



Universidad de Buenos Aires



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires

*Evaluación Citológica Comparativa De Lavajes
Traqueobronquiales Realizados En Caballos De Salto
Sometidos A Diferentes Exigencias Deportivas*

José Luis Flórez Bravo

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Buenos Aires - Argentina

2013



Universidad de Buenos Aires



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires

*Evaluación Citológica Comparativa De Lavajes
Traqueobronquiales Realizados En Caballos De Salto
Sometidos A Diferentes Exigencias Deportivas*

José Luis Flórez Bravo

**TESINA PARA ASPIRAR AL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN MEDICINA DEPORTIVA DEL EQUINO**

Director: MV. Hugo Scipioni

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
*Buenos Aires - Argentina***

2013

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme fuerza y sabiduría en el emprendimiento de mi proyecto de vida.

A mis padres y hermanos por su amor y respaldo incondicional.

Al Dr. José Alberto García Liñeiro, por sus valiosas enseñanzas que han sido de gran ayuda durante el desarrollo de mis estudios de postgrado en la Universidad de Buenos Aires.

A la sección veterinaria del colegio militar de la nación, en especial mención al Dr. Luis Galo por su colaboración incondicional durante este proceso.

Al todo el personal del laboratorio del hospital escuela, de la facultad de medicina veterinaria de la Universidad de Buenos Aires, en especial mención a la Dra. Adriana Duchene por su incondicional apoyo en esta experiencia.

Al Dr. Hugo Scipioni por su acompañamiento y colaboración durante la carrera de especialización.

RESUMEN

Se analizó la citología de las muestras obtenidas por lavaje traqueobronquial en 38 equinos sanos que fueron distribuidos en dos grupos de 19 individuos. El grupo I: animales que se encontraban sometidos a una actividad deportiva constante. El grupo II: animales que no se encontraban en actividad deportiva. Los diferentes tipos celulares estudiados como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos no mostraron diferencias significativas en ninguno de grupos de caballos estudiados, lo que sugiere que el ejercicio no impactó de manera significativa el porcentaje de células inflamatorias. La técnica del lavaje traqueobronquial demostró ser eficiente en el estudio de la dinámica celular inflamatoria a nivel pulmonar.

PALABRAS CLAVE: Equinos, Lavaje Traqueobronquial, Citología.

ABSTRACT

This study analyzed the cytology of tracheobronchial washes samples obtained in 38 healthy horses that were divided in two groups of 19 individuals. Group I: animals were subjected to a constant sporting activity. Group II: animals that were not in sporting activity. The different cell types studied as macrophages, neutrophils, eosinophils and mast cells showed no significant differences in any horse studied groups, suggesting that exercise did not impact significantly the percentage of inflammatory cells. Tracheobronchial wash technique proved to be efficient in the study of dynamics inflammatory cell in the lung.

KEYWORDS: Equines, Tracheobronchial wash, Cytology.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
LISTA DE ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
1. ANATOMOFISIOLOGÍA DEL SISTEMA RESPIRATORIO EQUINO	12
2. ENFERMEDAD RESPIRATORIA EQUINA	16
2.1. Obstrucción Recurrente De Las Vías Aéreas Y Enfermedad Pulmonar obstructiva asociada con pastoreo de verano	17
2.2. Enfermedad Aérea Inflamatoria (IAD)	19
2.3. Hemorragia Pulmonar Inducida Por El Ejercicio (EIPH)	23
3. DIAGNÓSTICO EN LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA	26
3.1. Exámenes Complementarios	27
3.2. Colecta Y Análisis De Las Secreciones Respiratorias	27
3.3. Lavaje Traqueobronquial (TW)	28
3.4. Procesamiento De Muestras	31
3.4.1. Estudio Citológico	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	37

4.1. Toma Y Remisión De Las Muestras	37
4.2. Procesamiento De Las Muestras	42
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y RESULTADOS	42
6. DISCUSIÓN	53
7. CONCLUSIÓN	55
8. BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE TABLAS, GRÁFICOS E IMÁGENES

<i>Figura 1. Sistema de clearance mucociliar</i>	14
<i>Tabla 1. Agentes que contribuyen a la respuesta inflamatoria en (RAO)</i>	18
<i>Tabla 2. Factores etiológicos asociados a la Enfermedad aérea inflamatoria (IAD)</i>	24
<i>Tabla 3. Factores asociados a hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio</i>	25
<i>Figura 3. Esquematización del lavaje traqueobronquial por vía percutánea en el equino</i>	31
<i>Figura 4. Kit de tinción T15 (Diff Quick)</i>	35
<i>Figura 5. Elementos para la realización del lavaje traqueobronquial</i>	38
<i>Figura 6. Realización de lavaje traqueobronquial por vía percutánea</i>	39-40-41
<i>Tabla 4. Porcentajes de cada tipo celular</i>	43
<i>Tabla 5. Correlaciones entre las presencias de los tipos celulares</i>	44
<i>Tabla 6. Cuadro de Análisis de la Varianza (Lawley-Hotelling)</i>	45
<i>Grafico 1. Porcentaje de cada tipo celular por grupo</i>	46
<i>Grafico 2. Vectores porcentuales medios por grupo</i>	46
<i>Grafico 3. Distribuciones porcentuales</i>	47
<i>Figura 7. Microfotografía digital: neutrófilos y linfocitos</i>	48
<i>Figura 8. Microfotografía digital: eosinófilos</i>	49
<i>Figura 9. Microfotografía digital: macrófago con material fagocitado</i>	50
<i>Figura 10. Microfotografía digital: macrófagos</i>	51
<i>Figura 11. Microfotografía digital: célula gigante, linfocitos, macrófagos y neutrófilo</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- * **BAL:** Lavaje broncoalveolar.
- * **BALT:** Tejido linfoide asociado a los Bronquios.
- * **EDTA:** Ácido Tetraacético Etilenodiamina.
- * **Hg:** Mercurio.
- * **EIPH:** Hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio.
- * **IAD:** Enfermedad aérea inflamatoria.
- * **Ig:** Inmunoglobulina.
- * **IgM:** Inmunoglobulina M.
- * **IgG:** Inmunoglobulina G.
- * **IV:** Vía endovenosa.
- * **Kg:** Quilogramo.
- * **RAO:** Obstrucción recurrente de las vías aéreas.
- * **SPAOPD:** Enfermedad pulmonar obstructiva asociada con Pastoreo de verano.
- * **TW:** Lavaje traqueobronquial.
- * **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.
- * **µl:** Microlitro.
- * **ACVIM:** Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria.
- * **%:** Porcentaje.

INTRODUCCIÓN

A través de la historia se ha podido observar que las alteraciones respiratorias ocupan un papel significativo en la salud y desempeño en los caballos de todas las edades y funciones deportivas (Viel & Hewson, 2001), (Santos et al. 2007). Este tipo de enfermedades, constituyen un desafío permanente para los profesionales del área, debido a que existen dificultades en el establecimiento de un diagnóstico preciso, mediante la utilización de los medios semiológicos tradicionales (Beech, 1991). Es así como han surgido diversas herramientas diagnosticas que hoy día nos permiten comprender de mejor forma la dinámica celular y las patologías de este sistema.

Una de las ayudas diagnosticas implementadas en la actualidad, son los estudios citológicos; Estos últimos, nos pueden suministrar una valiosa información sobre la naturaleza de las alteraciones que comprometen al sistema respiratorio. Entre las técnicas de obtención de muestras destinadas a citología, se destaca el lavaje traqueobronquial; técnica muy simple y confiable, que se caracteriza por prescindir de equipamientos sofisticados; lo que la convierte en una herramienta muy útil para entender cualquier tipo de alteración que este aconteciendo en las vías aéreas y en los pulmones (Beech, 1975).

Por último, es importante destacar que si bien, ninguna herramienta debe substituir una detallada anamnesis y un examen clínico minucioso las técnicas de evaluación citológica de las vías aéreas, en el equino deportivo, deben ser tenidas en cuenta como parte de la rutina diaria en la clínica médica; ya que son de fundamental importancia en la interpretación de diversas patologías respiratorias y nos acercan a un diagnóstico certero. (Hodgson & Hodgson, 2007).

HIPÓTESIS

El ejercicio, en caballos de salto, provoca modificaciones citológicas de tipo inflamatorio a nivel de la tráquea y bronquios.

OBJETIVO GENERAL

Comparar las modificaciones que presenta la citología de los lavajes traqueobronquiales realizados a caballos de salto sometidos a diferentes exigencias deportivas en una misma época del año.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Determinar un porcentaje relativo para cada grupo celular encontrado en cada lavaje.

- * Cuantificar las células nucleadas totales expresadas en células por milímetro cubico en los lavajes realizados.

1. ANATOMOFISIOLOGÍA DEL SISTEMA RESPIRATORIO EQUINO

El aparato respiratorio tiene como funciones principales el transporte de oxígeno y la remoción de dióxido de carbono de la corriente sanguínea (Robinson & Furlow, 2007). El aire llega a los pulmones a través de las vías respiratorias que establecen la comunicación entre el ambiente y los alvéolos donde el intercambio gaseoso ocurre (Robinson & Furlow, 2007). Además del intercambio gaseoso, el sistema respiratorio es el responsable del metabolismo de algunos compuestos; de la termorregulación y además funciona como un reservorio de sangre gracias a una extensa red de vasos que componen el sistema de circulación pulmonar (Marlin & Vicent, 2007). El aparato respiratorio equino está dividido en dos porciones, el tracto respiratorio anterior (cavidad nasal, senos paranasales, faringe, laringe y tráquea) e o tracto respiratorio posterior (bronquios principales, bronquios segmentares, bronquíolos y alvéolos pulmonares) (Gonçalves, 2004). La tráquea equina es una estructura tubular flexible que se encuentra entre la faringe y la carina, está formada por cuatro capas (adventicia, musculocartilaginosa, submucosa y mucosa) y por 40 a 60 anillos fibrocartilagosos incompletos (Voss & Seahorn, 2004). A nivel de la carina, la tráquea se bifurca en los bronquios primarios (derecho e izquierdo), a partir de los cuales son formados los lóbulos craneal derecho, lóbulo accesorio, lóbulo caudal derecho y lóbulos craneal y caudal izquierdos, respectivamente (Voss & Seahorn, 2004).

El aparato respiratorio presenta una superficie muy extensa estando continuamente expuesto a microorganismos (inertes o patógenos) presentes en el aire inhalado o transportados por la circulación sanguínea (Horohov, 2004). La capacidad de entrar en el sistema respiratorio y tener acceso a los pulmones depende de la dimensión de las partículas y de la funcionalidad de los mecanismos

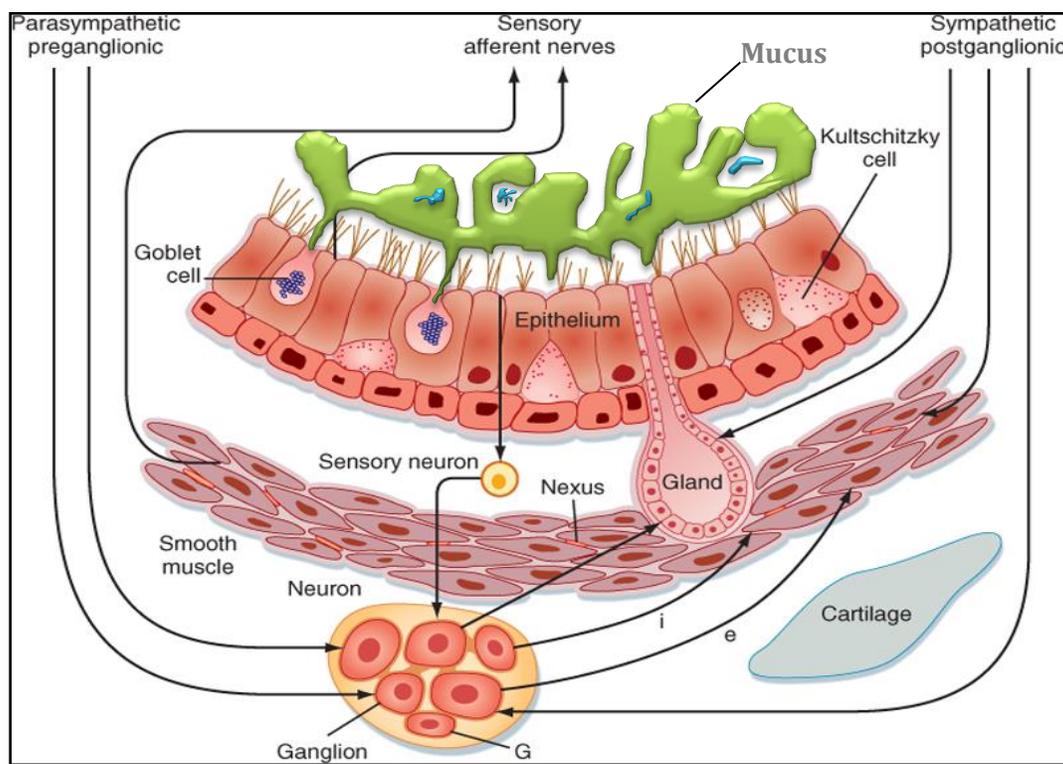
de defensa respiratorios (Horohov, 2004). De un modo general, las partículas con dimensiones superiores a 10 μm son retenidas en las fosas nasales, mientras que las partículas con dimensiones entre 2 a 10 μm son aprisionadas por el epitelio respiratorio ciliado (Junqueira & Carneiro, 2004). De este modo, solo las partículas con menos de 10 μm son capaces de acceder a las porciones más distales de las vías aéreas donde son eliminadas sin que haya necesidad de una respuesta inflamatoria o inmune en la ausencia de enfermedad respiratoria (Junqueira & Carneiro, 2004).

Los mecanismos de defensa del aparato respiratorio son complejos e incluyen barreras anatómicas, alfombra mucociliar, sistema inmunológico local (mucosa), tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT), macrófagos alveolares y el sistema inmunitario sistémico (Christley & Rush, 2007). Las alteraciones en cualquiera de estos mecanismos predispone al desarrollo de infecciones. La defensa de este sistema contra microorganismos patógenos es asegurada esencialmente a través de los mecanismos presentes en las vías aéreas (tracto respiratorio anterior y posterior) y en el espacio alveolar (Pilette, Ouadrhiri, Godding, Vaerman & Sibille, 2001). En las vías aéreas existe predominio de los mecanismos de defensa mecánicos que incluyen la deposición de microorganismos a nivel de la cavidad nasal y orofaringe donde son posteriormente eliminados a través de la tos, estornudo y del mecanismo de clearance mucociliar. El epitelio mucociliar es un mecanismo de defensa no específico, presente en la región de la faringe hasta los bronquiólos respiratorios siendo responsable de la remoción física de las partículas en las vías respiratorias (Davis, 2007). Esta alfombra está compuesta por una capa doble de muco, células secretoras y por células ciliadas (Davis, 2007). La capa de muco es un componente importante de la alfombra mucociliar, en la medida en que justo en este lugar, ocurre la captura, inhibición, destrucción y remodelación de las

partículas inhaladas a través del mecanismo de clearance mucociliar (Gerber & Robinson, 2007).

