



Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio

---

## **TRABAJO FINAL**

### ***Título***

"Citología comparada del líquido obtenido por lavaje bronco-alveolar 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"

### ***Autor***

*Mariel S. Frezza M.V.*

### ***Director***

*Dr. Marcos Muriel*

### ***Codirector***

*MSc. Hugo O. Hernández*

### ***Lugar de realización***

*Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales, Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata*

**Año 2017**



## **Agradecimientos**

Este trabajo no hubiera sido posible sin los profesionales del Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales, Hospital Escuela de la FCV-UNLP, quienes no sólo me guiaron y ayudaron a formar los cimientos en el comienzo de mi carrera como médica veterinaria, sino que años más tarde volvieron a abrirme las puertas, sin cuestionamientos ni condiciones, para continuar mi formación realizando este trabajo de especialización. Gracias a todos los veterinarios que forman parte del hospital por su generosidad y por impulsarme a crecer aportando su experiencia: Marcos, Hugo, Ramón, Viole, Roque, Marcelo, Juan, Vero y Pato, es un honor haber compartido el espacio de trabajo con ustedes. Un agradecimiento especial a Ramón López por facilitarme las endoscopías, a Silvia Olguin por las radiografías y al servicio de laboratorio por prestarme parte de los materiales necesarios para la realización del trabajo.

A mi director, el Dr. Marcos Muriel, por desafiarme a pensar estimulando discusiones y por la libertad con que me permitió llevar a cabo el trabajo.

A mi codirector, MSc. Hugo Hernández, por ayudarme siempre a sobrepasar los obstáculos y motivarme.

Gracias a ambos por la paciencia, por estar siempre dispuestos a escucharme, por la ayuda desinteresada y por haberme transmitido tantos conocimientos, los admiro profundamente.

Un gran agradecimiento a quien fue mi mano derecha en esta travesía, Maru Goñi, un placer trabajar con vos, gracias por tu dedicación, entusiasmo y por ser un cable a tierra junto a Fabi Begher, no hubiera sido lo mismo sin su compañía.

A mis compañeros de la especialización y a los profesores que nos acompañaron en este camino, gracias por la experiencia compartida.

A los caballos, especialmente a los participantes de este trabajo, que me ayudan día a día a descubrir quién soy y me enseñan lo que es la humildad, la valentía y el honor.

Por último, pero definitivamente no menos importante, gracias a mi familia, por el apoyo incondicional a lo largo de mi vida y por enseñarme a nunca bajar los brazos. A mis amigos y esas personas que se cruzaron por mi camino y que, aún sin saberlo, forman parte de quien soy hoy...Gracias.

# Índice

Agradecimientos .....	1
Índice .....	2
Índice de Figuras .....	4
Índice de Tablas .....	5
Índice de Gráficos.....	6
1. Introducción.....	7
1.1 Técnica del Lavaje Bronco-alveolar .....	8
1.2 Procesamiento de la muestra .....	12
1.3 Evaluación de la muestra .....	14
1.3.1 Examen Macroscópico .....	14
1.3.2 Recuento Celular Total.....	14
1.3.3 Recuento Celular Diferencial-Relativo .....	15
1.3.4 Células .....	17
1.3.4.1 Macrófagos.....	17
1.3.4.2 Linfocitos .....	18
1.3.4.3 Neutrófilos .....	19
1.3.4.4 Mastocitos .....	19
1.3.4.5 Células Basofiloides .....	20
1.3.4.6 Eosinófilos.....	20
1.3.4.7 Células Epiteliales .....	21
1.4 Interpretación de la citología de BAL.....	24
1.4.1 Hemorragia Pulmonar.....	24
1.4.1.1 Hemorragia Pulmonar Inducida por el Ejercicio .....	24
1.4.2 Inflamación Séptica.....	25
2. Hipótesis Y Objetivos.....	33
2.1 Hipótesis de trabajo.....	33
Hipótesis 1 .....	33
Hipótesis 2.....	33
2.2 Objetivo General .....	33



