

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE LAVAJE BRONCOALVEOLAR (BAL) EN
EQUINOS SPC EN EL URUGUAY**

por:

**Gastón CARLUCCIO
Floresia FELVINCZI**

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias.
Orientaciones: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Estudio Poblacional

MONTEVIDEO
URUGUAY
2021

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

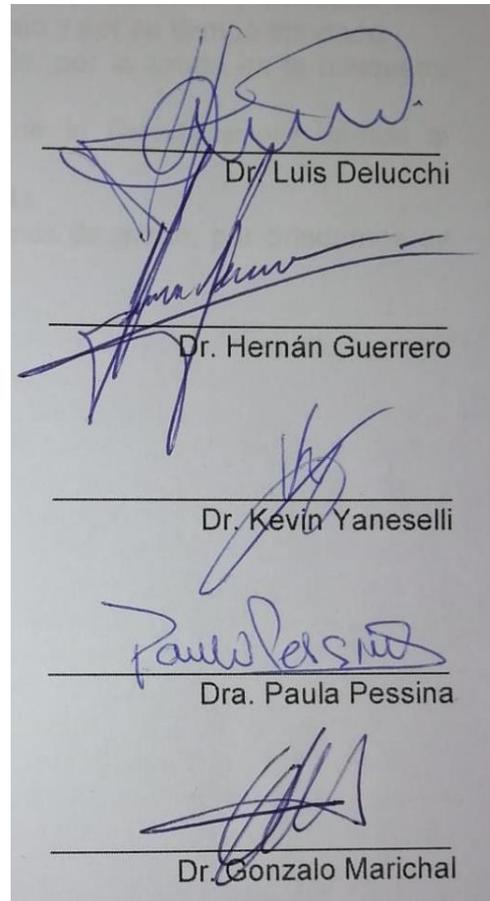
Presidente de mesa:

Segundo miembro (Tutor):

Tercer miembro:

Cuarto miembro:

Quinto miembro:



Dr. Luis Delucchi

Dr. Hernán Guerrero

Dr. Kevin Yaneselli

Dra. Paula Pessina

Dr. Gonzalo Marichal

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer especialmente a nuestras familias, amigos y compañeros por el apoyo brindado durante toda la carrera.

A nuestro tutor Dr. Hernán Guerrero, co-tutor Dr. Kevin Yaneselli y co-tutora Dra. Paula Pessina por guiarnos, apoyarnos en este trabajo y por su tiempo brindado.

Al personal de Biblioteca de Facultad de Veterinaria, por la ayuda en la búsqueda bibliográfica.

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales.

Al Dr. Muriel y su equipo de la Universidad de la Plata.

Por último, a los integrantes del tribunal de esta tesis de grado, por brindarnos su tiempo y atención.

RESUMEN

Las alteraciones del aparato respiratorio tienen gran importancia ya que causan una limitación en el rendimiento deportivo del equino, solo teniendo por delante las de origen músculo-esquelético. Esto deriva en grandes pérdidas económicas debido a que se debe interrumpir el entrenamiento, se generan costos de tratamiento o incluso puede llevar al retiro anticipado del caballo afectado. La detección precoz y el tratamiento adecuado permitirán el rápido regreso al entrenamiento de estos animales. El objetivo de esta tesis fue desarrollar la técnica de lavado broncoalveolar (BAL) en equinos SPC en el Uruguay, hecho que hasta hoy no fue descrito en Uruguay. Para ello fue necesaria la estandarización de los procedimientos de la técnica, tanto de la colecta del fluido pulmonar, como del reconocimiento citológico del líquido y análisis de la población celular. Se utilizaron 12 equinos pura sangre de carrera (PSC) en actividad deportiva de 2 a 5 años en condiciones de estabulación. Se utilizó una sonda broncoalveolar BAL 300 y para el lavado fueron instilados 5 alícuotas de 60 mL de solución fisiológica, hasta completar un total de 300 mL. Se recuperó en tubos falcón un promedio de 85% del volumen total de fluido instilado, siempre con presencia de surfactante pulmonar y ausencia de cuerpos extraños. De las muestras se valoró su aspecto macroscópico (color, turbidez y sobrenadantes), antes y después de una centrifugación (70 g por 10 minutos); y finalmente se realizó el extendido y tinción de láminas con May Grünwald–Giemsa. En la microscopia se realizó el recuento de 300 células consecutivas al aumento de 100X, donde se identificaron: macrófagos inactivos, macrófagos activados, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y hemosiderófilos. En la citología del lavado se observó una mediana de 52,2% de macrófagos, 32,1% linfocitos, 0,25% neutrófilos, 0,95% mastocitos, 0% eosinófilos y 0,1% hemosiderófilos. En suma, esta tesis permitió poner a punto la colecta de fluido pulmonar mediante la técnica de BAL a nivel local, así como conocer las poblaciones celulares existentes de los equinos SPC en Uruguay, en actividad deportiva que hasta el momento no existan antecedentes.

SUMMARY

Alterations of the respiratory system are of great importance since they cause a limitation in the equine's sporting performance, only having those of musculoskeletal origin ahead. This results in great economic losses due to the fact that training must be interrupted, treatment costs are generated or it can even lead to the early withdrawal of the affected horse. Early detection and appropriate treatment will allow these animals to return to training quickly. The objective of this thesis was to develop the bronchoalveolar lavage (BAL) technique in SPC horses in Uruguay, a fact that has not been described in Uruguay until today. For this, it was necessary to standardize the procedures of the technique, both for the collection of pulmonary fluid, as well as for the cytological recognition of the fluid and analysis of the cell population. Twelve thoroughbred race horses (PSC) were used in sporting activity from 2 to 5 years old in stable conditions. A BAL 300 bronchoalveolar probe was used and 5 aliquots of 60 mL of physiological solution were instilled for washing, until a total of 300 mL were completed. An average of 85% of the total volume of instilled fluid was recovered in falcon tubes, always with the presence of pulmonary surfactant and the absence of foreign bodies. The samples were evaluated for their macroscopic appearance (color, turbidity and surfactant), before and after centrifugation (70 g for 10 minutes); and finally the spreading and staining of the slides was carried out with May Grünwald – Giemsa. Microscopy performed a count of 300 consecutive cells at 100X magnification, where they were identified: inactive macrophages, activated macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils, mast cells and hemosiderophages. The lavage cytology revealed a median of 52.2% macrophages, 32.1% lymphocytes, 0.25% neutrophils, 0.95% mast cells, 0% eosinophils, and 0.1% hemosiderophages. In sum, this thesis made it possible to fine-tune the collection of pulmonary fluid by means of the BAL technique at the local level, as well as to know the existing cell populations of SPC horses in Uruguay, in sports activity that until now has no antecedents.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
SUMMARY	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Anatomía e histología del aparato respiratorio	11
2.1.1 Vías aéreas altas	11
2.1.2 Vías aéreas bajas	12
2.1.3 Fisiología respiratoria	13
2.2 Enfermedades respiratorias en equinos	14
Enfermedades respiratorias de origen viral	15
Enfermedades respiratorias de origen neoplásico	16
Enfermedades respiratorias causadas por parásitos	17
Hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio	17
Asma equino	18
2.3 Diagnóstico de enfermedades respiratorias	19
2.3.1 Examen clínico	19
2.3.2 Exámenes colaterales	20
2.4 Técnica de lavaje broncoalveolar	21
2.4.1 Generalidades	21
Toma de muestra	22
Valoración del fluido broncoalveolar	25
Interpretación de la citología del BAL	26
Asociación entre la citología del BAL y el rendimiento de equinos deportivos	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo general	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 Animales	31
4.2 Técnica de Lavaje Broncoalveolar (BAL)	31
4.3 Valoración del fluido broncoalveolar	31
4.4 Análisis citológico del BAL	31
4.5 Análisis estadístico	32
5. RESULTADOS	36

5.1 Muestreo de BAL	36
5.2 Valoración del fluido broncoalveolar	36
5.3 Análisis citológico del BAL	36
6. DISCUSIÓN	39
7. CONCLUSIÓN	42
8. BIBLIOGRAFÍA	43

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Sección medial de cabeza de equino, septo nasal removido. Tomada de: Barakzai (2007). 12

Figura 2. Estructuras del aparato respiratorio equino. (A) La tráquea y los bronquios están revestidos por epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes. (B) Los bronquiolos están revestidos proximalmente por células cuboides ciliadas y distalmente por células no ciliadas. (C) Los alvéolos están cubiertos principalmente por neumocitos tipo I y neumocitos tipo II que producen el surfactante. Tomada de: Cian, et al. (2015). 13

Figura 3. Demostración esquemática de la sonda de BAL obteniendo una muestra del segmento caudo - dorsal del pulmón. Tomada de: Hodgson, et al. (2002). 25

Figura 4. Preparación del animal y material para realizar el BAL. (A) Sonda en solución de clorhexidina. (B) Jeringas de 60 mL cargadas con solución fisiológica estéril. (C) Chequeo de temperatura. (D) Protocolo anestésico. (E) Extracción de sangre e inyección de xilacina (10%). (F) Muestra de sangre para hemograma en tubo con EDTA. 32

Figura 5. Esquemización del BAL en equinos. (A) Limpieza de ollares. (B) Introducción de la sonda BAL 300. (C) Preparación bolo lidocaína 2%. (D) Instilación de solución fisiológica estéril en jeringa de 60 mL. (E) Recuperación líquido instilado. (F) Valoración macroscópica del líquido recuperado. 33

Figura 6. Esquemización del procesamiento de muestras para citología. (A) Retiro de sobrenadante y resuspensión de pellet. (B) Centrifugación de muestras. (C) Pellet final. (D) Láminas de las muestras. (E) Visualización y conteo de láminas en microscopio (100x). (F) Imagen microscópica de preparado citológico. 34

Figura 7. Citología celulares. (A) Macrófago no activado en el BAL. (B) Macrófago activado en el BAL. (C) Linfocito en el BAL. (D) Neutrófilo en el BAL. (E) Flecha celeste Mastocito, flecha naranja Neutrófilo en el BAL. (F) Eosinófilo en el BAL. (G) Glóbulos rojos en el BAL. (H) Hemosiderófagos en el BAL. Tinción utilizada fue May Grünwald–Giemsa (MGG) y las imágenes magnificadas 100x. 38

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Resultado de análisis del BAL y controles de rutina individual	36
Cuadro 2. Análisis citológico del BAL grupal	37

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el stock equino alcanza los 57 millones de cabezas, Uruguay cuenta con 425 mil cabezas, siendo un 4 a 5% destinado a deportes ecuestres. Asimismo, nuestro país ocupa el segundo lugar en el mundo en la relación caballo/habitante. Dentro de esta población destinada a los deportes ecuestres la mayoría participan de actividades hípcas (39%), seguido de enduro (22%), raid (11%) y polo (5%) (Ferrari, 2012).

Las alteraciones del aparato respiratorio tienen gran importancia ya que causan una limitación en el rendimiento deportivo del equino, sólo precedidas por las de origen músculo-esquelético. Esto deriva en grandes pérdidas económicas debido a la consecuente interrupción del entrenamiento, costos de tratamiento médico o incluso por el retiro anticipado del caballo afectado. La detección precoz y el tratamiento certero son la solución para el rápido regreso al entrenamiento de estos animales (Reed, Bayly y Sellon, 2004).

Existen numerosas enfermedades que pueden afectar el sistema respiratorio del equino, como las enfermedades víricas (Herpesvirus, Adenovirus), neoplasias, parasitosis (*Dictyocaulus*), hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio, y asma equino (Couëttil et al., 2016). Todas estas patologías causan intolerancia al ejercicio de distinto grado y por lo tanto se resiente su rendimiento, pudiendo afectar en forma permanente el parénquima pulmonar (Loving, 2006).

Para el diagnóstico de las patologías respiratorias nos vamos a basar en la presencia de determinados signos clínicos, junto a un correcto examen objetivo particular y el uso de exámenes colaterales como el examen endoscópico, la radiografía de tórax y el lavado broncoalveolar (BAL). Esta última técnica nos permite identificar la población celular de la superficie epitelial del alvéolo y vías aéreas inferiores, obteniendo información que otros métodos diagnósticos no nos aportan y que se complementan de manera muy valiosa. (Reed et al., 2004). El BAL no presenta antecedentes bibliográficos en Uruguay por lo que es de suma importancia realizar una puesta a punto de ella y tener una referencia de valores locales para la técnica.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomía e histología del aparato respiratorio

La principal función del sistema respiratorio es ingresar oxígeno y remover dióxido de carbono hacia y desde la sangre. El aire ingresa a los pulmones mediante varios conductos que comunican el aire del ambiente al alvéolo donde finalmente se produce el intercambio gaseoso con la sangre. Anatómicamente estos conductos aéreos son representados por las narinas, la cavidad nasal, la faringe, laringe, tráquea, bronquio y bronquiolos. La sangre arterial alcanza los capilares pulmonares desde el ventrículo derecho, mediante las arterias pulmonares y vuelve hacia el atrio izquierdo por las venas pulmonares (McGorum, Dixon, Robinson y Schumacher, 2007).

2.1.1 Vías aéreas altas

El aparato respiratorio del caballo comienza en los orificios nasales, también llamados ollares. Son aberturas de forma semicircular, que comunican la cavidad nasal con el medio ambiente externo. El cartílago alar es el encargado de darle rigidez a dicha estructura, que tiene la capacidad de cerrarse, por ejemplo, durante el nado, y abrirse cuando la necesidad de pasaje de aire es mayor, como en el ejercicio. Al observar hacia el interior del ollar se puede ver la unión de la piel y la mucosa (McGorum et al., 2007).

