



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

## **Título:**

Descripción de un caso de fibrosis pulmonar multinodular equina (FPME) y revisión bibliográfica

Case description of an equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF) and bibliographic review

## **Autor:**

Iván Montañés Sancho

## **Directores:**

Lluís Luján Lerma

Francisco José Vázquez Bringas

Facultad de Veterinaria  
2016

# ÍNDICE

1. Resumen.....	Pag. 2-3
2. Justificación.....	Pag. 3
3. Objetivos.....	Pag. 3
4. Metodología.....	Pag. 3-4
5. Introducción.....	Pag. 4-5
6. Resultados.....	Pag. 6-22
6.1. Revisión bibliográfica de la fibrosis pulmonar multinodular equina (FPME) y el herpes virus equino tipo 5 (EHV-5)	
6.1.1. Cuadro clínico de la FPME.....	Pag. 6-7
6.1.2. Cuadro lesional de la FPME.....	Pag. 7-8
6.1.3. Etiopatogenia de la FPME.....	Pag. 9-11
6.1.4. Epidemiología de la FPME y el EHV-5.....	Pag. 12-13
6.1.5. Diagnóstico.....	Pag. 13-14
6.1.6. Tratamiento y pronóstico.....	Pag. 14-15
6.2. Descripción del caso clínico.	
6.2.1. Examen clínico. ....	Pag. 16
6.2.2. Pruebas de diagnóstico complementarias. ....	Pag. 16-19
6.2.3. Necropsia. ....	Pag. 19-22
6.2.4. Resultados de PCR y de las biopsias antemortem.....	Pag. 22
6.2.5. Diagnóstico.....	Pag. 22
7. Discusión. ....	Pag. 22-24
8. Conclusiones. ....	Pag. 24-25
9. Valoración personal. ....	Pag. 25
10. Bibliografía. ....	Pag. 26-30

**1. Resumen:** En Junio de 2015, fue remitido al Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza, un caballo macho, castrado, de 26 años, con un historial de adelgazamiento progresivo. En el examen clínico destacó el hallazgo de disnea mixta con marcados esfuerzos inspiratorios junto con un patrón nodular-intersticial difuso en las radiografías. Antes de establecer un diagnóstico y debido al pobre pronóstico, el animal fue eutanasiado. En la necropsia destacó la presencia de múltiples nódulos firmes y blanquecinos distribuidos por todo el pulmón. Tras el estudio histológico se estableció el diagnóstico definitivo de fibrosis pulmonar multinodular equina (FPME). Además, se realizó una PCR para el herpesvirus equino tipo 5 (EHV-5) en tejido pulmonar, cuyo resultado fue positivo. La FPME es una enfermedad pulmonar progresiva exclusiva de los caballos de mediana y alta edad que fue descrita por primera vez en el año 2007 en EEUU, en asociación a la infección por EHV-5, aunque su papel en la patogenia no está claramente definido. La infección por EHV-5 está distribuida a nivel mundial, mostrando prevalencia variable aunque generalmente alta. Sin embargo, la frecuencia de presentación de la enfermedad es baja. En la patología macroscópica de la enfermedad se han descrito dos presentaciones, ambas caracterizadas por la presencia de múltiples nódulos blanquecinos en la superficie y en la sección pulmonar. En el estudio histológico de ambas formas, se observa una neumonía intersticial con una marcada fibrosis intersticial. La histología es la única prueba válida para la confirmación del diagnóstico de FPME. La FPME ha sido escasamente descrita en nuestro país y debería incluirse en el diagnóstico diferencial de todos caballos que manifiesten signos respiratorios y adelgazamiento progresivo.

**1. Abstract:** A 26 year old gelding horse with a history of chronic weight loss was referred to the Veterinary Hospital at the University of Zaragoza. On physical examination, the horse showed mixed dyspnea with increased inspiratory and expiratory efforts along with nodular-interstitial lung pattern under X ray examination. The animal was killed before a diagnosis was established due to poor prognosis. The presence of firm, whitish nodules throughout the lung was remarkable at the postmortem exam. A final diagnosis of equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF) was established after the histopathologic study. Moreover, PCR for the detection of equine herpesvirus type 5 (EHV-5) was performed with positive results. EMPF is an specific pulmonary progressive disease of adult horses that was first described in the USA in 2007, linked to EHV-5 infection, although the role of the virus in the pathogenesis of the disease is not clear. The EHV-5 infection is distributed worldwide and it shows a variable but normally high prevalence. However, the incidence of the clinical disease is very low. Grossly, the disease shows two presentation forms, both of them characterized by the presence of

various whitish nodules on the pleural and cut surface. Histopathological study of both gross forms shows an interstitial pneumonia and severe interstitial fibrosis. Histopathology is the only confirmatory test for the diagnosis of EMPF. EMPF has been scarcely described in Spain and this disease should be included in the differential diagnosis of horses with respiratory signs and chronic weight loss.

## **2. Justificación:**

Se ha realizado este trabajo de fin de grado, ya que por primera vez se describió un caso de fibrosis pulmonar multinodular equina (FPME) en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HVUZ), que además es uno de los primeros diagnosticados en España. Se trata de una enfermedad poco conocida, descrita por primera vez en 2007 y donde actualmente se lleva a cabo una intensa investigación, ya que todavía no han sido aclarados muchos aspectos de esta patología, por lo que además de la presentación del caso se ha realizado una revisión bibliográfica completa.

## **3. Objetivos:**

Los objetivos del presente TFG son: i) descripción completa de un caso clínico de FPME diagnosticado en el HVUZ, ii) revisar el conocimiento que hasta la fecha se tiene de la enfermedad mediante una exhaustiva revisión bibliográfica y iii) realizar una discusión para comparar los hallazgos encontrados en nuestro caso con los hallazgos observados en otros casos publicados previamente

## **4. Metodología:**

La metodología utilizada en la presentación del caso comprende la descripción de una serie de pruebas clínicas, tales como exploración clínica, ecografías, radiografías y toracoscopia, junto con la descripción macroscópica y microscópica de las lesiones halladas. El estudio microscópico se ha realizado a partir de tejido pulmonar tomado durante la necropsia, el cual fue fijado en formol al 10%, incluido en parafina y conservado en dos bloques diferentes. De forma rutinaria, se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina y tras confirmar el diagnóstico de FPME, se realizó un estudio mediante tinciones especiales, en concreto, Plata de metenamina y tricrómico de Gallego y de Masson, además de tinciones de inmunohistoquímica para varios antígenos de interés.

En cuanto a la identificación del EHV-5, se realizó un estudio PCR sobre tejido pulmonar

obtenido en la necropsia e incluido en parafina. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de enfermedades infecciosas de la universidad y a un laboratorio en EEUU. En el caso de la revisión bibliográfica se ha utilizado la base de datos pubmed y la biblioteca de la UNIZAR y para la gestión de las citas y la bibliografía se ha empleado el gestor de citas, Refworks.

## **5. Introducción**

Las enfermedades intersticiales pulmonares del caballo o también conocidas como neumonías intersticiales, son un grupo heterogéneo de patologías esporádicas respiratorias, que se presentan en los équidos adultos y se caracterizan principalmente por el desarrollo de una fibrosis intersticial (Rush, B. y Mair, T., Equine Respiratory Diseases, 2004; Williams et al. 2007). Durante los últimos años se han diagnosticado en caballos casos de neumonías intersticiales, que tradicionalmente se han clasificado dentro de tres grupos denominados: neumonía intersticial eosinofílica o idiopática, neumoconiosis silicosa y neumonía granulomatosa idiopática (Dunkel et al. 2012). A nivel clínico estas enfermedades se caracterizan por cuadros crónicos respiratorios, con datos hematológicos indicativos de una inflamación crónica, por lo que en muchas ocasiones su diferenciación solo es posible mediante técnicas de histología (Dunkel et al. 2012). La patogenia de este grupo de enfermedades no está clara y en muchos casos el agente causal no se logra identificar denominándose los procesos comúnmente como “neumonías intersticiales idiopáticas” (Dunkel et al. 2012). Algunos agentes vinculados con el desarrollo de estos procesos, son por ejemplo fenómenos de hipersensibilidad, agentes tóxicos de plantas, gases tóxicos, silicosis, endotoxinas etc. (Rush, B. y Mair, T., Equine Respiratory Diseases, 2004; Poth et al. 2009),

En el año 2007 en EEUU, fue descrita una nueva forma de neumonía intersticial, diferente a las descritas con anterioridad y caracterizada por el desarrollo de una marcada fibrosis pulmonar intersticial con patrón nodular. La enfermedad se denominó fibrosis pulmonar multinodular equina (FPME) y el desarrollo de la misma se asoció a la infección vírica a nivel pulmonar de un gammaherpesvirus conocido como herpes virus equino tipo 5 (EHV-5) (Williams et al. 2007).

**Los herpesvirus** son un numeroso grupo de virus ADN, con un tamaño variable de entre 120-250 nm y envueltos por una membrana glicoprotéica. Están ampliamente distribuidos por todo el reino animal, afectando tanto a hospedadores vertebrados como invertebrados. En general presentan alta especificidad por sus hospedadores y no sobreviven bien fuera de ellos, inactivándose con facilidad. En cuanto a su patogenia, lo más característico es la capacidad de persistir en sus hospedadores en un estado latente, generando en muchas ocasiones ciclos continuos de reactivación-inactivación. También es característico su elevada capacidad para

evadir el sistema inmune (SI), de manera que en muchas ocasiones generan infecciones latentes en las células del SI (Maclacnlan, J.N. y Dubovi, J.E., Fenner's Veterinary Virology, Fourth Edition, 2011;).

Taxonómicamente el Orden herpesvirales, se encuentra subdividido en tres familias conocidas como *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae* y *Malacoherpesviridae*. Hasta la fecha, se han identificado 5 herpesvirus capaces de producir naturalmente infección en los caballos, estando todos ellos englobados dentro de la familia *Herpesviridae*.

Agente vírico	Subfamilia	Relevancia clínica
Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1)	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Puede producir abortos, síntomas respiratorios inespecíficos (tos, disnea, intolerancia al ejercicio etc.), y mieloencefalopatía (EHM).
Herpesvirus equino tipo 2 (EHV-2)	<i>Gammaherpesvirinae</i>	No está clara su patogenia (Poth et al; 2009). Se ha relacionado con problemas respiratorios de vías altas y bajas (neumonía), queratoconjuntivitis, y úlceras gastroesofágicas
Herpesvirus equino tipo 3 (EHV-3)	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Exantema coital: lesiones ulcerativas y pustulares en pene, prepucio y vagina.
Herpesvirus equino tipo 4 (EHV-4)	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Virus de la rinoneumonitis, produce neumonías, ictericia y daño hepático en neonatos. Cuadro respiratorios en potros, y abortos en yeguas en último 1/3 de la gestación
Herpesvirus equino tipo 5 (EHV-5)	<i>Gammaherpesvirinae</i>	Posible asociación con FPME, linfomas y pancitopenias.

**TABLA 1:** *Herpesvirus equinos capaces de infectar naturalmente a los caballos y su relevancia clínica (Maclacnlan, J.N. y Dubovi, J.E., Fenner's Veterinary Virology, Fourth Edition, 2011).*

En concreto, el EHV-5 es un gammaherpesvirus del género percavirus, que fue reconocido por primera vez en 1987 (Browning y Studdert 1987) como un miembro diferente del entonces heterogéneo grupo de los herpesvirus equinos tipo 2 (EHV-2). Fue en el 2007 cuando se describió por primera vez su capacidad para inducir lesiones pulmonares (FPME) en caballos, siendo además la primera correlación en medicina veterinaria entre el desarrollo de una fibrosis pulmonar y una infección vírica (Williams et al. 2007).

## **6. Resultados:**

### **6.1. Revisión bibliográfica de la FPME y el EHV-5**

#### **6.1.1. Cuadro clínico de la FPME**

Desde la primera descripción de la enfermedad en 2007 (Williams et al. 2007), han sido varios los casos de FPME estudiados en EEUU, Europa y Australia, entre los que cabe mencionar a Hart et al. 2008; Wong et al. 2008; Poth et al. 2009; Kubiski et al. 2009; Niedermaier et al. 2010; Verryken et al. 2010; Lehmecker et al. 2010; Schneider et al. 2010; Marezonzi et al. 2011; Soare et al. 2011; Vander Werf et al. 2011; Back et al. 2012; Scharner et al. 2012; Schwarz et al. 2012; Spelta et al. 2013; Schwarz et al. 2013a; Schwarz et al. 2013b; Vander Werf et al. 2013; Vander Werf et al. 2014; Bawa et al. 2014; Dunowska et al. 2014; Panziera et al. 2014. De acuerdo con todos estos casos, la FPME se caracteriza clínicamente por ser una enfermedad pulmonar crónica y progresiva, exclusiva de los caballos, a la cual se han asociado una serie de signos clínicos concretos y que son diferentes en número e intensidad según la fase clínica que atraviesa el animal. Así pues, en las fases iniciales de la enfermedad todos los animales muestran falta de apetito y adelgazamiento progresivo, además también es muy frecuente que muestren episodios de fiebre recurrente, intolerancia al ejercicio, taquicardia y taquipnea. En ocasiones también muestran disnea leve, descarga nasal, tos, y con menos frecuencia alteraciones en la auscultación tales como crepitancias, sibilancias y aumento de los sonidos respiratorios. Conforme progresa la enfermedad estos signos se van haciendo más severos, de forma que se observa presencia de marcados esfuerzos respiratorios tanto espiratorios como inspiratorios, disnea mucho más marcada, episodios de fiebre más intensos y duraderos y la falta de apetito progresa hacia la anorexia, por lo que la condición corporal del animal se sigue deteriorando. En las fases finales de la enfermedad los animales padecen hipertensión pulmonar, pudiendo desarrollar *cor pulmonale* y descompensación cardiovascular (Schwarz et al. 2013a).

