de estrés. Idealmente, se hará un seguimiento estrecho de sus parámetros clínicos y del nivel de CK sérica.

Pronóstico

Teniendo en cuenta que la tasa de mortalidad es alta (74% en el estudio de van Galen *et al.* (2012)), el pronóstico vital de un caballo con signos clínicos de MAE es por lo general sombrío. Sin embargo hay que tener presente que un cuarto de los caballos se recuperan, y aunque se requieren más investigaciones para excluir que la enfermedad siga presente en su forma subclínica, parece que por lo general los supervivientes no presentan secuelas tras un episodio de MAE. Por tanto, es importante realizar un pronóstico vital que

valore la utilidad del tratamiento.

Los parámetros clínicos y laboratoriales de valor pronóstico (van Galen *et al.*, 2012), favorables (más asociados a supervivencia) y desfavorables (más asociados a muerte) se recogen en la Tabla 2. Ninguno de ellos tomado por separado permite predecir la supervivencia o muerte de un caballo con MAE, sin embargo en conjunto permiten formar un pronóstico vital. Hay que destacar que el nivel de CK en sangre, aunque relacionado con el grado de daño muscular, no parece presentar correlación con el pronóstico vital.

Tabla2. Parámetros clínicos y laboratoriales de valor pronóstico

Favorable	Desfavorable
Postura de pie Defecación Mucosas de aspecto normal Temperatura rectal normal	Decúbito Anorexia Taquicardia Taquipnea / Dispnea Sudoración Hematocrito alto Hipocloremia Hiperuremia Hipoxemia / hipercapnia

Como vimos en la parte de bioquímica, los caballos con MAE presentan niveles aumentados de ciertas acil-carnitinas en sangre. La Universidad de Lieja está elaborando, a partir del perfil de acil-carnitinas, un índice de valor pronóstico para supervivencia (Habyarimana *et al.*, 2015). A modo de ejemplo, el nivel de C18:2-OH-carnitina estaría normal en supervivientes y mucho más alto en fallecidos.

La determinación de hipoglicina A sérica podría servir para diagnóstico, sin embargo algunos caballos no presentan síntomas a pesar de tener esa toxina en sangre, y el nivel de hipoglicina sérica no parece tener valor pronóstico (enfermos fallecidos y supervivientes presentan niveles parecidos). Por último, hasta ahora no se ha podido validar ninguna técnica para la medición de MCPA en sangre.

Tratamiento

Las principales recomendaciones en materia de tratamiento provienen de los estudios retrospectivos de van Galen *et al.* publicados en el 2013.

Consisten en un tratamiento de soporte. Los caballos con signos de MAE deberían ser estabulados inmediatamente, a ser posible antes de que ocurra el decúbito, en un ambiente confortable y libre de estrés. Está recomendado el reposo absoluto, con administración de miorrelajantes y AINEs u otros analgésicos. Una fluidoterapia adecuada permite restablecer la volemia y el equilibrio ácido-básico y electrolítico, y favorece la excreción de mioglobina, limitando el daño renal. Además de ofrecer una dieta rica en hidratos de carbono, repartida en varias tomas, se puede administrar glucosa intravenosa para

compensar las deficiencias del metabolismo lipídico y mejorar el balance energético. Se recomienda el seguimiento estrecho de las funciones respiratoria, cardíaca, renal, y digestiva. La administración de vitaminas del complejo B, en particular la riboflavina por su implicación en el metabolismo mitocondrial aeróbico, puede ser de ayuda. La terapia con antioxidantes (vitaminas C, E y selenio) parece igualmente tener efectos favorables.

Se están estudiando terapias más avanzadas, como por ejemplo la diálisis en caballos con MAE. A día de hoy no existe tratamiento etiológico, tal como un fármaco capaz de destruir la hipoglicina A en sangre o inhibir su activación a MCPA. No obstante, la Universidad de Lieja está llevando a cabo investigaciones sobre una molécula que sería capaz de activar las vías oxidativas, contrarrestando los efectos del MCPA.

Diagnóstico diferencial

Forman parte del diagnóstico diferencial todos los tipos de miopatía equina, así como ciertos trastornos con repercusiones sistémicas (Combes, 2010; van Galen *et al.*, 2008).

Miopatías de origen genético

- síndrome de rhabdmiolisis (enfermedad de los lunes)

→ rhabdmiolisis ligada al ejercicio: ocurren crisis tras un esfuerzo ligero. También se puede producir una crisis aislada en un caballo sano tras un esfuerzo exagerado. Es la hipótesis más probable si el caballo hizo ejercicio poco tiempo antes de la crisis. Provoca una degeneración de Zenker, con núcleos de las fibras musculares en posición central, sobre todo en los músculos locomotores y fibras de tipo II .

→ miopatía por almacenamiento de polisacáridos (MAPS): afecta al quarter horse, paint horse, apaloosa y también ciertas razas de tiro. Se observa un almacenamiento de glicógeno y polisacáridos anormales en las fibras musculares. El diagnóstico definitivo requiere una prueba genética.

- parálisis hiperpotasémica periódica (HYPP): debida a la permeabilidad excesiva de los canales de sodio. Se producen crisis recurrentes de hiperexcitabilidad muscular seguida de una parálisis. Tras un episodio de HYPP, de duración aproximada de una hora, el caballo vuelve a tener una apariencia normal. Afecta al quarter horse, más bien en reposo tras un episodio estresante o una dieta rica en potasio (ej. alfalfa). El cuadro clínico puede ser parecido a MAE (rigidez, decúbito), sin embargo a menudo hay una hiperkaliemia (5 a 1,7 mmol de K/L) mientras que la CK no suele estar elevada. Diagnóstico definitivo mediante prueba genética.
- hipertermia maligna: rigidez debida a la acumulación de calcio en el citoplasma de las células musculares tras un estímulo (por ej. anestesia, estrés). A diferencia de la MAE, se produce una hipertermia marcada y el cuadro remite con dantroleno sódico (miorelajante).

Miopatías nutricionales y tóxicas

- miopatía tóxicas: en ese grupo se incluye la MAE. Plantas como *Ageratina altissima* (antiguamente *Eupatorium rugosum*), *Senna occidentalis* o el algodón (conteniendo gossipol), y compuestos como los ionóforos (monensina) o las micotoxinas (lolitrem) tienen efectos miotóxicos o cardiotóxicos, produciendo una degeneración de Zenker. En el caso de la intoxicación por ionóforos también aparecen acúmulos de lípidos en las células miocárdicas.
- miopatía nutricional: aparecen calcificaciones y una degeneración de Zenker en fibras de tipo I y II como consecuencia de una deficiencia en vitamina E y selenio, por lo general en potros jóvenes (menores de 12 semanas), aunque los adultos también podrían verse afectados. Responde a la administración de selenio y vitamina E en los casos leves. En la necropsia aparece una decoloración en los músculos esqueléticos y cardíaco. Recordamos que en caballos con MAE, el selenio en sangre puede ser deficiente, y además su estado mejora por tratamiento con antioxidante.

Miopatías de origen infeccioso

- miopatías clostridiales: producen una necrosis localizada con gas. Recordamos también que la toxina de *C. sordellii* podría tener un papel en el desarrollo de MAE.
- rabdomiolisis asociada a una infección por *Streptococcus equi equi* : miopatía severa, a veces fatal, que resultaría de un shock tóxico tras la infección o la vacunación. También una infección de las vías respiratorias por *S. equi equi* puede producir una miositis inmunomediada de curso agudo.

Miopatías de origen traumático

- miopatía fibrótica: tras un traumatismo en el semimembranoso o semitendinoso.
- miopatía post-anestésica

Otros trastornos

- estados de debilidad y síndrome del caballo recumbente por ejemplo hipocalcemia, traumatismo, laminitis, cólicos, estados hipovolémicos o endotoxémicos. En caso de decúbito los indicadores de destrucción muscular se ven aumentados en sangre. Recordamos que MAE también puede dar signos cólicos.
- ciertas enfermedades neurológicas: por ejemplo tétanos, botulismo, encefalitis, intoxicaciones por organofosforados. Una deficiencia en vitamina E puede producir la enfermedad de la neurona motora, que cursa con debilidad, decúbito y atrofia muscular; sin embargo están en riesgo sobre todo los caballos estabulados ya que el heno y el concentrado son pobres en vitamina E.
- enfermedad de la hierba (grass sickness): su forma aguda presenta mucha similitud con MAE respecto a epidemiología (afecta a todos los équidos en pastoreo en el norte de Europa sobre todo

en otoño o primavera) y clínica (temblores musculares y signos cólicos con muerte a los pocos días). El diagnóstico definitivo se realiza por histopatología.

- trastornos del metabolismo lipídico, en particular hiperlipemia del poni: en caso de MAE también aparece una hiperlipemia así como gotas lipídicas en las fibras musculares. No obstante los caballos de condición corporal alta son menos propensos a MAE.