Una vez que se ingresa por el ollar, en la región dorso lateral, se encuentra el divertículo nasal (falso ollar), de aproximadamente 10 centímetros de profundidad. Si se continúa por la región ventromedial, se entra a la cavidad nasal, que está delimitada en medial por el septo nasal, y en lateral por el pliegue alar. El septo nasal divide la cavidad nasal en dos, y está formado por cartílago en su porción rostral y por hueso en su porción caudal. Cada mitad de la cavidad nasal tiene dos cornetes nasales (dorsal y ventral), que dividen a la cavidad en tres pasajes de aire, estos son los meatos ventral, medio y dorsal. Estos cornetes son proyecciones óseas recubiertas de mucosa, que tienen la función de aumentar la superficie de la mucosa de la cavidad nasal, lo que permite un mejor acondicionamiento del aire inspirado y aumenta las funciones de defensa (McGorum et al., 2007).

El meato ventral es el de mayor amplitud, por lo que va a ser el camino por el cual se introduce un endoscopio o una sonda en caso de ser necesario. Por otro lado, el meato dorsal se extiende hacia el etmoides, ésta es una estructura ósea, recubierta por tejido altamente vascularizado, ubicada en la porción dorsal de dicho meato. Existen siete pares de senos paranasales en el equino: Seno maxilar rostral (SMR), Seno maxilar caudal (SMC), Seno del cornete ventral, Seno del cornete dorsal, Seno frontal, Seno esfenopalatino y Seno etmoidal. El SMR se encuentra dorsal al tercer y cuarto molar; su porción lateral se comunica con la porción medial formando el seno del cornete ventral, por encima del canal infraorbitario. Se encuentra separado del SMC por un tabique óseo. El seno frontal, de forma triangular, se encuentra rostral al cráneo y dorsal a las etmoturbinadas. Dentro de las etmoturbinadas se encuentran varios senos pequeños que componen el seno etmoidal (McGorum et al., 2007).

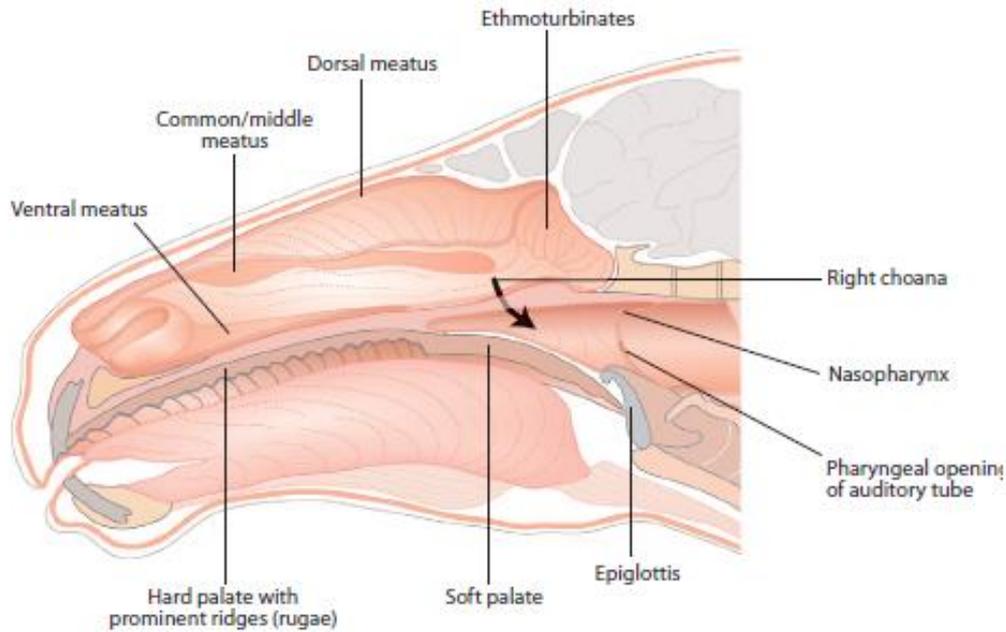


Figura 1. Sección medial de cabeza de equino, septo nasal removido. Tomada de: Barakzai (2007).

El epitelio de la parte rostral de los cornetes nasales es estratificado escamoso, se va haciendo una transición hacia epitelio estratificado cuboidal, con baja cantidad de células mucosas, para finalmente convertirse en epitelio respiratorio ciliado pseudoestratificado con abundantes células mucosas en la porción caudal del septo y los cornetes nasales. La submucosa de la cavidad nasal está altamente irrigada, lo que le permite calentar el aire inspirado y regular la producción de moco (McGorum et al., 2007).

Posteriormente se encuentra la faringe que comunica la cavidad nasal con la laringe, en la pared dorsal de la faringe se observan folículos de tejido linfoide. A diferencia de la cavidad nasal, la faringe carece de soporte rígido de parte de hueso o cartílago. En el caballo, la cavidad oral y la faringe están separadas por el paladar blando excepto cuando se realiza la deglución, es por esto que los caballos son respiradores nasales obligatorios. A cada lado de la misma se encuentra una abertura que corresponde a la comunicación con la bolsa gútural (McGorum et al., 2007).

Avanzando en sentido caudal se encuentra la laringe que previene la inhalación de comida hacia las vías aéreas inferiores durante la deglución; cumple también una segunda función, la fonación. El soporte cartilaginoso de la laringe lo proporciona el cartílago cricoides, el cartílago tiroides y un par de cartílagos aritenoides (McGorum et al., 2007).

2.1.2 Vías aéreas bajas

La tráquea funciona como conexión entre la laringe y la bifurcación bronquial, también llamada carina. La misma es flexible y mantiene su forma gracias a cartílagos con forma de “c”, en sentido transversal y ubicados a lo largo de la misma. El epitelio traqueal pseudoestratificado consta principalmente de células caliciformes productoras de moco y células ciliadas por arriba de una capa de células basales. La

lámina propia presenta muchas ramas de la circulación bronquial que sirven para humedecer y calentar el aire como también participar en la respuesta inflamatoria de la tráquea (McGorum et al., 2007).

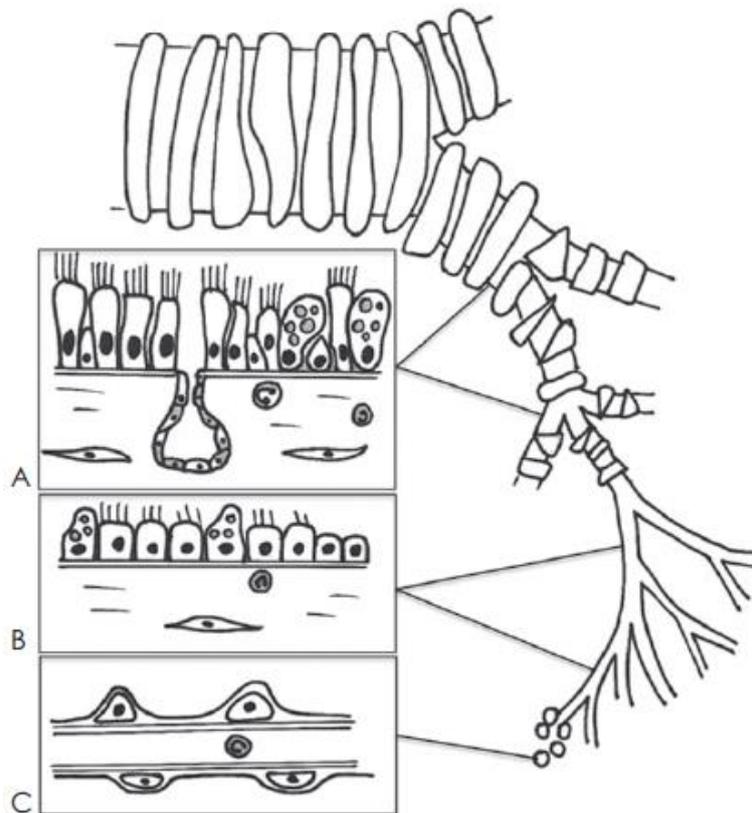


Figura 2. Estructuras del aparato respiratorio equino.(A) La tráquea y los bronquios están revestidos por epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes. (B) Los bronquiolos están revestidos proximalmente por células cuboides ciliadas y distalmente por células no ciliadas. (C) Los alvéolos están cubiertos principalmente por neumocitos tipo I y neumocitos tipo II que producen el surfactante. Tomada de: Cian, et al. (2015).

A continuación, el aire inspirado pasa por los bronquios, que son estructuras de pared cartilaginosa, con forma de túnel, cuya función es la de distribuir el aire a los pulmones desde el centro a la periferia. Esto lo logra mediante ramificaciones de los bronquios mayores a bronquios de menor calibre hasta llegar a los bronquiolos. La diferencia está dada en que estos últimos carecen de cartilago en su pared (McGorum et al., 2007).

Los bronquiolos terminales son los conductos aéreos más pequeños, a excepción de los alvéolos. Los conductos aéreos no participan del intercambio gaseoso. Los bronquiolos terminales se dividen luego en bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, para finalizar en los sacos alveolares. Las vías aéreas distales que contienen los alvéolos constituyen la zona respiratoria (Hawkins y Couëtil, 2013).

2.1.3 Fisiología respiratoria

El aire atmosférico ingresa por los ollares y se distribuye entre las ramas del árbol traqueobronquial hasta llegar al alvéolo. En este lugar, el oxígeno pasa hacia los capilares pulmonares mediante difusión donde se combina con la hemoglobina para ser transportada hacia los tejidos. A su vez, el dióxido de carbono abandona los tejidos, ingresando a la sangre, retornando hacia los pulmones para ser eliminado mediante la ventilación. Este proceso está regulado para ajustarse a las necesidades del ejercicio y otras demandas metabólicas (McGorum et al., 2007).

El objetivo principal de las vías aéreas es transportar el aire hacia dentro y fuera de los alvéolos, pero también existen otras funciones vitales de defensa contra factores irritantes, agentes infecciosos y toxinas, además del calentamiento y humidificación del aire. Las células alveolares (neumocitos) tipo II son las encargadas de producir el surfactante pulmonar, sin el cual la tensión superficial del líquido que cubre el pulmón sería tan alta que lo haría colapsar. El surfactante está compuesto por una mezcla de fosfolípidos y proteínas, encargándose de reducir la tensión superficial (McGorum et al., 2007).

Los caballos de carrera consumen 75 litros de oxígeno por minuto al realizar ejercicio de máxima intensidad. Para poder lograr suministrar el aporte adecuado de oxígeno, el caballo inhala un volumen de 13 litros, 120 veces por minuto (McGorum et al., 2007). En un caballo en reposo de 500 kg, el volumen tidal (aire inhalado y expirado en cada respiración) es de 4-5 litros en promedio (McGorum et al., 2007).

No existe una relación clara entre la frecuencia respiratoria y las pisadas cuando el caballo está al paso o trote, pero sí al galope, donde la inhalación ocurre cuando los miembros anteriores se extienden y la exhalación cuando los miembros anteriores están en el suelo y los posteriores se mueven hacia delante. Si el caballo presenta dificultad para respirar, esta coordinación entre la marcha y la respiración se altera. Por ejemplo, cuando presenta obstrucción de las vías respiratorias el caballo necesitará más tiempo para inhalar, pudiendo dar dos pasos en vez de uno (McGorum et al., 2007).

La tos se describe como la exhalación forzada que ayuda a limpiar los bronquios mayores de mucus y material extraño. Se inicia por la activación de los receptores de irritación que se ubican en la mucosa del bronquio, estos estímulos pueden ser tanto mecánicos (cuerpo extraño), cambios en la osmolaridad o liberación de mediadores inflamatorios. La tos puede ser un signo de inflamación, por lo que los caballos sanos raramente tosen. Un caballo puede estar horas sin toser pero luego toser 40 veces en 15 minutos, es así que los dueños pueden no darse cuenta que su animal presenta tos (McGorum et al., 2007).

2.2 Enfermedades respiratorias en equinos

Las enfermedades del aparato respiratorio son comunes en caballos de todas las edades y razas. Los requisitos impuestos por el metabolismo del cuerpo a dicho aparato incluyen la transferencia de oxígeno del aire inspirado a la sangre arterial que necesitan los tejidos del cuerpo y la eliminación de dióxido de carbono de la sangre venosa producida por el metabolismo. Estos requerimientos de la respiración aumentan notoriamente durante el ejercicio, por lo que la habilidad atlética del caballo va a depender de la integridad del aparato respiratorio junto con otros

sistemas como el músculo esquelético, nervioso y cardiovascular. En caballos sanos, el aparato respiratorio es el factor determinante en la performance atlética del mismo. Cualquier disfunción respiratoria puede causar un descenso en la ventilación e intercambio gaseoso, por lo que las enfermedades respiratorias son la mayor causa de intolerancias al ejercicio y baja en la performance (Rush y Mair, 2004).

A nivel mundial, las enfermedades respiratorias siguen siendo uno de los principales problemas en la industria ecuestre, teniendo sólo por delante las de origen músculo-esquelético. Esto se debe a la interrupción del entrenamiento, generando costos de tratamiento o incluso pudiendo llevar al retiro anticipado del caballo afectado (Hodgson y Hodgson, 2002; Reed et al., 2004). Para el rápido regreso al entrenamiento de estos animales es necesario realizar la detección precoz y el tratamiento adecuado de la afección. El lavado broncoalveolar y el aspirado transtraqueal son dos técnicas muy útiles para complementar la clínica (Gómez, 2012).

Enfermedades respiratorias de origen viral

La infección viral respiratoria es considerada la enfermedad más común en caballos mayores de un año en América del Norte y Europa; siendo las más importantes la Influenza equina H3N8/A y el Herpesvirus equino tipo 1 (HVE-1) y tipo 4 (HVE-4). Afectan principalmente a caballos jóvenes, con historial de haber estado en contacto con caballos nuevos (ferias, exposiciones, ventas) o haber estado expuestos a situaciones de estrés. Los signos clínicos más comunes son la letargia, fiebre, secreción nasal sero o mucopurulenta, linfadenopatía, tos y anorexia. Todos los virus de la influenza son tipo ARN (familia Orthomyxoviridae), y son clasificados en diferentes subtipos dependiendo de las glicoproteínas de superficie hemaglutininas (H) y neuraminidasas (N). Por otro lado, los herpesvirus son del tipo ADN y a diferencia de la influenza equina tienen poca variabilidad antigénica (Hawkins y Couëtil, 2013).