Las partículas inhaladas y los detritus presentes en el tracto respiratorio distal son atrapados por la capa superficial de muco, siendo transportados a la faringe donde son tragadas (Gerber & Robinson, 2007).

Figura 1. Sistema de clearance mucociliar. Adaptado de (Koeppen & Stanton, 2008).



Hay ciertos factores que pueden resultar en la alteración de la alfombra mucociliar, tales como la enfermedad viral respiratoria, inhalación de humo, amoníaco, deshidratación, entre otros (Mair & Rush, 2004).

La replicación del virus de la influenza, del herpes virus equino y la inhalación de humo culminan en la destrucción del epitelio respiratorio, la regeneración completa del epitelio se produce durante un período de aproximadamente 21 días

(Mair & Rush, 2004). Una alta concentración de amoníaco en la atmósfera deprime la motilidad ciliar y enlentece el mecanismo de clearance mucociliar; la deshidratación aumenta la viscosidad de la capa de moco e inhibe el movimiento ciliar y por lo tanto la efectividad de este mecanismo de defensa (Rush y Mair, 2004).

Por otro lado, la defensa del espacio alveolar está asegurada principalmente por la acción de los macrófagos alveolares y el BALT (Pilette et al., 2001). Las partículas depositadas en los alvéolos son fagocitadas y destruidas por los macrófagos alveolares; una vez fagocitadas son eliminadas de los pulmones a través del transporte del sistema mucociliar hasta la faringe o penetran en el epitelio respiratorio donde son eliminadas a través del sistema linfático (Davis, 2007). La función de los macrófagos alveolares se ve disminuida por el ejercicio intenso, el transporte y la infección viral respiratoria prolongada (Ainsworth & Cheetham, 2010). El BALT está compuesto por los nódulos presentes en la submucosa de los bronquios segmentarios y bronquiolos terminales, es el responsable de coordinar el mecanismo de defensa pulmonar antigénico-específico y participa en la inmunidad humoral y celular (Davis, 2007). Los linfocitos B presentes en el BALT producen toda clase de inmunoglobulinas (Ig), con la excepción de la IgM (Lunn, Soboll y Breathnach, 2007). La IgA predomina en el tracto respiratorio anterior e inhibe la adherencia de patógenos al epitelio respiratorio a través de un mecanismo llamado exclusión inmune, mientras que la IgG predomina en el tracto respiratorio posterior promoviendo la opsonización y la destrucción subsiguiente de los agentes inhalados (Lunn et al. 2007).

Los herpesvirus equinos, al realizar la replicación a nivel del BALT inducen necrosis de los linfonodos y por lo tanto se desencadena un estado de

inmunosupresión, aumentando la susceptibilidad a infecciones secundarias (Wood, Smith & Newton, 2007). Los neutrófilos y los linfocitos ejercen del mismo modo un papel importante en la defensa durante las infecciones del tracto respiratorio posterior (Ainsworth & Cheetham, 2010).

2. ENFERMEDAD RESPIRATORIA EQUINA

La enfermedad respiratoria sigue siendo un problema importante en la medicina equina y ha despertado el interés de muchos investigadores en todo el mundo (Allen & Franklin, 2007). En los caballos deportivos, las enfermedades respiratorias son la segunda causa más importante de disminución de la performance, interrupción del entrenamiento y la retirada prematura de las competiciones; siendo superada sólo por los trastornos musculoesqueléticos (Kusano, Hobo, Ode & Ishikawa, 2008). Las enfermedades respiratorias que involucran las vías respiratorias posteriores más comunes son: la enfermedad aérea inflamatoria (IAD), obstrucción recurrente de las vías aéreas (RAO), hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (EIPH) y la neumonía (Richard, Fortier, Lekeux & Van Erck, 2010). La infección del tracto respiratorio posterior es frecuentemente de etiología bacteriana aunque otros patógenos también pueden estar involucrados, incluyendo virus, hongos o parásitos (Burrell, Wood, Whitwell, Chanter, Mackintosh & Mumford, 1996); (Pusterla, Watson & Wilson, 2006).

Los signos clínicos varían según la naturaleza de la enfermedad (enfermedades infecciosas y no infecciosas) puede incluir intolerancia al ejercicio, tos, descarga nasal, fiebre, disnea, taquipnea, depresión, inapetencia, entre otros (Newton & Chanter, 2003).

2.1. Obstrucción Recurrente De Las Vías Aéreas Y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Asociada Con Pastoreo De Verano.

Robinson (2001) define a la obstrucción recurrente de las vías aéreas RAO como una enfermedad respiratoria obstructiva caracterizada por dificultad respiratoria con mejoría de los síntomas mediante el control de la concentración de polvo y alérgenos o mediante la administración de broncodilatadores. Enfermedad pulmonar obstructiva asociada al pastoreo de verano (SPAOPD) es una enfermedad respiratoria similar a la RAO, ambas son enfermedades respiratorias crónicas y están presentes sobre todo en el caballo adulto (mayores de 7 años) mantenidos en estabulación o a campo respectivamente (Costa, 2012).

La RAO y el SPAOPD pueden estar presentes en el mismo paciente, los caballos con RAO pueden desarrollar la segunda cuando son sometidos a pastoreo (Mair, 1996). El medio ambiente es un elemento importante en la fisiopatología de RAO y SPAOPD, sin embargo, el mecanismo por el cual se desencadena la respuesta inflamatoria en las vías respiratorias distales todavía necesita una mayor aclaración (Robinson, 2008; Ainsworth, 2010).

Anteriormente se pensaba que la RAO era el resultado de una respuesta inflamatoria antígenoespecífica (reacción de hipersensibilidad) contra la inhalación de polvos orgánicos presentes en el heno de mala calidad, hoy en día se reconoce que de igual modo podría ser causada por una respuesta inflamatoria no específica a agentes pro inflamatorios, como ácaros, endotoxinas, mohos (*Aspergillus fumigatus*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Faenia rectivirgula*) entre otros (Lavoie, 2007).

Tabla 1. Agentes que contribuyen a la respuesta inflamatoria en la obstrucción recurrente de las vías aéreas (RAO). Adaptado de (Lavoie, 2007).

Bacterias	Hongos	Gases tóxicos	Otros
endotoxinas	Alergenos	Amonio (NH ₄ ⁺)	Ácaros del forraje
Ácido lipoproteico	Glucanos	Sulfuro de hidrogeno (H ₂ S)	Detritus vegetales
Peptidoglicano	Proteasas	Metano (CH ₄)	Compuestos inorgánicos en el polvo
ADN bacteriano	Micotoxinas		
Proteasas			

Hoy en día no se tiene certeza si la RAO es un proceso infeccioso o no, sin embargo la enfermedad respiratoria causada por virus (por ejemplo, virus de la influenza) aumenta la predisposición al desarrollo de esta condición (Lavoie, 2007). Las bacterias aisladas en las secreciones traqueales de los caballos afectados son un reflejo de la colonización del tracto respiratorio distal, debido a la falla del mecanismo de clearance mucociliar (Ainsworth, 2010). La DPOAPV es causada por la inhalación de partículas presentes en el pasto, se cree que las neumotoxinas son la causa de la inflamación y obstrucción de las vías respiratorias posteriores (Lavoie, 2007). En ambos casos, la exposición al polvo dispara la afluencia de neutrófilos hacia las vías respiratorias más distales, la inflamación está acompañada por obstrucción de las vías respiratorias (broncoespasmo), la hipersecreción de moco y la remodelación de la pared de las vías respiratorias (Robinson, 2008). La remodelación del tejido respiratorio incluye una gran

variedad de eventos que en conjunto contribuyen a la reducción del diámetro de las vías respiratorias exacerbando el cuadro clínico, tales como hipertrofia o hiperplasia de las células musculares lisas, fibrosis peribronquial y la hiperplasia de las células epiteliales (Lavoie, 2007). El cuadro clínico varía en función del estadio de la enfermedad (Mazan & Tizard, 2012). Por lo tanto, en el período de remisión no se observan signos clínicos durante la fase de reposo, con la excepción a la intolerancia al ejercicio y tos (durante la alimentación) que pueden ocurrir debido al proceso de remodelación del tejido respiratorio, inflamación persistente e hipersecreción de moco (Mazan & Tizard, 2012). En el período de exacerbación, los síntomas no son específicos y pueden incluir flujo nasal (seroso, seromucoso, o mucopurulento), tos, intolerancia al ejercicio y dificultad respiratoria (Davis & Rush, 2002). La severidad y la frecuencia de la tos empeoran con la progresión de la enfermedad pasando a una tos paroxística no productiva (Davis & Rush, 2002). En los casos más graves se presenta taquipnea, dilatación de los ollares, extensión de cabeza y cuello junto con pérdida de peso (Mazan & Tizard, 2012). Los caballos con enfermedad respiratoria crónica desarrollan una línea de esfuerzo abdominal característica (*heave line*), debido a la hipertrofia de los músculos abdominales externos (Mazan & Tizard, 2012).

2.2. Enfermedad Aérea Inflamatoria (IAD).

Es un síndrome que se caracteriza por la inflamación de las vías respiratorias de etiología multifactorial, que se presenta con mayor frecuencia en los caballos de deporte (Dixon, McGorum & Pirie, 2003). Este síndrome fue definido en el *Workshop International* sobre la enfermedad aérea inflamatoria en el año 2002, por la presencia de uno o más de los siguientes signos clínicos: tos, presencia de mucus traqueal, evidencia citológica de inflamación respiratoria, secreción nasal, pérdida

de la performance y tiempo prolongado de recuperación después del ejercicio, no existen cambios en el patrón de respiración, no se presentan signos de afectación sistémica (por ejemplo, fiebre, depresión, falta de apetito) así como tampoco se evidencian cambios en el hemograma y la química sanguínea (Anon, 2003). El ACVIM (Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria) propone otra definición para la IAD, En la que se describen: (1) Pérdida de la performance, intolerancia al ejercicio o tos sin hipersecreción mucosa, (2) Inflamación aséptica observada en el examen citológico y (3) disfunción pulmonar basada en la presencia de signos de obstrucción de las vías respiratorias distales, hiperreactividad respiratoria o alteraciones en el intercambio gaseoso durante la fase de ejercicio o reposo (Couetil et al. 2007). Esta última excluye todos los casos de enfermedad aérea inflamatoria con signos de comprometimiento sistémico y esfuerzo respiratorio grave acentuado durante la fase de reposo (Couetil et al. 2007). La IAD es más frecuente en los animales jóvenes mantenidos bajo un régimen de estabulación ; en entornos con alta densidad de polvo, mala ventilación y alta concentración de endotoxinas, ácaros, hongos y otros alérgenos capaces de inducir la inflamación de las vías aéreas , similar a lo que ocurre en la RAO (Holcombe et al. 2001); (McGorum & Prie, 2003). La incidencia de la enfermedad disminuye con la edad en los equinos deportivos, lo que sugiere una menor susceptibilidad debido a la adquisición de resistencia o de inmunidad contra los principales patógenos asociados (Chapman et al. 2000). En los caballos que no se utilizan con fines deportivos, la patología generalmente se diagnostica en caballos más viejos (Allen & Franklin, 2007). La etiología y la fisiopatología de la enfermedad no se encuentran definidas de forma concreta (Ainsworth y Cheetham, 2010). Algunos autores abogan por la hipótesis de que la IAD presenta una etiología multifactorial, por lo que la respuesta inflamatoria pulmonar se

produce en respuesta a la presencia de una infección bacteriana o viral persistente, HPIE, inhalación de polvo, hongos, endotoxinas, y contaminantes ambientales (Burrell et al. 1996); (Christley & Rush, 2007); (Mazan, 2012).

La contribución relativa de cada factor varía en los distintos grupos de población según la edad, la dieta y la gestión preventiva, patrón de distribución de los agentes infecciosos y la predisposición genética (Couetil et al. 2007).

Tabla 2. Factores etiológicos asociados a la Enfermedad aérea inflamatoria (IAD).

Adaptado de (Ghio, 2003); (Christley & Rush, 2007).

Factores Etiológicos
<ul style="list-style-type: none">● Agentes infecciosos (bacterias, micoplasma, virus)● Modalidad deportiva● Secuela de HPIE● Inhalación de agentes proinflamatorios como endotoxinas● Gases tóxicos (amonio, monóxido de carbono, ozono, dióxido de azufre)● Infección respiratoria viral recurrente● Reacción de hipersensibilidad tipo I (elementos fúngicos)

Las bacterias y micoplasmas juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, los microorganismos aislados con mayor frecuencia son el *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Actinobacillus*, *Pasteurella spp.*, *Mycoplasma felis* y *Mycoplasma equirhinitis*, (Chapman et al. 2000); (Madera, Munford, Newton & Chanter, 2005); (Christley & Rush, 2007). Los resultados obtenidos en el cultivo bacteriano deben ser interpretados con cautela, ya que el aislamiento de bacterias no siempre está asociado a infección. En estos casos, la

infección no es la causa de la inflamación, pero si una consecuencia, pudiendo empeorar o prolongar el cuadro. Los caballos sujetos a un régimen de entrenamiento con finalidades deportivas presentan mayor predisposición debido a un aumento en el acumulo de partículas en el tracto respiratorio distal, deterioro de la función de los macrófagos alveolares y / o episodios de HPIE que contribuyen al proceso inflamatorio (Christley & Rush, 2007). La influencia de la infección respiratoria viral en la etiología y fisiopatología de la IAD es todavía controvertida, diversas investigaciones se han realizado con el fin de verificar la asociación entre la infección por herpesvirus equino tipos 1 y 4, así como el virus de influenza (Wood, Newton, Smith & Marlin, 2003). Se sabe que la enfermedad causada por virus respiratorios aumenta la predisposición directa o indirectamente, mediante la modificación de los mecanismos de defensa de las vías respiratorias y por lo tanto, conduce a un estado de mayor susceptibilidad a las bacterias, polvo, hongos y polen, que como se ha mencionado anteriormente tienen un papel importante en la génesis de la enfermedad (Allen & Franklin, 2007). El diagnóstico se hace más complejo en algunas situaciones, ya que a menudo la entidad se presenta en forma subclínica, los signos clínicos no son específicos y pueden variar dependiendo de la edad y el grado de actividad del paciente (Burrell et al. 1996). Como regla general, se considera que los signos clínicos más sutiles se dan en caballos jóvenes y está ausente durante el período de reposo (Hoffman, 2002); (Allen & Franklin, 2007). La tos durante el ejercicio y / o la alimentación y la disminución de la performance son los principales estímulos iatrotropicos (Christley & Rush, 2007). En muchos casos, la IAD se manifiesta con tos crónica intermitente, intolerancia al ejercicio y aumento del tiempo de recuperación, ocasionalmente se puede observar descarga nasal en pequeñas cantidades (Mazan, 2012).