Posible presencia de la enfermedad en España

Miopatías equinas descritas en España

En España, tanto a nivel de docencia universitaria como en la práctica clínica, apenas se habla de MAE mientras que se describen todas las patologías incluidas en su diagnóstico diferencial. Como destacamos en el párrafo anterior, las fronteras entre esas patologías, que tienen una etiología multifactorial y patogenia compleja, así como repercusiones sistémicas, no siempre están muy claras. A modo de ejemplo, ciertos casos de MAE muestran hiposeleniosis, y no se puede descartar que esa deficiencia intervenga en la etiopatogenia de MAE, al menos como factor predisponente, por lo que la distinción entre MAE y miopatía nutricional no es tan evidente como parece a primera vista. Ello no solo complica la investigación sobre la etiopatogenia de esos trastornos y su clasificación como entidades patológicas, sino que hace que sea difícil establecer un diagnóstico en base a signos clínicos. Por otra parte, son necesarios exámenes complementarios para confirmar un proceso miopático así como para especificar el tipo de miopatía. Aún así, no siempre se obtiene una respuesta clara, incluso las lesiones histopatológicas pueden ser inespecíficas si no se lleva a cabo una tinción especial.

En la práctica, en España sería posible que ciertos casos compatibles con MAE se atribuyan a otro tipo de miopatía (por ej. miopatía de origen genético o más sencillamente miopatía idiopática) o a otro trastorno, por desconocimiento o por la inaccesibilidad o coste prohibitivo de las pruebas analíticas necesarias para confirmar ese diagnóstico. Hay que recordar, además, que para la mayoría de esas patologías el enfoque terapéutico es similar ya que solo se dispone de un tratamiento sintomático o de soporte, por lo que desde un punto de vista clínico puede antojarse innecesario afinar el diagnóstico. Además, siempre que se trata de casos aislados sin muertes masivas, es posible que, por motivos económicos, no se pida necropsia de los caballos encontrados muertos en el pasto. Todo ello lleva a pensar que MAE podría estar subdiagnosticada en España: casos de MAE podrían quedar sin diagnóstico o con un diagnóstico erróneo. Según la información de que disponemos, no se ha publicado ningún estudio que evalúe la morbilidad de los procesos miopáticos en équidos en España. Sin más datos epidemiológicos, sería necesario mandar encuestas a veterinarios clínicos para analizar la prevalencia y distribución geográfica de los casos de miopatía, en particular en las zonas favorables a la emergencia de MAE, tarea amplia que no se pudo llevar a cabo dentro del marco de ese trabajo.

Condiciones ambientales y presencia del agente etiológico de MAE en España

Antes de todo recordamos algunos factores epidemiológicos recogidos en los estudios de Votion *et al.* (2007) y van Galen *et al.* (2012):

- En cuanto a recursos agrícolas, los casos de MAE aparecen en pastos con pendiente, árboles (en particular *Acer pseudoplatanus*), ríos, poco acondicionamiento o laboreo.
- Por lo que se refiere al clima, los casos se producen en una estación con poca radiación solar, frío moderado, humedad y viento.
- Por último, con respecto a la población equina, la MAE afecta a todos los équidos (caballos, asnos) pero más bien a jóvenes, con régimen de ejercicio bajo o nulo, pastando más de 6 horas al día, que reciben pocos cuidados (vacunación, desparasitación) y poco alimento adicional.

En España son pocas las zonas con relieve, humedad y vegetación abundante donde podrían darse casos de MAE. Estas zonas incluirían el Norte de España desde Galicia hasta País Vasco, zonas montañosas tales como el Pirineo, y ciertas dehesas. Dentro de ellas habría que centrarse en las áreas donde hay équidos (caballos, quizás asnos cerca de la frontera con Portugal) en pastoreo, en particular las zonas de cría.

Por lo que se refiere al agente etiológico, en un ejercicio de rigurosidad, empezaremos comentando acerca de *Clostridium sordellii*, que podría jugar un papel en la etiología de la MAE. Como ya vimos, se trata de una bacteria ubicuitaria, presente en el suelo y tracto digestivo de animales, siendo algunas cepas patógenas por la producción de una toxina letal. En España están descritos algunos casos de infección por *C. sordellii* conllevando la muerte, en concreto en carnívoros (cinco leones cautivos (de la Fe *et al.*, 2006) y un oso pardo (Balseiro *et al.*, 2013) desarrollaron un cuadro septicémico) y en équidos (ocho potros con onfalitis (Ortega *et al.*, 2007)). Pero, según nuestro conocimiento, no se ha publicado ningún caso de toxiinfección, en particular en équidos.

Centrémonos ahora en la hipoglicina A contenida en las sámaras del sicómoro. Registros muestran que hay ejemplares de *A. pseudoplatanus* en todas las comunidades autónomas de España (Figuras 2 y 3). A modo de ejemplo, el inventario de la Global Biodiversity Information Facility (GBIF)³ permite localizar a unos mil ejemplares en España, sobre todo en el norte de la península.

3 Global Biodiversity Information Facility 2011, "Acer pseudoplatanus". Available from: http://www.gbif.org/occurrence/search?TAXON_KEY=3189870&GEOMETRY=-9.377929+43.677407%2C-9.377929+41.740168%2C3.418944+41.740168%2C3.418944+43.677407%2C-9.377929+43.677407&COUNTRY=ES [21 abril 2015].

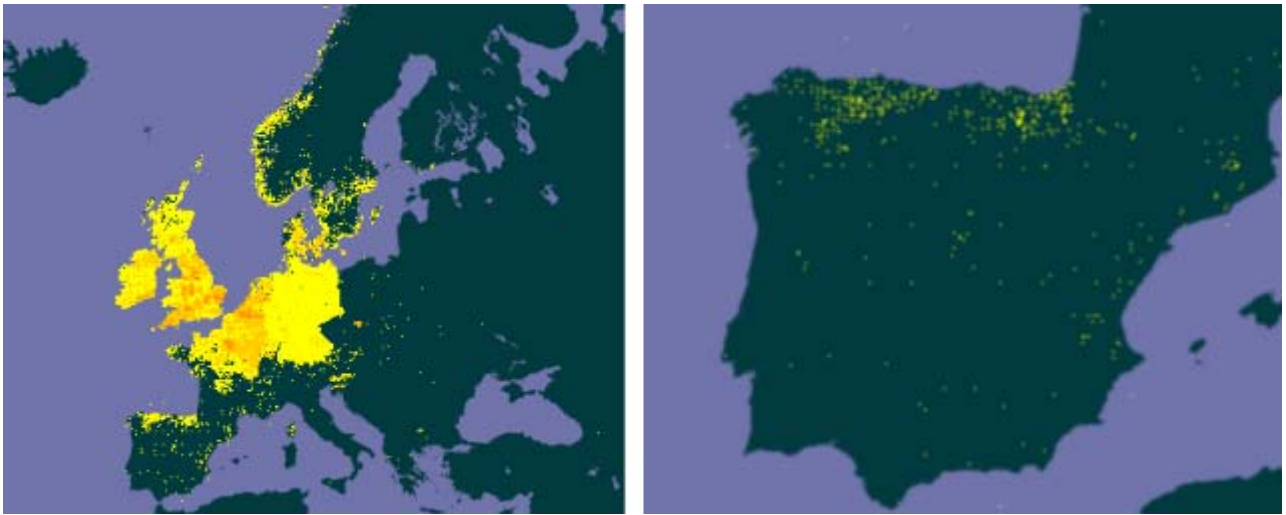


Figura 2. Ejemplares de *A. pseudoplatanus* identificados en Europa, en particular España, por el GBIF.⁴



Figura 3. Fotos de *Hacer pseudoplatanus* en España.

a) Foto de arce sicómoro en Vimianzo (Galicia); b) Fotos de hojas de arce sicómoro (Parque Natural de Somiedo (Asturias), situado a 50 km de Villablino, julio 2007)⁵; c) Fotos de sámaras de *A. pseudoplatanus* (Parque de los Pericones (Asturias), mayo 2009); d) Plantación de *A. pseudoplatanus* en España⁶.

4 Global Biodiversity Information Facility 2011, “*Acer pseudoplatanus*”. Available from: <http://www.gbif.org/species/3189870> [21 april 2015].

5 Menéndez Valderrey, JL 2007, “*Acer pseudoplatanus*”. Available from: <http://www.asturnatura.com/especie/acer-pseudoplatanus.html> [21 april 2015].

6 Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible 2013, “Selvicultura de plantaciones de frondosas”. Available from: http://sostenible.palencia.uva.es/sites/default/files/formacion/modulo_3.pdf [17 june 2015].

El arce sicómoro crece en valles frescos y montañas bajas, desde el nivel del mar hasta 1400 m de altitud. Se desarrolla tanto en suelos calizos como silíceos, ligeramente ácidos (pH 6-7), ricos en nutrientes y profundos (más de 1,2 m), bajo un clima eurosiberiano.⁷ Es exigente en humedad (se desarrolla en zonas de entre 800 y 1500 mm de precipitaciones por año, tolera mal el aridez estival)⁸. Prefiere el calor moderado (soporta temperaturas de hasta -30°C)⁹. No tiene preferencia para la insolación.¹⁰ Esas exigencias ambientales permiten establecer un área de presencia potencial del sicómoro en el territorio español (Figura 4).