El caballo es el huésped natural de ambos HVE-1/HVE-4 y la transmisión ocurre por contacto directo o indirecto con secreciones nasales infectadas. El HVE-4 produce exclusivamente signos respiratorios mientras que el HVE-1 es responsable de abortos y encefalomiелitis principalmente. El HVE-4 produce síntomas febriles agudos en caballos jóvenes caracterizados por rinofaringitis y traqueobronquitis. La replicación de este tipo viral se limita al epitelio del tracto respiratorio y sus ganglios linfáticos, por lo que la infección en hembras preñadas con HVE-4 raramente produciría abortos. El período de incubación es de 2-10 días, además es común la infección bacteriana secundaria manifestándose con secreción mucopurulenta, traqueítis, bronquitis y neumonía (Rush y Mair, 2004).

Por otro lado, el HVE-1 es endotelio trópico, con predilección por el epitelio vascular de la mucosa nasal, pulmonar, glándulas adrenales, tiroides, placenta y sistema nervioso central. Las principales manifestaciones clínicas son el aborto y la mielitis ascendente. El aborto ocurre entre las 2-12 semanas posteriores a la infección, pueden ser abortos esporádicos o presentarse en forma de tormenta de abortos dentro de la manada. Aquellas hembras preñadas que son expuestas al virus en el último tercio de gestación pueden no abortar pero dar a luz a potrillos con neumonitis viral fulminante, ictericia (hepatitis) y marcada neutropenia. Los signos nerviosos pueden variar desde incoordinación moderada y paresia posterior leve o total, con pérdida de la función de la cola, vejiga y pérdida de la sensibilidad de la piel de la

región perianal e inguinal. En casos excepcionales, la parálisis puede ser progresiva y terminar en cuadriplejía y muerte (Rush y Mair, 2004).

Solamente por los signos clínicos no es posible diferenciar la enfermedad por HVE-4 de la influenza equina. Asimismo el diagnóstico del herpesvirus equino por serología es difícil, debido a que muchos animales sanos tienen anticuerpos contra HVE-1 y HVE-4 circulantes (infecciones latentes, infección subclínica, vacunación). El diagnóstico definitivo se realiza mediante el aislamiento viral de muestras obtenidas por hisopado nasofaríngeo o muestra de sangre con citrato de sodio en fases tempranas de infección. El hisopado nasofaríngeo debe ser transportado dentro de las 24 hrs de obtenida la muestra en un medio adecuado (4°C). En caso de sospechar aborto por HVE-1, el diagnóstico se basa en las características macro y microscópicas del feto abortado, aislamiento viral y la detección de antígenos virales en tejido fetal (PCR o inmunohistoquímica). Por otro lado, el HVE-1 se diagnostica a nivel histopatológico por la presencia de lesiones vasculares en el sistema nervioso central en aquellos caballos que no sobrevivieron (Rush y Mair, 2004).

Existen dos subtipos del virus de la influenza (H7N7 y H3N8) infecciosos para el caballo. Cabe señalar que el H7N7E no se ha confirmado en equinos ni hubo ningún aislamiento desde 1980 a la fecha (Reed et al., 2004). El virus de la influenza equina es altamente contagioso y se esparce rápidamente por contacto directo en animales no vacunados. En caballos inmunizados, la enfermedad es difícil de diferenciar de otras enfermedades respiratorias contagiosas (Hawkins y Couëtil, 2013). Su infección predispone a una infección bacteriana secundaria por la disrupción de la barrera de la mucosa respiratoria. El reposo de por lo menos 3 semanas y el respectivo cuidado son los pilares para un tratamiento exitoso. Es la enfermedad respiratoria contagiosa más importante a nivel económico de la actividad ecuestre; algunos hipódromos llegan a experimentar 2 o 3 brotes de influenza dentro de una temporada de competición (Reed et al., 2004; Rush y Mair, 2004). Su replicación está limitada al tracto respiratorio y no produce viremia. El período de incubación es de aproximadamente 1-3 días y los signos clínicos aparecen de forma aguda; fiebre, descarga nasal serosa, linfadenopatía submandibular y tos. En casos leves, los signos desaparecen luego de 3 días. La tos es seca, dura y no productiva, característica de esta enfermedad. En potrillos jóvenes, la enfermedad es grave, pudiendo producir signos de neumonía viral, conduciendo a la muerte en 48 hrs (Rush y Mair, 2004). Debido a la similitud de signos clínicos con otras enfermedades respiratorias, se requiere el aislamiento viral de secreciones nasales o el aumento de anticuerpos específicos para confirmar el diagnóstico de Influenza. El aislamiento viral se debe recolectar de hisopado nasal o de lavado traqueal dentro de las primeras 48 hrs de iniciada la enfermedad, donde el caballo está febril, para aumentar las chances de éxito. El hisopado nasal tiene que introducirse por lo menos 15 cm, insertado en el meato ventral y avanzar hasta la nasofaringe para luego ser transportado en el medio especial con antibióticos y a una temperatura adecuada (Hawkins y Couëtil, 2013).

Los principales objetivos de una buena terapia son: proporcionar descanso, terapia de sostén y el tratamiento de complicaciones secundarias. Se recomienda una semana de reposo estricto por cada día que el caballo haya demostrado temperatura elevada. La vuelta al entrenamiento debe ser luego de una semana en que los signos clínicos hayan desaparecido, menos la tos, debido a que esta puede tardar hasta un mes para desaparecer (Hawkins y Couëtil, 2013).

Enfermedades respiratorias de origen neoplásico

Menos del 1% de las enfermedades respiratorias son causadas por neoplasias, y éstas son reportadas mayoritariamente en caballos mayores, presentando una tasa de prevalencia de 0,15 a 0,62% (Reed et al., 2004; Rush y Mair, 2004). Los signos clínicos de las neoplasias torácicas van a depender de la localización del tumor y del tipo celular. Se pueden dividir en mediastínicos e intrapulmonares. Los mediastínicos pueden tener origen metastásico o primario, mientras que los intrapulmonares tienen mayoritariamente origen metastásico. Los tumores intrapulmonares se presentan con signos de intolerancia al ejercicio, pérdida de peso, tos y se puede observar epistaxis. Por otro lado, aquellos caballos con tumores localizados en el mediastino pueden presentar grandes volúmenes de efusión pleural, respiración superficial y edema pectoral. También es posible observar laminitis debido a la infiltración y lisis del hueso por metástasis (Rush y Mair, 2004). Las neoplasias encontradas con mayor frecuencia basándose en estudios *postmortem* son los carcinomas de células escamosas, los sarcoides, los fibromas, los melanomas, los papilomas, los fibropapilomas y los linfomas. Se puede realizar el diagnóstico mediante el examen endoscópico, también por evidencias radiográficas como ecográficas. Los caballos con neoplasias presentan un pronóstico malo y la mayoría son sacrificados. Aquellos con tumores localizados con baja capacidad de hacer metástasis, pueden acudir a la resección pulmonar (Reed et al., 2004).

Enfermedades respiratorias causadas por parásitos

El parásito pulmonar, conocido como *Dictyocaulus arnfeldi*, produce signos clínicos de obstrucción de las vías aéreas inferiores pudiendo ser indistinguibles con los encontrados en la obstrucción recurrente de las vías respiratorias. Se debe de sospechar de infestaciones por parásitos pulmonares cuando se presenta un brote de animales con síntomas de obstrucción y existe un antecedente de haber tenido contacto con burros o mulas ya que éstos son los hospedadores naturales del *Dictyocaulus arnfeldi* y raramente desarrollan signos evidentes de infestación. Los signos clínicos se caracterizan por tos y dificultad respiratoria, presentándose principalmente a final del verano. Los caballos infestados pueden presentar eosinofilia periférica además de ser los eosinófilos las células inflamatorias que abundan en el fluido recolectado mediante BAL o lavado transtraqueal. Sin embargo, el obtener un fluido eosinofílico recolectado mediante el BAL, no es patognomónico de una parasitosis; aunque sí debería llevar al clínico a incluir esta patología en el diagnóstico diferencial. Los caballos adultos raramente desarrollan una infección latente (2%), por lo que realizar un examen coproparasitario (Baermann), no determinaría con seguridad la infestación por parásitos pulmonares. La droga de elección para la eliminación de este parásito es la Ivermectina (200 ug/kg PO), siendo efectiva contra formas maduras e inmaduras (Rush y Mair, 2004).

Hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio

La hemorragia pulmonar inducida por ejercicio (HPIE) es el sangrado que proviene de los pulmones de los caballos durante el ejercicio. Principalmente ocurre en aquellos equinos que son sometidos a entrenamientos intensos. Un 95% de los caballos de carrera sufren de esta enfermedad cuando están en entrenamiento (diagnosticado por citologías de lavado traqueales). La etiología precisa de esta

patología está aún inconclusa, pero existen varias hipótesis como: el aumento de las presiones intrapulmonares, junto con el aumento de la presión arterial del pulmón conduce a una falla de los capilares pulmonares. También el trauma en el pulmón caudo-dorsal luego de fuertes impactos puede causar hemorragia (Barakzai, 2007). La sangre puede ser visualizada directamente en los ollares (epistaxis) o en las vías traqueobronquiales mediante endoscopia, y su diagnóstico definitivo puede ser realizado mediante traqueoscopia donde se observa sangre en el tracto respiratorio o por la detección de hemosiderina en los macrófagos alveolares. La hemorragia ocurre casi exclusivamente en el área caudo-dorsal del pulmón y es asociado con fibrosis y bronquiolitis macrofágica (Couëtil et al., 2016). Para el tratamiento se recomienda el reposo, pero es probable que recurra la hemorragia cuando el caballo vuelva a entrenar. Asimismo, los fármacos que reducen la presión capilar pulmonar son elegidos para el tratamiento y prevención de la enfermedad. La aplicación de furosemida no evita el desarrollo de la enfermedad, pero existen evidencias de que puede reducir la gravedad de la alteración (Reed et al., 2004).

Asma equino

Antiguamente se describían varios nombres para esta condición: *Heaves*, *broken wind*, enfermedad respiratoria crónica obstructiva, enfermedad de las pequeñas vías aéreas; hoy en día denominada como obstrucción recurrente de las vías aéreas (en inglés: *recurrent airway obstruction* – RAO) y enfermedad inflamatoria de las vías aéreas (en inglés: *inflammatory airway disease* – IAD). Esta variabilidad de nombres se basa en la presentación clínica, patológica y citológica de la enfermedad. Actualmente se recomienda referirse a estas enfermedades crónicas no infecciosas de las vías aéreas inferiores como Asma Equino debido a las similitudes que se observan con el asma humano (Rossi, 2020). No existe predilección por sexo ni raza, sin embargo, puede haber un componente etiológico genético (Rush y Mair, 2004).

Según la severidad de los signos clínicos, el asma equino puede ser dividido principalmente en tres tipos: leve, moderado y severo (Bullone y Lavoie, 2017). Ambos fenotipos de Asma Equino, leve/moderado (EIVA) y severo (ORVA), comparten signos clínicos y fisiopatología (Rossi, 2020). El tipo leve incluye aquellos caballos con inflamación de las vías aéreas inferiores identificados mediante BAL, función pulmonar anormal y pueden presentar signos de compromiso pulmonar o simplemente una baja en la performance física. Los signos clínicos de caballos con asma moderado son más evidentes e incluyen normalmente tos y esfuerzos respiratorios en reposo. El asma severo incluye todos los casos donde el animal expresa visiblemente aumento en el esfuerzo respiratorio en reposo (Bullone y Lavoie, 2017). El asma leve/moderado afecta a caballos de todas las edades, pero se piensa que se presenta más comúnmente en animales de edad media, mientras que el asma severo se encuentra con mayor frecuencia en caballos de más de 7 años (Rossi, 2020).

La enfermedad se debe a un proceso inflamatorio producido por una hipersensibilidad a los agentes alérgenos inhalados (Morán, Araya y Folch, 2006). Se caracteriza por la inflamación de las vías aéreas, obstrucción reversible y acumulación de mucus, causado por la hipersensibilidad bronquial, lo que lleva al animal a que presente una marcada disnea y tos seca. Puede que en algunos casos solo se observa una disminución del rendimiento deportivo del caballo (Morán et al., 2006). Sin embargo, en casos severos se puede observar anorexia y pérdida de

peso. Cuando la enfermedad progresa existe una hipertrofia del músculo abdominal oblicuo externo observándose la “línea del esfuerzo”. Afecta mayoritariamente a caballos que se encuentran en un ambiente donde predomina el polvo orgánico del heno y la paja. Lo que lleva a que los signos clínicos sean más severos en invierno donde los caballos permanecen más tiempo dentro de las caballerizas (Hawkins y Couëtil, 2013). El diagnóstico se basa en una buena anamnesis, signos clínicos y la citología del BAL. La neutrofilia presente en la citología del BAL se correlaciona con la severidad de las lesiones pulmonares (Bullone y Lavoie, 2017).

2.3 Diagnóstico de enfermedades respiratorias

La evaluación diagnóstica del sistema respiratorio comienza con una detallada y dirigida anamnesis del paciente y su examen físico. La mención de la pérdida de apetito, presencia de secreción nasal u ocular anormal, alteraciones en la frecuencia respiratoria y cambios en la performance, suele reflejar lesiones patológicas en el sistema respiratorio. A su vez, alteraciones en la postura o el paso pueden significar dolor a nivel de tórax o reducción de la capacidad respiratoria. Asimismo, es importante recabar información sobre el ambiente del paciente (ubicación del establo, calidad y flujo de aire, características de la alimentación). Del mismo modo, información sobre viajes, competiciones recientes y las tendencias de enfermedades cerca de la ubicación del paciente pueden influenciar en el proceso diagnóstico (Hewson y Arroyo, 2015).