2.3. Hemorragia Pulmonar Inducida Por El Ejercicio (EIPH).

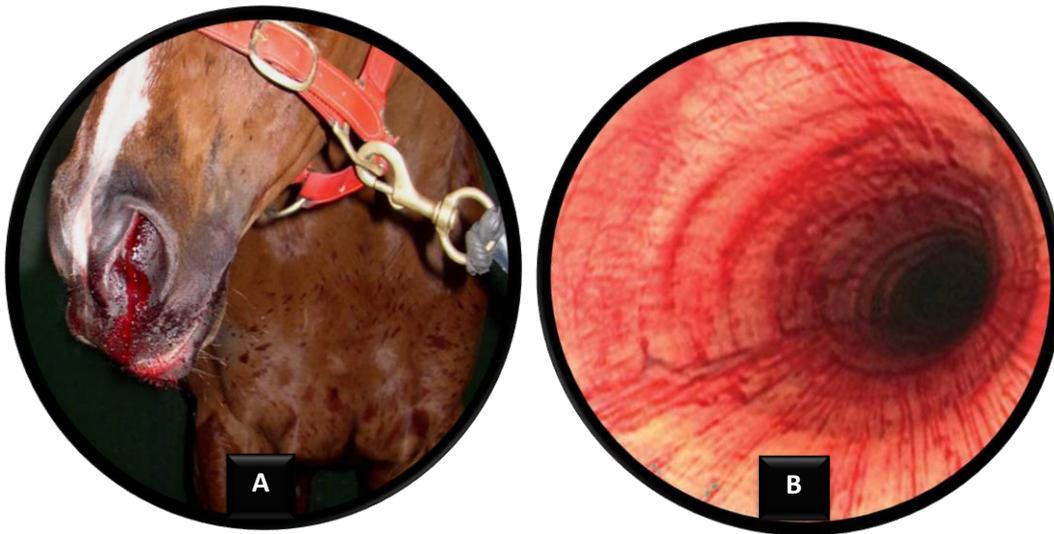
La EIPH es un trastorno que se presenta en caballos de carrera cuando se someten a ejercicio intenso (velocidad máxima) aunque también se observa ocasionalmente en otros deportes (Radostitis, Gay, Hinchcliff & Constable, 2009).

La incidencia más alta de episodios de EIPH se asocia con aumento de la intensidad del ejercicio, historial de episodios previos de sangrado, tiempo de entrenamiento prolongado, edad (más común en caballos adultos), inflamación respiratoria preexistente, arritmias cardíacas (por ejemplo, fibrilación auricular) y obstrucción severa o moderada de vía aérea (Durando, 2012). No existe consenso con respecto a la prevalencia de la enfermedad, la incidencia es más o menos es dependiente del método de diagnóstico utilizado y la frecuencia con la que se examinaron los pacientes (Durando, 2012).

La EIPH es causada por la ruptura de los capilares alveolares, dándose el paso de la sangre hacia el espacio intersticial y alveolar en una primera etapa y posteriormente, hacia los bronquios y la tráquea (Hinchcliff, 2007). Los capilares presentes en la porción caudodorsal son los más afectados, especialmente en la fase inicial de EIPH, la parte ventral rara vez se ve involucrada (Hinchcliff, 2007). La ruptura de los capilares es secundaria a un aumento de la presión transmural (diferencia entre la presión capilar y la presión alveolar) durante el ejercicio (Ainsworth & Cheetham, 2010).

Aunque la hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio ha sido una patología ampliamente estudiada a nivel mundial; hoy día constituye una entidad clínica que representa un gran desafío en cuanto al entendimiento de su fisiopatología.

Figura 2. Hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio, se observa: sangrado nasal (A); sangrado a nivel de tráquea (B)-[vista endoscópica]. Adaptado de (Nathan, 2004)



La presión arterial pulmonar media es de 20 a 25 mmHg durante el reposo, pasando a una presión superior de 90 mmHg durante el ejercicio intenso debido a un aumento del gasto cardíaco (Hinchcliff, 2007). Por lo tanto, el aumento de la presión arterial pulmonar asociada con un aumento de la presión atrial izquierda durante el ejercicio, resulta en el aumento de la presión capilar pulmonar (Langsetmo, Fedde, Meyer & Erickson, 2000). Asociado a este factor ocurre una marcada disminución en la presión pleural y por lo tanto hay una caída de la presión alveolar (Langsetmo et al. 2000). Por lo tanto, el aumento de la presión capilar pulmonar y la reducción de la presión pleural contribuyen a una mayor predisposición a la ruptura capilar pulmonar en la génesis de la HPIE (Langsetmo et al. 2000).

Tabla 3. Factores asociados a hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (HPIE).

Adaptado de (Hinchcliff, 2007).

Factores de riesgo asociados a HPIE
Hipertensión en capilares pulmonares
Propiedades reológicas de la sangre (viscosidad, morfología de los eritrocitos)
Presión intrapleurales (alveolar) subatmosférica
Obstrucción extrínseca o intrínseca del aparato respiratorio (hemiplejia laríngea, broncoconstricción)
Coagulopatias (alteración de la función plaquetaria, fragilidad del endotelio capilar)
Neovascularización bronquial
IAD (infecciosa, alérgica)
Fibrosis o alteración de la complacencia pulmonar
Presión generada durante la locomoción

Independientemente de la causa, la ruptura de los capilares y la posterior hemorragia hacia el espacio intersticial y la vía aérea conducen a la inflamación, fibrosis y alteración de la distensibilidad pulmonar (Radostitis et al. 2009). La combinación de alteraciones en las estructuras y de la presión pulmonar durante el ejercicio perpetúan la lesión pulmonar por medio de episodios repetidos de sangrado y de inflamación que pasan a asumir un carácter crónico (Radostitis et al. 2009). Los caballos afectados presentan un historial de disminución de la performance y presencia de sangre en la tráquea, observadas por endoscopia y epistaxis (Durando, 2012).

En la mayoría de los casos de EIPH no son detectados cambios en el examen físico o las alteraciones presentes no son específicas, con la excepción de epistaxis que se produce en algunos casos (Hinchcliff, 2007). Cuando se presenta epistaxis, es generalmente bilateral y ocurre durante o poco después del ejercicio (Hinchcliff, 2007).

3. DIAGNÓSTICO EN LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA.

El diagnóstico precoz y la instauración de un plan de tratamiento adecuado son esenciales para minimizar las alteraciones respiratorias y las pérdidas económicas asociadas, así como también para lograr una reducción en el tiempo de recuperación del paciente (Ainsworth & Cheetham, 2010). La realización de una adecuada anamnesis y un historial clínico completo, además de un correcto examen clínico son esenciales en el proceso de diagnóstico, ya que la información obtenida permite la identificación de problemas, la definición de la lista de diagnósticos diferenciales (DD) y la selección de los exámenes más adecuados de acuerdo a la sospecha clínica (Roy & Lavoie, 2003). Las pruebas complementarias utilizadas para la evaluación de las vías respiratorias son la endoscopia, radiografía, ecografía, análisis de gases en sangre, citología y cultivo bacteriano de secreciones respiratorias, examen fecal (búsqueda de parásitos pulmonares), pruebas de piel, examen histológico de la mucosa respiratoria y parénquima pulmonar, entre otros (Radostitis et al. 2009). Además, hay nuevas metodologías tales como la tomografía computarizada y la resonancia magnética que han sido sustancialmente más utilizadas, sobre todo en las enfermedades del tracto respiratorio anterior (Radostitis et al. 2009).

3.1. Exámenes Complementarios.

Una vez establecido el origen de los signos clínicos se puede recurrir a pruebas adicionales que pueden ser usadas para establecer un diagnóstico definitivo, documentar la naturaleza de los problemas, proporcionar información útil con respecto a la formulación de un plan de tratamiento y el pronóstico adecuado (Dixon et al. 2003). En la actualidad, se cuenta con numerosos exámenes adicionales disponibles para la evaluación de las vías respiratorias, sin embargo, teniendo en cuenta la naturaleza del presente estudio sólo se describirá la evaluación de las secreciones respiratorias.

3.2. Colecta Y Análisis De Las Secreciones Respiratorias.

Un análisis de las secreciones respiratorias nos permite llegar a un diagnóstico de las enfermedades respiratorias más frecuentes, con una buena sensibilidad, así como también nos permite el estudio de la fisiopatología de los procesos involucrados, y el seguimiento de los casos después de la terapia instaurada (Radostitis et al. 2009). La colecta de las secreciones respiratorias puede llevarse a cabo mediante lavaje traqueobronquial (TW), y lavado broncoalveolar (BAL), entre otros procedimientos (Richard, Fortier, Lekeux & Van Erck, 2010). Las muestras obtenidas mediante dichas técnicas pueden ser sometidas a citología, análisis bioquímico, cultivo bacteriano, aislamiento de virus, pruebas moleculares e histopatología (Richard et al. 2010). Es importante señalar que la técnica utilizada y el método de colecta pueden afectar de una manera significativa a los recuentos celulares, el tipo de células obtenidas y los recuentos bacterianos, por lo cual debería existir una estandarización de los protocolos utilizados en relación con el período de muestreo (por ejemplo, reposo o después del ejercicio), el

volumen y el tipo de líquido instilado, manejo y procesamiento de las muestras (Hodgson & Hodgson, 2007).

El lavaje traqueobronquial (TW) permite la toma de muestras de secreciones respiratorias presentes en las vías respiratorias grandes, la tráquea y los bronquios, mientras que las muestras de lavado broncoalveolar (BAL) son recogidas de las vías respiratorias más pequeñas y la región distal (Taylor et al. 2010). (Van Erck 2009), (Hodgson, 2006); (Radostitis et al. 2009) informan de que existe una correlación significativa entre la TW y la citología del BAL. Por lo tanto, la población de células muestreada por una de las técnicas no es representativa de la otra, seleccionando así el método de muestreo depende de los signos clínicos, la ubicación y la naturaleza de la enfermedad. La colecta de las secreciones de las vías respiratorias se indica con más detalle en la presencia de tos, pérdida de la performance, secreción mucopurulenta en la tráquea, epistaxis después del ejercicio, fiebre de origen desconocido y disnea (Hodgson & Hodgson, 2007). En casos de pérdida de la performance o tos durante el ejercicio se recomienda la toma de muestras a través de TW y BAL para aumentar el espectro de la evaluación respiratoria (Van Erck, 2009). Cuando se realizan ambas técnicas, el TW se debe realizar primero para evitar la posible contaminación transitoria de la tráquea distal por la flora orofaríngea ocasionada por el BAL.

3.3. Lavaje Traqueobronquial (TW).

El lavaje traqueobronquial es una técnica sencilla, de uso frecuente en el diagnóstico de las enfermedades respiratorias, como la neumonía bacteriana, la perineumonía y fiebre de origen desconocido (Ainsworth y Cheetham, 2010). El lavado y la aspiración traqueal pueden llevarse a cabo por punción percutánea (transtraqueal) o a través del canal de trabajo del endoscopio (Schaer & Orsini,

2007). El lavaje traqueobronquial por vía transtraqueal difiere del lavado traqueal endoscópico, ya que se lleva a cabo por punción percutánea de la tráquea a nivel del tercio medio del cuello (Schaer y Orsini, 2007). (Wilfong & Waldrige, 2009) recomiendan la sedación de los pacientes antes del procedimiento a través del uso de Xilacina (0,5 a 1,1 mg / kg IV) o detomidina (0,01 a 0,02 mg / kg IV) y Butorfanol (0,02 a 0,04 mg / kg IV). Los mismos autores también informan de que el uso de Butorfanol reduce la frecuencia de los episodios de tos, además de su efecto sedante. Cuando se realiza el TW por vía percutánea se debe proceder a la tricotomía y asepsia de una superficie de unos 10 cm² en la línea media del cuello (Schaer & Orsini, 2007). La técnica consiste en la localización y la estabilización de la tráquea manualmente con la otra mano para colocar la aguja perpendicular a la piel y realizar la punción de la tráquea entre dos anillos de tráquea (Schaer y Orsini, 2007). Después de la punción, una sonda siliconada debe ser introducida a través de la aguja y dirigida hacia la tráquea distal, luego se debe administrar de 20 a 30 ml de solución salina (Schaer & Orsini, 2007). Para recuperar el fluido se puede aspirar después de la instilación de solución salina completa o parcial hasta que se sienta tensión en la succión con la jeringa (Schaer & Orsini, 2007). En esta etapa, puede ser necesario repetir la administración de solución salina (hasta 100 ml) para aumentar la cantidad de fluido recuperado (Schaer & Orsini, 2007). La enfermedad pulmonar facilita el proceso de toma de muestras por la presencia de una cantidad variable de secreción a nivel de la entrada del tórax (Radostitis et al. 2009). Después de tomar la muestra se retira la sonda y después la aguja cuidadosamente para evitar posibles secuelas. El material obtenido se somete a estudios citológicos, microbiológicos o cualquier otro que se considere necesario. La técnica transtraqueal tiene la ventaja de que impide la cavidad nasal y el tracto respiratorio anterior de este modo se disminuye el riesgo de contaminación de la

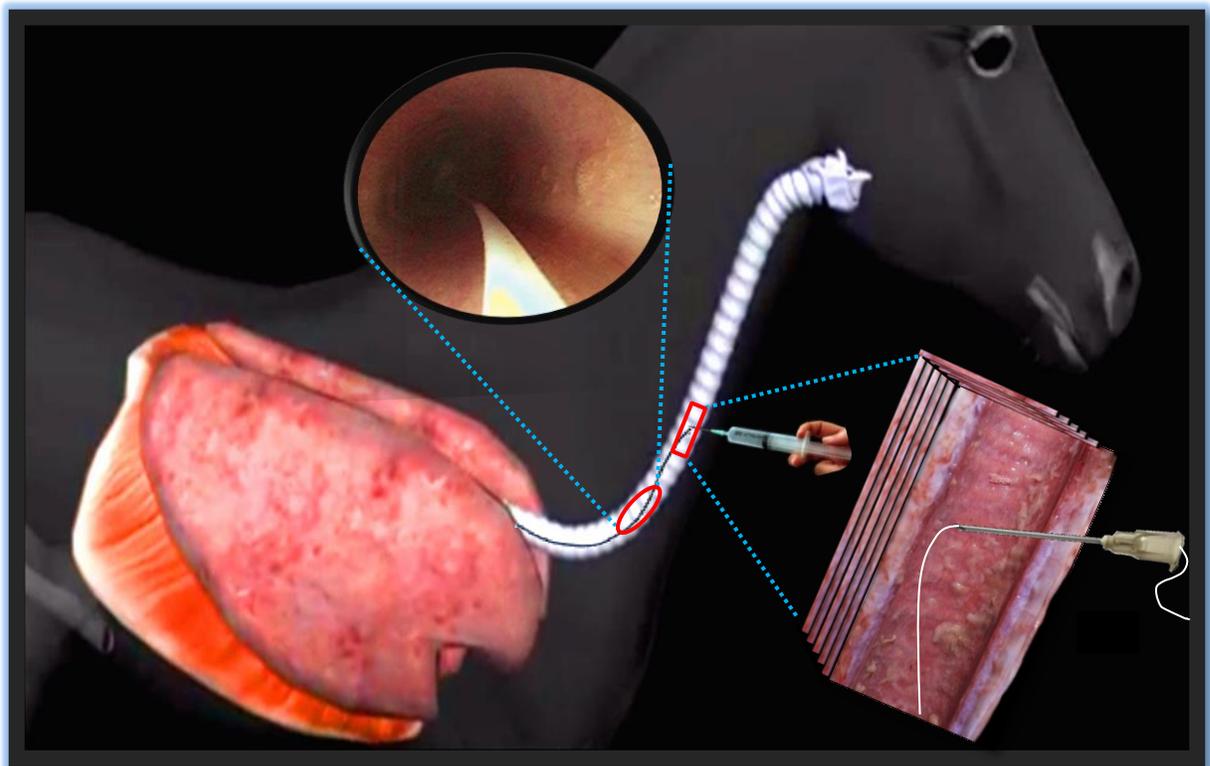
muestra por la microflora nasofaríngea (Holl & Schumacher, 2011). Por el contrario, el uso del endoscopio se asocia con un mayor riesgo de contaminación comprometiendo la utilidad de las muestras para cultivos bacterianos (Holl & Schumacher, 2011). La contaminación de las muestras obtenidas por medios endoscópicos puede estar limitada por el uso de una solución de desinfección (clorhexidina 2% y 70% de alcohol) del tubo entre cada examen endoscópico y por el uso de catéteres con sistema de protección (Hodgson & Hodgson, 2007).