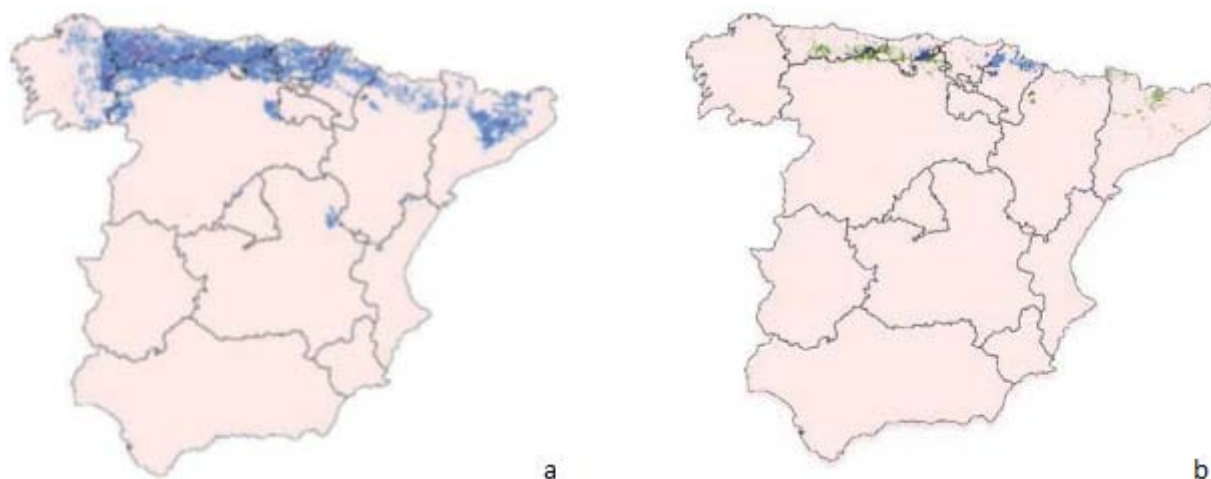


Figura 4. Área de presencia potencial de *A. pseudoplatanus* en España, a) hoy y b) predicción para 2100 (Magrama)¹¹.

El área de presencia potencial del sicómoro, probable agente etiológico de la MAE, coincide por tanto con el área propicia para la aparición de MAE (salvo las dehesas del sur) definida anteriormente según criterios epidemiológicos. Se trata simplemente de las regiones que más se parecen, en término de clima y vegetación, a los países del norte de Europa afectados por MAE (donde el sicómoro es una especie abundante), y que podrían reunir condiciones ambientales idóneas para la emergencia de MAE (sean cual sean sus mecanismos etiopatogénicos exactos).

7 Coello, J, Becquey, J, Ortisset, JP, Gonin, P, Baiges, T, Piqué, M 2013, “Froncosas productoras de madera de calidad: ecología y silvicultura de especies para el ámbito pirenaico y regiones limítrofes”. Available from: <<http://www.pirinoble.eu/docs/LIBRO%20FRONDOSAS%20CASTELLANO.pdf>> [17 june 2015].

8 Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 2013, “Acer pseudoplatanus”. Available from: <http://www.magrama.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/politica-forestal/desc_Acer_pseudoplatanus_descrip_regiones_tcm7-285846.pdf> [17 june 2015].

9 Encyclopedia of life 2014, “Acer pseudoplatanus”. Available from: <<http://eol.org/pages/583073/data#5991711>> [21 april 2015].

10 Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 2011, “Acer pseudoplatanus”. Available from: <http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/Acer_pseudoplatanus_tcm7-175201.pdf> [20 april 2015].

11 Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 2011, “Acer pseudoplatanus”. Available from: <http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/Acer_pseudoplatanus_tcm7-175201.pdf> [20 april 2015].

El arce sicómoro ocupa una pequeña porción de su área de presencia potencial en España (700 de 40.000 km², o sea el 2%). Según las previsiones del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, esta área se irá reduciendo en las siguientes décadas. No obstante, la población de sicómoros sigue creciendo dentro de esta área. Dados sus múltiples usos (carpintería, ebanistería, como combustible u árbol ornamental) se cultiva tanto para repoblación forestal como en fincas de particulares. Entre 2005 y 2009 se recogieron unos 100 kg de semillas por año y se plantaron entre 100 y 300 de hectáreas por año, con una densidad de 400 a 1100 árboles por hectárea.¹² En la provincia de León, en el 2008 se declararon unas 4.600 hectáreas de cultivo de *A. pseudoplatanus*.¹³ De crecimiento rápido, *A. pseudoplatanus* puede colonizar fácilmente zonas abiertas, y muy frecuentemente se encuentra silvestre o asilvestrado a partir de plantaciones. Aparece en bosques, entremezclado con otras especies caducifolias como la haya, y en orillas de ríos.

En España, el sicómoro florece entre marzo y mayo, el fruto madura en septiembre-octubre y las sámaras se liberan en octubre-noviembre,¹⁴ que correspondería al período de mayor riesgo para la aparición de casos de MAE (sin embargo las sámaras pueden seguir en el árbol más tiempo, hasta la primavera siguiente). No encontramos información acerca de la época de aparición de las plántulas de *A. pseudoplatanus* en España (marzo-abril en Bélgica, a modo de ejemplo).

Por último, no olvidemos que *Acer negundo* (cuyas sámaras llevan también hipoglicina A y están consideradas como el agente etiológico de la SPM, el equivalente de MAE en EEUU) también está presente en España. Importado desde América en el siglo XVII, hoy se usa ampliamente para repoblaciones mineras o con fines ornamentales en parques urbanos o jardines de particulares. Además, aunque no se ha comprobado todavía, otras especies vegetales podrían producir hipoglicina A.

12 Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible 2013, “Selvicultura de plantaciones de frondosas para la producción de madera de calidad”. Available from: <http://sostenible.palencia.uva.es/sites/default/files/formacion/anexo_seminario.pdf> [17 june 2015].

13 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2008, “Catálogo Nacional de Materiales de Base para la producción de MFR identificado”, BOE, nº 40, p. 8537.

14 Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 2013, “Acer pseudoplatanus”. Available from: <http://www.magrama.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/politica-forestal/mfr_Acer_pseudoplatanus_caract_MFR_tcm7-285789.pdf> [17 june 2015].

Casos clínicos descritos en España compatibles con MAE

- Casos notificados al AMAG

Desde la creación de esa red de epidemiovigilancia europea en el 2006, solo 31 casos sospechosos de MAE fueron notificados al AMAG en España, en el otoño 2011. Esos casos pertenecen todos a un mismo brote, en la provincia de León, que estudiamos más adelante.

- Análisis de casos publicados

Encontramos dos publicaciones acerca de casos españoles que podrían ser compatibles con MAE.

→ El trabajo de Palencia *et al.* (2007 A), es un estudio retrospectivo que describe dos casos fatales de miopatía equina. El primero apareció en 2005 en el norte-oeste de España, y el segundo en 2006 en Cantabria, en el valle de Polaciones. Ambos casos son compatibles con MAE por su anamnesis (caballos en pastoreo, sin ejercicio previo, en otoño-invierno o primavera tras días lluviosos y fríos), clínica (dolor muscular, temblor y sudoración, disnea, decúbito, orina marrón), pruebas complementarias (CK alta) e histopatología (degeneración de Zenker multifocal y segmental en músculos respiratorios y posturales). En el primer caso se hicieron tinciones histológicas específicas destacando que el daño muscular afecta sobre todo a las fibras del tipo I, con un potencial oxidativo menor de lo normal (tinción ATPasa) y acúmulos lipídicos intracelulares (tinción ORO). Los autores concluyen que probablemente puede tratarse de MAE.

Examinemos ahora si algunos datos concuerdan con los hallazgos recientes acerca de la etiología de MAE. Ambos casos están localizados en el área de presencia potencial de *A. pseudoplatanus*. Por lo que se refiere al segundo caso, en la área de Polaciones se relatan episodios epizooticos de muerte de caballos en pastoreo, que habrían sido atribuidos a una intoxicación por *Senecio jacobea* (Palencia *et al.*, 2007 B). Además, un trabajo del 2011 describe la expansión de bosques con sicómoros en la cuenca del río Nansa, donde está situado Polaciones, como consecuencia de las instalaciones hidroeléctricas que modifican la distribución de las aguas del río¹⁵.

→ El trabajo de Polledo *et al.* (2013), es un estudio retrospectivo acerca de cuatro brotes de miopatía en caballos en el mes de diciembre de los años 1999, 2003, 2009, 2011. Esos brotes habrían afectado a 10 explotaciones del Valle de Laciana (cuenca del río Sil, provincia de León), que cuentan con unos 200 caballos en total. En esas explotaciones la prevalencia del trastorno habría sido del 20-30% con una letalidad del 95%, lo que correspondería a unos 50 équidos muertos en cada brote. Hay que considerar esas cifras con cautela ya que no se declaran las muertes de caballos no registrados, que podrían constituir una parte importante del ganado equino en esa área. Además, el tema parece suscitar polémica, oponiendo intereses políticos y económicos, por lo que los ganaderos dudan en comunicar sobre los casos y es difícil

15 Carracedo Martín, V, García Codron, JC 2011, "Consecuencias biogeográficas de las infraestructuras hidroeléctricas del río Nansa (Cantabria)", *Boletín de la asociación de los geógrafos españoles*. Available from: www.boletinage.com/articulos/57/16-CONSECUENCIAS.pdf. [1 may 2015]

hacer un censo fiable. Según un ganadero de la zona, las bajas habrían podido ser aún más altas, con casos en otoño desde principios de noviembre y en primavera, llegando al centenar de caballos muertos por año. En el 2010, 30 casos fueron notificados al AMAG por particulares que habían ido informándose acerca de la enfermedad y consideraban esos casos sospechosos de MAE.