2.2.1 Objetivos Particulares .....	33
3. Materiales Y Métodos .....	34
3.1 Animales .....	35
3.1.1 Criterios de inclusión .....	36
3.2 Técnica del lavado broncoalveolar .....	36
3.3 Procesamiento de la muestra .....	37
3.4 Evaluación Citológica .....	37
3.4.1 Criterios en la interpretación de la citología del BALF .....	38
3.5 Análisis de datos .....	38
4. Resultados .....	39
5. Discusión .....	52
6. Conclusiones .....	64
Apéndice 1 .....	66
Apéndice 2: Materiales y Métodos .....	68
Apéndice 3: Equinos Sintomáticos .....	70
Apéndice 4: Equinos Asintomáticos .....	77
7. Bibliografía .....	79

## Índice de Figuras

<i>Figura 1:</i> Esquematización del lavaje broncoalveolar con sonda nasobronquial (técnica a ciegas). .....	10
<i>Figura 2:</i> Macrófagos no activados en el BALF. ....	17
<i>Figura 3:</i> Célula gigante multinucleada en el BALF. ....	17
<i>Figura 4:</i> Hemosiderófagos en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X). ....	18
<i>Figura 5:</i> Linfocitos en el BALF.....	18
<i>Figura 6:</i> Neutrófilos en el BALF. ....	19
<i>Figura 7:</i> Mastocitos en el BALF. ....	20
<i>Figura 8:</i> Eosinófilos en el BALF. ....	21
<i>Figura 9:</i> Acumulo de células epiteliales columnares ciliadas en el BALF. ....	21
<i>Figura 10:</i> Acumulo de células caliciformes y epiteliales columnares ciliadas en el BALF. ....	22
<i>Figura 11:</i> Espiral de Curschmann en el BALF. ....	22
<i>Figura 12:</i> Célula epitelial escamosa, linfocitos y macrófagos en el BALF. ....	23
<i>Figura 13:</i> Espora de <i>Alternaria</i> spp. en el BALF. ....	23

## Índice de Tablas

<i>Tabla 1:</i> Valores de referencia utilizados para la interpretación de la citología del BALF. ....	38
<i>Tabla 2:</i> Resultados de la citología del primer BAL de los equinos asintomáticos. ....	46
<i>Tabla 3:</i> Rango y promedio del recuento celular relativo del primer BAL de los equinos asintomáticos. ....	47
<i>Tabla 4:</i> Resultados de la citología del segundo BAL de los equinos asintomáticos. ...	48
<i>Tabla 5:</i> Rango y promedio del recuento celular relativo del segundo BAL de los equinos asintomáticos. ....	49
<i>Tabla 6:</i> Valores de referencia (promedio $\pm$ DS) de la citología del fluido del lavaje broncoalveolar (BALF) en equinos 'control' (Richard y col., 2010). ....	66
<i>Tabla 7:</i> Similitudes y diferencias entre el asma equino y humano. (Barton y Gehlen, 2016).....	66
<i>Tabla 8:</i> Características típicas del síndrome del asma equino. (Couëtil y col., 2016). 67	

## Índice de Gráficos

<i>Gráfico 1:</i> Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 1.....	39
<i>Gráfico 2:</i> Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 2.....	40
<i>Gráfico 3:</i> Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 3.....	41
<i>Gráfico 4:</i> Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 4.....	42
<i>Gráfico 5:</i> Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 5.....	43
<i>Gráfico 6:</i> Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 6.....	44
<i>Gráfico 7:</i> Comparación del promedio del recuento celular relativo del 1er BAL de los animales asintomáticos con cada animal sintomático (1-6).....	45
<i>Gráfico 8:</i> Recuento celular relativo de la citología del primer BAL de los equinos asintomáticos.....	47
<i>Gráfico 9:</i> Valores promedio del recuento celular relativo del primer BAL del grupo de equinos asintomáticos. ....	47
<i>Gráfico 10:</i> Comparación del promedio del recuento celular relativo del primer y segundo BAL de los equinos asintomáticos.....	49
<i>Gráfico 11:</i> Comparación del recuento celular relativo del primer (día 0) y segundo BAL (día 30) del equino asintomático 1. ....	50
<i>Gráfico 12:</i> Comparación del recuento celular relativo del primer (día 0) y segundo BAL (día 30) del equino asintomático 2. ....	50
<i>Gráfico 13:</i> Comparación del recuento celular relativo del primer (día 0) y segundo BAL (día 30) del equino asintomático 3. ....	50
<i>Gráfico 14:</i> Comparación del recuento celular relativo del primer (día 0) y segundo BAL (día 30) del equino asintomático 4. ....	51
<i>Gráfico 15:</i> Comparación del recuento celular relativo del primer (día 0) y segundo BAL (día 30) del equino asintomático 5. ....	51