Las contraindicaciones se asocian con la enfermedad respiratoria grave (no constituye una contraindicación absoluta), no hay medios adecuados para la contención y la tos espontánea severa (Radostitis et al. 2009). En ciertos casos puede ocurrir retroflexión del catéter proximal a la orofaringe y la tráquea durante la tos resultando en la contaminación de la muestra o una colecta involuntaria de las secreciones del tracto respiratorio anterior (Hewson & Viel, 2002). La contaminación de las muestras se puede confirmar en la citología ya que se observan células epiteliales escamosas que están ausentes en la porción distal de la laringe (Dixon, 1997). Las muestras con un recuento elevado de células escamosas presentan un mayor número de bacterias que las muestras con recuentos más bajos (Dixon, 1997). Por lo tanto se ha sugerido que el número de células escamosas recuperadas puede estar asociado al número de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas a partir de cultivo bacteriano (Christley, Hodgson, Rose, Reid & Hodgson, 1999).

El número exacto de células escamosas que puede ser sugestivo de infección aún no está claro, lo que podría explicarse por los diferentes recuentos bacterianos observados en diferentes estudios y por la distribución no homogénea en la

citología; estos datos deben interpretarse a la luz de la información proporcionada por el examen clínico, citológico y bacteriológico.

Figura 3. *Esquemmatización del lavaje traqueobronquial por vía percutánea en el equino.*
(Florez Bravo, 2013).



3.4. Procesamiento De Muestras.

Tras la recolección, las muestras deben ser evaluadas en relación al olor, turbidez, color, presencia de moco y otros elementos (por ejemplo, los residuos, los coágulos) (Hoffman, 2008). Las muestras recuperadas por BAL tienen un aspecto espumoso que indica la presencia de surfactante pulmonar (Hoffman, 2008). Las secreciones respiratorias son inodoras, claras o con un índice de turbidez medio en

la ausencia de enfermedades respiratorias (Hoffman, 2008). La presencia de un mal olor puede indicar infección por bacterias anaerobias o necrosis del tejido pulmonar (Hoffman, 2008). El color del líquido varía teniendo en cuenta el porcentaje de células nucleadas y los eritrocitos presentes, por lo que el aumento de la tasa de turbidez está asociada con hipersecreción de moco, aumento del recuento celular o detritus (Hodgson & Hodgson, 2007). En presencia de un episodio reciente de HPIE, el color varía desde rosa a rojo, pasando posteriormente a marrón debido a la concentración de hemosiderina (Hodgson & Hodgson, 2007). La evaluación de la cantidad de moco presente en el TW y el BAL deberá ser realizada en conjunto con endoscopia del tracto respiratorio (Hodgson & Hodgson, 2007). El mecanismo de clearance mucociliar en caballos sanos es eficiente, de modo que la producción y eliminación de moco se mantienen en equilibrio (Hodgson, 2006). Por lo tanto, estos animales tienen muy poco o ningún material mucocelular translúcido, de color verde pálido y un pequeño número de células libres (Hodgson, 2006). En las láminas teñidas por el método de Wright, el moco se observa de color rosa o azul claro (Zinkl, 2002). La hipersecreción mucosa y la acumulación subsiguiente de muco a nivel de los bronquiolos más pequeños pueden resultar en la formación de espirales observados en el examen citológico llamados espirales de Curschmann (Zinkl, 2002). El aumento de la producción muco o secreción mucopurulenta se observa en RAO, IAD, bronquitis crónica y neumonía (bacteriana, fúngica o parasitaria) (Holcombe et al. 2006). La hipersecreción de muco moderada a severa está asociada con la pérdida de la performance incluso en la ausencia de otros signos de enfermedad respiratoria (Holcombe et al. 2006).

El análisis de las muestras debe realizarse inmediatamente después del procedimiento para prevenir cambios celulares y la multiplicación bacteriana (Van Erck, 2009). Las muestras destinadas a citología pueden almacenarse en tubos que contengan EDTA de Na K a temperatura ambiente durante un período de hasta 8 horas o refrigeradas a 4 ° C hasta 24 horas (Van Erck, 2009). El EDTA preserva la morfología celular, enlentece el crecimiento bacteriano y evita la formación de coágulos (Taylor et al. 2010). Las bacterias anaerobias son particularmente susceptibles al EDTA y por lo tanto, las muestras destinadas a cultivo bacterianos son almacenada en tubos sin anticoagulantes o adecuado de transporte en condiciones de refrigeración y deben ser procesados tan rápidamente como sea posible para evitar el sobrecrecimiento de microorganismos contaminantes (Taylor et al. 2010).

El procesamiento de las muestras destinadas al examen citológico incluye la preparación del frotis, fijación y la tinción antes del examen microscópico propiamente dicho. El frotis se debe realizar inmediatamente después de la recolección, debido que los datos se utilizan como referencia en términos de morfología celular y de población bacteriana (Hodgson & Hodgson, 2007). La celularidad (número de células) de las muestras es un factor determinante para la preparación del frotis, debido a que el índice de mayor o menor turbidez determina la necesidad de centrifugación previa de las muestras (Schaer & Orsini, 2007). La celularidad se puede estimar en base a la turbidez de la muestra y la presencia de moco, o también puede ser determinada por el recuento de células totales (Schaer & Orsini, 2007). Es así como en las muestras con alta celularidad (> 30.000 células nucleadas / μ L) se puede proceder al frotis directamente; las muestras con celularidad moderada (3.000-30.000 células nucleadas / μ L) deben ser

centrifugadas y los frotis se deben realizar a partir del sedimento; en las muestras con baja celularidad (<3000 células nucleadas / μL) se recomienda el uso de citocentrifugación (Schaer & Orsini, 2007). La centrifugación no es totalmente inocua con respecto al recuento diferencial. (Richard et al. 2010) informaron que en las muestras sometidas a centrifugación el recuento de neutrófilos no se vio afectado de manera significativa, el porcentaje de linfocitos es menor y el porcentaje de macrófagos, mastocitos y eosinófilos se incrementa. La citocentrifugación tiene la ventaja de que las células se concentran en un solo punto; esto facilita la evaluación microscópica (Richard et al. 2010). Después de la preparación del frotis, este debe ser secado al aire y ser teñido. Diversos colorantes se encuentran disponibles en el mercado para la identificación y cuantificación de las poblaciones celulares presentes en el TW y el BAL. Los neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células epiteliales se identifican fácilmente con base en su morfología a través del uso de derivados de la tinción de Romanowsky (por ejemplo, Diff-Quik, Wright, tinción de hematoxilina-eosina) (Stokol & French, 2007). Los colorantes de tipo Romanowsky o policromáticos son los colorantes patrón utilizados en la citología, se forman por la combinación de azul (azul, pH básico) y eosina (rojo, pH ácido) (Stokol & French, 2007). Los colorantes básicos se unen a las estructuras ácidas (por ejemplo, ADN, RNA) coloreándolas en varias tonalidades de azul a púrpura, mientras que los colorantes ácidos se unen a estructuras alcalinas presentes en el citoplasma coloreándolas en diferentes tonalidades de rojo (Stokol & French, 2007). Denicola (2007) afirma que la mayor ventaja proviene del hecho de que estos colorantes pueden ser utilizados en muestras que han sido fijadas por el secado del aire dando tiempo al patólogo para preparar adecuadamente las muestras sin tener que recurrir al uso de etanol o de otros fijadores. El porcentaje medio de los mastocitos, determinado en frotis coloreados con derivados de

Romanowsky es menor que cuando son utilizados colorantes específicos, incluyendo May-Grunwald-Giemsa y azul Tuloidina (Leclerc, Desnoyers, Beauchamp & Lavoie, 2006). Los colorantes tipo Romanowsky no tiñen los gránulos metacromáticos, por lo que la identificación de los mastocitos es laboriosa, subjetiva y depende de la experiencia del patólogo (Hughes, Malikides Hodgson & Hodgson, 2003); (Radostitis et al. 2009).

Figura 4. Kit de tinción T15 (Diff Quick).



3.4.1. Estudio Citológico.

La citología es una prueba complementaria de uso común en el diagnóstico de la enfermedad de las vías respiratorias distales en equinos (Lavoie, 2007). Esta tiene como objetivos buscar y reconocer la presencia de inflamación o neoplasia, verificar los efectos de la lesión tisular y la naturaleza del proceso (por ejemplo, infecciosa, alérgica, inmunomediada) (Raskin, Meuten & Rebar, 2005,). El diagnóstico de la enfermedad respiratoria se basa a menudo en la proporción de células inflamatorias específicas, incluyendo los neutrófilos y linfocitos (Raskin et al. 2005). Sin embargo, aún queda mucho por descubrir sobre la distribución de los

eosinófilos y los mastocitos en el tracto respiratorio distal de los animales enfermos y sanos (Hughes et al. 2003). Los mismos autores informaron que en su experiencia personal, los mastocitos son más frecuentes en las muestras de las vías respiratorias distales, mientras que los eosinófilos se encuentran más frecuentemente en las vías respiratorias proximales. Por lo tanto, la técnica de recolección puede tener una influencia en los tipos de células obtenidas por lo que el BAL es más recomendado para la detección y cuantificación de los mastocitos, mientras que el TW para la identificación de los eosinófilos según el autor. El diagnóstico definitivo no siempre se consigue mediante citología, pero el proceso general de la enfermedad (inflamación o neoplasia) puede ser fácilmente reconocido a menudo si se usa un enfoque correcto (French, 2009). La importancia de la información proporcionada por el examen citológico se determina en relación con los signos y la anamnesis, así como sobre la base de los datos obtenidos a través de otros medios complementarios de diagnóstico. El examen citológico se lleva a cabo a partir de frotis coloreados y observados a través del microscopio óptico. Este examen se puede dividir en cuatro fases, la determinación de la calidad del frotis a través del reconocimiento de artefactos asociados al procesamiento de las muestras (por ejemplo, fijación, tinción), observación de la morfología celular general (búsqueda de alteraciones nucleares o degeneración celular); recuento de células totales y recuento diferencial (Denicola, 2007). Durante el examen microscópico es esencial determinar si los tipos celulares y la morfología corresponden a lo esperado, si existen indicios de inflamación e identificar el tipo de célula predominante e investigar la presencia de contaminantes en la muestra (por ejemplo, bacterias, polen, elementos fúngicos, cristales, detritus) (Denicola, 2007). Para realizar adecuadamente un examen citológico es necesario estar familiarizado con la morfología y el tipo de células que componen el sistema

respiratorio del equino, las enfermedades más frecuentes y sus efectos en el árbol respiratorio.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

Este estudio fue realizado en la sección de veterinaria del colegio militar de la nación, ubicado en la Avenida Matienzo y Ruta 201 - El Palomar ,Provincia de Buenos Aires, Argentina.

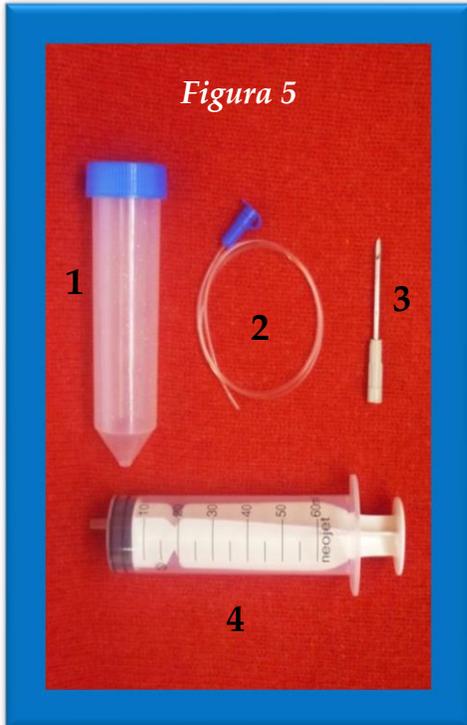
Fueron seleccionados para esta experiencia 38 ejemplares adultos de la raza silla argentino, utilizados para el deporte ecuestre del salto, los animales correspondieron a individuos de ambos sexos, entre los 8 y 15 años de edad. Se pudo determinar que al momento de la realización del experimento los individuos se encontraban clínicamente sanos, con un plan sanitario al día y en igualdad de condiciones de manejo, sometidos a un régimen de semiconfinamiento, en donde se encontraban estabulados por la noche y mantenidos en piquetes durante el día.

El principal objetivo de este estudio fue evaluar y comparar los distintos tipos celulares presentes a nivel de tráquea y bronquios en dos grupos de caballos en la época de verano; para lo cual fueron distribuidos en dos grupos de 19 individuos. El grupo I: animales que se encontraban sometidos a una actividad deportiva constante y el grupo II: animales que no se encontraban en actividad deportiva.

4.1. Toma Y Remisión De Las Muestras.

Para obtención del lavaje traqueobronquial por vía percutánea, los animales fueron sometidos a la técnica descrita por Mansmann & Knight (1972) y Fernandes et al. (2000) que consistió en la sedación del individuo mediante el uso de Xilacina clorhidrato al 10% a una dosis de 1,1 mg/kg por vía endovenosa (EV).