En el estudio se practicó necropsia de 10 caballos y se tomaron muestras de 22 caballos (10 enfermos y 12 aparentemente sanos). Varios hallazgos son compatibles con MAE; en la anamnesis (caballos en pastoreo, por lo general de 6 meses a 2 años, con condición corporal normal, sin ejercicio previo, en otoño-invierno tras días fríos y ventosos), clínica (rigidez, temblor y sudoración, decúbito, orina marrón, muerte en 48h), pruebas complementarias (CK alta, deficiencia en selenio) y histopatología (degeneración de Zenker multifocal y segmental en músculos respiratorios y posturales). Casi todos los caballos muestreados (enfermos y aparentemente sanos) tienen un nivel de CK superior a lo normal, asociado a una deficiencia en selenio, lo que indica que habrían individuos padeciendo un daño muscular de manera subclínica. En estos casos la deficiencia en selenio podría ser tanto un factor de riesgo como, según los autores, una consecuencia del trastorno observado (tras el daño oxidativo en las fibras musculares).

No obstante, algunos aspectos no coinciden con el cuadro habitual de MAE. Curiosamente, entre los síntomas descritos no se hace mención de disnea, pudiendo haber sido omitido por los autores ya que aparece un daño importante en los músculos respiratorios. Por otra parte, en la histopatología se ven afectadas tanto las fibras de tipo I como fibras de tipo II y los autores observan lesiones musculares mucho más severas que en los casos descritos de MAE así como calcificaciones, pero no acúmulos lipídicos intracelulares anormales bajo tinción ORO. Esas observaciones merecerían quizás una segunda opinión para garantizar una mayor objetividad en la interpretación de las imágenes. Dominique Cassart, histopatóloga en la Universidad de Lieja, discute por ejemplo, en base a las fotografías del artículo, que los depósitos lipídicos en las fibras de tipo I, aunque finos y regulares, forman una imagen similar a los casos de MAE (comunicación personal). Por último, los autores describen lesiones en las fibras de Purkinje del corazón, que son características de miopatía nutricional en el ternero. Basándose en esos hallazgos, estudian el papel potencial de *Eupatorium cannabinum* en la etiopatogenia del trastorno, aunque esa planta, que contiene tremetol y puede producir un cuadro similar al descrito, no estaba presente en los pastos de los caballos afectados, pero sí en pastos cercanos.

Este artículo tampoco discute los resultados acerca de la etiopatogenia de MAE, publicados posteriormente. Examinemos la posible implicación de la hipoglicina A en la aparición de los brotes descritos. Sospechando que el agente etiológico de la enfermedad esté en el ambiente, cuando aparece un caso, muchos ganaderos de la zona conducen sus caballos a los pastos más altos, llamados “brañas”, lo que tendría un efecto protector. Como se ve en la Figura 5¹⁶, el Valle de Laciana está situado en la área de

16 Cisneros, O, Martínez, V, Montero, G, Alonso, R, Turrientes, A, Ligos, J, Santana, J, Llorente, R, Vaquero, E 2010,

presencia potencial de *A. pseudoplatanus*.

En el Norte de la provincia de León, donde el crecimiento de ese árbol es muy rápido, se plantan sicómoros para producción madera¹⁷ en particular en la cuenca del río Sil: en 2008, en el municipio de Villablino se registraron unas 550 hectáreas de cultivo de *A. pseudoplatanus* (más precisamente en las localidades de

Castrillo, Pando y Calzada, Carracedo, Dehesa de Carracedo, Grallero, Monte de Sosas) y en el municipio de Palacios del Sil, situado a unos 10 km de Villablino, unas 310 Ha (más precisamente en las localidades de Zorondillo, Reguera del diablo, Pedroso, Palacios, Sil, Tejedo, Seita Buxade).¹⁸ En total eso representa el 20% de las plantaciones de sicómoro declaradas en León (4.300 hectáreas). Según testimonios de ganaderos de la zona, caballos fueron afectados en los municipios de Laciana, Babia, Palacios, Páramo del Sil, Caboalles de Abajo, Orallo, Villager y Sosas. Comparando la localización de esos casos y de las plantaciones de *A. pseudoplatanus* (cuyas coordenadas GPS aparecen en el BOE) obtenemos la mapa de la Figura 6.

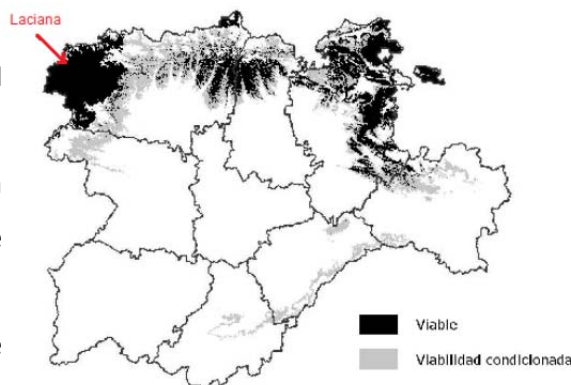


Figura 5. Área de presencia potencial de *A. pseudoplatanus* en la provincia de León

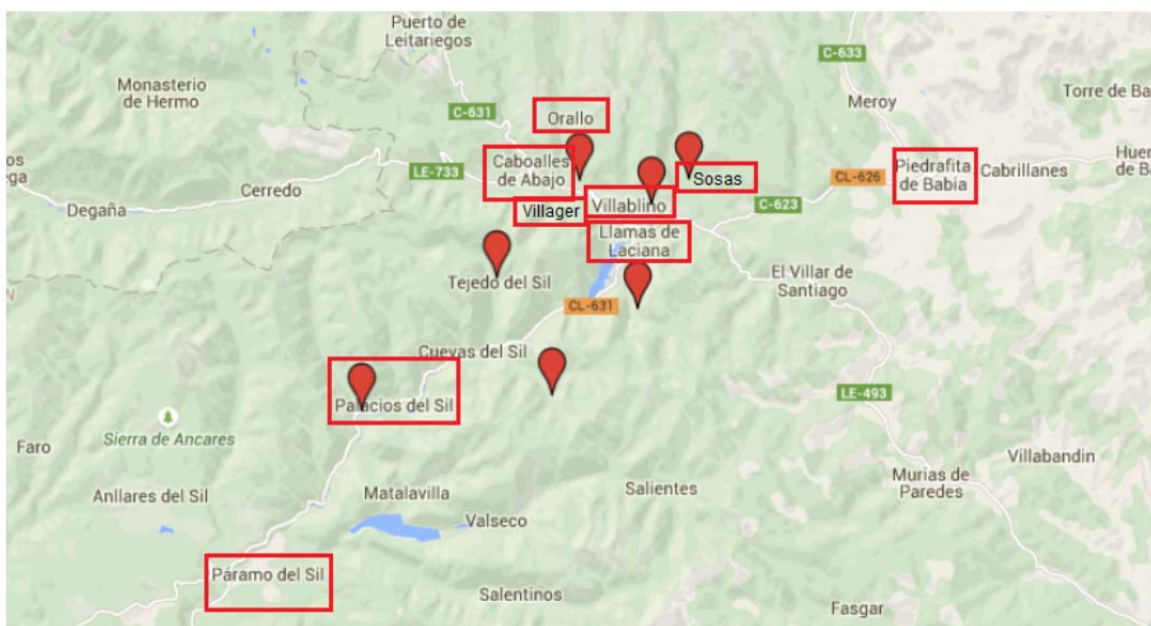


Figura 6. Localización de las plantaciones de *A. pseudoplatanus* georreferenciadas en el BOE 2008 (etiquetas) y de los municipios donde ganaderos declararon casos de caballos enfermos (cuadros).

“Plantaciones de frondosas en Castilla y León – Cuaderno de campo”, *Publicaciones de la Federación de Asociaciones forestales de Castilla y León (FAFCYLE)*. Available from: <http://www.asfole.com/archivos/descargas/1407346543.pdf>. [1 may 2015]

17 Cisneros, O, Martínez, VM 2008, “Plantaciones de frondosas para madera de calidad en la provincia de León”, *Publicaciones de la Federación de Asociaciones forestales de Castilla y León*. Available from: <http://www.asfole.com/archivos/descargas/1220948518.pdf>. [1 may 2015]

18 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2008, “Catálogo Nacional de Materiales de Base para la producción de MFR identificado”, BOE, nº 40, p. 8537.

Por tanto, coincide geográficamente la aparición de casos con el cultivo de sicómoros, que podría conllevar la ingestión accidental de sámaras así como cierta contaminación ambiental con hipoglicina A. Además, en la comarca de Laciana, sería tradicional alimentar al ganado con ramones de caducifolios¹⁹ y en particular con hojas de *Acer pseudoplatanus*.^{20, 21} Recordamos que no se conoce el contenido en hipoglicina A de las hojas de sicómoro. Según la misma fuente, las hojas del sicómoro se emplean para envolver al queso asturiano de Cabrales así como un postre cantábrico llamado panchón, lo que hace pensar que, o bien la cantidad de hipoglicina A en esas hojas no alcanza el umbral de toxicidad, o bien ese compuesto, igualmente tóxico para el hombre, no difunde en el queso (lo que sería contradictorio con un hallazgo reciente de que la hipoglicina difunde en el agua). Sin embargo, es fácil imaginar que las sámaras pudieran darse a los caballos mezcladas con las hojas.