En cuanto a la hematología y bioquímica las anomalías que puede presentar un caballo con FPME son bastante variables, siendo lo más frecuente alteraciones tales como anemia regenerativa, hipoxemia, leucocitosis con neutrofilia madura, linfopenia, hiperfibrinogenia o hipoalbuminemia. En los casos que se realizó un seguimiento analítico (Schwarz et al. 2013a) se observó que las alteraciones se hacen más severas conforme la enfermedad progresa y si el tratamiento es eficaz las anomalías se revierten, aunque tardan a corregirse (Schwarz et al. 2013b).

Los cambios radiológicos progresan desde un patrón intersticial hacia un patrón nodular (Schwarz et al. 2013a), por lo que a nivel radiográfico es prácticamente constante el hallazgo de un patrón nodular intersticial difuso inicial, localizado principalmente en el área pulmonar medio-ventral y cráneo-ventral (Wilkins et al. 2013). En el examen ecográfico las anomalías que pueden estar presentes son el arrugamiento de la pleura y la presencia de zonas hiperecoicas con sombras acústicas anexas denominadas “colas de cometa”. Lo más característico es la presencia bilateral de zonas de consolidación pulmonar, con un tamaño variable de entre 1 y 8 cm, con un patrón nodular y distribuidas multifocalmente. Si existe una hipertensión pulmonar se puede poner en evidencia mediante la realización de una ecocardiografía. Tanto los cambios radiológicos como los cambios ecográficos se acentúan conforme progresa la enfermedad, de forma que los nódulos aumentan de tamaño en las radiografías y las zonas de consolidación pulmonar ecográficas también aumentan (Wilkins et al. 2013). En los pocos casos en los que hay respuesta al tratamiento, las anomalías ecográficas y radiológicas mejoran hasta desaparecer, siendo los cambios radiológicos los primeros en revertirse (Schwarz et al. 2013b).

El análisis citológico de fluidos pulmonares, bien sea extraídos mediante lavado broncoalveolar o mediante aspirado transtraqueal, suele ser compatible con una inflamación de tipo neutrofílico, con presencia de neutrófilos no degenerados, moderada cantidad de macrófagos y menor número linfocitos (Niedermaier et al. 2010). En la gran mayoría de los casos no se han identificado agentes infecciosos secundarios y en algunas ocasiones se han observado macrófagos con cuerpos de inclusión (CI) intranucleares eosinofílicos (Schwarz et al. 2013b).

#### **6.1.2. Cuadro lesional de la FPME**

Tanto a nivel macroscópico como microscópico las lesiones descritas para la FPME son similares entre los diferentes casos y por lo general, las lesiones varían en severidad, de tal manera que cuantos más días lleva instaurada la enfermedad, más severas son las lesiones. La siguiente descripción se basa en algunos trabajos citados en este TFG

**A) Macroscopía:** las alteraciones macroscópicas vinculadas a la FPME se localizan exclusivamente a nivel del aparato respiratorio, y según se ha descrito la enfermedad puede presentarse con dos aspectos diferentes (Williams et al. 2007; Poth et al. 2009):

- **Forma difusa:** se caracteriza por la presencia en el pulmón de numerosos nódulos coalescentes, blanquecinos y firmes al tacto, con un tamaño variable de entre 1 y 5



cm. Los nódulos se distribuyen por todo el pulmón y entre ellos apenas se observan áreas de tejido pulmonar sano.

- **Forma multifocal:** los nódulos firmes y blanquecinos tienen un tamaño de hasta 10 cm, se distribuyen multifocalmente y están rodeados por amplias zonas de tejido pulmonar normal. Su presentación es menos común

En ambas formas los pulmones están aumentados de tamaño, no se observan colapsados y es frecuente que la impresión costal en la superficie pleural sea evidente (Marezonzi et al. 2011). En algunos casos los linfonodos bronquiales están aumentados de tamaño, y muestran pérdida de su arquitectura (Poth et al. 2009; Schwarz et al. 2013a).

**B) Microscopía:** Histológicamente, independientemente de la forma de presentación macroscópica, se desarrolla neumonía intersticial y fibrosis intersticial, localizadas principalmente a nivel del parénquima alveolar. Los septos alveolares están muy expandidos, como consecuencia del depósito de fibras de colágeno y de la infiltración de células de tipo inflamatorio, entre las que predominan los linfocitos y en menor medida neutrófilos, células plasmáticas y ocasionalmente eosinófilos. En la mayoría de las ocasiones el colágeno depositado es maduro y se dispone de forma ordenada formando nódulos de fibrosis claramente delimitados respecto del tejido pulmonar sano. Sin embargo, en ciertas ocasiones el colágeno depositado es inmaduro y se entremezcla con el tejido sano impidiendo diferenciar ambos tejidos.

En las zonas lesionadas donde el colágeno se distribuye de forma ordenada, se produce una remodelación de la arquitectura normal del pulmón, de tal forma que las luces alveolares no se destruyen y están tapizadas por células epiteliales cuboidales, que son neumocitos tipo II hiperplásicos. Tanto el interior de los bronquiolos como estos espacios alveolares suelen estar ocupados por neutrófilos, macrófagos activados, detritus celulares, células gigantes multinucleadas y en raras ocasiones en el interior de los macrófagos alveolares se ven cuerpos de inclusión (CI) intranucleares eosinófilos. Este patrón lesional es característico de la FPME y recibe el nombre de *“alveolar-like architecture”* o *“honeycombing pattern”* (Poth et al. 2009). Sin embargo, en las áreas en las que el colágeno no se dispone de forma ordenada los septos alveolares son destruidos y no se visualiza dicha estructura. Cuando los linfonodos están afectados, lo que se observa es una hiperplasia reactiva con presencia de algunas células multinucleadas (Schwarz et al. 2013a).

### **6.1.3. Etiopatogenia de la FPME:**

**A) Etiología:** La presentación de la FPME se ha asociado a la infección pulmonar por el herpes virus equino tipo 5 (EHV-5) (Williams et al. 2007), aunque se han descrito casos de FPME con una co-infección pulmonar por EHV-5 y EHV-2 (Poth et al. 2009), por lo que quizás éste último también podría contribuir al desarrollo de la enfermedad (Marezonzi et al. 2011). De acuerdo con los principios básicos de epidemiología, para que un microorganismo sea identificado como agente etiológico de una enfermedad debe cumplir los 4 postulados de Koch, los cuales no cumple por completo el EHV-5 (Wilkins et al. 2013). A pesar de ello, estos autores y otros muchos (Torfason et al. 2008; Hart et al. 2008; Wang et al. 2008; Schwarz et al. 2013a), identifican al EHV-5 como el principal agente etiológico responsable del desarrollo de FPME, pero no descartan otras etiologías y factores secundarios responsables del proceso. Para ello se basan en:

1. Existen muchos casos de FPME en los que el EHV-5 ha sido el único agente pulmonar identificado, por lo que la mayoría descartan que el EHV-2 también participe en el desarrollo de FPME (Wong et al. 2008; Hart et al. 2008; Schwarz et al. 2013a).
2. El EHV-5 ha sido identificado en el pulmón mediante técnicas de PCR de los caballos diagnosticados de FPME y no se ha detectado en la mayoría de los casos control (Williams et al. 2007, Dunowska et al. 2014).
3. Mediante técnicas de microscopía electrónica e hibridación in situ, el EHV-5 ha sido identificado en el interior de macrófagos alveolares, que se localizaban en las áreas lesionadas del pulmón de caballos diagnosticados de FPME (Williams et al 2007)
4. Se ha conseguido reproducir la FPME en caballos sanos tras la inoculación a nivel pulmonar de ciertas cepas del EHV-5, vinculando la aparición y desarrollo de las lesiones a la infección pulmonar por estas cepas (Williams et al., 2013)
5. La frecuencia de detección del EHV-5, así como la carga viral observada en la sangre, secreciones nasales y en el lavado pulmonar de animales diagnosticados de FPME, es significativamente mayor que la observada en los animales sanos (Pusterla et al. 2015).

**B) Patogenia de la enfermedad:** La FPME se caracteriza por ser una patología pulmonar progresiva en la que el EHV-5 juega un papel central, bien sea como agente primario o como co-factor de un proceso multifactorial (Dunowska et al. 2014). Williams y colaboradores, en base a los datos obtenidos a partir de su estudio en el que se consiguieron reproducir la FPME en caballos sanos, propusieron que el inicio y progresión de las lesiones pulmonares, así como la fase clínica en la que se encuentra el animal, depende de que el EHV-5 esté en una fase lítica o en una fase latente y de la evolución de ambas en el tiempo. De manera que según estos autores al comienzo del proceso de la FPME el virus se localizaría en el pulmón, con una carga vírica baja y en fase latente, expresando aun así un número bajo de copias de ADN, que son suficientes para iniciar las lesiones alveolares y posterior desarrollo de fibrosis pulmonar. Durante esta fase de la patología los animales no muestran signos clínicos, el aislamiento vírico no es posible y no se encuentran CI en los macrófagos alveolares. Los mismos autores concluyeron que en algún momento y por diversos mecanismos no del todo bien conocidos actualmente, se produce una reactivación vírica instaurándose una fase lítica, que coincidiría con la progresión de las lesiones y a partir de la cual comienzan a observarse signos clínicos, siendo también frecuente la observación de CI en los macrófagos alveolares. A partir de este momento ambos estatus de infección conviven en el pulmón. En su estudio también concluyeron que tanto en los casos de FPME naturales (Williams et al. 2007), como en sus casos de FPME experimental inducida, el colágeno depositado era ya muy maduro, lo que sugiere que el intervalo de tiempo entre el daño pulmonar y el inicio de la fibrosis es muy corto.

Se ha sugerido que la mayor parte de los virus localizados en el pulmón están en estado latente, ya que se han obtenido resultados negativos en el cultivo celular realizado a partir de tejido pulmonar que había sido positivo a la PCR para el EHV-5. Estos autores también suponen que en la fase clínica de la enfermedad hay instaurada una infección lítica en el pulmón, pues los CI son indicativos de la misma (Williams et al., 2007 y Marezonzi et al., 2011, Dunowska et al. 2014)

Seguramente los mecanismos y circunstancias implicadas en el desarrollo de la FPME sean complejos, específicos y poco frecuentes, ya que pocos animales acaban desarrollando una fibrosis pulmonar. A pesar de no conocerse bien el proceso patogénico, para muchos autores no hay duda de que la infección por EHV-5 es una causa necesaria para el desarrollo de FPME (Williams et al. 2007,2013; Wong et al. 2008; Poth et al. 2009; Marezonzi et al. 2011; Dunkel et al. 2012; Wilkins et al., 2013).