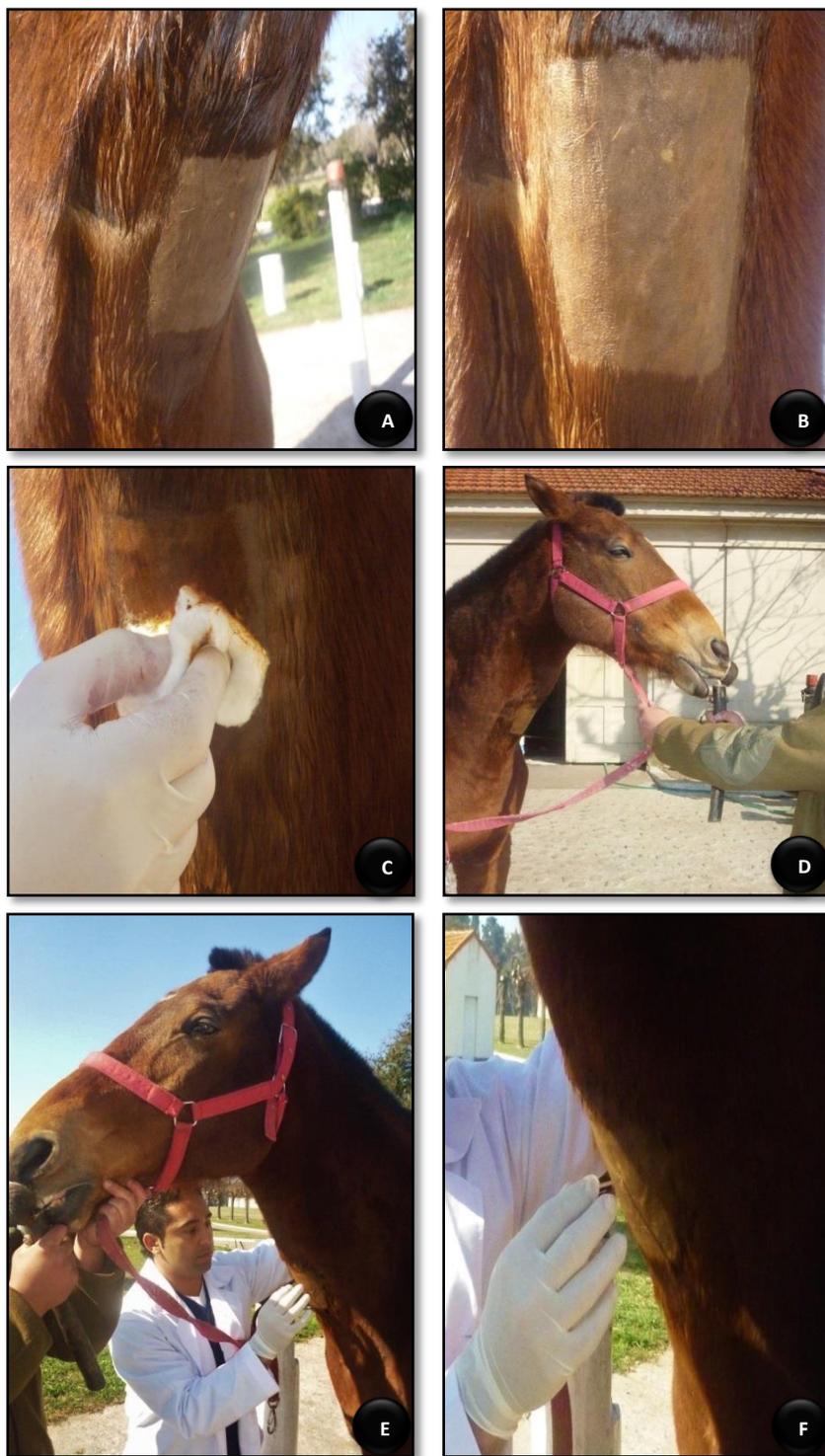
Posteriormente se procedió a la realización de la tricotomía y anti-sepsia de un área de 10x10cm, en la región media y ventral del cuello; craneal a la bifurcación del músculo esternocéfálico. Seguidamente fue introducida una aguja calibre 10 G a través de la piel entre dos anillos traqueales, hasta alcanzar el lumen de la tráquea. A continuación una sonda siliconada de polietileno K33 de 45 cm de



longitud fue introducida por dentro de la aguja hasta la región de la carina, donde fueron instilados de 20 a 30 ml de solución salina fisiológica estéril al 0.9%; inmediatamente después de este procedimiento se realizó una succión leve por medio de la jeringa logrando recuperar un 50 a 60% del líquido instilado. El fluido obtenido fue almacenado en alícuotas con el agregado de EDTA (de Na y K) en las mismas proporciones que para la sangre. Dichas alícuotas fueron transportadas en estado de refrigeración a 4^o C, en contenedores

de telgopor con pack refrigerante. Cabe destacar que todas las muestras fueron tomadas en estado de reposo post ejercicio y el contenido obtenido fue transportado y procesado en un tiempo máximo de 4 horas siguiendo las recomendaciones descritas por McGorum & Dixon (1994).

Figura 5. Se observa: (1) Tuvo con EDTA de Na K, (2) Sonda siliconada K33, (3) Aguja calibre 10G, (4) Jeringa de 60 ML



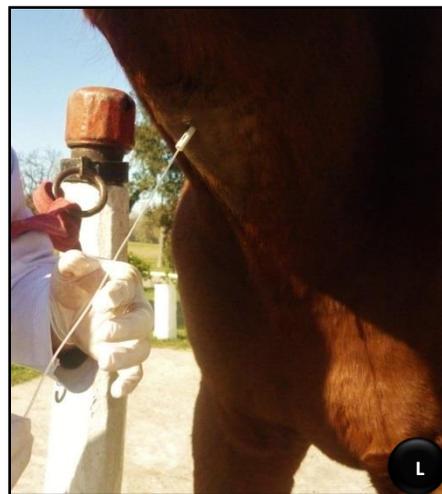
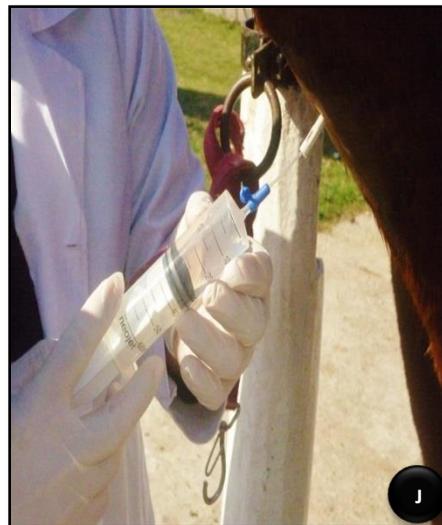
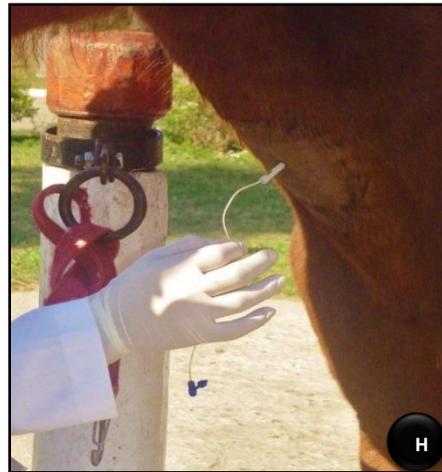
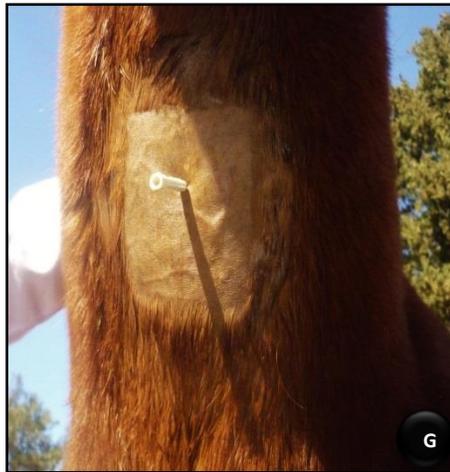




Figura 6. Realización de lavaje traqueobronquial por vía percutánea. se observa: Tricotomía De La Zona [(A)-Vista Lateral, (B)-Vista Ventral]; Desinfección Del Área (C); Inmovilización Mecánica Mediante El Uso De Mordaza (D); Estabilización De La Tráquea Y Determinación De La Zona De Punción (E); Punción (F); Aguja Ubicada Entre Dos Anillos Traqueales-Vista Ventral (G); Introducción De La Sonda A Través De La Aguja (H); Acoplamiento De La Sonda A La Geringa (I)(II); Instilación De La Solución Salina Fisiológica Estéril Al 0.9% (J); Extracción Del Contenido Mediante Succión Suave (K); Retirado De La Sonda (L); Retirado De La Aguja (M); Desinfección Del Área Incidida (N); Vertimiento Del Contenido En La Alícuota (O); Contenido Recuperado En La Alícuota (P)

4.2. Procesamiento De Las Muestras.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio del hospital escuela de la facultad de medicina veterinaria de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Para la realización del estudio citológico las muestras fueron sometidas a centrifugación y luego se realizaron extendidos que se fijaron con coloración *T15* (*Diff Quick*). Cada muestra fue posteriormente examinada utilizando todos los rangos de objetivo del microscopio óptico, realizándose de este modo un recuento diferencial de 300 células, siendo expresadas como porcentaje relativo para cada grupo celular encontrado. El recuento de células nucleadas fue realizado mediante un hemocitómetro en cámara de Neubauer.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y RESULTADOS.

Como modelo estadístico fue utilizado un análisis multivariado de varianza (MANOVA) que permite analizar la relación entre una o más variables independientes y dos o más variables dependientes. Para este estudio fue conveniente la utilización del test de Hotelling.

Los resultados obtenidos en el presente experimento se encuentran representados en las tablas (4, 5 y 6); así como también en los gráficos (1, 2 y 3).

Los hallazgos citológicos más representativos pueden observarse en las figuras (7, 8, 9, 10, y 11) respectivamente.

El análisis citológico comparativo de las células presentes el lavaje traqueobronquial de aquellos caballos que se encontraban en actividad deportiva

(grupo I) y aquellos que no se encontraban saltando (grupo II) muestra que hubo un aumento significativo de linfocitos en el grupo I con respecto al grupo II.

Para el resto de los grupos celulares en estudio (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, y células epiteliales) no se encontraron diferencias significativas.

Con respecto al recuento de células nucleadas totales medidas en células por mm³ no se encontraron diferencias significativas para ningún grupo.

Tabla 4. – Porcentajes de cada tipo celular (variables de la izquierda) en promedio por grupo.

Grupo	I	II
<i>Macrófagos %</i>	45,68	47,16
<i>Neutrófilos %</i>	8,47	7,74
<i>Linfocitos %</i>	4,53	2,26
<i>Eosinófilos %</i>	0,42	0,21
<i>Células Epiteliales %</i>	40,32	42,32
<i>Basófilos %</i>	0,26	0,16
<i>Mastocitos %</i>	0,11	0
<i>Rec. De Células Nucleadas</i>	1452,63	1468,42

Tabla 5. – Correlaciones entre las presencias de los tipos celulares.

Matriz de correlación común								
	Macrófagos %	Neutrófilos %	Linfocitos %	Eosinófilos %	Células Epiteliales %	Basófilos %	Mastocitos %	Rec. De Células Nucleadas.
Macrófagos %	1	0,14	-0,03	-0,03	-0,9	6,00E-04	-0,36	0,24
Neutrófilos %	0,14	1	0,61	0,18	-0,53	0,15	0,04	0,55
Linfocitos %	-0,03	0,61	1	0,15	-0,33	0,19	0,05	0,31
Eosinófilos %	-0,03	0,18	0,15	1	-0,09	-0,11	0,04	0,12
Células Epiteliales %	-0,9	-0,53	-0,33	-0,09	1	-0,09	0,29	-0,42
Basófilos %	6,00E-04	0,15	0,19	-0,11	-0,09	1	-0,16	0,03
Mastocitos %	-0,36	0,04	0,05	0,04	0,29	-0,16	1	-0,27
Rec. De Células Nucleadas.	0,24	0,55	0,31	0,12	-0,42	0,03	-0,27	1

Algunas variables aparecen fuertemente correlacionadas. Algunas asociaciones son positivas, eso indica que si hay presencia de un tipo, hay presencia de otro tipo, cuando por el contrario la asociación es negativa, significa que al aumentar una de ellas disminuye la presencia de la otra.

Tabla 6. – Cuadro de Análisis de la Varianza (Lawley-Hotelling)

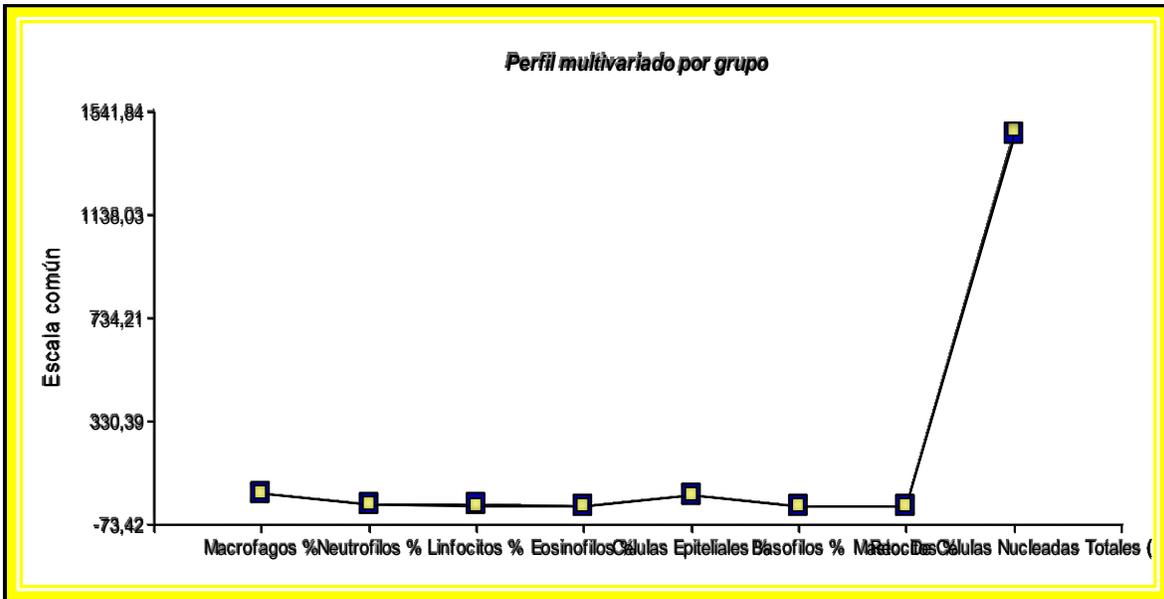
F.V.	Estadístico	F	gl(num)	gl(den)	p
Grupo	0,43	1,54	8	29	0,1857

Variable	Gr1	Gr2	M(1)	M(2)	D(1)	D(2)	Mdn a(1)	Mdn a(2)	W	p(2 colas)
Macrófagos %	1	2	45,68	47,16	13,43	9,65	47	47	355,5	0,6609
Neutrófilos %	1	2	8,47	7,74	3,88	3,45	7	8	384	0,6913
Linfocitos %	1	2	4,53	2,26	2,95	2,21	4	1	450,5	0,018
Eosinófilos %	1	2	0,42	0,21	0,51	0,42	0	0	408,5	0,168
Células Epiteliales %	1	2	40,32	42,32	13,76	12,68	38	42	361	0,7813
Basófilos %	1	2	0,26	0,16	0,45	0,37	0	0	389,5	0,432
Mastocitos %	1	2	0,11	0	0,32	0	0	0	389,5	0,151
Rec. De Células Nucleadas.	1	2	1452,6	1468,4	675,2	692,8	1600	1200	362	0,801

Fue analizada la composición porcentual de ambos grupos mediante el test de Hotelling y no se detectan diferencias significativas entre las distribuciones porcentuales consideradas conjuntamente entre los dos grupos.

Testeando de a una las presencias, se encuentran diferencias significativas solamente para los linfocitos.

Grafico 1. – Porcentaje de cada tipo celular por grupo.



Se puede observar que en todos los casos los porcentajes aparecen casi superpuestos.

Grafico 2. – Vectores porcentuales medios por grupo.