Entonces, el estudio de factores ambientales basado en los hallazgos recientes acerca de la etiología de la MAE lleva a pensar que los brotes observados en el Valle de Laciana podrían corresponderse con casos de MAE. Como comentamos anteriormente, la distinción entre MAE y miopatía nutricional (que por lo general afecta a potros pero puede afectar también a adultos) no siempre es clara, y para ambas enfermedades la aparición de un cuadro clínico se ve favorecida por condiciones climáticas adversas. Mientras la ingestión de hipoglicina A contenida en sámaras de *A. pseudoplatanus* actuaría como agente desencadenante, la deficiencia en selenio sería un factor predisponente que origina un daño muscular subclínico. Ello explicaría que algunos elementos histopatológicos (severidad de las lesiones afectando ambos tipos de fibras I y II con calcificaciones) no se correspondan con un cuadro típico de MAE, dándose un cuadro mixto entre MAE y miopatía nutricional. En caso de que se haya conservado alguna muestra, sería muy interesante medir los niveles de MCPA en el suero de caballos afectados y de hipoglicina A en el agua de sus pastos.

19 Cisneros, O, Martínez, V, Montero, G, Alonso, R, Turrientes, A, Ligos, J, Santana, J, Llorente, R, Vaquero, E **2010**, “Plantaciones de frondosas en Castilla y León – Cuaderno de campo”, *Publicaciones de la Federación de Asociaciones forestales de Castilla y León (FAFCYLE)*. Available from: <http://www.asfole.com/archivos/descargas/1407346543.pdf>. [1 may 2015]

20 Anonymous **2015**, “Acer pseudoplatanus”, *Página Web de la localidad de Villager de Laciana*. Available from: <http://villagerlaciana.com/Flora/Arboles.htm#Arce>. [2 may 2015]

21 Muñoz Garmendia, F, Navarro, C **2013**, “Aceraceae”, *Flora Ibérica (Real Jardín Botánico)*. Available from: http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/imprenta/tomoIX/09_113_00_ACERACEAE_3e.pdf. [17 june 2015]

Justificación y objetivos

Tanto el análisis de factores ambientales como la revisión de casos publicados sugieren que MAE podría estar presente en España. Por lo que sabemos, no se ha determinado nunca el nivel de hipoglicina A, toxina considerada hoy como el probable agente etiológico de la enfermedad, en sámaras de *Acer pseudoplatanus* recogidas en el territorio español. Por lo tanto, se decidió hacer la recogida y determinación de la toxina en muestras españolas. Comparamos ese resultado con el obtenido en muestras de Bélgica, donde la prevalencia de la MAE es alta.

Metodología

La primera etapa, y quizás la más larga, consistió en recoger muestras dentro del perímetro definido anteriormente (Norte de España, desde Galicia hasta el Pirineo). Procedemos a la localización de ejemplares concretos de *A. pseudoplatanus* (por ejemplo sicómoros identificados en jardines botánicos o árboles destacables en lugares públicos señalados en catálogos botánicos), o en su defecto a la identificación de zonas concretas donde la presencia de arces sicómoros está comprobada o muy probable. Eso supuso revisar y comparar diferentes fuentes de información, desde informes de organismos forestales hasta testimonios de particulares (botanistas, fotógrafos...).

Contactamos por correo electrónico con 19 organismos oficiales y particulares (ver lista en Anexo 1) repartidos por el Norte de España. Aparte de la ausencia de respuesta (aproximadamente la mitad de las personas contactadas no contestaron (11/19)), el mayor problema estuvo relacionado con la estación en la que hicimos la recogida: en diciembre ya no quedaban sámaras en los sicómoros identificados (6/19), que echan sus semillas en octubre-noviembre. No obstante, dos de ellos, los jardines botánicos de Alcalá de Henares y de Barcelona, nos facilitaron muestras de semillas recogidas en 2006 y 2010 respectivamente, desecadas y conservadas en cámara frigorífica. Los amigos contactados no consiguieron identificar arces sicómoros en las zonas determinadas (2/19). No consideramos el muestreo de plántulas porque su recogida, además de ser más compleja en cuanto a identificación y conservación, tampoco se ajustaba al calendario de este trabajo.

La determinación de la hipoglicina A, se hizo, por tanto en dos muestras de sámaras. Ésta se hace por High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC), según el método desarrollado en la Universidad de Lieja (Habyarimana *et al.*, 2014) (ver Anexo 2). Se extrae primero la hipoglicina A con metanol. El aparato Linomat V deposita las muestras en los pocillos de una placa de forma automatizada. Se usa una solución comercial de hipoglicina A como patrón y se dejan también pocillos vacíos como control negativo. Luego se lleva a cabo la cromatografía sobre capa fina en cámara CAMAG. Por último se añade un revelador, la ninhidrina, antes de leer la placa a 490 nm con el Scanner TLC 3.

Para cada pocillo el software winCATS Planar Chromatography Manager traza el cromatograma (curva de absorción en función de la posición). Bajo las condiciones experimentales descritas, la hipoglicina A migra a una distancia $R_f = 0,51 \pm 0,01$. Un pico en esa posición es indicativo de la presencia de hipoglicina A en la muestra. El área bajo ese pico varía linealmente con la cantidad de hipoglicina A. El programa permite calcular esa área, y por comparación con los pocillos de la solución patrón, deducir la concentración de hipoglicina A en la muestra.

Por último, se comprueba que el espectro de absorción entre 200 y 700 nm de cada pico seleccionado concuerda con el espectro obtenido a nivel de la banda de hipoglicina de la solución patrón. Eso permite discriminar eventuales sustancias contenidas en las muestras que migrarían al mismo nivel que la hipoglicina A (R_f próximo a 0,51).

Resultados y discusión

Por lo que sabemos, esta es la primera vez que se realiza la detección de hipoglicina A en sámaras de sicómoros españoles. Las dos muestras contienen hipoglicina A en cantidad detectable. Los resultados cuantitativos están expuestos en la tabla siguiente.

Tabla : Contenido de las muestras en toxina (expresado en μg de hipoglicina A por mg de sámara)

Muestra	Promedio	Desviación estándar
Madrid	11,3	1,5
Barcelona	7,35	0,77

Según Jean Habyarimana, investigador en la Universidad de Lieja, las muestras belgas de sámaras de *A. pseudoplatanus* analizadas en su laboratorio hasta hoy, contienen entre 0,2 y 0,6 μg de hipoglicina A por mg de sámara (comunicación personal). Un estudio sobre muestras suizas recogidas en pastos donde hubieron casos de MA señala niveles más variables, de entre 0,04 y 2,81 μg de hipoglicina A por mg de sámara (Unger *et al.*, 2014). Por tanto, las sámaras recogidas en España tienen un contenido en hipoglicina equivalente o incluso superior al de las sámaras recogidas en países europeos afectados por MAE. Eso es razonable en la medida que se trata de la misma especie vegetal, sin embargo hay que destacar que las zonas de recogida (jardines botánicos cerca de Madrid y Barcelona) están fuera de la área de presencia potencial de *A. pseudoplatanus* y ofrecen condiciones ambientales bastante diferentes del norte de Europa.

Las posibles fuentes de error asociadas al protocolo experimental incluyen:

- a lo largo de todo el proceso, la posible contaminación en hipoglicina A por el patrón o de las muestras entre sí o (en particular a través del material como las jeringas Hamilton)
- la incertidumbre en la medición de masas y volúmenes, ligada al material o al operador
- una extracción por el metanol incompleta (por ej. picado o tiempo de maceración insuficiente)

- imprecisión en el depósito de las muestras sobre la placa de silicio por el Linomat V (inconstancia en el volumen y la superficie vaporizados), que pusimos de manifiesto mediante ensayos con colorante azul de tripán.
- imprecisión en el proceso de elución, (tiempo, manipulación y disposición de las placas en la cámara, posible interacción entre la fase móvil y el solvente de las muestras)
- imprecisión durante el revelado (vaporización manual de ninhidrina no uniforme, temperatura o tiempo de incubación incorrecto)
- y por último, el riesgo mínimo de confundir la hipoglicina A con una sustancia de propiedades físico-químicas muy parecidas.

En conjunto, según Jean Habyarimana, ese protocolo permitiría estimar el contenido en hipoglicina A con un margen de error inferior al 5% (comunicación personal). Aquí obtenemos una desviación estándar de unos 10%, lo que es relativamente alto.

Obviamente, este estudio experimental se basa en un número muy pequeño de muestras no homogéneas (por su tiempo y forma de conservación, que influye probablemente en su contenido en hipoglicina A). Sin embargo, estamos seguros de que se trata de sámaras de la especie *Acer pseudoplatanus* y que fueron almacenadas bajo condiciones adecuadas.

Suponiendo que nuestros resultados son lo suficientemente fiables, hay que ir con cautela a la hora de interpretarlos y relacionarlos con la posible aparición de casos de MAE. A modo de ejemplo, el estudio mencionado anteriormente (Unger *et al.*, 2014) encuentra niveles de hipoglicina A en sámaras provenientes de árboles situados en pastos donde se dieron casos de MAE inferiores a los de muestras provenientes de pastos donde viven caballos sanos. Como ya vimos en la parte de revisión bibliográfica, falta por saber:

- los determinantes de la producción de hipoglicina A (variable entre sámaras y árboles, y según las condiciones ambientales)
- el grado de contaminación del ambiente por la toxina (número de semillas producidas por un árbol, diseminación de las sámaras por el viento y de la toxina por el agua) y la vida media de la toxina en el ambiente.
- la vía de entrada de la toxina en el caballo (ingestión de sámaras directamente, de agua o vegetales contaminados) y condiciones de absorción de la toxina
- la toxicocinética y toxicodinamia de la hipoglicina A sérica (metabolización a MCPA y desarrollo de la enfermedad).
- Los factores ambientales e intrínsecos que pueden afectar a la toxicidad.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Con todos los aspectos que quedan por investigar en cuanto a la etiología de la MAE, el análisis de muestras vegetales llevado a cabo en ese trabajo no permite decidir sobre la posible presencia de la enfermedad en España, sino que sus resultados llamativos invitan a más investigaciones. Los pocos casos publicados dejan pensar que, en base a un diagnóstico histológico, sí se dan casos de MAE en España. El estudio de factores ambientales es igualmente muy favorable. Sin embargo, una mera revisión bibliográfica no permite estimar la prevalencia de esa enfermedad en nuestro país. Para ello, habría que disponer de datos epidemiológicos, clínicos y histológicos acerca de un número importante de casos compatibles. Hallazgos recientes abren el camino a un diagnóstico etiológico de MAE por determinación de hipoglicina A (o sus metabolitos) en suero, lo que tendría también aplicación a la hora de evaluar la prevalencia.