### **Posibles mecanismos de patogénesis:**

- ❖ **La infección a nivel pulmonar y el papel de las células pulmonares** En el análisis realizado mediante qPCR a un caballo con FPME, se determinó que el EHV-5 estaba presente en varios órganos, pero de todos ellos sólo el pulmón presentaba lesiones. Además, la carga vírica era mayor en el pulmón que en el resto de órganos y concretamente en las áreas del pulmón que presentaban las lesiones más severas, lo que sugiere una fuerte correlación entre la infección por el EHV-5 a nivel pulmonar y el desarrollo de la FPME (Marezonzi et al. 2011). Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha identificado que en la FPME las células con mayor carga antigénica son los miofibroblastos y los macrófagos alveolares, por lo que sería de esperar que la infección a nivel pulmonar y el papel de ambas células sea clave en el desarrollo de FPME (Williams et al. 2013). Dichos autores, basan su hipótesis en el hecho de que los miofibroblastos se han catalogado como células responsables en la progresión de fibrosis pulmonares (Phan et al. 2012; Sivakumar et al. 2012) y en que el establecimiento de una infección latente en los macrófagos alveolares, es capaz de estimular la síntesis de factores profibróticos tales como el TGF- $\beta$ , que podrían actuar como mediadores del proceso (Stoolman et al. 2010). Los macrófagos activos regulan los mecanismos celulares de reparación tisular, angiogénesis, inflamación y secreción de factores profibróticos, además han sido propuestos como células clave en el desarrollo de la fibrosis idiopática humana (Mora et al. 2006). Por esta razón la alteración de las funciones de los macrófagos, como consecuencia de una infección activa por EHV-5 podría jugar un papel importante en el desarrollo de las lesiones (Dunowska et al. 2014).
- ❖ **La interacción con el sistema inmune:** El EHV-5 posee un gen homólogo al que codifica de manera natural la síntesis de interleucina 10 endógena, lo que le permite sintetizar una citoquina similar a la endógena, denominada *viral IL-10-like protein*. Esta citoquina de origen vírico posee la capacidad de producir inmunosupresión (Fortier et al. 2010), por lo que podría interferir con la respuesta inmunitaria del hospedador y ser clave en el establecimiento de la infección latente y en la reactivación de la misma. Otra posible causa es que, tras un episodio de inmunosupresión se produzca la reactivación vírica y posterior desarrollo de la FPME (Schwarz et al. 2013b)

Recientemente el EHV-5 ha sido identificado en caballos que padecían FPME junto con trastornos linfoproliferativos, como leucemias (Schwarz et al. 2012), linfomas (Vander Werf et al. 2013; Vander Werf et al. 2014; Bawa et al. 2014), por lo que es posible que el EHV-5 tenga capacidad también para inducir el desarrollo de este tipo de lesiones (Dunkel et al. 2012)

#### **6.1.4. Epidemiología de la FPME y el EHV-5**

**A) Epidemiología del EHV-5:** El EHV-5 se considera un virus ubiquitario, cuya infección es común entre la población equina y está distribuido mundialmente (Fortier et al. 2010; Marezonzi et al. 2010). Mediante técnicas moleculares (PCR) y de cultivo, el virus ha sido identificado *in vivo* en caballos de todo el mundo, con diferentes prevalencias. La detección del virus se ha realizado a partir de secreciones nasales, sangre (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) y de muestras del tracto respiratorio inferior, obtenidas mediante lavado broncoalveolar (*bronchoalveolar lavage, BAL*) o por aspirado transtraqueal (*tracheal wash, TW*) (Anexo II-TABLA 2). El EHV-5 se ha identificado en animales de todas las edades, desde caballos de 3 meses de edad hasta de 28 años y tanto en animales sanos, como en caballos diagnosticados de FPME o con otra enfermedad respiratoria diferente de la FPME. Algunos de los factores por los que la prevalencia de la infección es enormemente variable entre las poblaciones son los siguientes:

- **Edad:** La infección por EHV-5 tiene una prevalencia más elevada en potros que en animales adultos (Bell et al. 2006; Wang et al. 2007) mientras que otros factores como la raza o el sexo no influyen en la prevalencia del EHV-5 (Marezonzi et al. 2010)
- **Muestra analizadas:** En líneas generales, tanto en los caballos sanos como en animales con una enfermedad respiratoria diferente de la FPME, el lugar donde el EHV-5 ha sido detectado con mayor frecuencia es a nivel de las secreciones nasales (Anexo II - TABLA 2), siendo la fuente de excreción vírica y vía de contagio (Wang et al. 2007). El EHV-5 ha sido también identificado en la sangre (PBMC) de caballos no diagnosticados de FPME (Anexo II - TABLA 2) pero en general el porcentaje de detección es menor (Bell et al. 2006; Wang et al. 2007). En cuanto a la infección a nivel pulmonar, la presencia del EHV-5 en el BAL o el aspirado transtraqueal de animales no diagnosticados de FPME es prácticamente nula, por lo que se ha determinado que el EHV-5 no es un habitante común del tracto respiratorio bajo de los équidos (Fortier et al. 2009; Pusterla et al. 2015)
- **Técnicas analíticas:** En base a los datos del estudio de Wang et al. 2007, se sabe que cuando se intenta estimar la prevalencia del EHV-5 en sangre, es más sensible realizar técnicas de co-cultivo, que utilizar PCR. Por esta razón, estos mismos autores concluyeron que al utilizar la PCR convencional para estimar la prevalencia del EHV-5

en la sangre, dicha prevalencia se está subestimando, de manera que deberían utilizarse técnicas más sensibles, como la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) o técnicas de co-cultivo, tales como la adición al medio de cultivo de la citoquina IL-2 que favorece la reactivación vírica (Wang et al. 2007)

**B) Epidemiología de la FPME:** La FPME se ha caracterizado como una enfermedad esporádica e infecciosa en lugar de una enfermedad infectocontagiosa, dado que caballos sanos en contacto con caballos diagnosticados de FPME, no llegan a desarrollar la enfermedad (Williams et al. 2007; Wong et al. 2008; Soare et al. 2011). A pesar de que la infección por EHV-5 está ampliamente distribuida en la población equina, el número de animales infectados que desarrollan la enfermedad es muy bajo (Fortier et al. 2009b, 2010; Marezonzi et al. 2010), posiblemente porque no todas las cepas de EHV-5 poseen la capacidad para desarrollar una FPME y sólo unas pocas generan la enfermedad (Williams et al. 2013). Algunos también creen que la baja prevalencia podría deberse a que los casos que existen no se diagnostican correctamente (Wilkins et al. 2013). La enfermedad se presenta en caballos de media y elevada edad (Poth et al. 2009; Schwarz et al. 2013a) aunque se han descrito casos en potros de 2 años (Kubiski et al. 2009).

#### **6.1.5. Diagnóstico:**

**A) Diagnóstico antemortem:** La única prueba que permite confirmar el diagnóstico antemortem de FPME es el estudio histológico de tejido pulmonar, que se recomienda extraer mediante biopsia pulmonar ecoguiada y en la cual se han de identificar las lesiones histológicas características de la FPME (Pusterla et al. 2015). Sin embargo, aunque la biopsia pulmonar permite un diagnóstico in vivo, se trata de un procedimiento invasivo en el que pueden presentarse complicaciones, tales como epistaxis debido a una hemorragia pulmonar, tos y/o dificultad respiratoria, que se presentan con mayor frecuencia en los animales con problemas respiratorios avanzados (Pusterla et al. 2015).

El hallazgo por PCR del EHV-5 en el tejido pulmonar extraído mediante biopsia ecoguiada se ha descrito como una de las pruebas de referencia en el diagnóstico clínico, pero dado que hay caballos que pueden tener el virus y no desarrollar la enfermedad (Fortier et al. 2009a, 2009b), no permite confirmar el diagnóstico (Pusterla et al. 2015). El hallazgo en la historia clínica de signos clínicos, signos radiológicos, alteraciones hematológicas o bioquímicas y cambios ecográficos compatibles con FPME, no permite confirmar su diagnóstico, pero sí permite establecer un diagnóstico sospechoso de FPME, por lo que estas pruebas deberían realizarse previamente a la toma de una biopsia (Wong et al. 2008; Poth et al. 2009; Niedermaier et al.

2010; Wilkins et al. 2013; Pusterla et al. 2015). De todas las pruebas clínicas que se pueden realizar, la más recomendada es el estudio del lavado broncoalveolar (broncoalveolar lavage, BAL), que ha de ser testado por PCR y citología (Wong et al. 2008; Schwarz et al. 2012; Wilkins et al. 2013; Pusterla et al. 2015). Un resultado positivo para el EHV-5 a la prueba PCR realizada sobre el BAL es altamente sugestivo de que el animal padece FPME (Wong et al. 2008), además de ser la muestra que mejor se correlaciona con la carga vírica presente en el pulmón (Marezonzi et al. 2011). Es posible encontrar en la muestra del BAL macrófagos con CI, cuyo hallazgo también permite apoyar el diagnóstico de FPME, por lo que las citologías deben estudiarse exhaustivamente (Schwarz et al. 2012; Wilkins et al. 2013)

Recientemente también se ha señalado la prueba PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), como una herramienta útil en el diagnóstico, además de como marcador de la progresión de la enfermedad y respuesta al tratamiento (Pusterla et al. 2015). Estos mismos autores sugieren que, en aquellos casos en los que la toma de una biopsia suponga un riesgo, el análisis combinado por qPCR de sangre entera y secreciones nasales puede ser utilizado a nivel clínico para apoyar el diagnóstico de FPME.

**B) Diagnóstico postmortem:** Está basado en el hallazgo de las lesiones macro y microscópicas características del tejido pulmonar, junto con la identificación del EHV-5 en el tejido mediante PCR.

#### **6.1.6. Tratamiento y pronóstico:**

Actualmente el pronóstico para cualquier animal diagnosticado de FPME es fatal, si bien parece ser que un diagnóstico precoz puede mejorarlo (Wilkins et al. 2013). Tras el diagnóstico de la enfermedad en varios casos se instauró un tratamiento (Poth et al. 2009; Niedermaier et al. 2010; Schwarz et al. 2013a; Dunowska et al. 2014), pero tras una mejora inicial de los síntomas los animales siempre fueron eutanasiados. Hasta la fecha sólo existen 3 casos de remisión de enfermedad, dos mediante la administración de Aciclovir y corticoesteroides (Wong et al. 2008) y otro en el que se administró Valaciclovir durante 7 días (Schwarz et al. 2013b). Por el momento no hay evidencias fundamentadas sobre que pauta terapéutica debe administrarse (Dunkel et al. 2012; Wilkins et al. 2013) y hasta la fecha sólo existen algunas recomendaciones terapéuticas:

1. **Anti-inflamatorios:** Existe una controversia respecto al uso de los corticoides, de manera que algunos autores (Wilkins et al. 2013) recomiendan su uso a dosis antiinflamatorias, ya que inhiben la síntesis de citoquinas y otros mediadores que promueven el desarrollo de la

fibrosis (Polverino et al.2014). Por el contrario, debido a sus efectos inmunosupresores hay varios autores que no recomiendan su uso, ya que podría favorecer la replicación vírica y por ello la progresión de la fibrosis (Mareizoni et al., 2011).

2. **Antivirales:** No hay estudios que demuestren la eficacia de los antivirales contra el EHV-5 y su uso está basado en la experiencia y en otros estudios realizados sobre otros virus (Wong et al. 2010; Wilkins et al. 2005,2013; Schwarz et al. 2013b). Si se va a administrar una terapia por vía oral se recomienda utilizar Valaciclovir en lugar de Aciclovir (Wilkins et al. 2013; Schwarz et al. 2013b), ya que la biodisponibilidad del primero es 60% mayor que la del segundo (Maxwell et al.2008). El Valaciclovir es muy caro (Schwarz et al. 2013b), por lo que una posible opción es utilizar el Aciclovir intravenoso seguido de una pauta oral, la cual permite alcanzar concentraciones teóricamente eficaces (Wilkins et al. 2005,2013).
3. **Otros:** Otras terapias de mantenimiento propuestas, son el aporte de oxigenoterapia en casos de hipoxemia, el uso de broncodilatadores, AINES para la fiebre y pentoxifilina ya que favorece la irrigación pulmonar (Poth et al. 2009; Niedermaier et al. 2010)

## **6.2. Descripción del caso clínico**

Un caballo de raza cruzado, macho, castrado, y de 26 años de edad fue examinado en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza (Fig. 1). El animal presentaba un historial de adelgazamiento progresivo y apatía que comenzó unas 3 semanas antes de la llegada y como signo clínico destacable se observaba hirsutismo, por lo que fue remitido para confirmar la presencia de un adenoma de hipófisis.