El sistema respiratorio es muy accesible para las pruebas diagnósticas, responde a un arsenal de drogas y tiene buena capacidad de sanar. Por lo que es un aparato realmente confortable para evaluar y tratar para los clínicos. Las técnicas empleadas para evaluar el tracto respiratorio del equino son las siguientes: examen endoscópico, imágenes radiográficas y ecográficas, evaluación citológica, cultivo bacterial de secreciones respiratorias, evaluación histopatológica de la mucosa y parénquima pulmonar. La tomografía computarizada y resonancia magnética son técnicas avanzadas que están siendo empleadas cada vez más, especialmente para enfermedades que afectan el tracto respiratorio superior. A diferencia del sistema nervioso central, la accesibilidad al aparato respiratorio, habilita al clínico a obtener un diagnóstico definitivo en la mayoría de los casos (Rush y Mair, 2004).

Al examen endoscópico, se puede observar directamente las vías aéreas superiores, bolsas gurgutales, tráquea, y el bronquiolo principal. Se indica una endoscopia cuando el clínico percibe ruidos, dificultad inspiratoria, baja en la performance y descarga nasal. Para examinar las vías aéreas inferiores, las principales técnicas utilizadas son el lavado transtraqueal y el broncoalveolar. El lavado transtraqueal es indicado para realizar cultivos bacterianos y fúngicos de las vías aéreas inferiores. Por otro lado, el lavado broncoalveolar es indicado para la evaluación citológica de las vías respiratorias inferiores en animales con enfermedad pulmonar no infecciosa (Rush y Mair, 2004).

2.3.1 Examen clínico

Los signos clínicos junto con la historia del paciente van a determinar el origen de la enfermedad respiratoria para luego poder realizar una lista de diferenciales. Es útil evaluar la condición corporal ya que la pérdida de peso y una pobre condición de la misma puede ser indicativo de enfermedades crónicas (neoplasia, RAO, neumonía/pleuritis crónica). Por ejemplo, la presencia de edema ventral se ve con

frecuencia en enfermedad de la pleura como resultado de un descenso en el retorno linfático (efusión pleural, pleuroneumonía, linfoma torácico). A su vez, es importante evaluar la postura y el comportamiento. Un animal letárgico puede estar asociado con hipoxia, sepsis, fiebre o neoplasias. Cuando el clínico se encuentra frente a un paciente con hipoxia, obstrucción aérea y dolor en el tórax, puede estar agitado agresivo y provocar un comportamiento peligroso (Hawkins y Couëtil, 2013).

El examen del tracto respiratorio del equino se realiza de una manera sistemática, comenzando con la observación del animal en reposo. Previamente al examen físico se aprecia la frecuencia (promedio 8-12 RPM), esfuerzo respiratorio y presencia de algún sonido respiratorio audible sin utilizar el estetoscopio. Muchas enfermedades respiratorias pueden presentarse sin alteraciones en el reposo. Del mismo modo, la taquipnea no necesariamente indica un desorden respiratorio, la presencia de fiebre, ansiedad, dolor y acidosis pueden aumentar la frecuencia respiratoria. La espiración en los caballos es predominantemente pasiva, menos la última fase que se realiza un esfuerzo abdominal. En consecuencia, la fase inicial de la inspiración es pasiva por el retroceso de la pared abdominal para luego ser principalmente activa. A diferencia de la mayoría de las especies, donde la inspiración es un proceso activo realizado por el diafragma y los músculos intercostales, y la espiración es pasiva guiada por el retroceso elástico (Rush y Mair, 2004).

La extensión de la cabeza, inflamación de las fosas nasales, postura o marcha anormal, presencia de descarga nasal y ocular o el aumento del esfuerzo espiratorio observado sobre el músculo externo abdominal oblicuo son signos característicos en patologías respiratorias (Hewson y Arroyo, 2015).

La mayoría de los clínicos comienzan el examen físico por la cabeza. Se evalúan los ollares observando el grado de inflamación, descarga nasal y el flujo de aire presente. La descarga nasal puede ser serosa, mucosa, purulenta o hemorrágica. Cuando la descarga es serosa se relaciona con infecciones respiratorias virales o rinitis alérgica. Por otro lado, la descarga mucoide a purulenta suele indicar una infección bacteriana primaria o secundaria. Las descargas nasales unilaterales indican que el origen del exudado se encuentra rostral al aspecto caudal del septum nasal y se observa comúnmente en caballos con sinusitis o masas nasales o etmoidales unilaterales. Las descargas bilaterales pueden tener origen tanto de las vías aéreas superiores como las inferiores (Rush y Mair, 2004).

Durante el examen físico, también se debe incluir la percusión de los senos, palpación de los ganglios submandibulares y retrofaríngeos, y la auscultación de los pulmones. Debe evaluarse un ciclo respiratorio completo (una inspiración y espiración completa), auscultando cada espacio intercostal de ambos hemitórax. La tráquea debería ser auscultada igualmente en distintos niveles de ella, para detectar variaciones en la intensidad de ruidos anormales; lográndose apreciar el movimiento de moco dentro de la misma. La percusión del tórax puede permitir la detección de efusión pleural, áreas alteradas de la densidad del pulmón (abscesos pulmonares), o la extensión del área pulmonar (obstrucción de las vías aéreas inferiores y asma equino) (Hewson y Arroyo, 2015).

2.3.2 Exámenes colaterales

Una vez que la anamnesis y examen clínico del paciente guiaron al examinador hacia una localidad del tracto respiratorio, otros exámenes diagnósticos colaterales pueden ser realizados dependiendo de la localización y naturaleza de la enfermedad

sospechada (Hewson y Arroyo, 2015). Existen varios diagnósticos colaterales para valorar el tracto respiratorio y serán descritos a continuación.

A. *Ultrasonografía*: La ecografía pulmonar es el método diagnóstico ideal para evaluar fluido en el espacio pleural, consolidación y abscedación pulmonar periférica. Se puede identificar el volumen, la ubicación y carácter del fluido o aire dentro del espacio pleural. Como esta técnica no puede penetrar el aire, los abscesos pulmonares y consolidaciones profundas no se pueden detectar y se deben detectar mediante radiografía. A su vez, mediante la ecografía, el clínico puede determinar el sitio más apropiado para realizar la centesis basado en la presencia de fibrina, ecos gaseosos y presencia de fluidos. (Rush y Mair, 2004).

B. *Radiografía de tórax*: Las radiografías de tórax son las más utilizadas para la identificación de anomalías en el parénquima pulmonar, mediastino y diafragma (consolidación pulmonar, abscedación pulmonar, masas mediastínicas como neoplasias, abscesos y granulomas) (Rush y Mair, 2004).

C. *Examen endoscópico*: El examen endoscópico de las vías aéreas puede ser realizado tanto en condiciones de campo como en centros especializados. La visualización directa de las vías aéreas superiores permite al clínico observar dinámica como estáticamente las anomalías presentes en caballos destinados al deporte con antecedentes de disminución del rendimiento. En estos casos, primero se realiza la evaluación en reposo sin anestesia para evaluar la funcionalidad íntegra de las estructuras presentes que puedan alterar la performance del animal, como el cartílago aritenoides y el paladar blando (Hewson y Arroyo, 2015).

D. *Lavado Broncoalveolar (BAL)*: *Bronchoalveolar Lavage* (en inglés), es una técnica que consiste en la recolección de muestras de secreciones, junto con los depósitos del lavado de las vías aéreas inferiores, que nos permite realizar una evaluación citológica, además de macroscópica (presencia de surfactante, fibrina, turbidez y color de la muestra recolectada) orientándose a un diagnóstico definitivo de la evolución/proceso de las patologías respiratorias/pulmonares no infecciosas (Hoffman, 1999; Hawkins y Couëttil, 2013). Al no realizarse de manera estéril no se recomienda hacer el estudio microbiológico de las mismas (Lucas, 2012).

2.4 Técnica de lavaje broncoalveolar

2.4.1 Generalidades

La técnica fue realizada por primera vez por el Dr. Laurent Viel en la Universidad de Guelph, en Ontario, a fines de los 70s (Hoffman, 2008). Es una técnica segura, de bajo costo y puede ser realizada a campo, con mínimo requisito de instalaciones (Hawkins y Couëttil, 2013). La técnica está indicado para equinos con disminución en el rendimiento, aquellos con presentación de tos durante el ejercicio y en estación, exudado mucopurulento en uno o ambos ollares, presencia de disnea y para la evaluación de las enfermedades pulmonares difusas, como la obstrucción recurrente, enfermedad inflamatoria de las vías aéreas y hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (Lucas, 2012).

Esta técnica ha sido utilizada para determinar la prevalencia y consecuencias clínicas de las enfermedades inflamatorias de los caballos, además de estudiar los aspectos de los mediadores de la inflamación (citoquinas, proteasas/antiproteasas, mieloperoxidasas) como también los posibles tratamientos para estas enfermedades. El análisis de los fluidos recolectados mediante la técnica del BAL es

también útil para la cuantificación de células sanguíneas de las vías aéreas de los caballos que se sospecha presentan Hemorragia inducida por el ejercicio (HIPE) (Hoffman, 2010).

Cabe mencionar que existe otra técnica utilizada para la recolección de muestras/secreciones, que es el lavado transtraqueal, pero a diferencia del BAL, es de elección para los procesos infecciosos localizados del pulmón, mientras que el Lavaje Broncoalveolar es de elección para los procesos difusos. Esto se debe a que los fluidos recolectados en el BAL solamente representan la región del lóbulo distal del bronquio en el cual se aloja la sonda, mientras que en el lavado transtraqueal, se recolecta las secreciones que se han acumulado en la tráquea, provenientes de “todas” las regiones de los pulmones. En caso de no tener conocimiento de la etiología, se realizan las dos técnicas, siendo muy importante efectuar primero el lavado transtraqueal con el fin de evitar la contaminación cruzada entre los dos procedimientos (Hawkins y Couëttil, 2013). Es por esto que la técnica de BAL es más utilizada para el diagnóstico de enfermedades con procesos difusos o crónicos (Hodgson, 2006).

Está contraindicado el uso de estas técnicas en caballos o potros con distrés respiratorio evidente, cianosis, marcada hipovolemia, taquicardia o evidencia de hipertensión pulmonar (Barton, 2008). Además, si el animal presenta una contaminación en las vías aéreas superiores, estas pueden contaminar el endoscopio o sonda a utilizar y causar contaminación de las muestras o peor aún, una infección pulmonar iatrogénica. A su vez, si existe una neumonía focal, se puede extender y hacerse difusa si se propaga por el pulmón durante el lavaje (Hewson y Arroyo, 2015).

Por lo que es importante monitorear el caballo por lo menos 48 hrs después de realizar la técnica para la detección precoz de neumonía, que incluye la observación del apetito del paciente, el esfuerzo respiratorio y la temperatura rectal dos veces al día. Si no existe ninguna complicación después de las 48 hrs de haber realizado el BAL, el animal puede retomar con sus actividades previas (Hewson y Arroyo, 2015). Debemos recordar que estas técnicas no deben reemplazar la realización de una correcta anamnesis y examen clínico del animal. Podemos encontrar un animal con signos clínicos poco específicos asociados a una enfermedad respiratoria, pero sin embargo evidenciar baja en la performance indicando una posible patología pulmonar subclínica o de bajo nivel. En esta situación, estas técnicas pueden lograr detectar mínimos cambios en el tracto respiratorio que no son discernibles en el examen clínico rutinario (Hodgson, 2006).

Independientemente de la técnica a utilizar, es imprescindible una buena higiene de los ollares, contención física y química del animal. El BAL puede ser realizado con el animal en estación pero debe estar sedado y se debe utilizar una mordaza para prevenir que el equino mueva la cabeza. Para la sedación se puede utilizar un alfa 2 agonista como la Xilacina (0,4-0,8 mg/kg IV) o Detomidina (0,01 mg/kg) que presentan propiedades broncodilatadoras que ayudan a disminuir la tos y el broncoespasmo (Hoffman, 2010).

Toma de muestra

El fluido puede ser recolectado mediante la utilización de una sonda específica para BAL de al menos 2,5 m de longitud y 10 mm de diámetro (sonda nasobronquial), con un balón inflable en el extremo o mediante un endoscopio largo (Hawkins y Couëttil, 2013). La utilización del endoscopio tiene varias ventajas, nos permite

seleccionar un bronquio en particular y además disminuye la incidencia de hemorragia iatrogénica reduciendo la contaminación de la muestra por células sanguíneas. A su vez, nos permite realizar una inspección visual con la ventaja de grabar en video el procedimiento dejando un registro pudiéndose agregar a la historia clínica del paciente (Barakzai, 2007).

La profundidad a la cual se accede depende del diámetro de la sonda a utilizar. En el caso de utilizar broncoscopios de mayores diámetros (10-13mm) estos generalmente alcanzan hasta la cuarta o sexta generación de bronquios, por lo tanto, la recolección celular proviene de un mayor número de alvéolos que si se utilizara un broncoscopio de menor diámetro (Hewson y Viel 2002).