## 1. Introducción

El lavaje broncoalveolar (difundido en la literatura con las siglas en inglés “BAL” de Broncho Alveolar Lavage) permite la toma de muestras de las vías aéreas distales y se utiliza para el diagnóstico de enfermedad pulmonar difusa, particularmente de causas no infecciosas (Rush y Mair, 2004; Hodgson y Hodgson, 2007). En estos casos, las muestras colectadas de cualquiera de los dos pulmones son consideradas representativas de ambos (McGorum y Dixon, 1994). El BAL colecta células, proteínas extracelulares y otras moléculas de la superficie epitelial del alvéolo y vías aéreas inferiores (Pickles y col., 2002). Esta técnica se ha utilizado para la caracterización de la prevalencia y consecuencias clínicas de la inflamación de las vías aéreas bajas en equinos y para estudiar los aspectos temporales de los mediadores de la inflamación (citoquinas, mieloperoxidasas, proteasas/antiproteasas) en la Inflamación de las Pequeñas Vías Aéreas (IPA) y la Obstrucción Recurrente de las Vías Aéreas (ORA), así como los potenciales tratamientos para estas afecciones (Hoffman, 2008). También ha permitido la cuantificación del sangrado de las vías aéreas en caballos con sospecha de Hemorragia Pulmonar Inducida por el Ejercicio (HPIE), el análisis de los factores de riesgo (intensidad del ejercicio, inclinación del terreno) y los tratamientos posibles (Hoffman, 2008).

Las principales indicaciones para su realización son los problemas respiratorios de las vías aéreas bajas que cursan con tos, diferentes tipos de secreciones por ambos ollares, epistaxis tras el esfuerzo o presencia de disnea. En ocasiones también está indicada, aunque los signos respiratorios típicos están ausentes, cuando existe una evidencia de baja en el rendimiento deportivo (Lucas, 2012).

Esta técnica es más representativa que la citología del lavaje transtraqueal en el análisis de caballos sanos y aquellos con enfermedad respiratoria crónica (Derksen y col., 1989) y ha demostrado una buena correlación con la histopatología pulmonar (McGorum y Dixon, 1994). Sin embargo, representa solo el proceso presente en el segmento pulmonar lavado y por lo tanto, puede no reflejar de manera adecuada la severidad de la inflamación pulmonar o puede ser normal en caballos con enfermedad pulmonar no difusa o localizada. Otra desventaja de esta técnica comparada con el lavaje transtraqueal es que no permite el cultivo bacteriológico debido a la inevitable contaminación con la flora nasofaríngea al introducir la sonda o endoscopio a través de las vías aéreas superiores (Rush y Mair, 2004).

Existen dos técnicas, una “visual” mediante un endoscopio flexible y otra “a ciegas” utilizando una sonda broncoalveolar. La sonda pasada a ciegas generalmente entra en el pulmón derecho, en el área caudo-dorsal, llegando hasta un bronquio de cuarta o quinta generación (Hoffman, 2008), mientras que por vía endoscópica se

puede seleccionar el sitio de lavado (McGorum y Dixon, 1994). Si bien el BAL no debe ser utilizado en casos de procesos localizados, como un absceso, la técnica endoscópica permite la selección del sitio de lavado en función de la enfermedad que se sospeche (por ejemplo, craneoventral en caso de neumonía por aspiración o caudodorsal en caso de HPIE) (Hewson y Viel, 2002).