**FIGURA 1:** *Caballo a la llegada al HCVZ. Obsérvese el hirsutismo en el flanco y la zona ventral del cuello.*

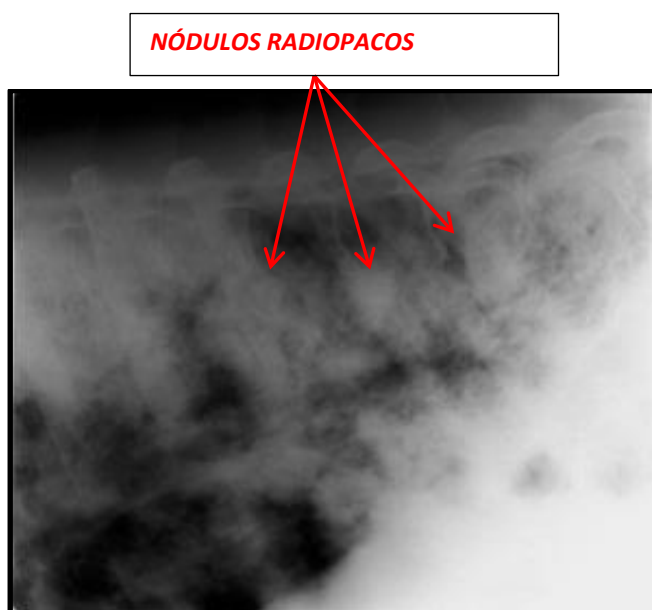


### **6.2.1. Examen Clínico:**

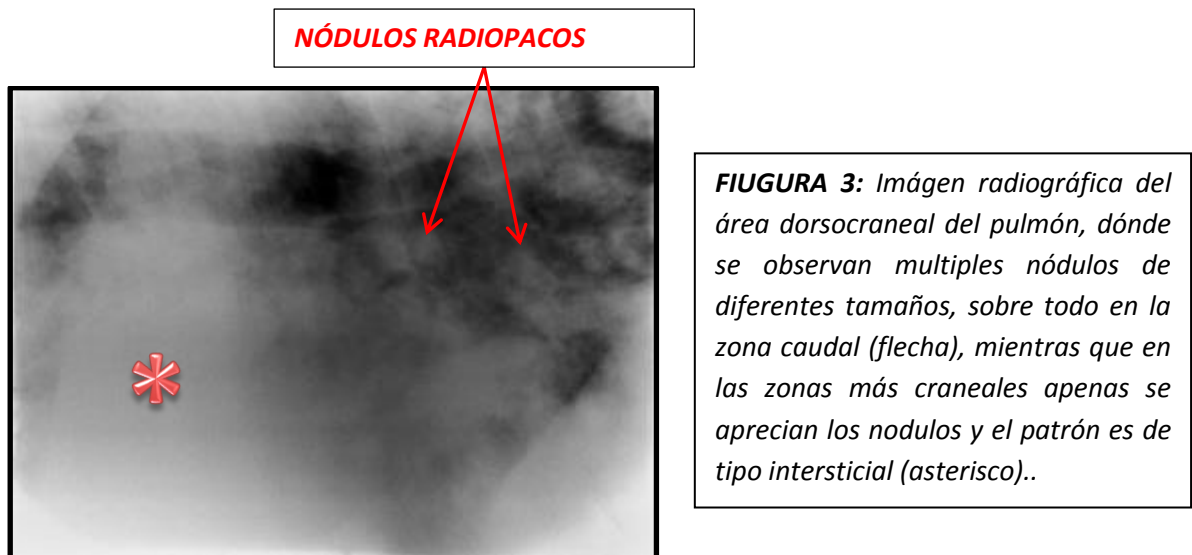
A su llegada el animal pesaba 326 kg, mostraba escasa condición corporal (2 sobre 5), estaba bastante apático, no tenía dolor y -como ya se ha señalado- presentaba un marcado hirsutismo. Se realizó una exploración clínica en la que se observó fiebre (37.9° C), pulso normal (40 pulsaciones/min) y la frecuencia respiratoria estaba ligeramente aumentada (24 respiraciones/min.). Los signos clínicos más relevantes se hallaron a nivel respiratorio, observándose una marcada dificultad respiratoria sobre todo en fase inspiratoria, con los ollares muy dilatados. En la auscultación se escucharon ronquidos en las zonas cráneo-ventrales y sibilancias en los lóbulos caudales, además de una disnea de tipo mixto. Durante la exploración clínica se extrajo una muestra de sangre a partir de la cual se realizó una hematología, observándose neutrofilia ( $8,78 \times 10^6$  cels/mL ref. 2,26-8,50), linfopenia ( $1,12 \times 10^6$  cels/mL ref. 1,50-7.70) y eosinopenia ( $0,07 \times 10^6$  cels/mL ref. 0,10-1,00). Se intentó hacer un lavado broncoalveolar, pero por problemas técnicos fue imposible realizar la recuperación del líquido de lavado introducido.

### **6.2.2. Pruebas diagnósticas complementarias:**

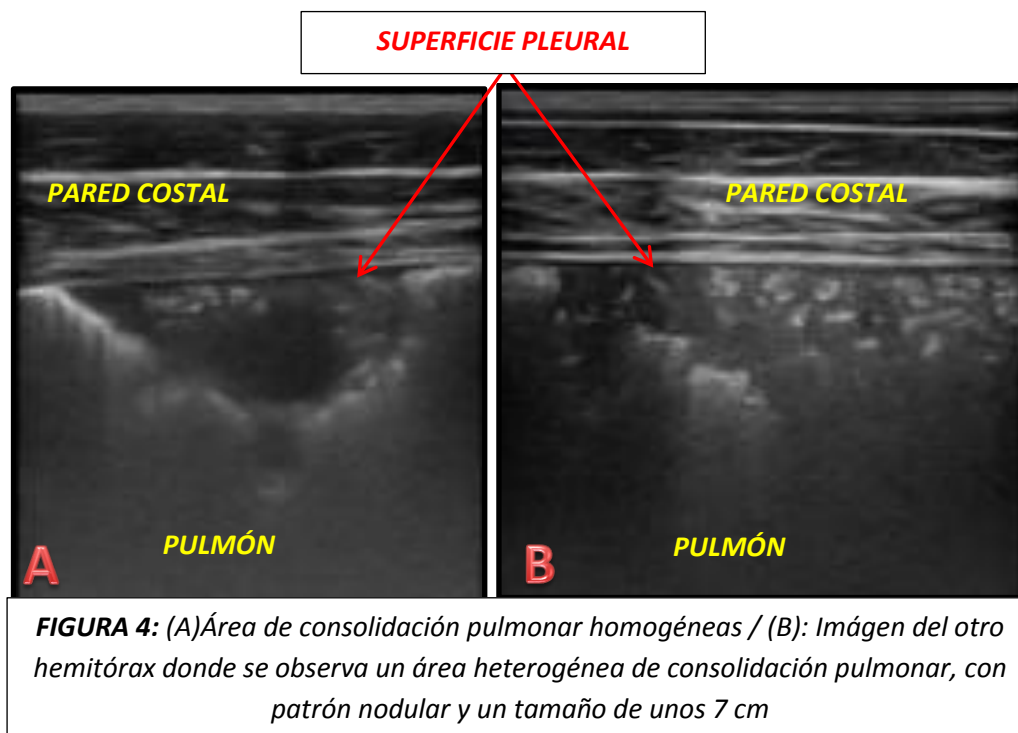
**A) Radiografías.** Se realizaron proyecciones latero-laterales de la región dorsocaudal y dorsocraneal de la caja torácica, en las que se identificó un patrón intersticial-nodular difuso en la toda la silueta pulmonar (Fig. 2 y 3). Los nódulos estaban distribuidos por todo el pulmón y tenían un tamaño variable, siendo algunos hasta 2 veces mayores que el cuerpo de las costillas (Fig. 2). En algunas zonas el patrón nodular desaparecía dando lugar a un patrón de tipo intersticial (Fig. 3).

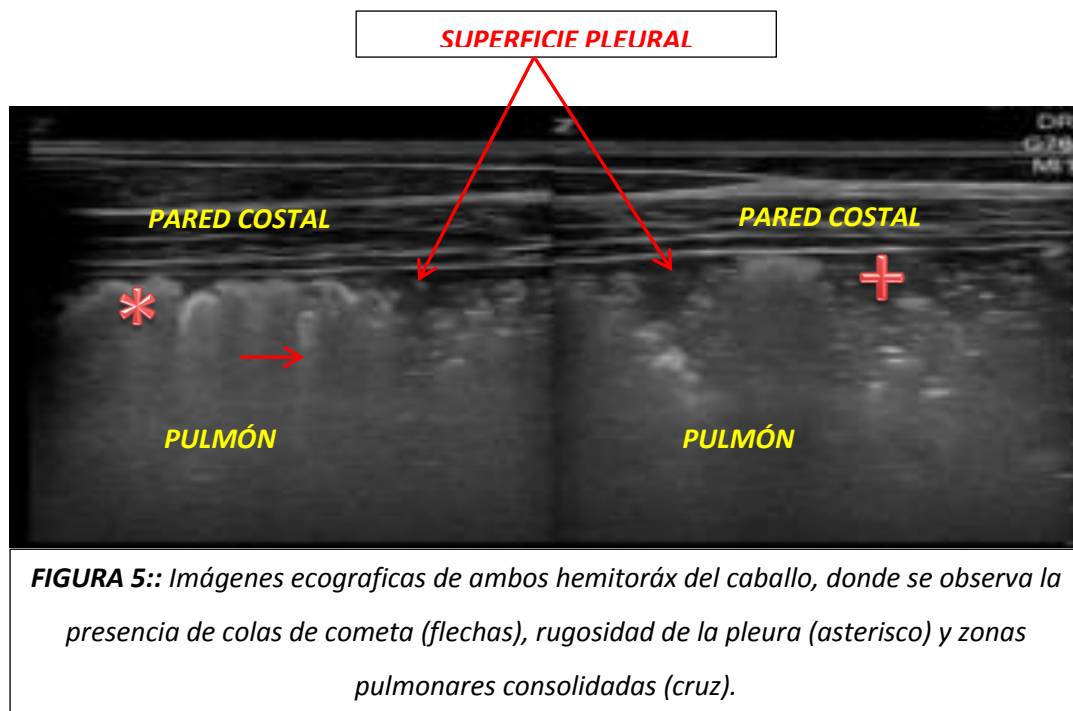


**FIGURA 2:** Imágen radiográfica del área dorsocaudal del pulmón, dónde se observan multiples nódulos de diferentes tamaños, distribuidos de forma difusa



**B) Ecografía:** Previamente a la realización de la ecografía, se procedió a rasurar la región pulmonar de ambos hemitórax hasta el 13º espacio intercostal. Las ecografías fueron realizadas con una sonda lineal de 5-7,5 MHz y se observó un engrosamiento y rugosidad de la superficie pulmonar, junto con diversas áreas de consolidación pulmonar con un patrón nodular, distribuidas a lo largo de toda la superficie pulmonar ecografiada, patrón que es compatible con una neoplasia (Fig. 4). Las zonas consolidadas tenían tamaños diferentes y la gran mayoría eran heterogéneas con zonas hiperecoicas e hipoecóicas entremezcladas (Figura 4) También se visualizaron las denominadas “colas de cometa”, cuyo hallazgo es compatible con áreas de fibrosis o inflamación (Fig. 4 y 5) Las anomalías descritas fueron observadas en ambos hemitórax.

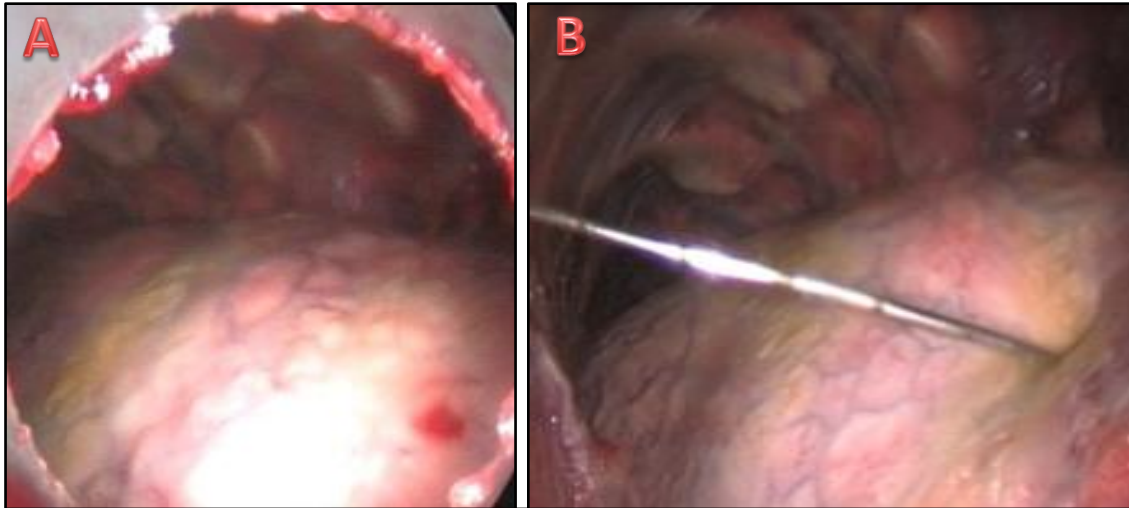




**C) Biopsia pulmonar ecoguiada:** Se realizó una biopsia ecoguiada por el hemitórax derecho, a la altura del 10º espacio intercostal. Se tomaron dos muestras, las cuales se enviaron al laboratorio de histopatología veterinaria y al de enfermedades infecciosas de la Universidad de Zaragoza para ser procesadas y realizar PCR.

**D) Toracoscopia:** Con el fin de poder manipular al caballo se sedó con romifidina y butorfanol y se procedió a rasurar el pelo de la superficie pulmonar del caballo y con alcohol se preparó asépticamente la zona. Además para el manejo del dolor se realizó una infiltración con lidocaína. Con el fin de acceder a la cavidad torácica se hizo una incisión de 15 mm en el 10º espacio intercostal, en la parte más dorsal a nivel de la musculatura epaxial. A través de la incisión se introdujo una aguja de Veress por el interior de la malla expandible del sistema Step (Autosuture®), dejando la aguja abierta para crear un pneumotórax e introducir sin riesgo la cánula con ayuda de un trocar romo. El endoscopio se insertó a través de la cánula. Finalmente tras la exploración se redujo el pneumotórax y se cerró la incisión en dos planos.