Es recomendable advertir a los dueños que el caballo probablemente tosa y haga arcadas vigorosamente durante el procedimiento (Hoffman, 2008), debido a la presencia de múltiples receptores de la tos en la unión laringo-traqueal y en la carina. En equinos sanos se puede esperar que tosan entre 5 a 10 segundos, pero ante la presencia de hipersensibilidad o inflamación de las vías aéreas, es esperable que este tiempo se prolongue (Hodgson y Hodgson, 2002). Para aliviar la tos, se puede instilar una solución diluida de anestésico local como la lidocaína al 0,4% (60 - 120ml) (Hodgson y Hodgson 2002; Hewson y Viel 2002) o al 0,66% (30 - 60ml)(Hoffman 2008), atemperada. Esta solución se va a aplicar específicamente a la glotis y a la carina. Por otro lado, no es recomendado la aplicación del anestésico local en la laringe durante los procesos iniciales del BAL, debido a que este fluido va a arrastrar las secreciones traqueales hacia los bronquios, previo a la colecta, alterando el resultado de la misma (Hewson y Viel 2002).

La sonda utilizada se pasa por la nasofaringe mediante el meato ventral utilizando la misma técnica que cuando se pasa una sonda nasogástrica. La extensión de la cabeza puede facilitar el pasaje del tubo de la faringe a la tráquea. El tubo avanza lentamente hasta que calza en las pequeñas vías aéreas (uno se da cuenta por la resistencia que presenta). Una vez calzada la sonda, se insufla el bolo (5 mL de aire) ubicándose en forma segura (Barton, 2008). Si se infla demasiado el bolo de la extremidad de la sonda puede producir necrosis de la mucosa bronquial o una sobredistensión de las vías aéreas distales con el fluido para realizar el lavado (Rush y Mair, 2004).

Una vez que se ingresa, si es utilizado el endoscopio, se debe evaluar la nasofaringe, buscando la presencia de anomalías anatómicas o descargas, seguida por la inspección de la tráquea, evaluando y dejando registro de la presencia de hiperemia, así como la cantidad y calidad de cualquier secreción presente. Si se sospecha la presencia de ruidos en las vías respiratorias superiores, es importante observar la función de las estructuras faringo-laríngeas previo a la sedación y sin el uso de una mordaza para poder evaluar mejor las posibles irregularidades. Finalmente se debe observar la bifurcación de la tráquea (carina), para determinar la presencia de edema, pudiéndose encontrar engrosada y redondeada (Hewson y Viel 2002).

El volumen del líquido instilado va a tener un impacto en el recuento celular total del BAL. Por ejemplo, cuando se utilizan volúmenes más pequeños generalmente no llega al espacio alveolar obteniendo un mayor porcentaje de neutrófilos. Por otro lado, con volúmenes mayores, se pueden obtener muestras más representativas del líquido que reviste el epitelio de los alvéolos. Por lo que se recomienda un volumen de 250-500 mL (Hodgson, 2006).

La mayoría de los clínicos instilan 100-300 mL de una solución estéril, isotónica y cristalóide y recuperan el fluido mediante la aspiración manual (jeringas de 60ml) o

aspiración al vacío (600 mm Hg). Se recupera aproximadamente el 50-80% del volumen insuflado (Rush y Mair, 2004). También se recomienda precalentar la solución salina a 37 C previo a la infusión debido a que produce menos broncoespasmo permitiendo una mayor recuperación del líquido (Hewson y Viel 2002). Es importante observar la presencia de espuma blanca (surfactante) en la superficie de la muestra, esto nos indica que es proveniente del alveolo (McGorum et al., 2007).

Fallas en la recolección del líquido puede ser debido a que el endoscopio o catéter se posiciona en la bifurcación bronquial dando como resultado la aspiración de aire. En este caso, la rotación del endoscopio o catéter puede ayudar, o puede procederse a repetir el procedimiento. También puede suceder que el endoscopio o catéter pase a un sector del pulmón diferente durante la tos, obteniendo nuevamente aire durante la aspiración. Del mismo modo, cuando se usa un catéter para el BAL, este puede quedar muy apretado en las vías respiratorias impidiendo la aspiración de líquido y aire. Al intentar realizar la aspiración para la colecta, se siente un gran vacío en la jeringa, igualmente se puede recuperar el líquido si se aspira suavemente mientras se retira el catéter de manera lenta varios centímetros (McGorum y Dixon, 1994). Se debe evitar la presión negativa excesiva, en especial en las vías aéreas inflamadas, porque causaría el colapso del lumen disminuyendo el volumen recolectado además de causar trauma en el epitelio respiratorio obteniendo un número significativo de células rojas. Finalmente se desinfla el bolo y se retira la sonda (Hewson y Viel 2002).

Como las muestras son generalmente colectadas a campo, existe un retraso inevitable mientras se transportan al laboratorio. Se debe hacer todo lo posible para transportarlas en el menor tiempo posible para prevenir el deterioro de la morfología celular y el crecimiento de bacterias (Hodgson, 2006). Si las muestras no pueden ser enviadas dentro de las primeras horas de ser colectadas, éstas deben ser refrigeradas. A pesar de que las proteínas presentes en el surfactante deberían ser suficientes para la preservación de las células, si se demora en el procesamiento puede haber un cambio morfológico significativo. Para evitar este cambio, se recomienda la adición de suero (10% v/v), o un volumen igual de alcohol etílico (Barton, 2008). Si el procesamiento ocurre dentro de las 8 hrs de la colecta, existe un mínimo deterioro celular si las muestras son almacenadas a temperatura ambiente, y puede ser extendida a 24 hrs si son almacenadas a 4° C. Por otro lado, las muestras que no son refrigeradas son propensas a que ocurra un rápido crecimiento bacteriano con organismos patógenos que pueden llegar a confundir la interpretación de las muestras (Hodgson, 2006). Estas muestras pueden ser colocadas en tubos de vidrio simple (tubos de suero) o tubos con conservante celular como EDTA (Hewson y Viel 2002).

No es necesario añadir antibióticos a la solución insuflada, y el control rutinario del equino tampoco es indicado diariamente. Por al menos 48 horas luego del procedimiento, existe un infiltrado de neutrófilos en el segmento del pulmón lavado. Algunos caballos pueden manipular la sonda hacia su cavidad oral durante el pasaje de la misma. En caso de observar que el animal está masticando durante el procedimiento, se debe cancelar inmediatamente la técnica para evitar daños en los materiales (Rush y Mair, 2004).

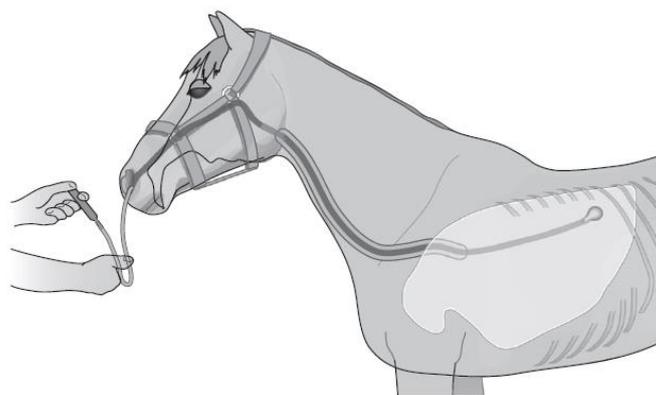


Figura 3. Demostración esquemática de la sonda de BAL obteniendo una muestra del segmento caudo - dorsal del pulmón. Tomada de: Hodgson, et al. (2002).

Valoración del fluido broncoalveolar

Primero se deben evaluar las muestras macroscópicamente, sosteniéndola contra luz y agitando suavemente el líquido; se deben observar y anotar las características como, color, turbidez, presencia de surfactante (espuma blanca), y cualquier resto floculante o larvas presentes (Hewson y Arroyo, 2015). Normalmente son claras o ligeramente turbias, cuando aumenta la turbidez y existe material floculento lo que refleja un aumento de mucus, células y restos celulares que puede observarse en caballos con infección respiratoria del tracto inferior. Ocasionalmente pueden encontrarse pedazos de material vegetal en caballos que hayan realizado ejercicio previo al muestreo. Normalmente el líquido obtenido debe ser inoloro, si se siente un olor pútrido puede estar asociado a una infección por anaerobios o necrosis del tejido pulmonar que tiene un pronóstico reservado. Sin embargo, la ausencia de olor no significa la no presencia de un proceso infeccioso (Hodgson, 2007).

El color de la muestra puede ser claro o incoloro, y puede cambiar según la cantidad de glóbulos rojos y células nucleadas presentes. Las colectas de caballos que han padecido recientemente hemorragia pulmonar inducida por ejercicio pueden aparecer rosadas o rojas, mientras que hemorragias más prolongadas pueden resultar en un color teñido de marrón debido a la presencia de hemosiderina (Hodgson, 2006).

El mecanismo de aclaramiento mucociliar en caballos es eficiente cuando la eliminación del mismo sigue el ritmo de su producción. En consecuencia, los caballos sanos contienen poco o nulo material mucoso y poco número de células libres. Citológicamente un poco de moco se debe observar. Cuando existe irritación pulmonar, la cantidad de moco en el tracto aéreo inferior aumenta, puede ser debido a una neumonía bacteriana, por hongos o parásitos, bronquitis crónica (Hodgson, 2007).

El recuento diferencial celular es un factor clave para identificar el tipo y grado de inflamación pulmonar que está presente. En general, se debe contar unas 300 a 500 células para asegurarse que se ha evaluado una muestra representativa. Se han establecido diferentes rangos para el recuento celular y este varía dependiendo de la literatura, pero se hace referencia a un 50% a 60% macrófagos, 30% a 50% linfocitos, menos del 5% neutrófilos, menos del 2% mastocitos, y menos del 0,1% de eosinófilos sería clínicamente normal en caballos en reposo (Hewson y Arroyo, 2015).

Interpretación de la citología del BAL

La interpretación citológica del BAL no es tarea fácil; entrenamiento y experiencia son necesarios. Un reporte citológico completo debe incluir tanto un recuento diferencial de células como su descripción morfológica y comentarios de si se encontraron componentes no celulares en las muestras (Hewson y Arroyo, 2015). A su vez, la evaluación de la muestra no debe realizarse de forma aislada, sino que debe interpretarse en asociación con la historia clínica, el examen clínico y otros exámenes colaterales (Hodgson, 2006).

Se requiere un conocimiento previo de las células que están presentes en forma rutinaria en los sitios a evaluar además de su apariencia morfológica normal para la evaluación de las muestras obtenidas. Asimismo, la determinación de las proporciones relativas de las células puede ayudar a interpretar los posibles cambios patológicos y se realiza mediante el recuento diferencial de 200-300 células consecutivas (Hodgson, 2006).

A continuación, se mencionan:

a) *Células epiteliales*: se pueden observar comúnmente. Incluyen células columnares ciliadas, no ciliadas y ocasionalmente células cuboideas. Las células cuboideas tienen relación núcleo:citoplasma alta con un núcleo chico/mediano redondo y céntrico con gránulos finos de cromatina y moderada cantidad de citoplasma (Cian, Monti y Dutham, 2015). Es raro observar un aumento en el número de células epiteliales de las muestras, sin embargo, es más común observar cambios en la morfología de estas células indicando la presencia de una patología pulmonar. En los casos de infecciones respiratorias, existe un daño directo en las células del epitelio provocado por las toxinas de los virus o bacterias (Hodgson, 2006).

b) *Células inflamatorias*: se reporta una gran variación en el porcentaje de células inflamatorias en el BAL obtenidas de caballos sanos. Esto se puede deber a las diferencias en la técnica de muestreo y procesamiento, y también estar influenciado por el lugar geográfico y momento de la colecta. Se estima que generalmente los caballos estabulados tendrán una mayor proporción de células inflamatorias, seguramente debido a la irritación por los agentes inhalados. Para poder definir mejor las anormalidades se deben establecer los valores de referencia de los caballos sanos, se considera que un BAL normal debería tener menos de 5% de neutrófilos, menos de 2% de mastocitos y menos de 0,5% de eosinófilos (Hodgson, 2006).

c) *Macrófagos, células rojas y hemosiderófagos*: los macrófagos pulmonares son las células inflamatorias que más se encuentran en un BAL de un caballo sano, por lo tanto, es difícil detectar un aumento en las proporciones de los mismos (Hodgson, 2006). Son de tamaño y morfología variable – 15-40 μ m de diámetro (Hewson y Viel 2002), se pueden observar grandes macrófagos multinucleados y formas mióticas en caballos sanos. Tienen una relación citoplasma:núcleo alta, de aproximadamente 3:1 (Hewson y Viel 2002) y se reconocen fácilmente cuando son grandes y vacuolados. Cuando estos son pequeños, es difícil diferenciarlos de linfocitos grandes, sin embargo, no es importante para el diagnóstico final (McGorum y Dixon, 1994).