Las contraindicaciones para esta técnica incluyen equinos con signos de exacerbación de ORA, marcada taquipnea o disnea, mucosas cianóticas, debilidad, hipotensión, arritmias cardíacas, hipoxemia significativa o tos paroxística (Hoffman, 2008).

La técnica es segura y lo suficientemente sensible para detectar inflamación a nivel citológico, pero no está definitivamente estandarizada, encontrando amplias variaciones en aspectos tales como el volumen de lavado, técnica, elección de la alícuota para análisis, conservación y preparación de la muestra (Hoffman, 2008; Depecker y col., 2014).

## **1.1 Técnica del Lavaje Bronco-alveolar**

El BAL se realiza con el animal en estación luego de una sedación suave utilizando  $\alpha 2$  agonistas, como la Xilacina, Romifidina o Detomidina, que presentan propiedades broncodilatadoras, disminuyendo la tos y broncoespasmo (Lessa y col., 2008). En caso de caballos con signología severa de ORA o marcada hiperreactividad de las vías aéreas, se puede combinar con Butorfanol (0,01-0,02 mg/kg) para aliviar la tos en respuesta al pasaje de la sonda o broncoscopio (Hewson y Viel, 2002). La utilización de broncodilatadores inhalatorios previo al BAL reduce el riesgo de broncoconstricción y tos durante el procedimiento y dura por varias horas (Hoffman, 2008).

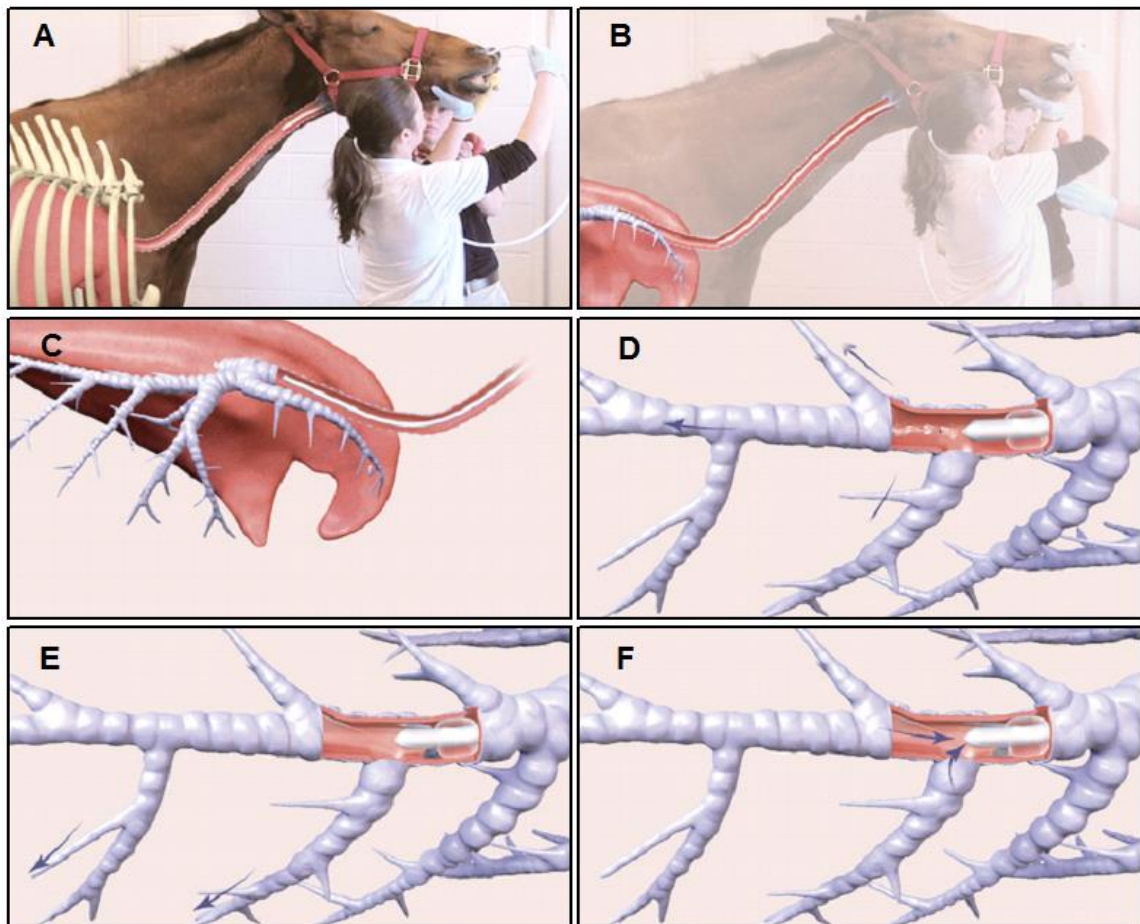
Las dos posibles técnicas, como ya se mencionó, son mediante un endoscopio largo o a ciegas utilizando una sonda nasobronquial flexible, con balón en un extremo, específica para BAL (generalmente 8-11mm de diámetro exterior; 2,4 o 3,0 m de largo, manufacturados por Cook, Bivona o Mila). El broncoscopio deberá tener un largo mínimo de 160-180 cm para permitir el lavaje de los segmentos pulmonares distales de un caballo adulto (Hodgson y Hodgson, 2007). Otro factor a tener en cuenta es que la profundidad pulmonar del lavado dependerá no solo del largo sino también del diámetro externo del endoscopio o sonda utilizada (Hewson y Viel, 2002).