En la valoración del interior de la cavidad torácica se observó que la superficie del pulmón estaba irregular, con presencia de pequeñas nodulaciones de varios tamaños distribuidas al menos por toda la superficie valorable con el endoscopio (Fig. 6). Aprovechando el acceso a la cavidad torácica también se realizó una biopsia pulmonar, tomando dos muestras adicionales de tejido de las áreas irregulares, que se procesaron conjuntamente con las tomadas en el punto 3 (Fig.6)



**FIGURA 6:** *Toracoscopia: Se observa la presencia de nódulos en la superficie pulmonar (A) y la toma de una biopsia de una de las zonas afectadas (B).*

### **6.2.3. Necropsia**

Las pruebas diagnósticas anteriormente descritas no permitieron establecer ningún diagnóstico definitivo. Al sospecharse de la presencia de un adenoma de hipófisis, y una neoplasia pulmonar, y dado que el animal seguía empeorando, se procedió a realizar una eutanasia humanitaria con el consentimiento informado por parte del propietario

**A) Lesiones macroscópicas:** En concordancia con los signos clínicos las lesiones relevantes fueron halladas a nivel del aparato respiratorio y de la hipófisis. Además se hallaron otros cambios morfológicos no relacionados con la historia clínica del paciente.

❖ **Aparato respiratorio:** Los pulmones estaban aumentados de tamaño, con la impresión costal marcada en la pleura visceral y presentaban nódulos blanquecinos-amarillentos distribuidos multifocalmente en toda la superficie (Anexo I-Fig. 7). En la sección, el pulmón contenía múltiples nódulos sólidos de color blanquecino/beige, presentes en todo el parénquima y con diferentes presentaciones. En algunas zonas los nódulos tenían una distribución multifocal a coalescente y estaban separados por amplias zonas de tejido pulmonar congestivo y no afectado (Anexo I-Fig. 9), mientras que en la mayoría de las secciones del pulmón los nódulos invadían prácticamente todo el parénquima (Anexo I-Fig. 8). En otras áreas los nódulos tendían a la coalescencia pero no invadían todo el parénquima (Anexo I-Fig. 10). Los bronquios y la tráquea contenían abundante moco en su interior, y había bronquiectasia. El hilio pulmonar tenía una marcada congestión. Los

linfonodos mediastínicos y traqueobronquiales estaban aumentados de tamaño y mostraban ligera pérdida de la arquitectura normal

- ❖ **Hipófisis:** lesión nodular en parte intermedia, de crecimiento expansivo, compatible con un adenoma hipofisario.
- ❖ **Otros hallazgos** no relacionados con la historia clínica:
  - Tiroides: nódulo intraparenquimatoso de coloración marronácea, bien delimitado, no encapsulado, de crecimiento expansivo y compatible con un adenoma (Anexo I-Fig. 12)
  - Mesenterio: presencia de dos lipomas, uno de ellos necrosado (Anexo I-Fig. 11)
  - Esófago: Hipertrofia muscular de la parte distal (Anexo I-Fig. 13)

**B) Lesiones microscópicas:** En todos los órganos muestreados se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina. En el pulmón también se realizaron las tinciones especiales de tricrómico de Masson y Gallego, Plata y tinciones inmunohistoquímicas frente a CD3, citoqueratinas y macrófagos

- ❖ **Pulmón:** Histológicamente se observó que los nódulos descritos macroscópicamente se correspondían con extensas áreas de fibrosis intersticial y neumonía intersticial con marcado engrosamiento de los tabiques alveolares, consecuencia del depósito de fibras de colágeno y del infiltrado inflamatorio (Anexo I-Fig. 14 y 15). En concordancia con los hallazgos macroscópicos las lesiones histológicas estaban perfectamente delimitadas respecto de las áreas sanas del pulmón (Anexo I-Fig.16). En la mayoría de las áreas lesionadas se observó un patrón lesional característico denominado patrón en panal de abejas o “honeycombing” de manera que las luces alveolares estaban perfectamente definidas y visibles (Anexo I-Fig. 17), como consecuencia del depósito de fibras de colágeno maduro. Al realizar tinciones de inmunohistoquímica se observó que las luces alveolares estaban tapizadas por células epiteliales de morfología cuboidal positivas frente a citoqueratinas (Anexo I- Fig. 18), que eran compatibles con neumocitos tipo II hipertrofiados (Anexo I-Fig. 17). Respecto al contenido celular de las luces alveolares se observó que predominaban los linfocitos tipo T (Anexo I-Fig. 25,26), junto con neutrófilos en menor medida, macrófagos y ocasionalmente células multinucleadas (Anexo I-Fig.22). El mismo infiltrado inflamatorio pero en menor grado se observó en las luces de algunos bronquios y bronquiolos (Anexo I-Fig.24). En ocasiones se encontraron cuerpos de inclusión intranucleares esonofílicos en el interior de macrófagos alveolares (Anexo I-Fig.

23). Las células halladas en el intersticio fueron sobre todo linfocitos tipo T (Anexo I-Fig. 25,26) y en menor medida neutrófilos, macrófagos y células plasmáticas (Anexo I-Fig. 14,16,22 y 23). La pleura se encontraba de leve a moderadamente engrosada y contenía capilares con endotelio reactivo. Este tipo de lesiones descritas ocupaban la mayor parte del pulmón y se correspondían con una fibrosis y lesiones ya consolidadas. En otras zonas en las que las lesiones macroscópicas no eran evidentes se observó que los espacios alveolares apenas contenían celularidad, los tabiques estaban poco engrosados, comenzando a ser infiltrados por células y colágeno, aunque en este caso no era maduro y estaba más desordenado (Anexo I-Fig. 27). También se vieron otras zonas donde los tabiques comenzaban a estar engrosados y había gran cantidad de células en el interior de las luces alveolares (Anexo I-Fig. 28).

❖ **Linfonodos traqueo-bronquiales:** Se diagnosticó hiperplasia linfoide reactiva, leve histiocitosis en senos trabeculares y medulares y presencia ocasional de células gigantes multinucleadas.

❖ **Hipófisis:** Se diagnosticó adenoma hipofisario de la *pars intermedia*. Se observó proliferación neoplásica localizada en la parte intermedia de la hipófisis, no encapsulada, bien delimitada y de crecimiento expansivo que aparecía dividida en lóbulos de tamaño variable separados por septos de tejido conjuntivo de grosor variable. Dentro de los lóbulos las células tumorales se organizaban en nidos y cordones. Morfológicamente las células tumorales eran grandes, poligonales/cilíndricas con citoplasma eosinófilo, granulado y microvacuolizado, de límites imprecisos, núcleos redondos u ovalados, hipercromáticos, con cromatina densa o punteada y presencia ocasional de nucleolo evidente en el 50% de las células. El grado de anisocitosis y anisocariosis eran bajos y no se observaban mitosis.

❖ **Otros hallazgos:**

- **Tiroides:** Adenoma tiroideo. Se observó proliferación celular nodular, bien delimitada, encapsulada, formada por células poligonales-cúbicas organizadas en nidos separados por un fino estroma fibrovascular. Morfológicamente se caracterizaban por moderado citoplasma bien delimitado, eosinófilo y microvacuolizado, núcleo redondo a ovalado con cromatina punteada y sin presencia de mitosis.

- **Riñón:** Nefritis intersticial multifocal leve. Nefritis intersticial multifocal linfocítica en el córtex renal, congestión vascular, leve degeneración tubular en la corteza renal y mineralizaciones multifocales en los túbulos de la zona medular.
- **Lipoma:** Lipomas mesentéricos. Los nódulos consistían en una cápsula de tejido conjuntivo en el interior de la cual se observaba una proliferación de adipocitos bien diferenciados y trabéculas irregulares de tejido fibroso necrosado que contenía fibrina, restos de algunas células inflamatorias y hemosiderófagos.
- **Esófago:** Hipertrofia de la parte distal del esófago
- **Bazo:** Hiperplasia linfoide reactiva leve a moderada, hemosiderosis moderada con presencia multifocal de agregados de hemosiderófagos en pulpa roja.

#### **6.2.4 Resultados de PCR y de las biopsias antemortem.**

En ninguna de las biopsias realizadas antemortem se encontraron lesiones que permitiesen establecer un diagnóstico. En la PCR que se realizó en primera instancia en el laboratorio de la facultad, los resultados tras el procesamiento de la muestra indicaron que dicho pulmón poseía una CT (*cycle threshold*) de 23,22 equivalente a un intervalo comprendido entre  $1,1 \times 10^7$ - $4,5 \times 10^7$  copias DNA de EHV-5. Se añadió un control interno endógeno a la reacción para asegurar la eficiencia de dicho proceso, en concreto la  $\beta$ -actina cuya CT= 20,12 equivalente a un intervalo comprendido entre  $4,8 \times 10^6$ - $1,9 \times 10^7$  copias DNA de  $\beta$ -actina. En las muestras remitidas al laboratorio de EEUU también se confirmó la presencia de EHV-5

#### **6.2.5. Diagnóstico:**

De acuerdo con los resultados de las pruebas clínicas, de la histología y los resultados de la PCR, el diagnóstico definitivo fue fibrosis pulmonar multinodular equina y adenoma de hipófisis. Las otras lesiones y anomalías no eran relevantes en el contexto de los hallazgos descritos.

#### **7. Discusión:**

Al igual que en los casos estudiados en la revisión de este trabajo, el caballo fue remitido al hospital por un problema de adelgazamiento progresivo, apatía y sospecha de adenoma de hipófisis. En la primera valoración realizada el caballo mostraba signos respiratorios graves, por lo que se realizaron pruebas adicionales para intentar establecer la causa del cuadro

respiratorio. Los resultados antemortem no permitieron establecer un diagnóstico preciso aunque indicaron la presencia de un problema crónico grave de mal pronóstico, que en aquel momento era compatible con neoplasia pulmonar. Además, al tener sospecha de adenoma de hipófisis se decidió la eutanasia. Solamente en la necropsia, a la vista de los hallazgos macroscópicos, se sospechó de un proceso proliferativo difuso, compatible con FPME, que se confirmó al estudiar las muestras al microscopio.

La exploración clínica, radiográfica y ecográfica fue compatible con FPME (Poth et al. 2009). Debido a fallos en el instrumental no fue posible realizar un BAL, prueba que ha sido señalada de gran utilidad en los casos de FPME (Wong et al. 2008; Marezonzi et al. 2011). La toracoscopia no ha sido incluida en el protocolo diagnóstico de esta enfermedad (Pusterla et al. 2015) y éste es el único caso descrito de FPME en el que se ha realizado una toracoscopia. La toracoscopia permitió tomar una biopsia de uno de los nódulos del pulmón y debería haber permitido definir el diagnóstico diferencial de la enfermedad. Por esta razón aunque la toracoscopia no ha sido indicada como una prueba de rutina en los casos de FPME (Pusterla et al. 2015), sería recomendable su ejecución, ya que permite valorar el aspecto externo del pulmón y también permite tomar una biopsia de una zona lesionada concreta e incluso obtener biopsias de mayor tamaño que las habituales.

En cuanto a la anatomía patológica, las alteraciones macroscópicas descritas previamente a nivel del pulmón siempre se han clasificado o bien dentro de la forma difusa o de la forma multifocal (Williams et al. 2007; Poth et al. 2009)). En nuestro caso es destacable que en algunas áreas del pulmón las lesiones eran compatibles con la forma multifocal (Anexo I-Fig. 9), mientras que en otras áreas (Anexo I-Fig. 8) las lesiones eran similares a la forma difusa. Este fenómeno podría ser debido a que al principio de la enfermedad se instaura una forma multifocal que progresa hacia una forma difusa. Las lesiones histológicas halladas coinciden con la forma más común de presentación en la que se conservan las luces alveolares y el colágeno se deposita de forma ordenada, patrón denominado “honeycombing” (Williams et al. 2007; Poth et al. 2009; Soare et al. 2011). Las tinciones especiales no se realizan de forma rutinaria en los casos de FPME (Niedermaier et al. 2010; Verryken et al. 2010), pero como sucedió en nuestro caso son muy útiles para definir y entender mejor la enfermedad y sus lesiones cuando son diagnosticadas por primera vez.

Finalmente se llevó a cabo la identificación en el tejido pulmonar, por lo que no hay duda que estamos ante un caso de FPME, que además de ser uno de los pocos descritos en España también es el primero diagnosticado en el HCVZ.



La FPME es una patología descrita recientemente, no muy conocida y por ello no es incluida rutinariamente en el diagnóstico diferencial de caballos con problemas respiratorios y adelgazamiento progresivo (Wong et al. 2008; Niedermaier et al. 2010; Soare et al. 2011; Pusterla et al. 2015) Además, y según algunos autores, se podría estar subestimándose su prevalencia al confundir los casos de FPME con otras enfermedades (Wilkins et al. 2013), como sucedió en nuestro caso y en muchos descritos en éste trabajo. De esta manera, se comienza a tratar a los animales frente a otras patologías respiratorias y al no responder favorablemente al tratamiento inicial, se acaban realizando más pruebas para confirmar el diagnóstico de FPME (Dunkel et al. 2012; Wilkins et al. 2013; Panziera et al. 2014) En muchos casos, cuando se establece el diagnóstico ya es tarde, dado que los animales muestran signos respiratorios avanzados, apenas responden al tratamiento y el pronóstico es mucho peor (Wilkins et al. 2013).