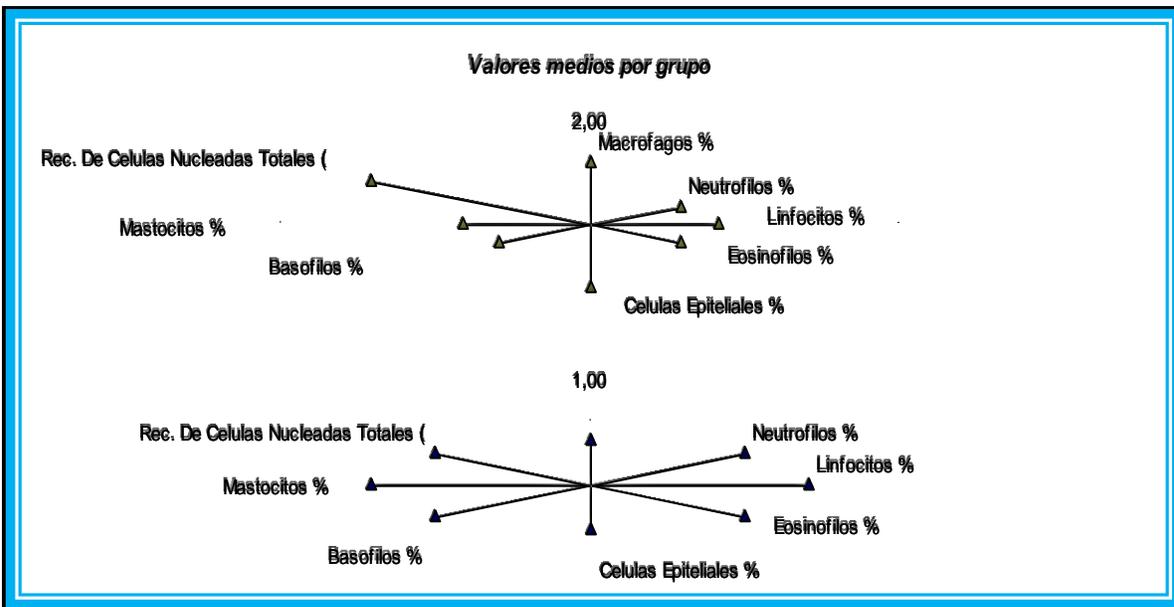
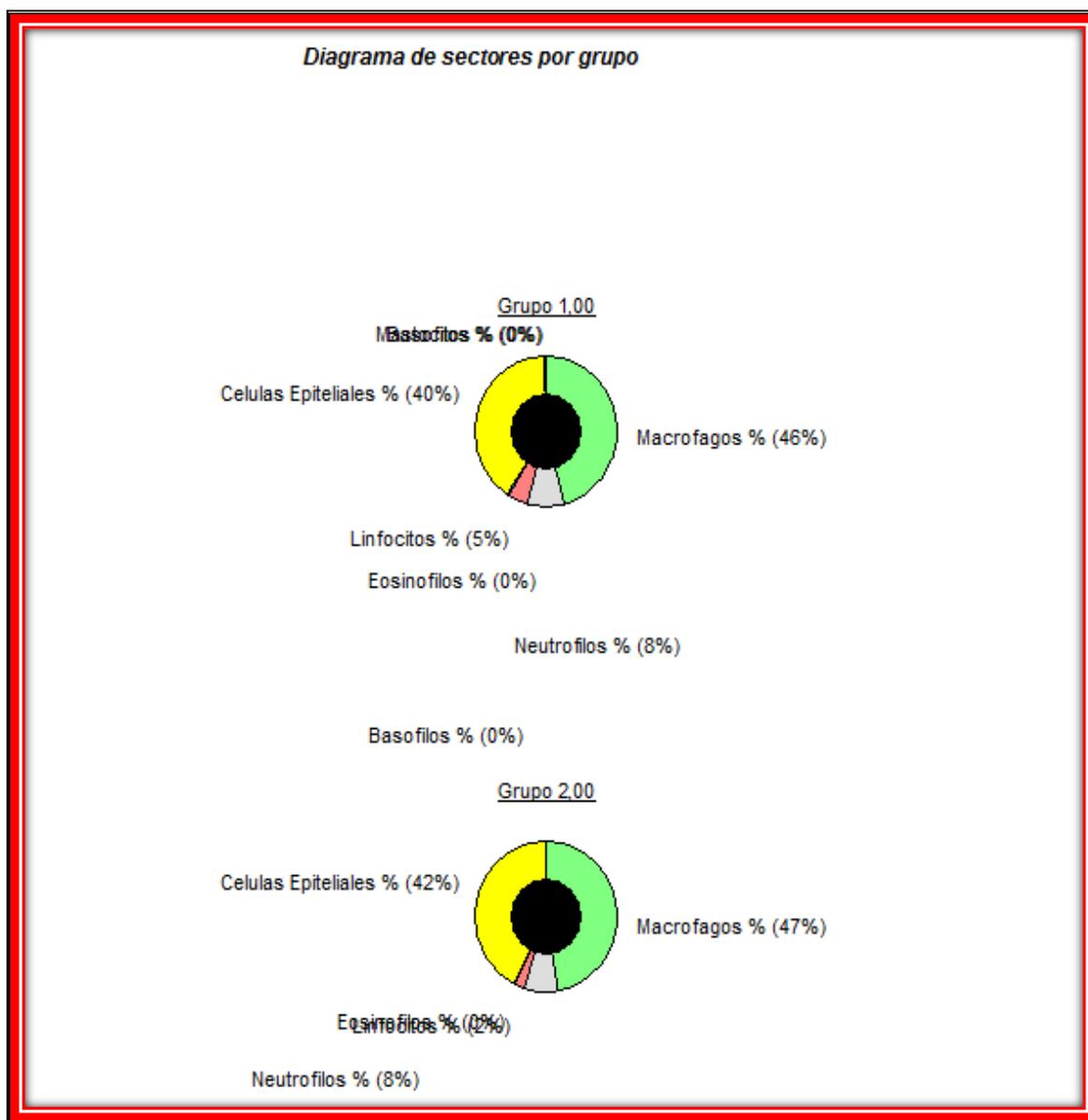


Grafico 3. – Distribuciones porcentuales.



En el anterior diagrama circular se puede observar la clara similitud entre los porcentajes de cada grupo.

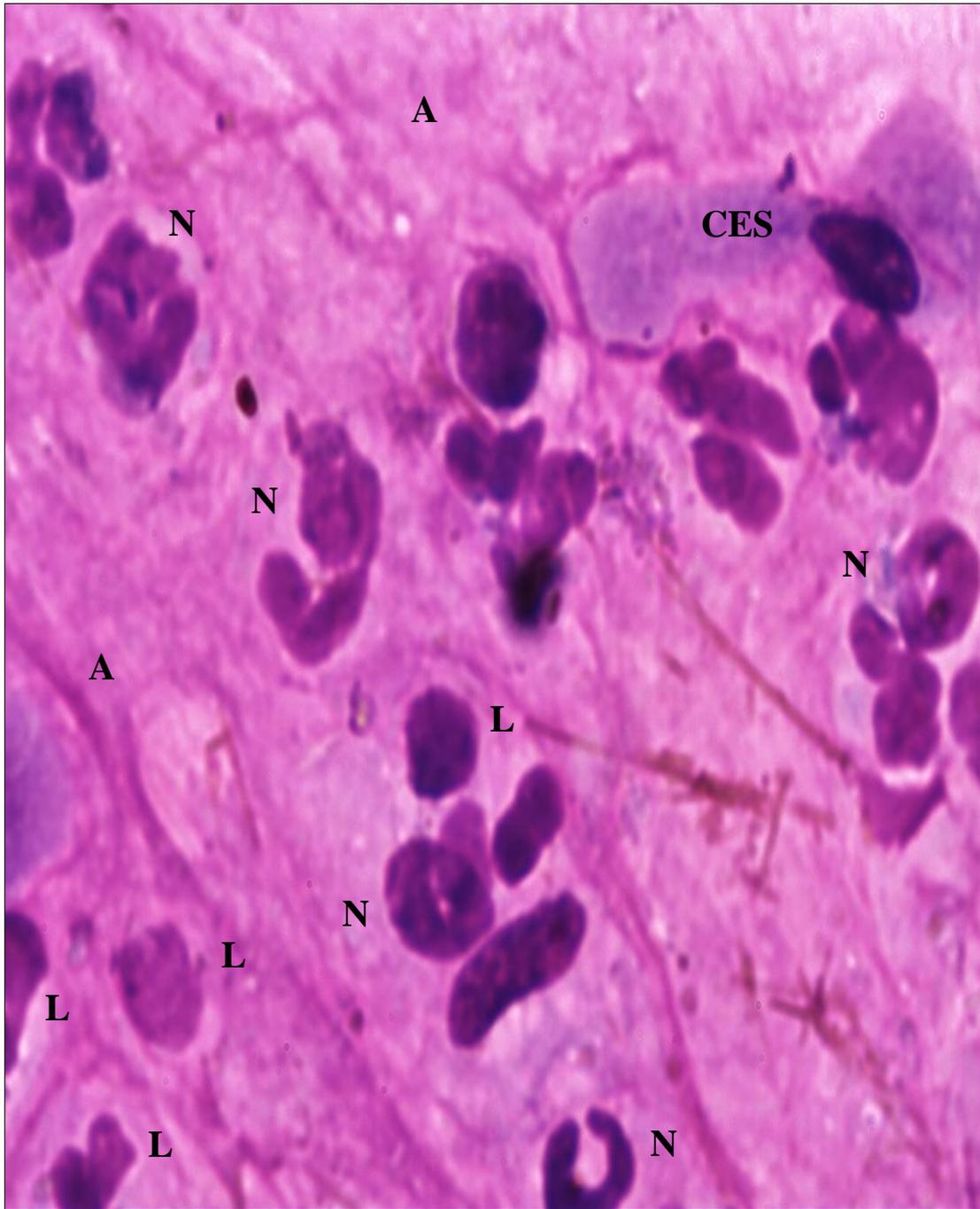


Figura 7. Microfotografía digital de citología de lavaje traqueobronquial en caballo de grupo I: Se observa fondo basófilo con abundante muco (A). Presencia de linfocitos (L) polimorfonucleares neutrófilos (N) y célula epitelial superficial (CES). Tinción 15 (Diff-Quik). Microscopía óptica en aumento de 1000X.

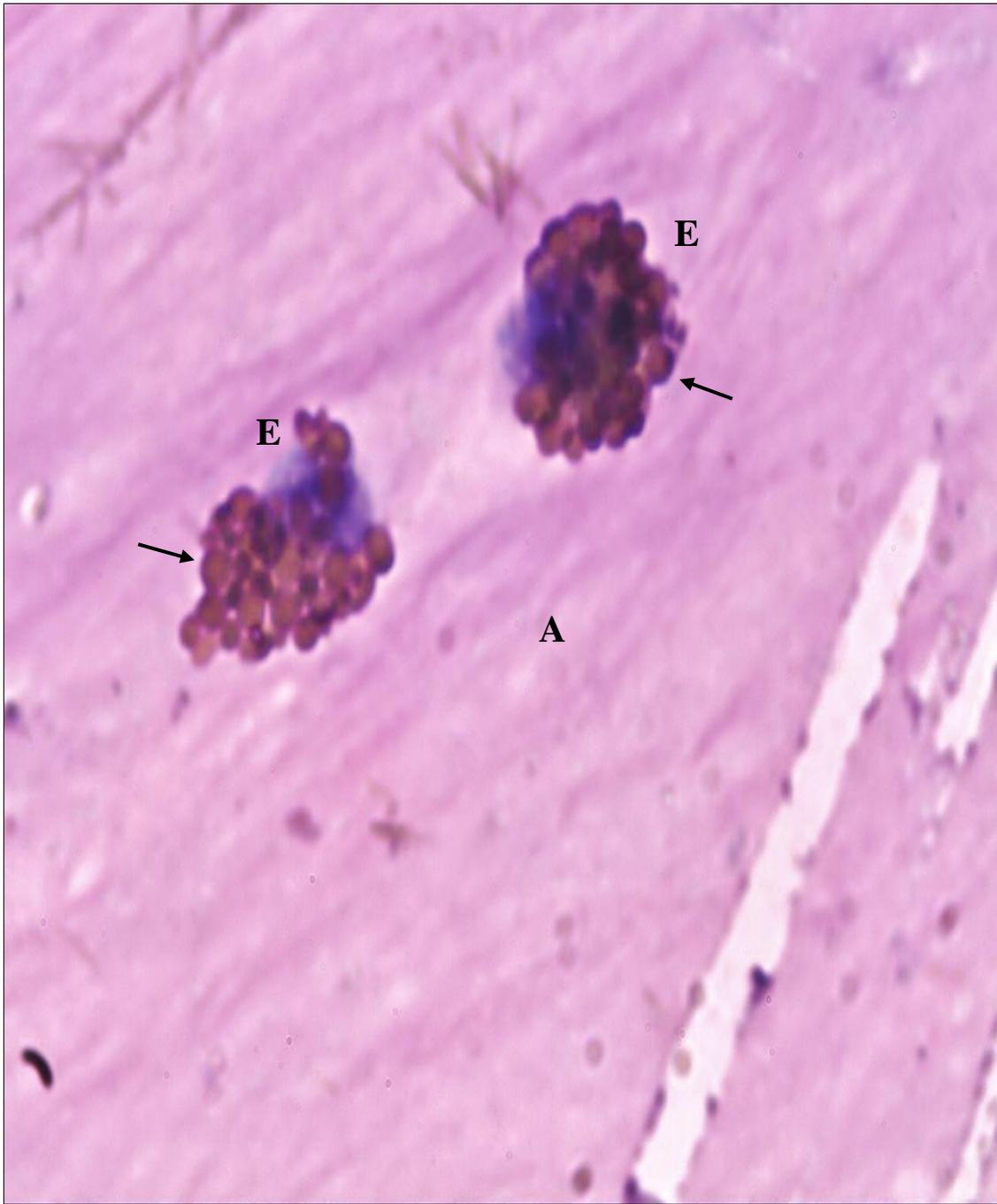


Figura 8. Microfotografía digital de citología de lavaje traqueobronquial en caballo de grupo I: Se observa gran cantidad de muco (**A**). Presencia de Eosinófilos (**E**) con gránulos característicos bien definidos (**flechas**). Tinción 15 (Diff-Quik). Microscopía óptica en aumento de 1000X.