La técnica endoscópica no solo permite la guía visual del endoscopio durante la recolección y el uso de sus herramientas de biopsia, sino que también permite la inspección ocular de las vías aéreas previo al lavado (Hodgson y Hodgson, 2007). Comenzando por la nasofaringe, evaluando la presencia de anomalías anatómicas o descargas y continuando por la tráquea, detectando hiperemia y

secreciones o sangre, registrando sus características de color, cantidad, y localización. También se debe prestar atención en la detección de edema, evaluando la bifurcación de la tráquea (carina), que se puede encontrar engrosada y redondeada, así como también los grandes bronquios en su punto de bifurcación. Además, permite la visualización de broncoespasmo caracterizado por la reducción del diámetro de la luz de la vía aérea. Debido a que esta evaluación es subjetiva y dependiente de la experiencia previa del observador, se han establecido sistemas semicuantitativos de grados para los diferentes hallazgos, por ejemplo el moco traqueal, para poder estandarizar los reportes (Hewson y Viel, 2002).

Para ambas técnicas, primariamente se deben higienizar las fosas nasales con una gasa húmeda y jabón neutro para así reducir la contaminación de la muestra. Debido a la estimulación de múltiples receptores de tos localizados principalmente en la unión laringo-traqueal y en la carina, un caballo normal toserá alrededor de 2 o 3 veces durante el pasaje de la sonda o broncoscopio, con una respuesta tusígena leve de 5-10 segundos, mientras que un caballo que sufra de hiperreactividad de las vías aéreas u ORA lo hará más veces, por un periodo más prolongado de tiempo (Hodgson y Hodgson, 2007). Para aliviar esta respuesta tusígena se utilizan anestésicos locales, por ejemplo, una solución diluida de lidocaína atemperada (lidocaína al 0,4%: 12ml de lidocaína al 2% diluida en agua estéril hasta un volumen total de 60 ml), que disminuye la tos luego de 30 segundos de aplicada (Hodgson y Hodgson, 2007).