En base a estos argumentos proponemos, que a pesar de que la FPME no es una patología frecuente en la clínica de los équidos, debería incluirse en el diagnóstico diferencial de caballos adultos que muestren adelgazamiento progresivo y signos respiratorios, acompañados de patrón nodular intersticial difuso en el estudio radiográfico. Una vez establecida la sospecha de que el animal puede padecer FPME, debería realizarse un protocolo diagnóstico que incluyera, radiografías de tórax, ecografías, un BAL para ser testado por PCR para el EHV-5 y finalmente confirmar el diagnóstico mediante una biopsia pulmonar ecoguiada o por toracoscopia (preferiblemente), que será sometida a PCR para el EHV-5 y a un estudio histológico. Para confirmar el diagnóstico ante mortem deben identificarse las lesiones típicas de FPME en el tejido pulmonar. El tratamiento, si así se decide, debería instaurarse lo antes posible, aunque las posibilidades de éxito son muy limitadas y hacen falta muchos más estudios en este campo (Williams et al. 2013; Wilkins et al. 2013)

## **8. Conclusiones**

1. La FPME es una patología recientemente descrita, de la que se desconocen muchos aspectos patogénicos, epidemiológicos y víricos. Se señala al EHV-5 como principal agente responsable de la FPME, pero no se descarta la influencia de otros agentes concurrentes.
2. La infección por EHV-5 está distribuida a nivel mundial, con prevalencia variable pero en general elevada. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad es muy baja.
3. Existen diversas pruebas útiles para apoyar el diagnóstico antemortem de la FPME pero la confirmación del diagnóstico requiere de un estudio anatomopatológico.

4. No se conoce ningún tratamiento eficaz por lo que *a priori* el pronóstico para cualquier animal diagnosticado de FPME es fatal. Las aparentes remisiones de la enfermedad tras el tratamiento son muy escasas.
5. Hay pocos casos descritos de FPME en el mundo. El aquí estudiado es uno de los primeros descritos en España.
6. El estudio de los datos clínico-patológicos del caso estudiado en el presente trabajo coincide plenamente con lo descrito hasta la fecha para la FPME, incluida la detección del EHV-5, lo que confirma el diagnóstico final.
7. La sospecha de FPME debería llevar a un protocolo diagnóstico que incluyera la toracoscopia y la toma de biopsia.
8. La FPME podría estar siendo infra diagnosticada, por lo que debería incluirse en el diagnóstico diferencial de caballos adultos con adelgazamiento progresivo y síntomas respiratorios.

## **8. Conclusions:**

1. EMPF is a recently-described disease with many pathogenic, epidemiologic and viral aspects still unknown. The EHV-5 is pointed as the etiologic agent responsible for EMPF but the role of other concurrent agents cannot be rule out yet.
2. The EHV-5 infection is distributed worldwide, with a variable (normally high) prevalence. However, the disease incidence is very low.
3. There are several useful tests to support the antemortem diagnosis of EMPF but the confirmation of the diagnosis requires a pathologic study.
4. An effective treatment does not exist and, consequently, the prognosis for the disease is always very poor. The remission of the disease, which has been described in a few cases, is extremely rare.
5. There are few EMPF cases described in the world. This one is one of the first observed in Spain.
6. Clinic-pathologic data obtained in the current case fully coincide with previous descriptions, including detection of EHV-5.
7. To confirm EMPF diagnosis, the protocol should include thoracoscopy and lung biopsy.
8. EMPF could be underdiagnosed. It should be included in the differential diagnosis of adult horses with chronic weight loss and respiratory symptoms.

## **9. Valoración personal.**

Es la primera vez en toda mi carrera que me he enfrentado a un trabajo científico de esta naturaleza y envergadura. Este trabajo me ha exigido, entre otras cosas, realizar una amplia revisión bibliográfica, por lo que he tenido que perfeccionar mis habilidades sobre dónde y cómo buscar y encontrar información sobre un tema. Además, me ha servido para aprender a gestionar una gran cantidad de información eligiendo y sintetizando aquella que era más relevante. A parte de reforzar conocimientos adquiridos durante la carrera, también he ampliado y aprendido otros nuevos conocimientos, sobre todo en el campo de la anatomía patológica y por supuesto de la patología conocida como FPME. A nivel más personal, el TFG también me ha exigido mejorar mi capacidad de organización propia y con otras personas, pero sobre todo mi capacidad a la hora de tomar mis propias decisiones, debatir diferentes opiniones, escuchando las opiniones de los otros. Por último me ha permitido presentar mi primera comunicación oral en un congreso. Agradezco a mis dos tutores el esfuerzo realizado conmigo. Agradezco especialmente a Pedro, Jessica y Javier el tiempo que me han dedicado para desarrollar este trabajo..

## **10. Bibliografía:**

1. Back Helena, Kendall Anna, Grandón Rodrigo, Ullman Karin, Treiberg-Berndtsson Louise, Ståhl Karl, et al. (2012). Equine multinodular pulmonary fibrosis in association with asinine herpesvirus type 5 and equine herpesvirus type 5: A case report.
2. Bawa, B., Andrews, G., Almes, K., Werf, K. V., Beard, L., & Davis, E. (2014). Equine multinodular pulmonary fibrosis and lymphoma in a horse associated with equine herpesvirus-5. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(5), 694.
3. Belgrave, R. L. (2009). Review of the diagnosis, treatment, and management of equine multinodular pulmonary fibrosis (five cases). *Proceedings of the Annual Convention-American Association of Equine Practitioners*, (55), 304.
4. Bell, S., Balasuriya, U., Nordhausen, R., & MacLachlan, N. (2006). Isolation of equine herpesvirus-5 from blood mononuclear cells of a gelding. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(5), 472.
5. Doran P, & Egan JJ. (2005). Herpesviruses: A cofactor in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? *American Journal of Physiology.Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(5), L709.
6. Dunkel, B. (2012). Pulmonary fibrosis and gammaherpesvirus infection in horses. *Equine Veterinary Education*, 24(4), 200.

7. Dunowska, M., Hardcastle, M. R., & Tonkin, F. B. (2014). Identification of the first new zealand case of equine multinodular pulmonary fibrosis. *New Zealand Veterinary Journal*, 62(4), 226.
8. Fortier, G., Pronost, S., Miszczak, F., Fortier, C., Léon, A., Richard, E., et al. (2009a). Identification of equid herpesvirus-5 in respiratory liquids: A retrospective study of 785 samples taken in 2006-2007. *Veterinary Journal*, 182(2), 346.
9. Fortier, G., van Erck, E., Fortier, C., Richard, E., Pottier, D., Pronost, S., et al. (2009b). Herpesviruses in respiratory liquids of horses: Putative implication in airway inflammation and association with cytological features. *Veterinary Microbiology*, 139, no. 1-2(1-2)
10. Fortier, G., Erck, E. v., Pronost, S., Lekeux, P., & Thiry, E. (2010). Equine gammaherpesviruses: Pathogenesis, epidemiology and diagnosis. *Veterinary Journal*, , 186, issue 2
11. Hart, K. A., Barton, M. H., Williams, K. J., Flaminio, M. J. B. F., & Howerth, E. W. (2008). Multinodular pulmonary fibrosis, pancytopenia and equine herpesvirus-5 infection in a thoroughbred gelding. *Equine Veterinary Education*, 20(9), 470.
12. Kane, E. (2008). EMPF: A newly described disease linked to EHV-5: Michigan state investigators report a growing number of cases in adult horses of various breeds. *DVM Newsmagazine*, 39(10)
13. Kubiski, S. V., Rech, R. R., Camus, M. S., Pellegrini-Masini, A., Elfenbein, J. R., & Howerth, E. W. (2009). Pathology in practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(4), 381.
14. Lehmbecker, A., Biesenbach, W., König, P., Schneider-Buhl, L., & Wohlsein, P. (2011). Multinodular pulmonary fibrosis in a horse from schleswig-holstein. *Tieraerztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere*, 39(4), 237.
15. MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (Fenner's Veterinary Virology, Fourth Edition, 2011). Chapter 9: Herpesvirales. In Elsevier (Ed.), (pp. 176-198)
16. Marenzoni, M., Coppola, G., Maranesi, M., Passamonti, F., Cappelli, K., Capomaccio, S., et al. (2010). Age-dependent prevalence of equid herpesvirus 5 infection. *Veterinary Research Communications*, 34(8), 703.
17. Marenzoni, M. L., Passamonti, F., Lepri, E., Cerccone, M., Capomaccio, S., Cappelli, K., et al. (2011). Quantification of equid herpesvirus 5 dna in clinical and necropsy specimens collected from a horse with equine multinodular pulmonary fibrosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 802.

18. Maxwell, L. K., Bentz, B. G., Bourne, D. W. A., & Ekert, R. S. (2008). Pharmacokinetics of valacyclovir in the adult horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31, no. 4(4)
19. Mora, A. L., Torres-González, E., Rojas, M., Corredor, C., Ritzenthaler, J., Xu, J., et al. (2006). Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in herpesvirus-induced lung fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(4), 466.
20. Niedermaier, G., Poth, T., & Gehlen, H. (2010). Clinical aspects of multinodular pulmonary fibrosis in two warmblood horses.
21. Nordengrahn, A., Merza, M., Ros, C., Lindholm, A., Palfi, V., Hannant, D., et al. (2002). Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using type-specific PCR assays. *Veterinary Research*, 33(3), 251.
22. Panziera, W., Giarretta, P. R., Galiza, G. J. N., Lim, A., Bolin, S. R., Borges, C. H., et al. (2014). Equine multinodular pulmonary fibrosis associated with equine herpesvirus 5 in a horse in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 7(1), 17.
23. Pavlik, I. E. C., Jahn, P., Dvorska, L., Bartos, M., Novotny, L., & Halouzka, R. Mycobacterial infections in horses: A review of the literature. *Veterinarni Medicina - UZPI (Czech Republic)*, 49(11), 427.
24. Phan, S. H. (2012). Genesis of the myofibroblast in lung injury and fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 148.
25. Polverino, E., Cillóniz, C., Gabarrús, A., Ferrer, M., Agustí, C., Torres, A., et al. (2013). Systemic corticosteroids for community-acquired pneumonia: Reasons for use and lack of benefit on outcome. *Respirology*, 18(2), 263.
26. Poth, T., Niedermaier, G., & Hermanns, W. (2009). Equine multinodular pulmonary fibrosis in association with an EHV-5 infection in 5 horses. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 96(7/8), 203.
27. Pusterla, N., Pesavento, P. A., Smith, P., Durando, M. M., Magdesian, K. G., & Wilson, W. D. (2003). Idiopathic granulomatous pneumonia in seven horses.
28. Pusterla N, Magdesian KG, Mapes SM, Zavodovskaya R, & Kass PH. (2015). Assessment of quantitative PCR for equine herpesvirus-5 in blood, nasal secretions and bronchoalveolar lavage fluid for the laboratory diagnosis of equine multinodular pulmonary fibrosis. *Equine Veterinary Journal*,
29. Rush, B., & Mair, T. (Equine Respiratory Diseases, 2004). Chapter 19: Noninfectious pulmonary disease. In Blackwell Science Ltd. (Ed.), (pp. 189-229)
30. Scharner, D., Böttcher, D., Müller, K., & Köhler, C. (2012). Equine multinodular pulmonary fibrosis in a shire horse mare. *Praktische Tierarzt*, 93(5), 420.

31. Schneider, A. (2010). Hypertrophic osteopathy associated with equine multinodular pulmonary fibrosis in a gelding.
32. Schwarz, B., Gruber, A., Benetka, V., Rütgen, B., Schwendenwein, I., Leidinger, E., et al. (2012). Concurrent T cell leukaemia and equine multinodular pulmonary fibrosis in a hanoverian warmblood mare. *Equine Veterinary Education*, 24(4), 187.
33. Schwarz, B., Klang, A., Bezdekova, B., Sárdi, S., & Korbacska-Kutasi, O. (2013a). Equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF): Five case reports.
34. Schwarz, B., Schwendenwein, I., & van den Hoven, R. (2013b). Successful outcome in a case of equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF) treated with valacyclovir. *Equine Veterinary Education*, 25(8), 389.
35. Sivakumar, P., Ntoliou, P., Jenkins, G., & Laurent, G. (2012). Into the matrix: Targeting fibroblasts in pulmonary fibrosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 18(5), 462.
36. Soare, T., Leeming, G., Morgan, R., Papoula-Pereira, R., Kipar, A., Stewart, J., et al. (2011). Equine multinodular pulmonary fibrosis in horses in the UK. *The Veterinary Record*, 169(12), 313.
37. Spelta, C., Axon, J., Begg, A., Diallo, I., Carrick, J., Russell, C., et al. (2013). Equine multinodular pulmonary fibrosis in three horses in australia. *Australian Veterinary Journal*, 91(7), 274.
38. Stoolman, J., Vannella, K., Coomes, S., Wilke, C., Sisson, T., Toews, G., et al. (2011). Latent infection by gamma herpesvirus stimulates profibrotic mediator release from multiple cell types. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(2), L274.
39. Torfason, E. G., Thorsteinsdóttir, L., Torsteinsdóttir, S., & Svansson, V. (2008). Study of equid herpesviruses 2 and 5 in iceland with a type-specific polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science*, 85, issue 3
40. Vander Werf, K., & Davis, E. (2013). Disease remission in a horse with EHV-5-associated lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(2), 387.
41. Vander Werf, K. A., Davis, E. G., Janardhan, K., Bawa, B., Bolin, S., & Almes, K. (2014). Identification of equine herpesvirus 5 in horses with lymphoma. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(6), 738.
42. Verryken, K., Saey, V., Maes, S., Borchers, K., Van De Walle, G., Ducatelle, R., et al. (2010). First report of multinodular pulmonary fibrosis associated with equine herpesvirus 5 in belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 79(4), 297.