Por hoy, hay que sensibilizar a los veterinarios equinos para que incluyan a la MAE en su diagnóstico diferencial, y mandar encuestas invitándoles a comunicar sobre sospechas. Ello no se pudo hacer dentro del marco de ese trabajo de extensión limitada; sin embargo, al ofrecer una síntesis en castellano de los últimos avances de la investigación sobre MAE, podría representar una primera etapa de información a los clínicos de España.

Conclusions

With all the aspects of AM etiology that are still to be investigated, the analysis of vegetal samples conducted in this work does not enable us to decide whether the disease is present in Spain, but its striking results invite to further investigation. The few published cases lead to think that, on the basis of a histological diagnosis, cases of AM occur in Spain. The study of environmental factors is also quite favourable. Nevertheless, a mere review of literature does not allow us to reckon the prevalence of this disease in our country. To this end, epidemiological, clinical and histological data about a high number of compatible cases would be needed. Recent findings open the way to an etiologic diagnosis of AM by the determination of seric hypoglycin A (or its metabolites), which could also be used to evaluate prevalence.

As for now, we should raise awareness among equine veterinarians so that they include AM in their differential diagnosis, and send surveys inviting them to communicate about suspicions. This could not be done as part of this work of limited extent; nonetheless, as far as it offers a synthesis in Spanish of the last advances of research about AM, it could represent a first step for the information to clinicians in Spain.

VALORACIÓN PERSONAL

La propia realización de ese trabajo permite unir y ampliar competencias adquiridas a lo largo de los estudios universitarios, en particular desarrollar cierta autonomía, método de trabajo, organización y capacidad de gestión del tiempo. A lo largo de la fase de revisión bibliográfica, no solo es necesario integrar conocimientos vistos en diferentes asignaturas del Grado en Veterinaria, sino que basándose en ellos se debe llegar a evaluar la calidad científica de la información disponible en la literatura para seleccionar las fuentes más pertinentes. En la parte experimental se requiere más bien desarrollar habilidades transversales, desde calidades relacionales a la hora de comunicarse e interactuar con investigadores o tercios en el caso de la recogida de muestras, hasta cierta creatividad para superar dificultades técnicas concretas, y ejercicio de sentido crítico en la valoración de los resultados obtenidos. La etapa final de producción de un informe escrito no solo exige familiarizarse con las normas de redacción de un texto con contenido científico, sino que supone adquirir una visión sintética del trabajo en su conjunto para presentar la información de forma estructurada, jerarquizada y orientada hacia una conclusión.

Fue muy estimulante realizar ese trabajo en el seno de un grupo de investigación. Eso permite darse cuenta de las exigencias concretas, por ejemplo en término de presupuesto, infraestructuras, mano de obra y tiempo, a las que este se ve sometido en todo tipo de tareas, desde la elaboración de una página web de divulgación, o recolección de información mediante encuestas a particulares, hasta la realización de experimentos con máquinas de alta precisión, y redacción colaborativa de artículos científicos. Estar inmersa en un equipo muy activo, con un papel central en la investigación sobre la MAE, supuso también recibir información sobre hallazgos muy recientes, algunos todavía sin publicar, a cambio quizás de perder cierta objetividad en la valoración de las publicaciones acerca del tema.

No obstante, una de las enseñanzas más grandes de ese trabajo fue de naturaleza epistemológica. Fue sumamente interesante reconstituir, a través de la lectura de artículos, el proceso de construcción de conocimientos sobre la MAE desde la génesis de una nueva enfermedad e investigaciones iniciales hasta el aporte de la medicina humana y la identificación de un posible agente etiológico. Está obvio que el conocimiento surge de los enlaces y diálogos entre equipos, disciplinas y países... y que todavía queda mucho por conocer acerca de la MAE. Todos los conocimientos actuales se basan en estudios retrospectivos. Si es probable que la experimentación con cohortes de caballos pueda proveer información adicional, queda cuestionable desde un punto de vista deontológico. En su defecto, favoreciendo la comunicación entre clínicos y investigadores, se podría sin duda acceder a otro tesoro de información.

BIBLIOGRAFÍA

Marcamos con un asterisco (*) las fuentes conteniendo información de mayor relevancia acerca de la MAE.

Anonymous **1985**, "Atypical Myoglobinuria : a new disease in horses?", *Veterinary Record*, vol. 116, pp.86-7.

*Atypical Myopathy Alert Group **2015**, *Myopathie atypique*. Available from: <<http://labos.ulg.ac.be/myopathie-atypique/>>. [15 april 2015].

Balseiro, A, Oleaga, A, Polledo, L, Aduriz, G, Atxaerandio, R, Kortabarria, N, García Marín, JF **2013**, "Clostridium sordellii in a Brown Bear (*Ursus arctos*) from Spain", *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 49, no 4, pp. 1047-51.

Blake, OA, Bennink, MR, Jackson, JC **2006**, "Ackee (*Blighia sapida*) hypoglycin A toxicity: dose response assessment in laboratory rats", *Food and chemical toxicology*, vol. 44, no2, pp. 207-13.

Bowen, JN, Craig, JF **1942**, "Myoglobinuria in horses", *Veterinary Record*, vol. 35, article 354.

*Cassart, D, Baise, E, Cherel, Y, Delguste, C, Antoine, N, Votion, D, Amory, H, Rollin, F, Linden, A, Coignoul, F, Desmecht, D **2007**, "Morphological alterations in oxidative muscles and mitochondrial structure associated with equine atypical myopathy", *Equine Veterinary Journal*, vol.39, no1, pp.26-32.

*Combes, L **2010**, *Bilans clinique, épidémiologique et étiologique de la myopathie atypique du cheval de pré*. Ph.D thesis, École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

de la Fe, C, Rodríguez, JM, Ramírez, GA, Hervás, J, Giland, J, Poveda, JB **2006**, "Sudden death associated with Clostridium sordellii in captive lions (*Panthera leo*)", *Veterinary Pathology*, vol.43, pp.370-4.

*Gillman, JH, Hegeman, AD, Sharp, RG **2014**, "Clarifying the role of maples in atypical myopathy", *Equine Veterinary Journal*, vol. 46, pp. 135-6.

* Habyarimana, J, Baise, E, Weber, M, Franck, T, Gault, G, Carlier, J, Votion, D, Gustin, P **2014**, "Validation of a HPTLC method for quantitative determination of hypoglycin A in methanol extract of maple (*Acer*) samples", *Proceeding of the International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography*. Available from: <http://www.hptlc.com/pdf/2014lyon/HPTLC_2014_final.pdf>. [17 june 2015].

*Habyarimana, J, Boemer, F, Amory, H, Baise, E, Carlier, J, De Tullio, P, Douny, C, Gault, G, Gustin, P, Fanck, T, Frederich, M, Marcillaud-Pitel, C, Richard, E, Patarin, F, Weber, M, Votion, D **2015**, "Les nouveaux outils de diagnostic et de pronostic de la myopathie atypique", *Proceeding de la 41ème Journée de la Recherche équine*. Available from: <<http://hdl.handle.net/2268/179559>>. [20 april 2015].

Ortega, J, Daft, B, Assis, RA, Kinde, H, Anthenill, L, Odani, J, Uzal, FA **2007** "Infection of internal umbilical remnant in foals by Clostridium sordellii", *Veterinary Pathology*, vol. 44, pp.269-75.

*Palencia, P, Rivero, JL **2007 A**, "Atypical myopathy in two grazing horses in northern Spain", *The*

Veterinary Record, vol. 161, no 10, pp. 346-8.

Palencia, P, Díez de Castro, E, Chamizo, V, López Rivero, JL **2007 B**, “Caso compatible con miopatía atípica aparecido en un caballo de pastoreo en la región occidental de Cantabria (España)”, *Revista electrónica de Veterinaria*. Available from: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html>>. [1 may 2015].

*Patarin, F, van Galen, G, Dopagne, C, Rouxhet, S, Pitel, C, Votion, D **2014**, “Etiologie de la myopathie atypique : conditions de toxicité de l’agent causal – étude préliminaire”, *Proceeding de la 40ème journée de la recherche équine*. Available from: <<http://hdl.handle.net/2268/171054>>. [20 april 2015].

*Polledo, L, García Marín, JF, González, J, Martínez-Fernández, B, Delgado, L, Pérez, V, Jiménez, W, Pérez-Martínez, C, Ferreras, MC, García-Iglesias, MJ **2013**, “Contribution to the understanding of unexplained death of pasturing horses in the north of Spain : a restrospective case series”, *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 33, pp. 475-82.