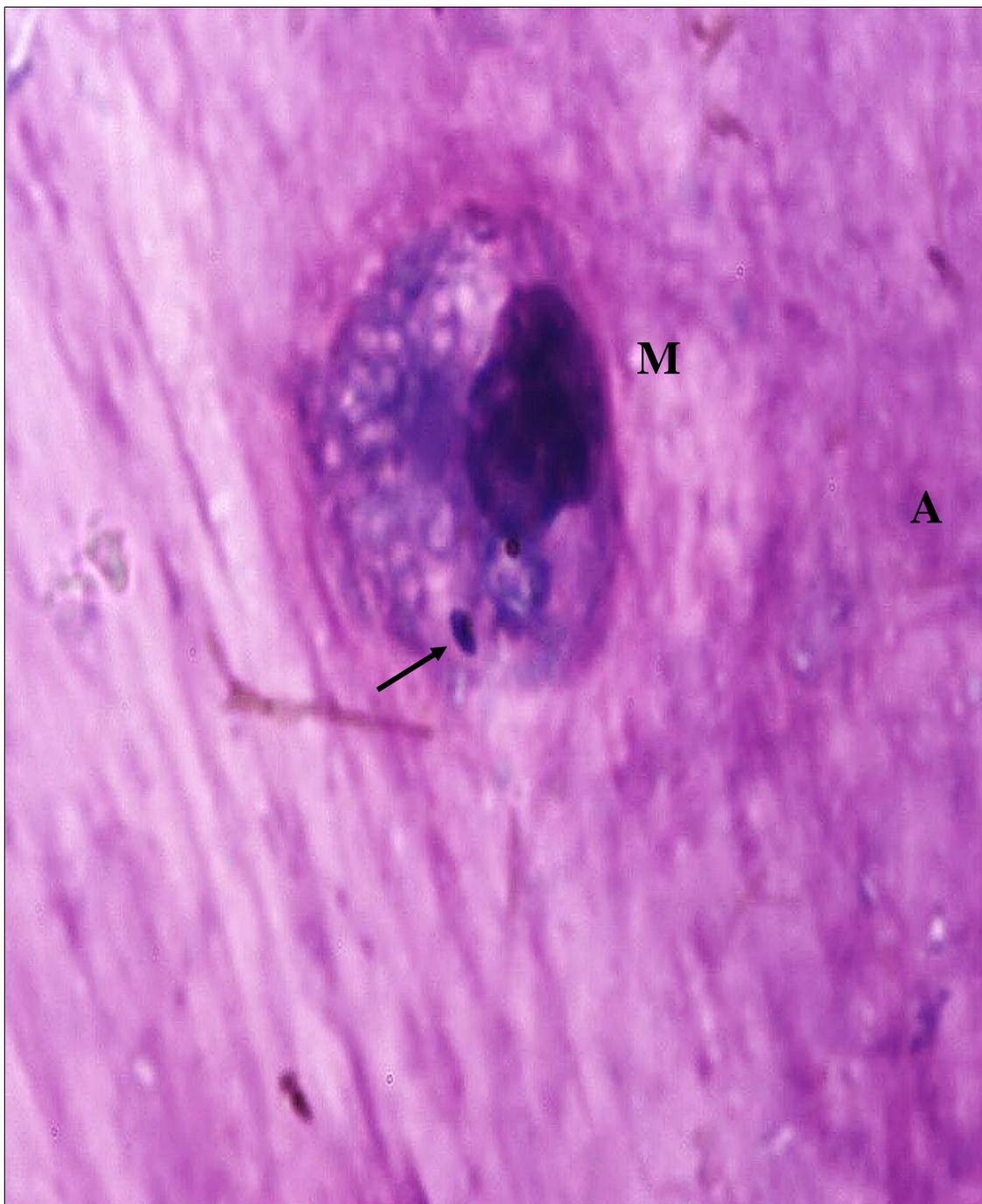


Figura 9. Microfotografía digital de citología de lavaje traqueobronquial en caballo de grupo II: Se observa fondo basófilo (A). Presencia de macrófago (M) con material fagocitado (flecha). Tinción 15 (Diff-Quik). Microscopía óptica en aumento de 1000X.

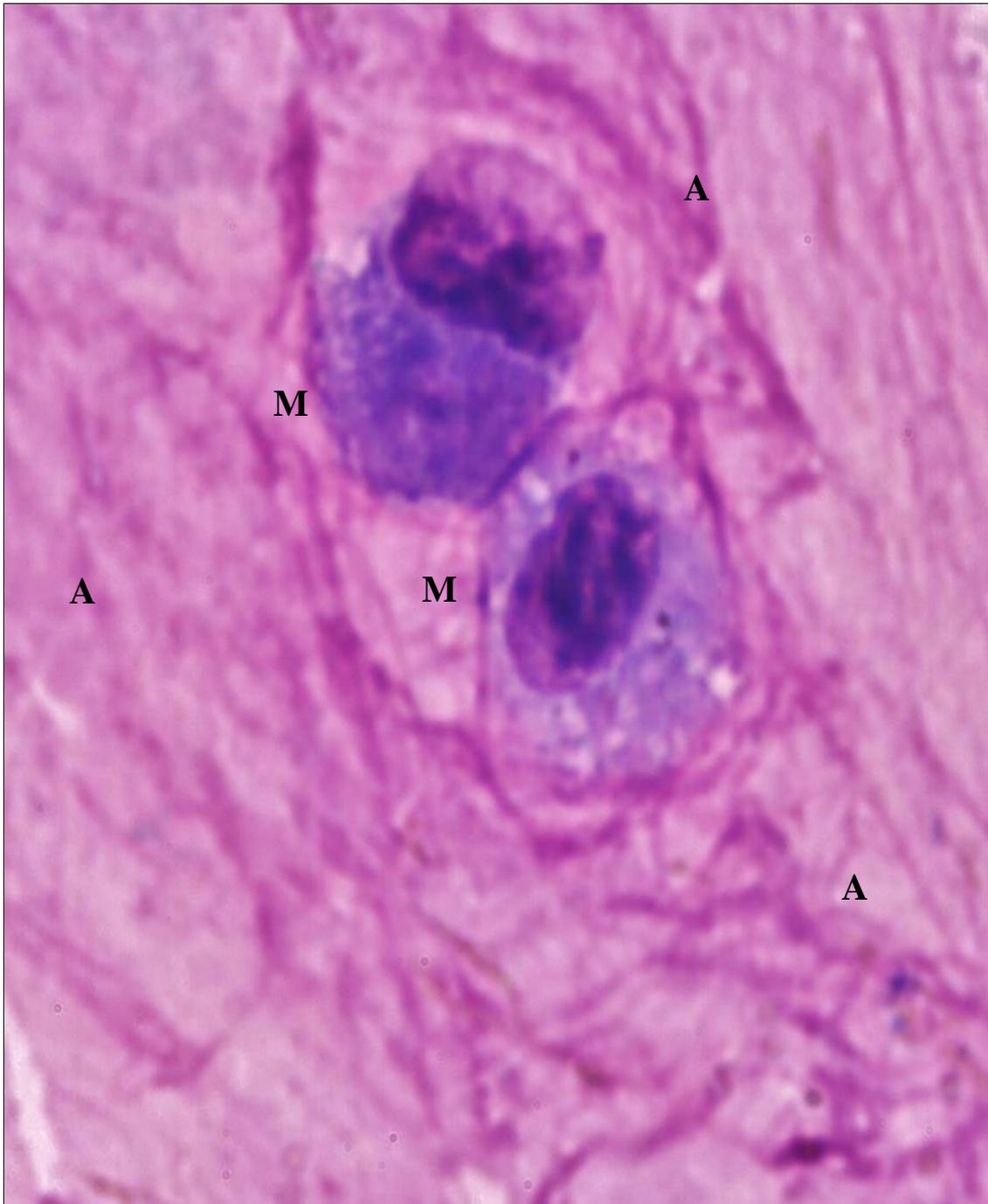


Figura 10. Microfotografía digital de citología de lavado traqueobronquial en caballo de grupo II: Se observa fondo basófilo con abundante muco (A). Presencia de macrófagos (M). Tinción 15 (Diff-Quik). Microscopía óptica en aumento de 1000X.

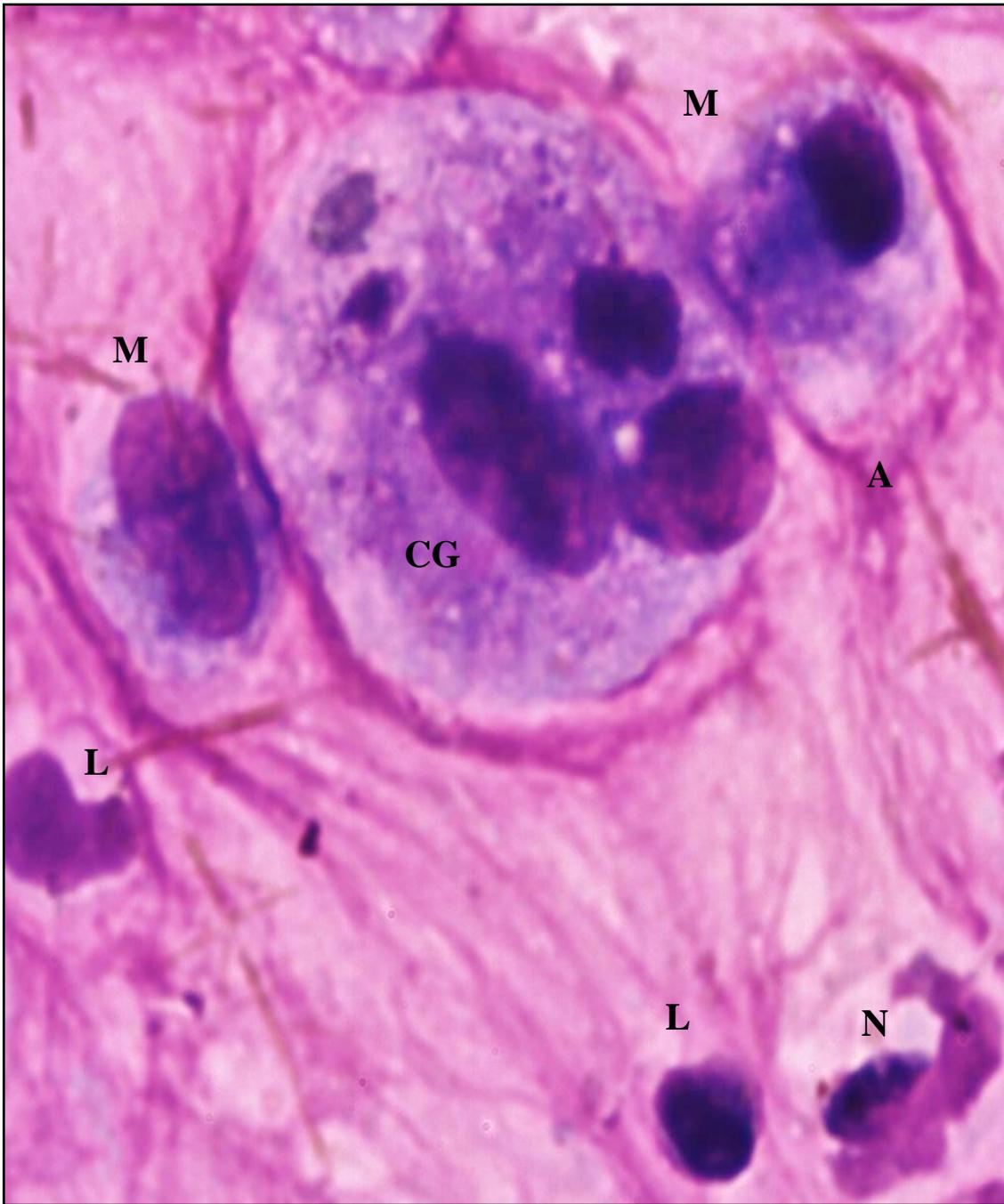


Figura 11. Microfotografía digital de citología de lavado traqueobronquial en caballo de grupo I: Se observa fondo basófilo con abundante muco (A). Presencia de célula gigante (CG), linfocitos (L), polimorfonucleares neutrófilos (N) y macrófagos (M). Tinción 15 (Diff-Quik). Microscopía óptica en aumento de 1000X.

6. DISCUSIÓN.

Los macrófagos alveolares fueron la célula predominante en las muestras obtenidas, resultado coincidente con reportes bibliográficos de referato como los de (Hoffman et al. 2002); (Viel & Hewson, 2003) y (Hodgson & Hodgson, 2007). Se pudo observar, en algunos casos la presencia de material fagocitado en su interior lo cual evidencia una actividad fagocitaria normal por parte de estas células. Esto si se tiene en cuenta que Wong et al. (1990) y Raidal et al. (2000), demostraron que la fagocitosis se reduce en el ejercicio intenso, comprometiéndose así la capacidad antimicrobiana de los macrófagos alveolares, lo que resulta en un aumento de la susceptibilidad a las infecciones respiratorias en caballos atletas.

La cantidad de neutrófilos en las vías respiratorias de los caballos testeados mostro la presencia de dichas células en pequeñas cantidades. Se considera que el porcentaje de neutrófilos en las vías respiratorias de los caballos sanos debe ser menor de un 20% en el lavaje traqueobronquial según (Hodgson & Hodgson, 2007); (Hoffman et al. 2003), lo cual fue confirmado a través de nuestra experiencia. Aunque el porcentaje de linfocitos fue variable para ambos grupos de caballos testeados, las cantidades reportadas en nuestra experiencia no superaron en ningún caso el 10% de las células totales, coincidiendo con los datos de (Hodgson & Hodgson, 2007); (Hoffman et al, 2003).

Los eosinófilos se encuentran en un número muy bajo (0% - 2%) en el TW y BAL de los caballos adultos clínicamente sanos (Hodgson & Hodgson, 2007). Las cantidades de eosinófilos obtenidas no sobrepasaron 0.5% del total celular. Un posible aumento de su porcentaje en el fluido se considera generalmente como un

hecho transitorio, este hallazgo es improbable que se repita, incluso realizar un nuevo cultivo 24 horas después (Hewson & Viel, 2003).

La eosinofilia se ha observado también en la secreción de caballos corredores que mostraron hiperreactividad bronquial al ejercicio, y que también mostraron mayores niveles de óxido nítrico en el aliento y la exacerbación de los síntomas inducidos por el ejercicio (Verges et al. 2005).

Los mastocitos también se encontraron en pequeñas cantidades en los caballos testeados, lo anteriormente dicho puede estar correlacionado con el hecho de que su identificación se ve facilitada por el uso de colorantes especiales, tales como azul de toluidina y Leishmann (Hewson & Viel, 2002); (Hodgson & Hodgson, 2007); (Hughes et al 2003.).

El recuento total de células nucleadas (NTCN) no cambia después de un entrenamiento extenuante, pero está influenciado por el entrenamiento. Las muestras obtenidas de los caballos de carrera, después de un período de entrenamiento, mostraron un NTCN más alto que antes (Raidal et al. 2000). También, un estudio en los potros jóvenes carreras de PSI donde el TW se cosechó 24 horas después de un ejercicio intenso, se puede observar un aumento significativo en NTCN en comparación con el grupo de control (Michelotto junior et al, 2008). En el presente trabajo se encontraron valores que en ningún momento sobrepasaron el rango de referencia considerado normal por el Laboratorio de salud animal de la Universidad de Guelph, que es de $0,4 \times 10^9$ células / litro. (4000 cl nucl / mm³).

7. CONCLUSIÓN.

Las principales células involucradas en el proceso inflamatorio como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos no mostraron diferencias significativa en para ningún grupo de los caballos estudiados, lo que sugiere que el ejercicio no impactó de manera significativa el porcentaje de células inflamatorias. Esto aunado al hecho de que ambos grupos de caballos se encontraban bajo condiciones idénticas, tanto medioambientales como de manejo. La ligera diferencia de linfocitos entre los caballos que se encontraban saltando con respecto a los que no, puede deberse a una respuesta inespecífica de adaptación al ejercicio.