43. Wang, L., Raidal, S. L., Pizzirani, A., & Wilcox, G. E. (2007). Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. *Veterinary Microbiology*, 121, issue 1-2
44. Wilkins, P. A. (2003). Review article: Lower airway diseases of the adult horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 19(1), 101.
45. Wilkins, P. A., Papich, M., & Sweeney, R. W. I. (2005). Pharmacokinetics of acyclovir in adult horses. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 15, no. 3(3)
46. Wilkins, P. A. (2008). Equine multinodular pulmonary fibrosis: New, emerging or simply recently described? *Equine Veterinary Education*, 20(9), 477.
47. Wilkins, P. A. (2013). Equine multinodular pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment. *Equine Veterinary Education*, 25(8), 393.
48. Williams KJ, Robinson NE, Lim A, Brandenberger C, Maes R, Behan A, et al. (2013). Experimental induction of pulmonary fibrosis in horses with the gammaherpesvirus equine herpesvirus 5. *Plos One*, 8(10), e77754.
49. Williams, K. J., Maes, R., Del Piero, F., Lim, A., Wise, A., Bolin, D. C., et al. (2007). Equine multinodular pulmonary fibrosis: A newly recognized herpesvirus-associated fibrotic lung disease. *Veterinary Pathology*, , 44, no. 6(6)
50. Wong, D. M., Belgrave, R. L., Williams, K. J., Del Piero, F., Alcott, C. J., Bolin, S. R., et al. (2008). Multinodular pulmonary fibrosis in five horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232, no. 6(6)
51. Wong, D., Maxwell, L., & Wilkins, P. (2010). Use of antiviral medications against equine herpes virus associated disorders. *Equine Veterinary Education*, 22(5), 244.

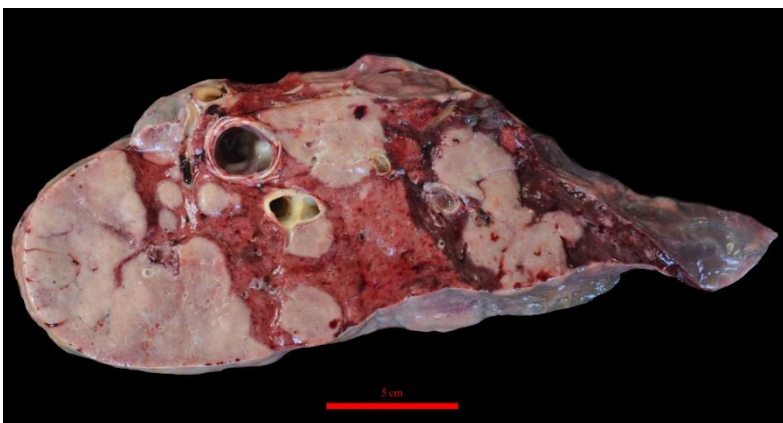
## Anexo I: Lesiones macroscópicas y microscópicas



**FIGURA 7:** Apariencia externa de los pulmones, los cuales están aumentados de tamaño, no están colapsados y tienen la impresión costal marcada. Se observa la presencia de múltiples nódulos de color blanco-amarillento, de diferentes tamaños distribuidos por toda la superficie pulmonar



**FIGURA 8:** Sección pulmonar de un área pulmonar en la que los nódulos se distribuyen de forma coalescente y apenas quedan áreas de tejido pulmonar sano (forma difusa)



**FIGURA 9:** Sección pulmonar de otra área pulmonar en la que los nódulos se distribuyen de forma multifocal, de manera que quedan amplias áreas de tejido pulmonar no afectado entre los nódulos (forma multifocal)





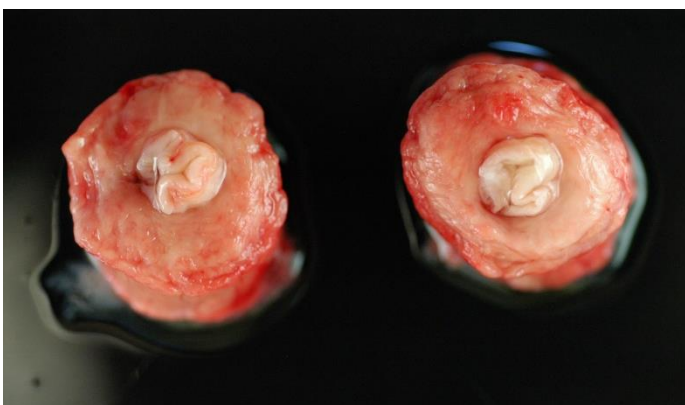
**FIGURA 10:** Sección pulmonar de otra área pulmonar en la que los nódulos se tiende a coalescer, pero todavía no han consolidado la forma difusa.



**FIGURA 11:** Lipomas mesentéricos, uno de los cuales está necrosado

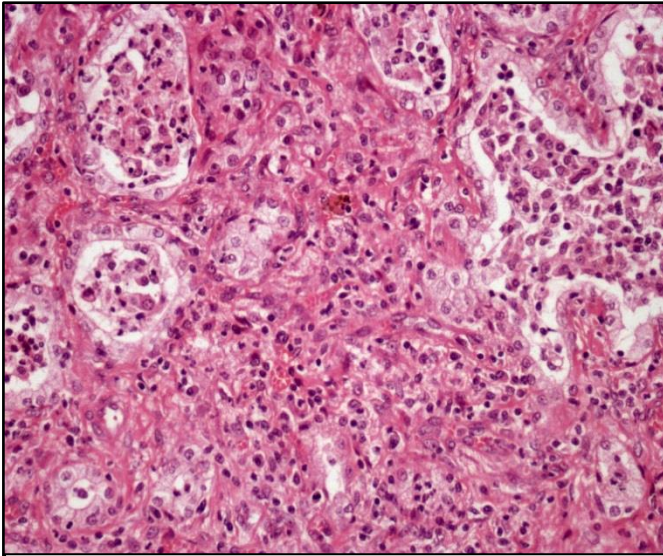


**FIGURA 12:** Masa en el tiroides, compatible con adenoma tiroideo

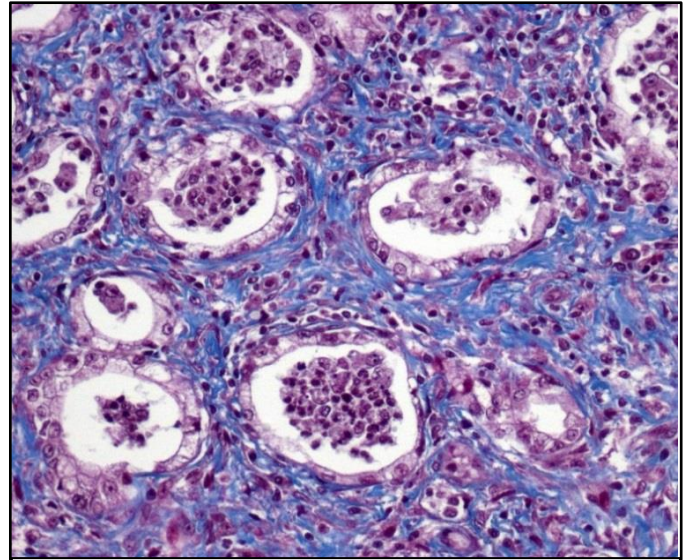


**FIGURA 13:** Hipertrofia muscular del tercio distal del esófago.

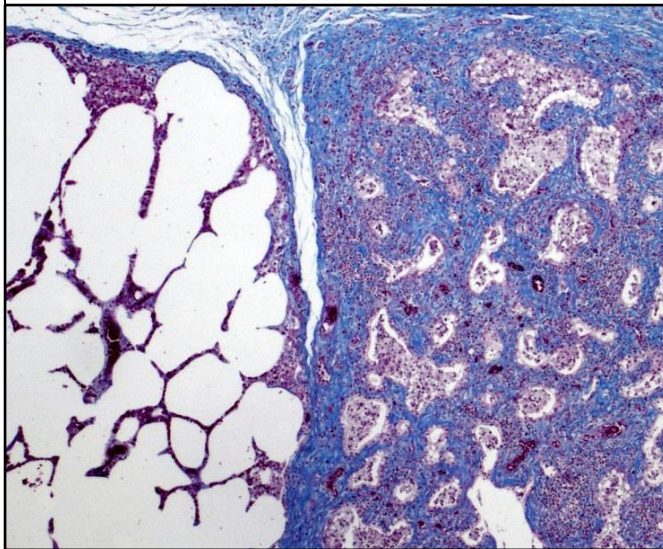




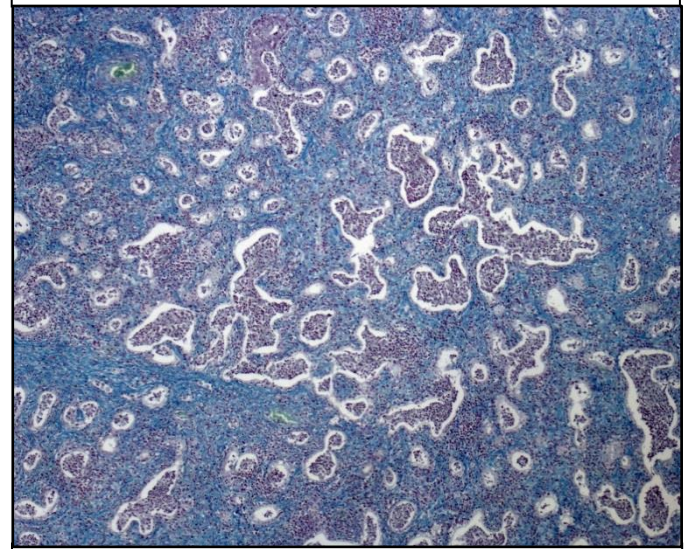
**FIGURA 14:** Área de fibrosis intersticial en la que los tabiques están aumentados de tamaño, consecuencia del depósito de fibras de colágeno y de un infiltrado inflamatorio. (HE 20X)



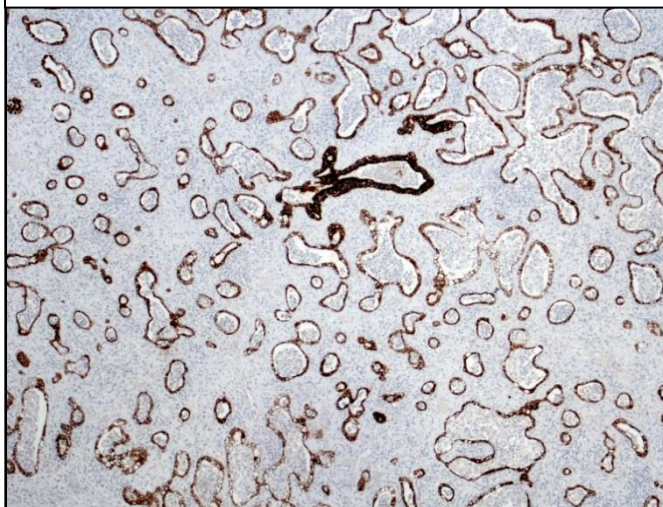
**FIGURA 15:** Área de fibrosis intersticial, donde se observa gran cantidad de fibras de colágeno depositadas a lo largo de todo el intersticio. (Masson 20X)



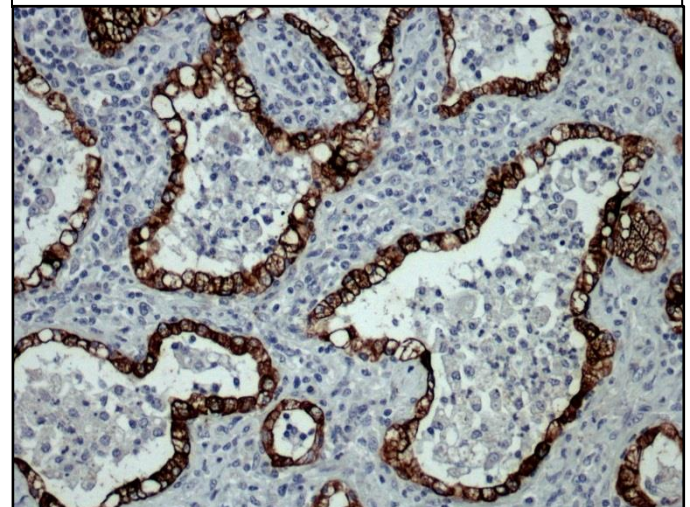
**FIGURA 16:** Tejido pulmonar no afectado (izquierda) perfectamente delimitado respecto del tejido pulmonar afectado (derecha). (Masson 4X)



**FIGURA 17:** Las luces alveolares están claramente delimitadas, como consecuencia del depósito de fibras de colágeno. Patrón en panal de abejas ("honeycombing"). (Gallego 4X)

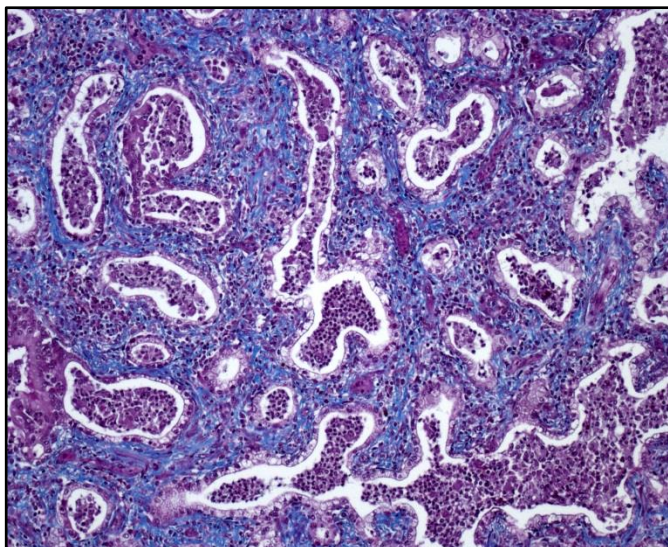


**FIGURA 18:** Las luces alveolares están tapizadas por células epiteliales positivas frente a las citoqueratinas. (IHQ - AE1/AE3 - pancitoqueratina).