Unger, L, Nicholson, A, Jewitt, EM, Gerber, V, Hegeman, A, Sweetman, L, Valberg, S **2014**, “Hypoglycin A concentrations in seeds of *Acer pseudoplatanus* trees growing on atypical myopathy-affected and control pastures”, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 28, pp. 1289–93.

*Unger-Torroledo, L, Straub, R, Lehmann, AD, Graber, F, Stahl, C, Frey, J, Gerber, V, Hoppeler, H, Baum, O **2010**, “Lethal toxin of *Clostridium sordellii* is associated with fatal equine atypical myopathy”, *Veterinary Microbiology*, vol. 144, pp. 487-92.

*Valberg, SJ, Sponseller, BT, Hegeman, AD, Earing, J, Bender, JB, Martinson, KL, Patterson, SE, Sweetman, L **2013**, “Seasonal pasture myopathy/atypical myopathy in North America associated with ingestion of hypoglycin A within seeds of the box elder tree”, *Equine Veterinary Journal*, vol. 45, pp. 419-26.

*van der Kolk, JH, Wijnberg, ID, Westermann, CM, Dorland, L, de Sain-van der Velden, MGM, Kranenburg, LC, Duran, M, Dijkstra, JA, van der Lugt, JJ, Wanders, RJA, Gruys, E **2010**, “Equine acquired multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) in 14 horses associated with ingestion of Maple leaves (*Acer pseudoplatanus*) covered with European tar spot (*Rhytisma acerinum*)”, *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 101, pp.289-91.

*van Galen, G, Amory, H, Sertheyn, D, Votion, D **2008**, “Diagnostic différentiel des troubles musculaires.”, *Proceedings des Journées AVEF (Association des Vétérinaires Equins Français)*. Available from: <<http://hdl.handle.net/2268/98779>>. [20 april 2015].

*van Galen, G, Saegerman, C, Marcillaud Pitel, C, Patarin, F, Amory, H, Baily, JD, Cassart, D, Gerber, V, Hahn, C, Harris, P, Keen, JA, Kirschvink, N, Lefere, L, McGorum, B, Muller, JMV, Picavet, MTJE, Piercy, RJ, Roscher, K, Sertheyn, D, Unger, L, van der Kolk, JH, van Loon, G, Verwilghen, D, Westermann, CM, Votion, D **2012 A**, “European outbreaks of atypical myopathy in grazing horses (2006–2009): Determination of indicators for risk and prognostic factors”, *Equine Veterinary Journal*, vol. 44, pp.621-5.

*van Galen, G, Marcillaud Pitel, C, Saegerman, C, Patarin, F, Amory, H, Baily, JD, Cassart, D, Gerber, V, Hahn, C, Harris, P, Keen, JA, Kirschvink, N, Lefere, L, McGorum, B, Muller, JMV, Picavet, MTJE, Piercy, RJ,

Roscher, K, Serteyn, D, Unger, L, van der Kolk, JH, van Loon, G, Verwilghen, D, Westermann, CM, Votion, D **2012 B**, “European outbreaks of atypical myopathy in grazing equids (2006–2009): Spatiotemporal distribution, history and clinical features”, *Equine Veterinary Journal*, vol. 44, pp.614-20.

*van Galen, G, Votion, D **2013 A**, “Management of cases suffering from atypical myopathy: Interpretations of descriptive, epidemiological and pathophysiological findings. Part 1: First aid, cardiovascular, nutritional and digestive care”, *Equine Veterinary Education*, vol. 25, no 5, pp. 264-70.

*van Galen, G, Votion, D **2013 B**, “Management of cases suffering from atypical myopathy: Interpretations of descriptive, epidemiological and pathophysiological findings. Part 2: Muscular, urinary, respiratory and hepatic care, and inflammatory/infectious status”, *Equine Veterinary Education*, vol. 25, no 6, pp. 308-14.

Vengust, M, Arroyo, LG, Weese, JS, Baird, JD **2003**, “Preliminary evidence for dormant clostridial spores in equine skeletal muscle”, *Equine Veterinary Journal*, vol. 35, no5, pp. 514-6.

*Votion, DM, Linden, A, Saegerman, C, Engels, P, Erpicum, M, Thiry, E, Delguste, C, Rouxhet, S, Demoulin, V, Navet, R, Sluse, F, Serteyn, D, van Galen, G, Amory, H **2007**, “History and clinical features of atypical myopathy in horses in Belgium (2000-2005)”, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 21, pp. 1380-91.

*Votion, D **2012** “The story of equine atypical myopathy: a review from the beginning to a possible end”, *ISRN Veterinary Science*, vol. 2012, article no 281018.

*Votion, DM, van Galen, G, Sweetman, L, Boemer, F, de Tullio, P, Dopagne, C, Lefère, L, Mouithys-Mickalad, A, Patarin, F, Rouxhet, S, van Loon, G, Serteyn, D, Sponseller, BT, Valberg, SJ **2014**, “Identification of methylenecyclopropyl acetic acid in serum of European horses with atypical myopathy”, *Equine Veterinary Journal*, vol. 46, pp.146-9.

*Westermann, CM, de Sain-van der Velden, MGM, van der Kolk, JH, Berger, R, Wijnberg, ID, Koeman, JP, Wanders, RJA, Lenstra, JA, Testerink, N, Vaandrager, AB, Vianey-Saban, C, Acquaviva-Bourdain, C, Dorland, L **2007**, “Equine biochemical multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) as a cause of rhabdomyolysis”, *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 91, pp.362-9.

*Westermann, CM, Dorland, L, Votion, D, de Sain-van der Velden, MGM, Wijnberg, ID, Wanders, RJA, Spliet, WGM, Testerink, N, Berger, R, Ruiter, JPN, van der Kolk, JH **2008**, “Acquired multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 10 horses with atypical myopathy”, *Neuromuscular Disorders*, vol.18, no 5, pp. 355-64.

*Westermann, CM, Dorland, L, van Diggelen, OP, Schoonderwoerd, K, Bierau, J, Waterham, HR, van der Kolk, JH **2011**, “Decreased oxidative phosphorylation and PGAM deficiency in horses suffering from atypical myopathy associated with acquired MADD”, *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 104, pp.273-

Anexo I. Organismos contactados para obtener muestras de sámaras de *A. pseudoplatanus*

Área	Ciudad, Organismo	Respuesta
Madrid	Madrid, Instituto nacional de investigaciones agrícolas (INIA)	N
	Madrid, Jardín botánico de Madrid	S
	Álcala de Henares, Real Jardín botánico Juan Carlos I	*,S
Norte de Castilla y León	León, Universidad de León, Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria (ETSIA)	N
	León, Particulares	S, I
	Valladolid, Particular (botanista)	N
	Valladolid, Universidad de Valladolid	N
	Laciana/Villablino, Particular (centro ecuestre)	N
Galicia	Vimianzo, Ayuntamiento	S
	Padrón, Jardín botánico de Padrón	S
Asturias	Posada de Valdeón, Parque Nacional de los Picos de Europa	N
	Gijón, Jardín Botánico Atlántico	N
Cantabria	Santander, IES La Granja	N
País Vasco	Bilbao, Parque Natural de Urkiola	N
La Rioja	Hormilla, Jardín botánico de La Rioja	N
Pirineo Aragonés	Broto, Parque Nacional de Ordesa y Monte perdido	N
	Rañín, Particulares	I
Cataluña	Barcelona, Jardín botánico de Barcelona	*, S

(N: no contestó (11/19), I: no consiguió identificar a ejemplares de *Acer pseudoplatanus* en la área determinada (2/19), S: no quedaban sámaras en los árboles (6/19), *: mandaron muestras de semillas conservadas (2/19)).

Anexo II. Protocolo de determinación de hipoglicina A en las semillas de *A. pseudoplatanus*

A lo largo de todo el proceso se deben llevar guantes, ya que el método de HPTLC es muy sensible, y la mínima contaminación de las muestras por hipoglicina A directamente o mediante el material, dará resultados erróneos.

Extracción con metanol de la hipoglicina A

Muestrear unos 5 g de sámaras desecadas.

Picar las sámaras completas (semillas + alas) en la picadora.

Pesar la muestra con una balanza de precisión.

Añadir 20 mL de metanol, agitar con el vortex y dejar en reposo 15 minutos.

Centrifugar 15 min a 4100 rpm.

Recuperar 10 mL de sobrenadante.

Poner el recipiente en la campana y dejar que evapore el metanol a temperatura ambiente bajo flujo de aire durante una noche.

Añadir 5 mL de agua ultrapura (Millipore) y agitar con el vortex.

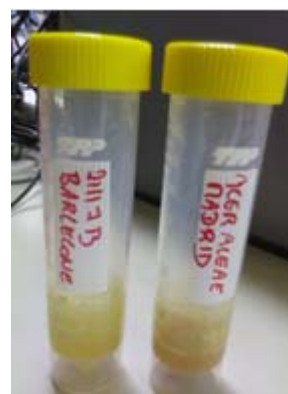
Médida por High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

→ Preparación de la placa

Preparar la placa (placa de silicio 60A marcada con un fluorocromo F254 de 10 x 20 cm): lavar en metanol 24 h, delimitar con líneas el campo de migración.

Lavar una jeringa Hamilton 3 veces con una solución diluida de HCl y luego tres veces con una solución de agua ultrapura (Millipore).

Cargar la jeringa Hamilton con 10 μ L de solución estándar (solución comercial de 200 μ g de hipoglicina A por mL de metanol (no agua!))