En cuanto al porcentaje de células epiteliales se puede decir que a pesar de la escasez de datos bibliográficos de referato en caballos de salto, no se observaron cambios que sugieran un aumento de células provocado por el ejercicio.

El recuento celular total no mostro alteración significativa en ninguno de los caballos testeados.

La presente experiencia confirma al lavaje traqueobronquial como un método de diagnóstico rápido, preciso y asequible que revaloriza la aplicabilidad de la citología, como ayuda diagnostica en patologías de las vías respiratorias distales así como también para futuros estudios acerca del impacto del ejercicio en la dinámica celular inflamatoria a nivel del sistema respiratorio en el equino.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. AINSWORTH, D.M. & CHEETHAM, J. (2010). Disorders of the respiratory system: diagnostic approach to respiratory disorders. In S.M. Reed, W.M. Bayly, & D.C. Sellon, *Equine internal medicine* (3rd Ed). (pp. 289-341). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
2. AINSWORTH, D.M. (2010). Review of recurrent airway obstruction (RAO Heaves): Diagnosis and treatment options. Proceedings of the American association of equine practitioners – Focus on Upper and Lower Respiratory Diseases. Salt Lake City, USA. Published in *International Veterinary Information Service*.
3. ALLEN, K. & FRANKLIN, S. (2007). RAO and IAD: Respiratory Disease In Horses Revisited. In *Practice*, (pp.29, 76-82).
4. ANON (2003). Workshop summary. In A. Hoffman, N.E. Robinson & J.F. Wade (Eds.), *Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 9. (pp. 89-91). R & W Publications, Newmarket.
5. B. C. MCGORUM, P. M. DIXON (2010). The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. Article first published online: 26 APR 2010 DOI: 10.1111/j.2042-3292.1994.tb01136.x.

6. BEECH, J. (1975). Cytology of tracheobronchial aspirates in horses. *Veterinary Patology*, v.12, n.3, (pp.157-64).
7. BEECH, J. (1991) Tracheobronchial aspirates. In: *Equine respiratory disorders*, Philadelphia: Lea & Febiger. (pp.41-53).
8. BURRELL, M.H., WOOD, J.L.N., WHITWELL, K.E., CHANTER, N., MACKINTOSH, M.E. & MUMFORD, J.A. (1996). Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationships between disease and viruses, bacteria and environment. *Veterinary Record*, 139, (pp.308-313).
9. CHAPMAN, P.S., GREEN, C., MAIN, J.P.M., TAYLOR, P.M., CUNNINGHAM, F.M., COOK, A.J.C. & MARR, C.M. (2000). Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. *Veterinary Record*, 146, (pp.91-95).
10. CHRISTLEY, R.M. & RUSH, B.R. (2007). Inflammatory airway disease. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 591-600). Philadelphia: Elsevier Saunders.
11. CHRISTLEY, R.M., HODGSON, D.R., ROLSE, R.J., REID, S.W.J. & HODGSON, J.L. (1999). Comparison of bacteriology and cytology of tracheal fluid samples collected by percutaneous transtracheal aspiration or

- via an endoscope using a plugged, guarded catheter. *Equine Veterinary Journal*, 31 (3), (pp.197-202).
- 12.** COSTA, L.R.R. (2012). Summer pasture-associated recurrent airway obstruction. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (pp. 591-593). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- 13.** COUËTIL, L.L., HOFFMAN, A.M., HODGSON, J., BUECHNER-MAXWELL, V., VIEL, L., WOOD, J.L.N & LAVOIE, J.P. (2007). Inflammatory airway disease of horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, (pp. 356-361).
- 14.** DAVIS, E. & RUSH, B.R. (2002). Equine recurrent airway obstruction: pathogenesis, diagnosis and patient management. *The Veterinary Clinics, Equine Practice*, 18, (pp.453-467).
- 15.** DAVIS, E.C. (2007). Respiratory infections. In D.C. Sellon, & M.T., Long, *Equine infectious diseases*. (pp. 1-13). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- 16.** DENICOLA, D.B. (2007). Introduction to cytologic interpretation. *Proceedings of the North American veterinary Conference, Orlando, Florida, 13-27 January*, (pp. 232-238). Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service.
- 17.** DIVERS, *Equine emergencies: treatment and procedures (3rd Edition)*. (pp. 565-588). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

18. DIXON, P.M., MCGORUM, B.C. & PIRIE, R.S. (2003). Inflammatory airway disease: European clinicians' perspective. In A. Hoffman, N.E. Robinson & J.F. Wade (Eds.), *Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 9. (pp. 7-8). R & W Publications, Newmarket.
19. DURANDO, M. (2012). Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (pp.192-193). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
20. FERNANDES, W.R., MORI, E. SANCHES, A. (2000). Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.6, (pp.604-609).
21. FRENCH, C.A. (2009). Respiratory tract. In E.S. Cibas & B.S. Ducatman, *Cytology Diagnostic Principles and Clinical Correlates (3rd Ed.)*. (pp. 65-70). Philadelphia: Saunders Elsevier.
22. GERBER, V. & ROBINSON, N.E. (2007). Airway secretions and mucociliary function. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 55-69). Philadelphia: Elsevier Saunders.
23. GHIO, A.J. (2003). Aetiological agents: outdoor environment and airways. In A. Hoffman, N.E. Robinson & J.F. Wade (Eds.), *Workshop on*

- Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 9. (pp.29-30). R & W Publications, Newmarket.
24. GONÇALVES, R.C. (2004). Semiologia do sistema respiratório. In F.L.F. Feitosa, Semiologia Veterinária, a Arte do Diagnóstico. (pp. 314-331). São Paulo: Editora Roca.
25. HINCHCLIFF, K.W. (2007). Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), Equine Respiratory Medicine and Surgery. (pp. 619-629). Philadelphia: Elsevier Saunders.
26. HODGSON, J.L & HODGSON, D.R. (2007). Collection and analysis of respiratory tract samples. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), Equine Respiratory Medicine and Surgery. (pp.119-149). Philadelphia: Elsevier Saunders.
27. HODGSON, J.L. (2006). Collection and interpretation of tracheal wash and bronchoalveolar lavage for diagnosis of infectious and non-infectious lower airway disorders. Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association, Marrakech, Morocco, 22 – 26 January. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service.
28. HODGSON, J.L.; HODGSON, D.R. (2007) Collection and analysis of respiratory tract samples. In: MCGORUM, B.C.; DIXON, P.M.; ROBINSON,

- N.E.; SCHUMACHER, J. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Philadelphia: Saunders, (pp. 119-150).
29. HOFFMAN, A. (2002). Newest diagnostic methods for inflammatory airway disease. In: *Annual Convention of the AAEP Proceedings*, vol. 48. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service.
30. HOFFMAN, A.M. (2008). Bronchoalveolar lavage: Sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *The Veterinary Clinics - Equine Practice*, (pp.423-435).
31. HOLCOMBE, S.J., JACKSON, C., GERBER, V., JEFCOAT, A., BERNEY, C., EBERHARDT, S. & ROBINSON, N.E. (2001). Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Veterinary Journal*, 33 (3), (pp.244-249).
32. HOROHOV, D.W. (2004). Immunology of the equine lung. In P. Lekeux (Ed.), *Equine Respiratory Diseases*. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service.
33. HUGHES, K.J., MALIKIDES, N., HODGSON, D.R. & HODGSON, J.L. (2003). Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses. Evaluation of cytological stains and the percentage of mast cells and eosinophils. *Australian Veterinary Journal*, 81 (11), (pp.681-684).

34. J.F. WADE (EDS.), Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 9. (pp. 33-36). R & W Publications, Newmarket.
35. JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. (2004). Aparelho respiratório. (pp. 339-357). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.
36. KUSANO, K., HOBBO, S., ODE, H. & ISHIKAWA, Y. (2008). Tracheal endoscopic and cytological findings and blood examination results in thoroughbred racehorses suspected to have lower respiratory tract disease. *Journal of Equine Science*, 19 (4), (pp.97-102).
37. LANGSETMO, I., FEDDE, M.R., MEYER, T.S. & ERICKSON, H.H (2000). Relationship of pulmonary arterial pressure to pulmonary haemorrhage in exercising horses. *Equine Veterinary Journal*, 32, (pp. 379-384).
38. LAVOIE, J.P. (2007). Recurrent airway obstruction (heaves) and summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 565-589). Philadelphia: Elsevier Saunders.
39. LECLERE, M., DESNOYERS, M., BEAUCHAMP, G. & LAVOIE, J.P. (2006). Comparison of four staining methods for detection of mast cells in equine bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, (pp.377-381).

40. LUNN, D.P., BREATHNACH, C. & SOBOLL, G. (2007). Immunology and immunopathology. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp.71-81). Philadelphia: Elsevier Saunders.
41. MAIR, T.S. (1996). Obstructive pulmonary disease in 18 horses at summer pasture. *Veterinary record*, 138, (pp.89-91).
42. MANSMANN, R.A., KNIGHT, H.D. (1972). Tracheal aspiration in the horse. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.160, n.11, (pp.1527).
43. MARLIN, D.J. & VICENT, T.L. (2007). Pulmonary blood flow. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp.33-42). Philadelphia: Elsevier Saunders.
44. MAZAN, M.R. & TIZARD, I. (2012). Airway obstruction, recurrent. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (pp.16-17). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
45. MCGORUM, P.M. DIXON, N.E. & J. SCHUMACHER (EDS.) (1993), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp.591-600). Philadelphia: Elsevier Saunders.
46. MCGORUM, P.M. DIXON, N.E. ROBINSON & J. SCHUMACHER (EDS.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp.287-326). Philadelphia: Elsevier Saunders.

47. MICHELOTTO JÚNIOR, P.V.; KAISELER, P.; SILVA, F.T.; CRUZ, L.A.; MUEHLMANN, L.A.; ZANATTA, A.L.; KOZEMJAKIN, D.A. (2008). Total and differential cell count of the BALF from thoroughbred colts in three different conditions: natural condition, environment challenged and exercise challenged.
48. NATHAN M. (2004). Atlas Of Equine Endoscopy. Mosby An Affiliate of Elsevier. (p.108) Philadelphia, PA, USA.
49. NEWTON, J.R., WOOD, J.L. & CHANTER, N. (2003). A case control stud of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK thoroughbred racehorses. Preventive Veterinary Medicine, 60, (pp.107-132). Elsevier.
50. PILETTE, C., OUADRHIRI, Y., GODDING, V., VAERMAN, J.P. & SIBILLE, Y. (2001). Lung mucosal immunity: immunoglobulin A revisited. In M. Spiteri & L.P. Nicol (Eds.), Series "Lung infection and lung immunity", number 1. European Respiratory Journal, 18, (pp.571-588).
51. PUSTERLA, N., WATSON, J.L. & WILSON, W.D. (2006). Diagnostic approach to infectious respiratory disorders. Clinical Techniques in Equine practice, 5, (pp.174-186).
52. RADOSTITIS, O.M., GAY, C.C., HINCHCLIFF, K.W. & CONSTABLE, P.D. (2009). Diseases of the respiratory system. Veterinary medicine: a textbook

- of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses (10th ed). (pp.470-519). London, UK: W.B. Saunders Elsevier.
53. RAIDAL, S.L.; LOVE, D.N.; BAILEY, G.D.; ROSE, R.J. (2000). The effect of high intensity exercise on the functional capacity of equine pulmonary alveolar macrophages and BAL-derived lymphocytes. *Research in Veterinary Science*, v. 68, (pp. 249-253).
54. RASKIN, R.E., MEUTEN, D.J. & REBAR, A.H. (2005). General principles of cytologic respiratory disorders. *Clinical Techniques in Equine practice*, 5, (pp.174-186).
55. RICHARD, E.A., FORTIER, G.D., LEKEUX, P.M. & VAN ERCK, E. (2010). Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly-performing horse. *The Veterinary Journal*, 185, (pp.115-122).
56. ROBINSON, N.E. & FURLOW, P.W. (2007). Anatomy of the respiratory system. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 3-18). Philadelphia: Elsevier Saunders.
57. ROBINSON, N.E. (2001). International workshop on equine chronic airway disease. 16-18 June 2000, Michigan State University. *Equine Veterinary Journal*, 33, (pp.5-19).
58. ROBINSON, N.E. (2008). Equine COPD, heaves, RAO, IAD: understanding the phenotypes of equine airway disease. In *Proceeding of the Southern*

European Veterinary Conference, 17-19 October, Barcelona, Spain.
Published in International Veterinary Information Service.

59. ROY, M.F. & LAVOIE, J.P. (2003). Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. *The Veterinary Clinics – Equine Practice*, 19, (pp.1-17).
60. RUSH, B. & MAIR, T. (2004). *Equine respiratory disease (1st Ed.)*. (pp. 1-9; 237-240; 291-294) Oxford: Blackwell Science Ltd.
61. SANTOS, L. C. P.; MICHELOTTO-JÚNIOR, P. V.; KOZEMJAKIN, D. A. (2007). Achados endoscópico e citológico das vias respiratórias de potros puro sangue inglês em início de treinamento no Jóquei Clube do Paraná. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia Unipar*, v.10, n.1, (pp.9-13).
62. SCHAER & ORSINI. (2007). *Equine emergencies: treatment and procedures (3rd Edition)*. (pp. 436-439). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
63. TAYLOR, I.G.R., BRAZIL, T.J. & HILLYER, M.H. (2010). Respiratory diseases. In *Diagnostic techniques in equine medicine (2nd Ed.)*. (pp. 217-248). London: Saunders Elsevier.
64. VAN ERCK, E. (2009). Sampling the respiratory tract: Techniques and interpretation. In *11th Geneva Congress on Equine Medicine and Surgery*, Westergren, Belgium, 15-17 December. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service.

65. VERGÈS, S.; DEVOUASSOUX, G.; FLORE, P.; ROSSINI, E.; FIOR-GOZLAN, M.; LEVY, P.; WUYAM, B. (2005). Bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation, and airflow limitation in endurance athletes. *Chest*, v. 127, (pp. 1935-1941).

66. VOSS, E. & SEAHORN, T. (2004). Tracheobronchoscopy. In N.M. Slovis, *Atlas of equine endoscopy*. (pp. 97-118). St. Louis, Missouri: Mosby.

67. WILFONG, D. & WALDRIDGE, B. (2009). Technical procedures. In D. Reeder, S. Miller, D. Wilfong, M. Leitch & D. Zimmel (Eds.), *American association of equine veterinary technicians and assistants. Equine manual for veterinary technicians*. (pp. 305-310). Ames, Iowa: Wiley- Blackwell.

68. WONG, C.W.; THOMPSON, H.L.; THONG, Y.W.; THORNTON, J.R. (1990). Effect of strenuous exercise stress on chemiluminescence response of equine alveolar macrophage. *Equine Veterinary Journal*, v. 22, n.1, (pp. 33-35).

69. ZINKL, J.G. (2002). Lower respiratory tract. In R.L. Cowell & R.D. Tyler (Eds.), *Diagnostic cytology and hematology of the horse (2nd Edition)*. (pp. 73-86). St. Louis, Missouri: Mosby.