Se puede observar frecuentemente un número mínimo de células rojas intactas en animales sanos que reflejan una hemorragia iatrogénica durante la colecta. Después de la hemorragia del tracto respiratorio, las células rojas son fagocitadas

rápidamente por los macrófagos de la zona dando lugar a los hemosiderófagos. Todas las causas de hemorragia del tracto respiratorio caudal a la laringe van a dar lugar a hemosiderófagos, pero la causa más común es la Hemorragia Pulmonar Inducida por el Ejercicio. El número aceptable de hemosiderófagos en el BAL es controversial debido a que puede que no refleje la cantidad total de sangre que entró a las vías aéreas (Hodgson, 2006). Existe una correlación entre la presencia de hemosiderófagos en BAL y la existencia de HPIE en el lóbulo dorsocaudal del pulmón en la necropsia, estas células pueden ser encontradas luego de varios meses de haber presentado el episodio de HPIE (Hewson y Viel 2002).

d) *Linfocitos*: debido al gran rango de linfocitos en proporción, es difícil la interpretación cuando estos se encuentran elevados en el BAL de un caballo sano. Sin embargo, se han reportado aumentos en la proporción de estos en caballos intolerantes al ejercicio y con tos crónica (Hodgson, 2006). Son células predominantemente pequeñas con escaso citoplasma y núcleo en forma de riñón u ovoide densamente teñido. Muchos tienen un grupo de pequeños gránulos intracitoplasmáticos (McGorum y Dixon, 1994). Se han observado poblaciones mixtas de linfocitos; pequeños (aproximadamente 6mm de diámetro, con núcleo denso) y grandes (aproximadamente 10-15 mm de diámetro, con un núcleo menos denso) en los BAL de caballos sanos. Se ha demostrado mediante la tinción de los anticuerpos, que la mayoría de los linfocitos de las muestras del BAL de los caballos sanos, son linfocitos T, mayoritariamente CD3+, mientras que menos del 10% son linfocitos B (Hewson y Viel 2002).

e) *Neutrófilos*: el número de neutrófilos puede variar rápidamente debido a que responden a una gran variación de estímulos, pero ellos suelen encontrarse en un número considerablemente bajo. Son las células más predominantes en caballos con neumonía o pleuroneumonía con un porcentaje de neutrófilos mayor al 40% y en casos agudos, alcanzando un 90%. También se puede observar un aumento de neutrófilos en casos de EPIH, infecciones virales agudas y bronquitis crónica. En casos de caballos con neumonía o pleuroneumonía causada por hongos o bacterias suele encontrarse neutrófilos degenerativos (Hodgson, 2006). Se observan con distintos grados de madurez pero son reconocidos por presentar un núcleo multilobulado y citoplasma rosado. Se debe observar con detalle para diferenciar los neutrófilos picnótico de los linfocitos, los primeros son pequeños y tienen un núcleo fuertemente condensado. Los neutrófilos picnóticos son comúnmente encontrados en BAL de caballos con obstrucción recurrente de las vías aéreas (McGorum y Dixon, 1994). Cuando nos encontramos con neumonía séptica, podemos detectar signos de degeneración de neutrófilos caracterizados por cariólisis, pérdida de segmentación o cariorrexis (ruptura del núcleo) (Hewson y Viel 2002).

f) *Eosinófilos*: es bajo el número de eosinófilos que se encuentra en el BAL de caballos sanos, sin embargo, incrementa en los casos de infección pulmonar por larvas o migración de ascaris. Un incremento menor también puede observarse en casos de reacciones respiratorias alérgicas. Estas elevaciones son frecuentemente transitorias y no son observadas si se vuelve a tomar la muestra 24 hrs después (Hodgson, 2006). Son reconocidos por los grandes gránulos eosinófilos intracitoplasmáticos (McGorum y Dixon, 1994).

g) *Mastocito*: un aumento en el porcentaje de mastocitos se relaciona a una hiperactividad del tracto respiratorio y reducción de la tolerancia al ejercicio (Hodgson, 2006). Son de tamaño variable y contienen varias características: pequeños con gránulos intracitoplasmáticos rosados-violetas y se pueden observar con varios grados de degranulación (McGorum y Dixon, 1994).

Asociación entre la citología del BAL y el rendimiento de equinos deportivos

McKane y colaboradores describen los resultados obtenidos de la realización del BAL en 62 caballos de carrera, que concluyeron en la utilidad del BAL como buen diagnóstico de varias enfermedades del tracto respiratorio inferior. De este artículo se pueden destacar varios resultados importantes. Los datos clínicos que los entrenadores mencionaron sobre los caballos a muestrear, demostraron que 10 de los 62 animales en examinación habían tosido más de lo habitual en la semana anterior a la toma de muestras. Sin embargo, ninguno de los 10 caballos estaba deprimido, con hipertermia o signos de secreción nasal ni disminución del rendimiento. Cuando se analizaron las muestras, se detectó que este grupo de caballos en comparación con los 52 restantes presentaban varias diferencias significativas. El porcentaje de macrófagos presentes en las muestras de los caballos normales era 10% mayor al reportado en los caballos que habían tosido. Además, los caballos que estaban saludables presentaron un mayor porcentaje de hemosiderófagos, que a su vez contenían más hemosiderina que los colectados en los caballos que habían tosido. Asimismo, el porcentaje de linfocitos en las muestras de los caballos sanos fue significativamente menor que la de los 10 caballos que presentaron tos (McKane, Canfield y Rose, 1993).

Asimismo, en este estudio se reportaron hemosiderófagos en el 90% de las muestras, indicando la ocurrencia inmediata o pasada de la Hemorragia Pulmonar Inducida por Ejercicio (HPIE), por lo que el uso del BAL, permite la detección precoz y monitorización del HPIE, proporcionando a los veterinarios valiosa información para la prevención de la enfermedad. Se sugiere que el HPIE está relacionado con la intensidad del ejercicio debido al aumento en los porcentajes de eritrocitos encontrados en estos caballos. Una posible explicación al cambio en las células inflamatorias puede ser el resultado de un aumento de la exposición de las vías aéreas inferiores a los aerosoles irritantes. Durante el ejercicio intenso, el flujo de aire que ingresa a los pulmones es mayor, aumentando el volumen tidal y la frecuencia respiratoria. Este aumento de la ventilación facilita el ingreso de partículas hacia los pulmones y su depósito en los pequeños bronquiolos. Por lo que es esperable que la mayoría de los caballos que realizan ejercicio intenso presenten HPIE (McKane et al., 1993).

Por último, los porcentajes de neutrófilos y células sanguíneas fueron mayores en animales con actividad intensa que aquellos que realizan ejercicio de baja intensidad. Asimismo, se presentaron diferencias en la morfología de los macrófagos, estos eran más grandes y se observaban más vacuolados en caballos que estaban en competición (McKane et al., 1993).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar la técnica de lavaje broncoalveolar (BAL) en equinos deportivos.

3.2 Objetivos específicos

- A. Poner a punto la colecta de fluido pulmonar a través de la técnica de lavado broncoalveolar (BAL).
- B. Realizar el reconocimiento citológico en líquido pulmonar según criterios internacionales.
- C. Analizar la población celular bronco-alveolar del líquido colectado

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales

Se muestrearon 12 equinos Pura Sangre de Carrera clínicamente sanos, 8 eran hembras y 4 machos realizando en su totalidad actividad deportiva al momento, con un rango de edad de 2 a 5 años en condiciones de estabulación, ubicados en el Hipódromo de Maroñas, Montevideo, Uruguay. Se registraron los datos individuales del animal, y se realizaron controles de rutina como un hemograma. En promedio el tiempo de estabulación de los equinos es de 1,4 años, estando 23 horas dentro del box al día con cama de viruta (primeros 6) y viruta con cáscara de arroz (últimos 6).

4.2 Técnica de Lavaje Broncoalveolar (BAL)

Inicialmente se realizó la sedación del animal utilizando xilacina 10% (1mg/kg de peso vivo, endovenoso) y sujeción mediante mordaza. Previo a la introducción de la sonda, se higienizó los ollares con clorhexidina (0,045 g/L). Para el lavado se utilizó una sonda broncoalveolar de 300 cm de largo, 10 mm de diámetro externo y 2,2 mm de diámetro interno (BAL 300, MILA, USA) previamente desinfectada en solución de clorhexidina (Figura 4). A continuación, se introdujo la sonda flexible a través del ollar, por el meato nasal ventral, hacia la tráquea y se avanzó suavemente hasta que hizo tope (bronqueo más distal del lóbulo caudal). Simultáneamente, se aplicó bolos de lidocaína al 2% (20mg/mL) con un volumen de 10 mL para abolir el reflejo tusígeno durante la maniobra. Una vez que se alcanzó el tope, se insufló el balón para fijar la sonda con 5 a 10 mL de aire y se procedió a tomar las muestras. Para ello, se introdujo 300 mL solución fisiológica estéril a 37 °C en alícuotas con jeringas de 60 mL y posteriormente se recuperó el líquido del lavaje broncoalveolar (Figura 5), según protocolo adaptado de Frezza (2017). Los procedimientos realizados cuentan con la autorización del comité de ética protocolo No 1101 CEUA, Fvet.

4.3 Valoración del fluido broncoalveolar

Se valoró el aspecto macroscópico de la muestra como el color, turbidez y presencia de flóculos, los cuales fueron categorizados según categorización de Frezza (2017).

4.4 Análisis citológico del BAL

Las muestras fueron todas procesadas en las primeras 6 horas de su colecta en tubos falcon 50 mL estériles. Se comenzó por centrifugar todo el volumen recuperado del BAL por animal a 1000 rpm (70 g) por 10 minutos a 21 °C. Se retiró el sobrenadante de cada tubo y se hizo un pool de todos los tubos del mismo individuo con sus respectivos pellets. Posteriormente, se repitió la centrifugación y se concentró en un único pellet para la preparación de un extendido y su tinción con May Grünwald–Giemsa (MGG). Para la cuantificación del perfil citológico de los extendidos se realizó el recuento de 300 células consecutivas como mínimo mediante la visualización de varios campos por extendido, para ello se utilizó el objetivo de inmersión con una magnificación de 100X (Figura 6). Las células se identificaron como: macrófagos inactivos, macrófagos activados, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y hemosiderófilos, adaptado a la clasificación descrita por Frezza (2017).

4.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados de manera descriptiva y los resultados expresados en gráficos y cuadros. Para el análisis fue utilizado el software Graph Pad.

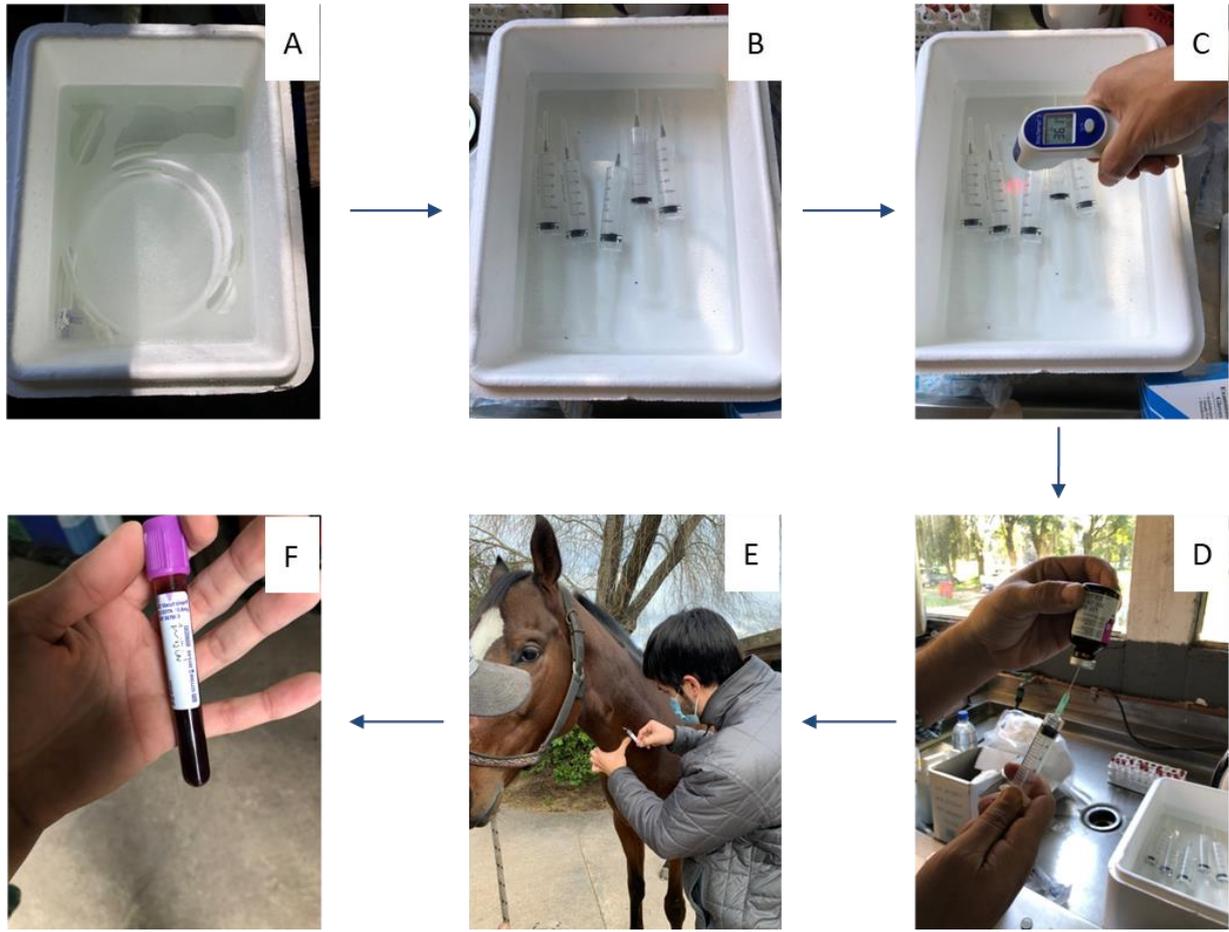


Figura 4. Preparación del animal y material para realizar el BAL. (A) Sonda en solución de clorhexidina. (B) Jeringas de 60 mL cargadas con solución fisiológica estéril. (C) Chequeo de temperatura. (D) Protocolo anestésico. (E) Extracción de sangre e inyección de xilacina (10%). (F) Muestra de sangre para hemograma en tubo con EDTA.



Figura 5. Esquematización del BAL en equinos. (A) Limpieza de ollares. (B) Introducción de la sonda BAL 300. (C) Preparación bolo lidocaína 2%. (D) Instilación de solución fisiológica estéril en jeringa de 60 mL. (E) Recuperación líquido instilado. (F) Valoración macroscópica del líquido recuperado.