Programar el aparato Linomat V para que deposite 1 μL , 3 μL y 6 μL de solución en los tres primeros pocillos, que servirán para trazar una recta patrón

Se dejan también 3 pocillos vacíos como control negativo.

Usar otra jeringa para las muestras. Lavarla como se describió anteriormente.

Cargar la jeringa Hamilton con 10 μL de solución de muestra.

Programar el aparato Linomat V para que deposite 3 μL de solución en cada uno de los tres pocillos siguientes, con los que determinaremos la hipoglicina A por triplicado.

Secar 3 minutos al aire libre, y luego 2 minutos con secador de pelo.

→ Elución

Verter 20 mL de fase móvil (de composición (en volumen) 70% de isobutanol, 20% de ácido acético y 10% de agua ultrapura (Millipore)) en una cámara cromatográfica CAMAG.

Cerrar la cámara durante 3 minutos para que este saturada.

Colocar la placa en la cámara sin que entre en contacto con la fase móvil durante 15 minutos.

Hundir la base de la placa en la fase móvil sin que esta contacte con los pocillos, cerrar la cámara y esperar hasta que el frente de la fase móvil llegue a la línea que delimita por arriba el campo de migración.

Sacar la placa y dejar secar al aire libre en la campana. Luego aplicar el secador de pelo durante 2 minutos.

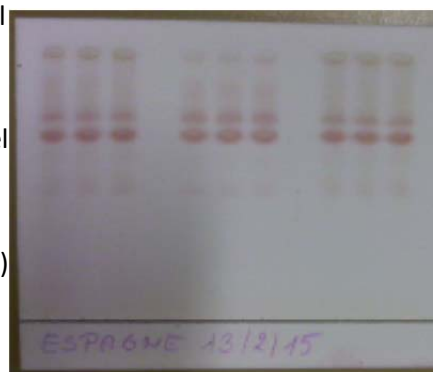
Vaporizar el revelador sobre la placa (solución comercial de ninhidrina) 3 veces, dejando que se seque la placa entre cada aplicación.

Colocar inmediatamente la placa en la estufa, en medio húmedo a 115°C, durante 5 minutos hasta coloración.

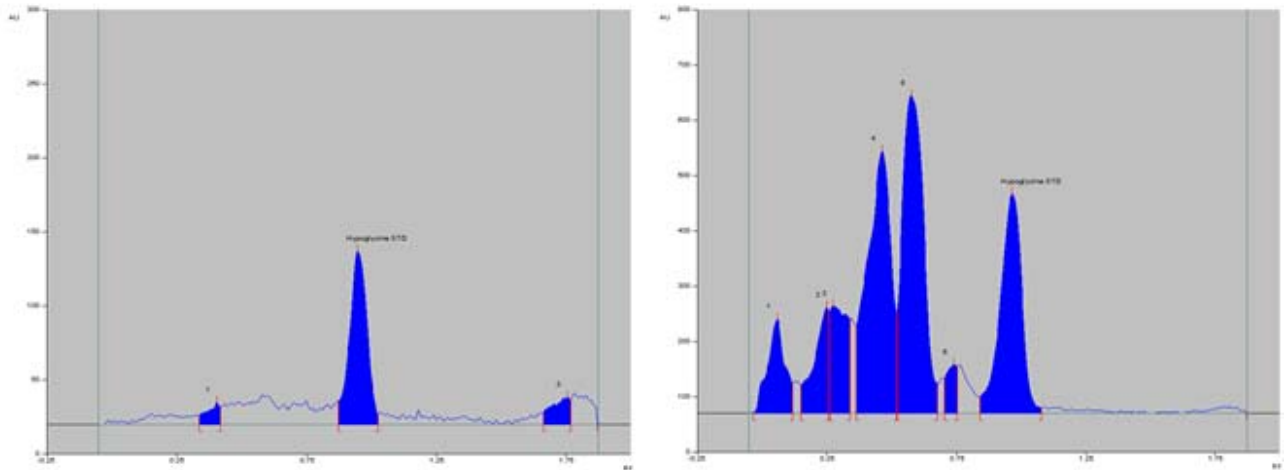
→ Lectura

Disponer la placa en el Scanner TLC 3 y programar el aparato para una lectura a 490nm.

Para cada pocillo, el software winCATS Planar Chromatography Manager traza el cromatograma (curva de absorción en función de la posición para cada pocillo).

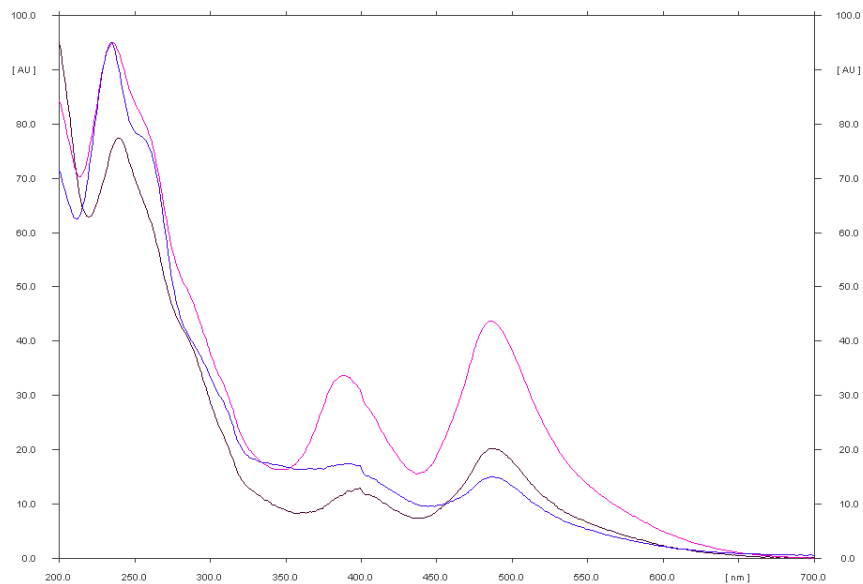


Anexo III. Gráficos de absorción



Ejemplos de cromatogramas (curvas de absorción en función de la posición).

(Izquierda: estándar, derecha: muestra de Barcelona. Está marcado el pico de Rf próximo a 0,51)



Espectro de absorción (entre 200 y 700 nm) en el pico de Rf próximo a 0,51

(Negro: estándar, rosa: muestra de Barcelona, azul: muestra de Madrid. El perfil es el mismo en las tres muestras, lo que confirma que se trata de la misma sustancia)

Anexo IV. Cálculos para determinar el contenido en hipoglicina A

Tabla de los resultados obtenidos para la solución patrón (200µg de hipoglicina A por mL de metanol)

Volumen (µL)	Hipoglicina A (µg)	Área bajo la curva (unidad arbitraria, UA)
1	0,2	3631,7
3	0,6	3820,3
6	1,2	4110,8
Recta de regresión (calculada por winCATS) : Hipoglicina A (µg) = área bajo la curva (UA) * 0,002086 - 7,371 (coeficiente de regresión R2=0,9999)		

Se añade 20 mL de metanol a la muestra inicial y se recupera 10 mL de sobrenadante. Además, según el protocolo de validación del método, el metanol extrae sólo parte (50,49%) de la hipoglicina A contenida en la muestra, de modo que se recupera $(1/2)*0,5049$ de la hipoglicina contenida en la muestra inicial, de masa X (en g). Tomando en cuenta que en un pocillo se depositan 3 µL de solución obtenida tras extracción con metanol y adición de 5 mL de agua ultrapura, hay que aplicar un factor $u = (2*5)/(3*X*0,5049) = 6,602/X$ Para pasar de “µg de hipoglicina A en el pocillo” a “µg hipoglicina A por mg de sámara”

Por último, para obtener resultados comparables hay que aplicar un factor corrector a la muestra de Madrid que contenía semillas (sin alas) en la vez de sámaras completas. Suponiendo que el contenido de las alas en hipoglicina A es nulo, de una muestra de 10 g de sámaras obtenemos 6,9 g de semillas, por tanto el factor corrector aplicable al contenido en hipoglicina A es de $v = 0,69$.

Tabla de los resultados obtenidos para las muestras de Madrid y Barcelona

Muestra		Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio ± desviación estándar
Madrid (2,2401 g de semillas) u = 2,947 v = 0,69	Área bajo la curva (cm ²)	6609	5998	6004	
	µg hipoglicina A en el pocillo	6,41	5,14	5,15	
	µg hipoglicina A por mg de semilla	18,9	15,14	15,18	
	µg hipoglicina A por mg de sámara	13,0	10,5	10,5	11,3 ± 1,5
Barcelona (2,6038 g de sámaras) u = 2,535	Área bajo la curva (cm ²)	5053	4954	4766	
	µg hipoglicina A en el pocillo	3,17	2,96	2,57	
	µg hipoglicina A por mg de sámara	8,03	7,50	6,51	7,35 ± 0,77

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Cecilia Sosa Misuraca y Dominique Votion por co-dirigir ese trabajo.

Damos las gracias también a Jean Habyarimana por su ayuda y sus consejos.

Expresamos nuestra gratitud a todas las personas y organismos que, en mayor o menor medida, contribuyeron a la elaboración de ese trabajo, en particular a los jardines botánicos de Alcalá de Henares y Barcelona por mandar las muestras necesarias para la realización de la parte experimental.

Y mandamos un abrazo tierno al pequeño vaquero-nabatero y a la princesita del esquí por recorrer el Pirineo en búsqueda de sámaras, deseándoles mucha satisfacción ecuestre;)