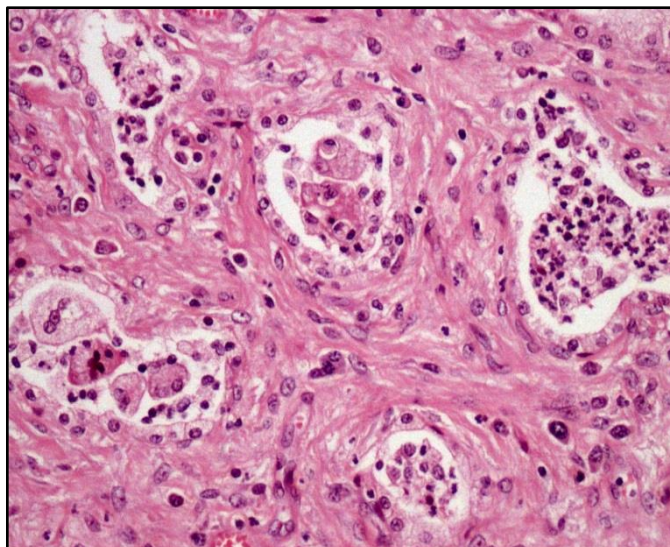


**FIGURA 19:** Células epiteliales compatibles con neumocitos tipos II que han sufrido hiperplasia y están vacuolizados. (IHQ - AE1/AE3 - pancitoqueratina).

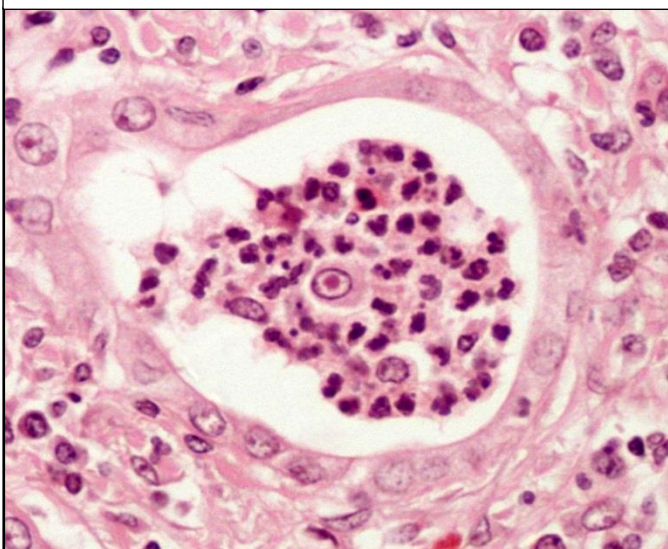




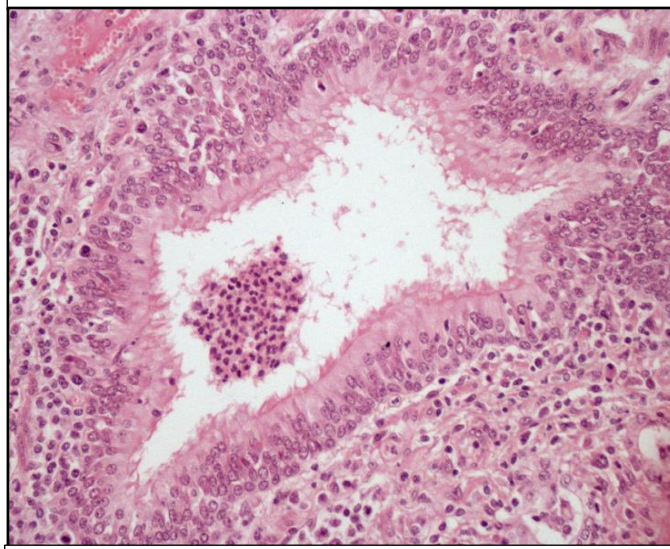
**FIGURA 21:** Gran cantidad de células inflamatorias y detritus celulares en el interior de las luces alveolares (Masson 10X)



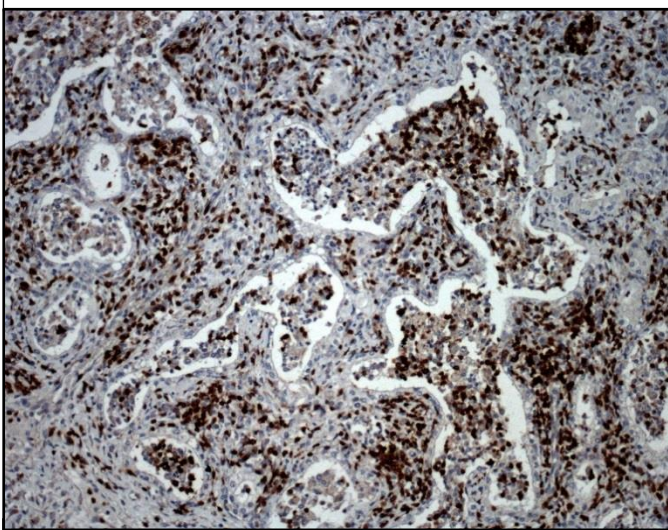
**FIGURA 22:** Gran cantidad de neutrófilos, macrófagos en menor cantidad y ocasionalmente células multinucleadas en el interior de las luces alveolares. (HE 20X)



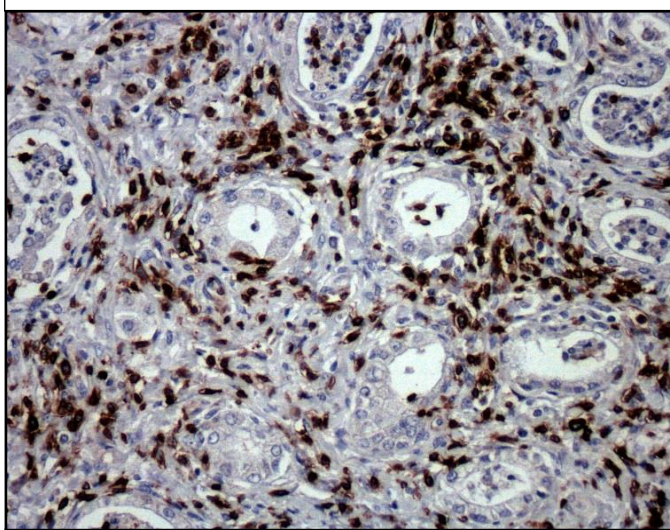
**FIGURA 23:** que se observa un cuerpo de inclusión intranuclear eosinofílico en el interior de un macrófago localizado en un área de fibrosis.. (HE 60X)



**FIGURA 24:** Luz de un bronquio con células inflamatorias, localizado en una zona de fibrosis. (HE 20X)

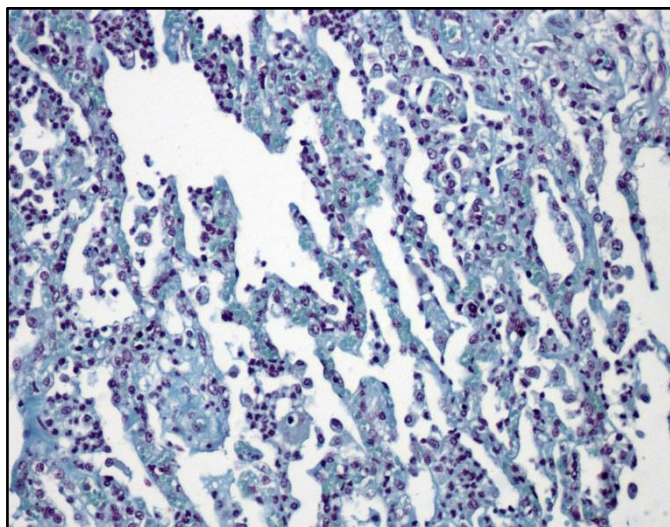


**FIGURA 26:** Gran cantidad de linfocitos tipo T en el intersticio pulmonar. (IHC-CD3)

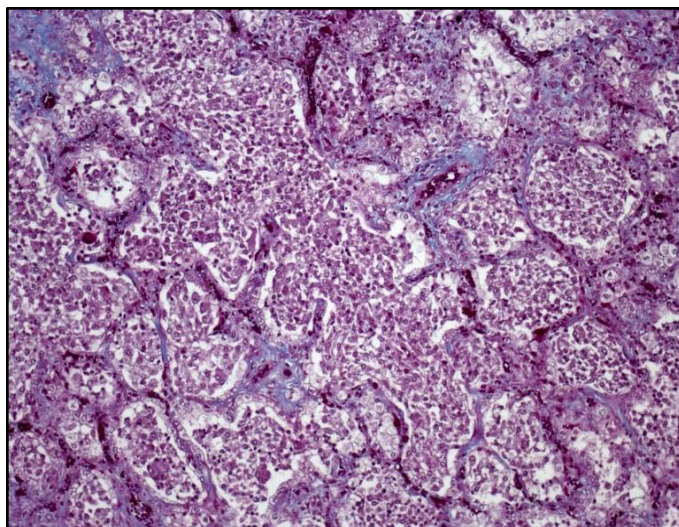


**FIGURA 25:** Las células más abundantes en el infiltrado inflamatorio son los linfocitos tipo T. (IHC-CD3)





**FIGURA 27:** Área de inicio de las lesiones, donde los tabiques están poco engrosados, las fibras de colágeno están desordenadas y no hay células en las luces alveolares. (Gallego 10X)



**FIGURA 28:** Zona lesionada en la que las luces alveolares no han sido remodeladas por completo, en su interior hay gran cantidad de células inflamatorias y las fibras de colágeno comienza a ser maduras. (Masson 10X)

## Anexo II: Tabla de prevalencia

**TABLA 2:** Muestra la prevalencia estimada del EHV-5 en las diferentes muestras, valoradas mediante PCR y qPCR, así como el estudio de referencia, lugar y la población valorada.

Grupo	SN	Sangre (PBMC)	BALF	TW	Edad	Estudio referencia/lugar
1		4/27 (15%)			E:13-23 s	Nordergrhan et al 2002/Hungría e Inglaterra.
1		5/21 (24%)				
1	30/47 (64%)					Bell et al 2006/ EEUU
1 y 2(17)	25/64 (39%)	39/64 (60%)			E:5-8 m	Wang et al., 2007/ Australia
1	80/141 ((57%)	74/131 (56%)			E:6-9 m	
1			4/47 (8%)	0/45 (0%)	EM: 6 a.	Fortier et al., 2009a. / Francia
2			9/402 (2%)	7/291 (2%)		
1			0/25 (0%)	0/37 (0%)	E:18m-13a.	Fortier et al., 2009b. / Francia
2			16/387 (4%)	8/259 (3%)		
1	10/25 (40%)	5/25(20%)			E:4-17a.	Marezonzi et al., 2010
1	22/30 (73%)	24/30(80%)			E:1-3a.	
1	10/14 (70%)	2/14 (14%)	0/14 (0%)			Pusterla et al., 2015/ California
2	20/45 (44%)	7/45 (15%)	0/45 (0%)			
3	9/11 (82%)	10/11 (90%)	11/11 (100%)		E:2-30 a.	

1: animales sanos / 2: animales con enfermedad respiratorio diferente de la FPME / 3: animales con FPME /

BAL:Bronchoalveolar lavage fluid / PBMC: peripheral blood mononuclear cell