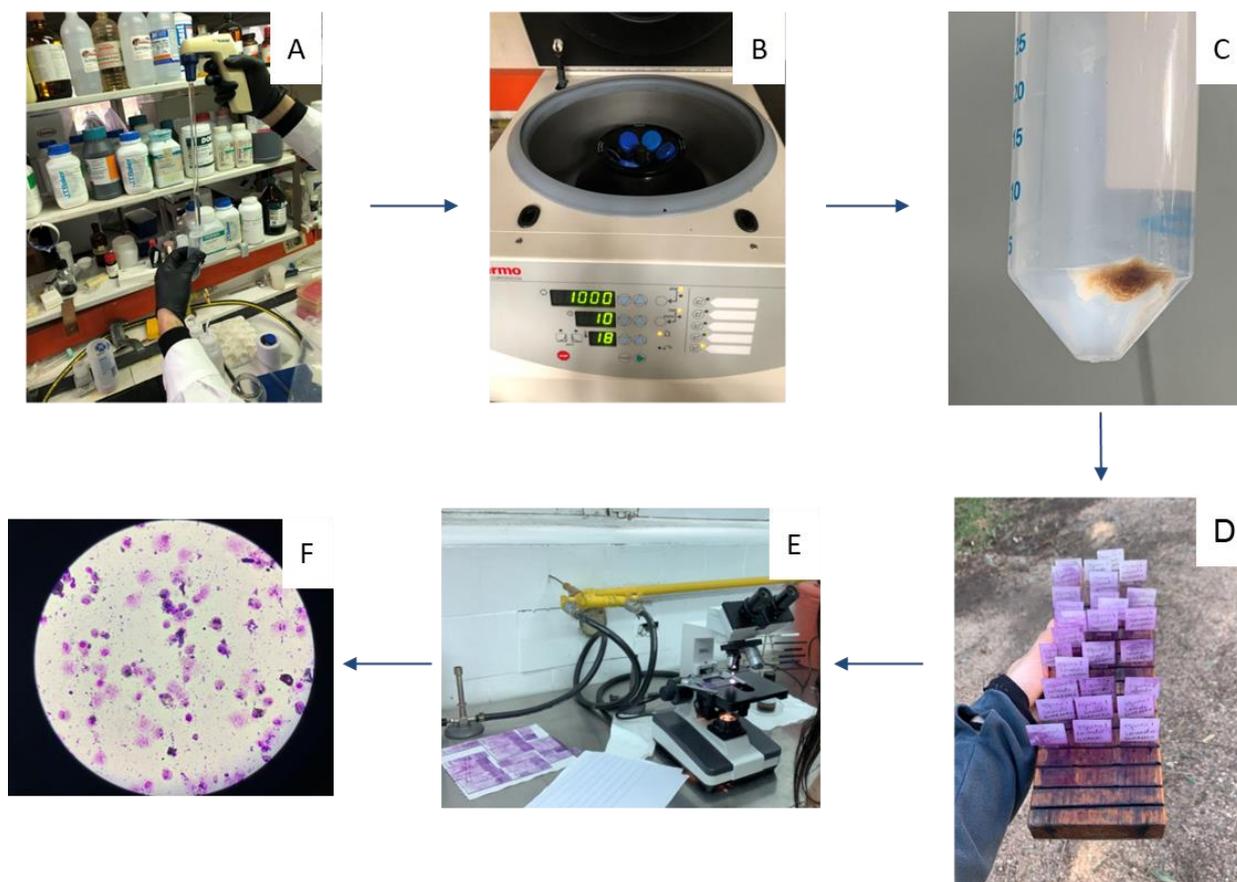


Figura 6. Esquematización del procesamiento de muestras para citología. (A) Retiro de sobrenadante y resuspensión de pellet. (B) Centrifugación de muestras. (C) Pellet final. (D) Láminas de las muestras. (E) Visualización y conteo de láminas en microscopio (100x). (F) Imagen microscópica de preparado citológico.

5. RESULTADOS

5.1 Muestreo de BAL

El volumen recuperado de cada lavaje en promedio fue del 85% (225/300mL). Los resultados del hemograma presentaron valores normales en la mayoría de los equinos a excepción de tres animales (Nº 5, 9 y 11), que presentaron monocitosis, leucocitosis y neutrofilia, y neutrofilia respectivamente.

5.2 Valoración del fluido broncoalveolar

Todas las muestras presentaron surfactante y ninguna de ellas presentó larvas. Dos de las muestras (n 4, n 7) se observaron con tono rojizo y turbidez moderada, mientras que el resto exhibió una tonalidad clara con escasa turbidez.

5.3 Análisis citológico del BAL

En el análisis citológico se pudo observar que el rango de macrófagos totales fue de 34,7% a 85%, macrófagos activados 14,6% a 71%, Linfocitos 6,2% a 60,1%, Neutrófilos 0% a 1,9%, Mastocitos 0% a 5,4%, Eosinófilos 0% a 9,4% y Hemosiderófagos 0% a 16,2% (cuadro 1). En cuanto a los animales que presentaron un hemograma alterado, en el BAL se observaron rangos anormales, el animal nº 5 presentó monocitosis al hemograma y linfocitosis al BAL, el animal nº 9 mostró leucocitosis con neutrofilia en el hemograma y en el BAL presentó un aumento en la proporción de macrófagos. Por último, el animal nº 11 presentó neutrofilia en el hemograma y en el BAL presencia abundante de glóbulos rojos.

Cuadro 1. Resultado de análisis del BAL y controles de rutina individual

Animal	Análisis citológico del BAL							Perfil I. hemograma
	M. totales (%)	M. activados (%)	Linfocitos (%)	Neutrófilos (%)	Mastocitos (%)	Eosinófilos (%)	Hemosiderófagos (%)	
1	52,0	38,3	34,0	0,3	0,3	0	13,3	Normal
2	38,9	23,3	60,1	0,3	0,7	0	0	Normal
3	42,1	30,1	55,2	0,5	1,6	0,3	0,3	Normal
4	46,1	33,4	30,2	1,9	5,4	0	16,2	Normal
5	56,8	17,8	40,5	0,58	1,6	0	0	Anormal
6	52,4	14,6	45,1	0	1,9	0	0,2	Normal
7	66,3	57,7	20,9	0,3	1,3	9,4	1,8	Normal
8	51,1	35,8	47,2	0	0,8	0	0,5	Normal
9	85,0	71,0	14,6	0	0	0,2	0	Anormal
10	75,3	61,7	20,4	0,2	1,1	2,6	0	Normal
11	34,7	30,8	6,2	0	0,2	0,2	0	Anormal
12	81,1	57,8	18,2	0	0,6	0	0	Normal

Cuadro 2. Análisis citológico del BAL grupal

Tipo celular	Resultado	
	Rango (%)	Mediana (%)
Macrófagos	34,7–85,0	52,2
M. Activados	14,6–71,0	34,6
Linfocitos	6,2–60,1	32,1
Neutrófilos	0–1,9	0,25
Mastocitos	0–5,4	0,95
Eosinófilos	0–9,4	0
Hemosiderófagos	0–16,2	0,1
Glb. Rojos	0–58,4	0

M. activado: macrófago activado M. totales: Macrófagos totales; M. activados: Macrófagos activados; Perfil I. hemograma: Perfil leucocitario hemograma (valores de referencia de la Universidad de Oregón)

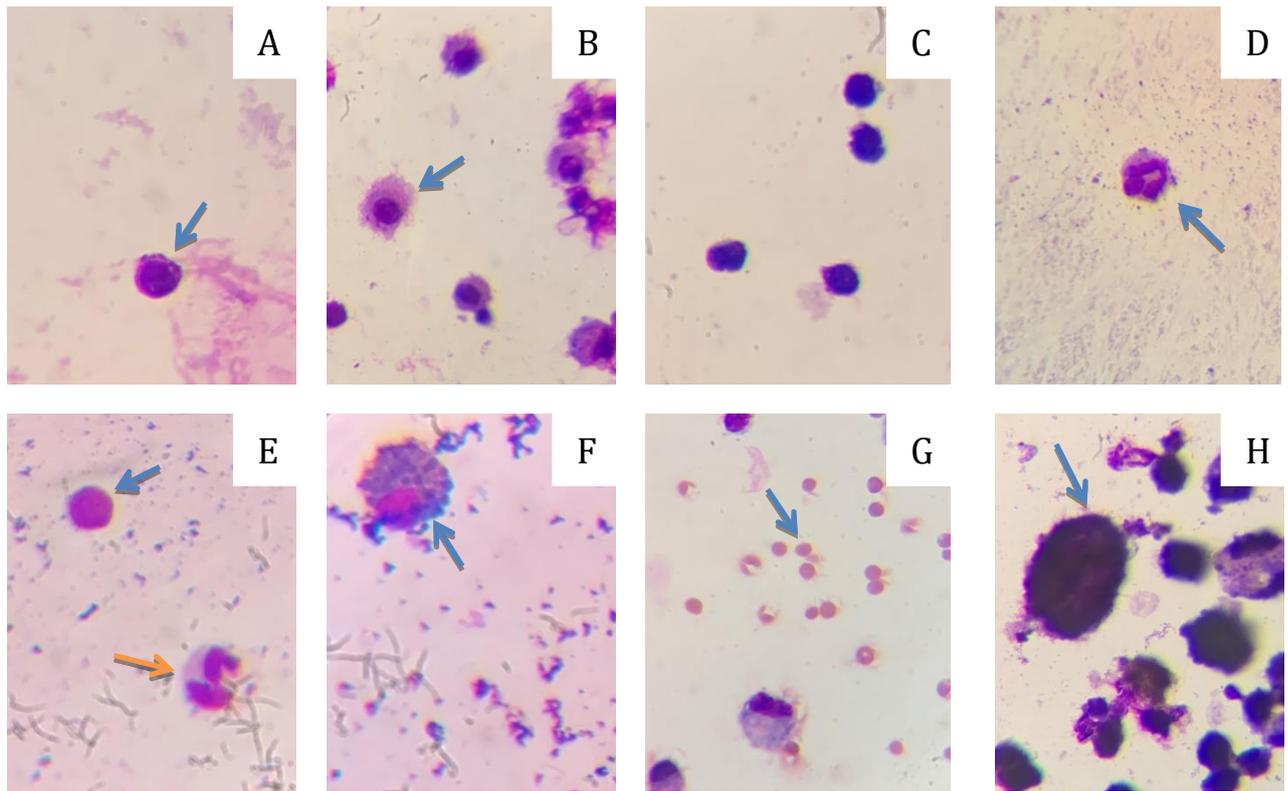


Figura 7. Citología celular. (A) Macrófago no activado en el BAL. (B) Macrófago activado en el BAL. (C) Linfocito en el BAL. (D) Neutrófilo en el BAL. (E) Flecha celeste Mastocito, flecha naranja Neutrófilo en el BAL. (F) Eosinófilo en el BAL. (G) Glóbulos rojos en el BAL. (H) Hemosiderófagos en el BAL. Tinción utilizada fue May Grünwald–Giemsa (MGG) y las imágenes magnificadas 100x.

6. DISCUSIÓN

Como aporte significativo del presente trabajo se pudo describir por primera vez en Uruguay el análisis citológico a través del BAL, y valorarla como técnica complementaria para el diagnóstico de patologías respiratorias con asiento en las vías aéreas inferiores. A pesar de que esta técnica es usada con frecuencia en otros países, está poco difundida en Uruguay y los países vecinos como Argentina y Brasil. Sin embargo, en América del Norte desde los 1980's el BAL fue ganando popularidad para la colecta de secreciones respiratorias ya que se considera que se recupera una muestra representativa de las vías aéreas inferiores (Hewson y Viel 2002). En Canadá se usa comúnmente la evaluación citológica del fluido mediante el BAL en clínica y en investigación para el monitoreo y diagnóstico de enfermedades difusas de las vías aéreas inferiores (Jean, Vrins, Beauchamp y Lavoie 2011).

El volumen recuperado de cada lavaje fue satisfactorio y presentó mínima diferencia en cuanto al porcentaje recuperado en cada equino. Resulta interesante considerar que el volumen utilizado fue de 300 mL, ya que en la literatura se recomienda entre 250 y 500 mL siendo el rango muy amplio. Recientemente se ha demostrado que la utilización de mayor cantidad de líquido instilado (500 mL) puede alterar los porcentajes de neutrófilos, obteniendo una menor cantidad de los mismos. Esto puede influenciar la confirmación citológica de enfermedades como el asma equino que su diagnóstico final es confirmado por el examen citológico del BAL donde se encuentra aumentado las proporciones de neutrófilos y/o mastocitos y/o eosinófilos. A su vez se ha demostrado recientemente que muestras simultáneas de ambos/pulmones difieren, encontrándose porcentajes superiores de neutrófilos en el derecho comparado con el izquierdo (Orard et al., 2016). Asimismo, Orard y col. sostienen que para la confirmación citológica de inflamación de las vías aéreas es suficiente con la toma de muestra de un solo pulmón, mientras que el muestreo de ambos pulmones sería necesario para clasificar al caballo como "control". Nos lleva a afirmar que es imprescindible la estandarización de la técnica del BAL para que no haya variaciones importantes en los resultados.

Por otro lado, ninguno de los animales presentó indocilidad y toleraron correctamente el procedimiento, tampoco hubo complicaciones a causa de esta técnica y no presentaron síntomas de infección pulmonar. A diferencia de la mayoría de la bibliografía consultada, nosotros decidimos utilizar Xilacina (10%) para la sedación de los animales, contrariamente a la utilizada por el resto: detomidina combinado con butorfanol por no contar con ninguna de las drogas en el mercado nacional.

A pesar del número reducido de equinos, se pudo observar que el aspecto macroscópico de las muestras obtenidas presentaba características normales de tonalidad clara, escasa turbidez y presencia de surfactante como se describe en la literatura (Lessa et al., 2005). Contrariamente, tres de las muestras presentaron color rojizo y mayor turbidez, indicando la posible presencia de glóbulos rojos correspondiente a una posible hemorragia aguda o de hemosiderófagos cuando la hemorragia es crónica (Cian et al., 2015).

Se contaron 300 células consecutivas como en la mayoría de la bibliografía consultada (Hermange, Le Corre, Bizon, Richard, Courouc e 2019; Hostetter et al. 2017; Orard et al. 2016 y Rossi et al. 2018). Otros autores realizaron el conteo de 400 o incluso 500 células consecutivas, pero no se encontraron grandes diferencias

en los resultados relativos en porcentaje (Cullimore, Secombe, Lester y Robertson, 2018 y Hansen et al., 2018). Esta diferencia para el conteo se debe a que no existe un criterio de referencia internacional estandarizado que defina un número. Se podría proponer realizar una investigación cuyo objetivo sea definir un total de celular consecutivas para el recuento en concreto o definir si existe correlación entre número y porcentaje de células observadas.

Sería esperable obtener en un caballo normal los siguientes resultados de BAL: \leq 5% neutrófilos, \leq 2% mastocitos, $<$ 1% eosinófilos; macrófagos y linfocitos entre 20% y 60% (Secombe, Lester, Robertson y Cullimore, 2015). Cuando comparamos los resultados del análisis citológico, podemos observar que al igual que en la literatura, los macrófagos alveolares fueron los que se encontraron en mayor proporción. Así mismo, cuatro de los valores obtenidos de dichas células, superaron el límite superior de referencia de las bibliografías consultadas (Cian et al., 2015; Hewson y Arroyo, 2015; Hewson y Viel, 2002; Lessa et al., 2005 y Tee et al., 2012). Un aumento en el número de macrófagos se relaciona con la tos crónica en equinos pura sangre (Michelotto, Lessa, da Silva, Gawlowski y Fernandes, 2013). Igualmente, a pesar de no tener valores de corte de referencia para los macrófagos activados, tomamos en cuenta lo descrito en la tesis de Frezza (2017) y fueron incluidos en nuestro conteo final. Al realizar la diferencia de los macrófagos, se puede observar que la mayoría eran activados.

Los mastocitos se encontraron presentes en todas las muestras, con resultados dentro del valor de los reportes internacionales, encontrando solamente uno por encima. Contrariamente los eosinófilos estuvieron ausentes en la mayoría de las muestras o en una mínima proporción a excepción de dos animales donde los mismos superaron ampliamente el valor de referencia. Este aumento puede estar asociado a hipersensibilidad y se puede observar en bronquitis alérgicas e infecciones parasitarias, en esta última el aumento sería más severo y prolongado en el tiempo (Cian et al., 2015). Sin embargo, en nuestro trabajo no determinamos la evaluación de la cinética citológica del BAL a lo largo del tiempo, pero sería interesante realizar en aquellos caballos con celularidad alterada un seguimiento para acompañar como herramienta diagnóstica al veterinario tratante.

Al comparar los linfocitos, solamente dos de los animales obtuvieron valores por encima de la referencia. Un alto porcentaje de linfocitos acompañado de un aumento en los neutrófilos puede relacionarse con una infección respiratoria viral (Frezza, 2017). Con respecto a los neutrófilos todos los resultados fueron dentro del rango normal. Sin embargo, Hostteter y col. reportan una media de 4% a los 12 meses, valor por encima al obtenido en este trabajo. Se puede deber a que los animales utilizados en esta tesis fueron todos mayores a 12 meses utilizando caballos de hasta 5 años. Cabe mencionar que Hostteter y col (2017), también observaron un descenso en el porcentaje de neutrófilos a medida que avanza la edad. Por lo que en potrillos es esperable encontrar un porcentaje mayor de neutrófilos que en adultos.

Se describe que en animales estabulados se puede observar un incremento en el recuento celular de neutrófilos, eosinófilos y mastocitos, asociado a una inflamación respiratoria leve, en animales sin signos de patología en vías aéreas inferiores. De prolongarse en el tiempo, esta inflamación leve puede llevar al desarrollo de afecciones respiratorias permanentes como el asma equino (Frezza, 2017). En nuestro trabajo no fue considerado el factor climático como variante debido a que fueron tomadas el mismo año (agosto-septiembre), pero Hansen y col (2018)

demuestran cómo los cambios estacionales afectan la concentración de partículas de polvo y alérgenos en las caballerizas modificando la citología de las vías respiratorias en caballos sanos en estabulación. Condiciones climáticas de invierno con bajas temperaturas, menor cantidad de horas/sol y un porcentaje de humedad alto fue asociado con porcentajes mayores de neutrófilos en BAL en caballos clínicamente sanos. Como en Uruguay, en el hemisferio norte, los caballos se encuentran la mayor parte del año estabulados donde el tiempo de pastoreo se reduce en los meses de invierno por el clima frío y los días lluviosos por lo que la inhalación de alérgenos y partículas ambientales especialmente del forraje alimentado se ve aumentado siendo un factor causante de la inducción del asma equino leve y severo (Hansen et al., 2018).

Otro factor a considerar en una futura investigación, que no fue tomado en cuenta en este trabajo, es la edad. La totalidad de los animales muestreados en este trabajo se encontraban dentro del rango de 2-5 años. Hostetter y col (2017) identificaron un aumento progresivo de linfocitos y una disminución de macrófagos en caballos a medida que aumenta la edad en la citología del BAL. La causa de esta diferencia relacionada con la edad todavía es desconocida por lo que es necesario profundizar en la investigación. Estos hallazgos demuestran la importancia de la edad como variable para la interpretación del BAL equino (Hostetter et al., 2017). Una vez más, es muy importante la estandarización de la técnica a nivel local.

Otra variable a tener en cuenta es el efecto tiempo y temperatura sobre las muestras obtenidas. En nuestro caso, todas las muestras fueron procesadas dentro de las 6 horas luego de obtenidas, por lo que no demostraron crecimiento bacteriano ni cambios en la morfología de las células. Sin embargo, Pickles y col demostraron que la viabilidad de las células se ve reducida por 24 hrs a 4 °C, 8 hrs a 18 °C y 4 hrs a 38 °C, mostrando una disminución progresiva más rápida con el aumento de la temperatura. También expusieron que en las muestras sometidas a altas temperaturas se observan un crecimiento bacteriano significativo y deterioro morfológico a las 8 hrs (Pickles, Pirie, Rhind, Dixon y McGorum, 2002).

7. CONCLUSIÓN

El desarrollo de esta tesis permitió estandarizar la colecta de fluido pulmonar mediante la técnica de BAL. Nos permitió constatar que es una técnica útil en la clínica equina que puede ser realizada a campo, es segura para el animal y el técnico. Como limitantes, cabe destacar que en el mercado nacional no hay sondas para BAL, siendo una desventaja para su utilización de rutina. Otro inconveniente es la falta de disponibilidad de algunos fármacos utilizados para la neuroleptoanalgesia recomendada en literatura internacional, sin embargo, esto no fue un obstáculo en el presente trabajo. Por otro lado, nos entrenamos en el reconocimiento citológico con lo que se llegó a una identificación de los tipos celulares presentes con claridad. Al realizar el análisis de dichas células obtenidas con la técnica BAL se definieron valores estándar para la población estudiada por primera vez a nivel nacional. Cabe aclarar que esta técnica no reemplaza el examen clínico del animal y siempre se debería evaluar en conjunto.

8. BIBLIOGRAFÍA

Barakzai S. (2007). *Handbook of Equine Respiratory Endoscopy*. Elsevier.

Barton M. (2008). *Inflammatory airway disease: When, how to perform a bronchoalveolar lavage*. DVM Newsmagazine

Bullone M., Lavoie J. P. (2017). *Science-in-brief: Equine asthma diagnosis: Beyond bronchoalveolar lavage cytology*. Equine Veterinary Journal.

Cian F., Monti P., Durham A. (2015). *Citology of the lower respiratory tract in the horses: An update review*. Equine Veterinary Education.

Couëtil L.L, Cardwell J.M, Gerber V., Lavoie J.P, Léguillette R., Richard E.A. (2016). *Inflammatory Airway Disease of Horses- Revised Consensus Statement*. Journal of Veterinary Internal Medicine.

Cullimore, A. M., Secombe, C. J., Lester, G. D., & Robertson, I. D. (2018). *Bronchoalveolar lavage fluid cytology and airway hyper-reactivity in clinically normal horses*. Australian Veterinary Journal, 96(8), 291–296.

Ferrari A. (2012). *Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay*. Informe Final. Uruguay XXI, Montevideo.

Frezza, M. (2017). *Citología comparada del líquido obtenido por lavaje broncoalveolar de equinos con y sin signología de enfermedad respiratoria baja, ingresados al Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (Trabajo final)*. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Gómez R. (2012). *Uso del lavado broncoalveolar y aspirado transtraqueal en campo. Indicaciones y valor diagnóstico en problemas de vías respiratorias bajas*. I Congreso Solidario de Clínica Equina. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. Madrid

Hermange, T., le Corre, S., Bizon, C., Richard, E. A., & Couroucé, A. (2019). *Bronchoalveolar lavage fluid from both lungs in horses: Diagnostic reliability of cytology from pooled samples*. Veterinary Journal, 244, 28–33.

Hansen, S., Honoré, M. L., Riihimaki, M., Pringle, J., Ammentorp, A. H., & Fjeldborg, J. (2018). *Seasonal Variation in Tracheal Mucous and Bronchoalveolar Lavage Cytology for Adult Clinically Healthy Stabled Horses*. Journal of Equine Veterinary Science, 71, 1–5.

Hawkins J., Couëtil L. (2013). *Respiratory Diseases of the Horse*. Manson Publishing/ The veterinary press. Chapter 4

Hewson J., Arroyo L. G. (2015) *Respiratory disease: diagnostic approaches in the horse*. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.

Hewson J., Viel L. (2002). *Sampling, microbiology and cytology of the respiratory tract*. Lekeux P. Equine Respiratory Diseases. Ithaca: International Veterinary Information Service.

Hodgson J.L. (2006). *Collection and interpretation of tracheal wash and bronchoalveolar lavage for diagnosis of infectious and non-infectious lower airway disorders*. Proceedings World Equine Veterinary Association. p. 71-77

Hodgson J., Hodgson D. (2002). *Inflammatory airway disease*. Lekeux P. Equine Respiratory Diseases. Ithaca: International Veterinary Information Service.

Hoffman A. (2008). *Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation*. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.

Hoffman A. (1999). *Bronchoalveolar lavage technique and cytologic diagnosis of small airway inflammatory disease*. Equine Veterinary Education. Tufts University School of Veterinary Medicine.

Hostetter, S. J., Clark, S. K., Gilbertie, J. M., Wiechert, S. A., Jones, D. E., & Sponseller, B. A. (2017). *Age-related variation in the cellular composition of equine bronchoalveolar lavage fluid*. Veterinary Clinical Pathology, 46(2), 344–353.

Jean D., Vrins A., Beauchamp G., Lavoie J.P. (2011). *Evaluation of variations in Bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction*. American Journal of Veterinary Research.

Lessa D., Mori E., Viana E., Santos O., Moreira J., Fernandes W. (2005). *Lavado Broncoalveolar em equinos: Revisão de literatura Parte 1: Técnica de colheita*.

Loving N. (2006). *Todos los sistemas del caballo: Tratado Completo De La Salud Y Cuidados Veterinarios Equinos*. LTC. P 227-287

Lucas R. (2012). *Uso del lavado broncoalveolar y aspirado transtraqueal en campo. Indicaciones y valor diagnóstico en problemas de vías respiratorias bajas*. I Congreso Solidario de Clínica Equina.

McGorum B., Dixon P., Robinson E., Schumacher J. (2007) *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Saunders Elsevier.

McGorum B.C, Dixon P.M. (1994). *The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology*. Equine Veterinary Education. 203-209.

McKane S. A., Canfield P. J., Rose R. J. (1993). *Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of Thoroughbred racehorses in training*. Australian Veterinary Journal. 70(11): 401-404.

Michelotto Jr, P.V., Lessa D.A.B, da Silva K.M., Gawlowski K.R.S, Fernandes W.R. (2013). *The airway fluid analysis-methods and interpretation for the athletic horse*. Revista Brasileira de Ciência Veterinária.

Morán G., Araya O., Folch H. (2006). *Obstrucción recurrente de las vías aéreas en el caballo*. Archivos de Medicina Veterinaria.

Orard, M. Depecker, M. Hue, E. Pitel, P. Couroucé-Malblanc, A. Richard, E. (2016). *Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses*. The Veterinary Journal, 207, 193-195.

Pickles, K., Pirie, R. S., Rhind, S., Dixon, P. M., & McGorum, B. C. (2002). *Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 3: The effect of time, temperature and fixatives*. Equine Veterinary Journal, 34(3), 297–301.

Reed S., Bayly W., Sellon D. (2004) *Medicina interna equina*. 2da ed. Tomo 1. Ed Intermédica

Rossi, H. (2020). *Equine lower airway inflammation- Insights into asthma, diagnostics, and anesthesia* (Academic dissertation). Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.

Rossi, H., Virtala, A. M., Raekallio, M., Rahkonen, E., Rajamäki, M. M., & Mykkänen, A. (2018). *Comparison of tracheal wash and bronchoalveolar lavage cytology in 154 horses with and without respiratory signs in a referral hospital over 2009-2015*. Frontiers in Veterinary Science, 5(MAR).

Rush B., Mair T. (2004). *Equine respiratory diseases*. Blackwell Science Ltd.

Secombe, C. J., Lester, G. D., Robertson, I. D., & Cullimore, A. M. (2015). *Retrospective survey of bronchoalveolar lavage fluid cytology in Western Australian horses presented for evaluation of the respiratory tract: Effect of season on relative cell percentages*. Australian Veterinary Journal, 93(5), 152–156.

Tee, S. Y., Dart, A. J., MacDonald, M. H., Perkins, N. R., Horadagoda, N., & Jeffcott, L. B. (2012). *Effects of collecting serial tracheal aspirate and bronchoalveolar lavage samples on the cytological findings of subsequent fluid samples in healthy Standardbred horses*. Australian Veterinary Journal, 90(7), 247–251.