Se debe avanzar el endoscopio o sonda con la cabeza del equino extendida (lo más horizontal posible, con la articulación atlanto-occipital extendida), a través del meato nasal ventral hacia la nasofaringe y tráquea. La posición de la sonda en la tráquea se puede verificar por la capacidad de aspirar aire (lo cual no es posible si se encuentra en el esófago), la ausencia de intentos de tragar y el no poder palpar o visualizar su pasaje a través del esófago, además por supuesto, de la presencia de tos (Hoffman, 2008). Luego se reposiciona la cabeza a una posición más relajada para continuar avanzando la sonda o endoscopio hasta que calce en un bronquio, detectado por la resistencia frente a los intentos, suaves, de continuar avanzando (Hoffman, 2008). En el caso de la sonda, como lo demuestra la figura 1, en este momento se insufla el balón con 5-10 ml de aire para sellar la vía aérea. Se procede entonces a realizar el lavado bronco-alveolar con solución salina estéril (NaCl 0,9%) o PBS (buffer fosfato salino) precalentada a 37°C para disminuir el broncoespasmo, permitiendo de esta manera una mejor recuperación del líquido por medio de succión leve a presión constante (Hoffman, 2008). Se debe evitar una presión negativa excesiva, particularmente en las vías aéreas inflamadas, ya que causa colapso de la luz y trauma del epitelio con gran número de glóbulos rojos en el fluido recuperado (Hewson y Viel, 2002).



**Figura 1:** Esquemización del lavado broncoalveolar con sonda nasobronquial (técnica a ciegas). (Adaptado de Equine Lower Respiratory Disease Diagnostics, UGA College of Veterinary Medicine)  
 (A)(B)(C) Pasaje de la sonda a través de la nasofaringe y tráquea con la cabeza del equino extendida. Avanzar hasta encontrar resistencia. (D)(E) Con la sonda calzada en el bronquio se insufla el balón con aire y se instila el líquido de lavado. (F) Aspirar gentilmente y a presión constante para recuperar la muestra.

Es necesario tener en consideración, que el volumen infundido influye significativamente el perfil citológico del fluido del lavado broncoalveolar (BALF), impactando en los resultados del recuento total y diferencial de células, recuperando menor porcentaje de neutrófilos a mayor volumen instilado (Hewson y Viel, 2002; Orard y col., 2016). Volúmenes bajos típicamente producen un lavado bronquial sin recuperación de células de los alvéolos y por lo tanto tienen un mayor número de neutrófilos y menor número de mastocitos (Richard y col., 2010), mientras que grandes volúmenes recuperan muestras más representativas del fluido y epitelio de revestimiento del alvéolo (Hewson y Viel, 2002). El volumen a utilizar varía considerablemente entre distintos reportes a lo largo de los últimos 20 años, por lo tanto, el *International Workshop on Equine Chronic Airway Disease* ha establecido un estándar de entre 250 a 500ml para permitir una mejor comparación entre futuros estudios (Robinson, 2001). Por lo tanto, es importante la estandarización del procedimiento del BAL, utilizando de manera consistente el mismo volumen de lavado y estableciendo valores de referencia para cada extremo del volumen recomendado (Orard y col., 2016).



En el caso de la broncoscopia el fluido puede ser instilado en dos o tres alícuotas por el canal de biopsia con recuperación entre cada alícuota utilizando jeringas de 60ml o bombas de succión con una presión de -5 a -15 cmH<sub>2</sub>O. Con la técnica a ciegas se utilizan jeringas de 60 ml para infundir el líquido de lavado, comenzando con 100 ml y luego recuperándolos y continuando con volúmenes de 60 ml por alícuota (Hewson y Viel, 2002). El volumen instilado en cada alícuota y la forma de recuperación varía según el autor. Además, aun es controversial la necesidad de analizar una o varias alícuotas para la citología del BALF (Pickles y col, 2002; Jean y col, 2011). Lo habitual es recuperar un 50-80% del líquido infundido, aunque en casos de animales con afecciones como el ORA, se pueden recuperar muy bajos volúmenes debido al colapso de la luz durante la succión como consecuencia del edema y broncoespasmo presente (Hodgson y Hodgson, 2007). Aun así, con un volumen bajo de líquido recuperado, el análisis citológico de la muestra tiene valor diagnóstico (Pickles y col., 2002; Jean y col., 2011). Una falla en la recuperación del fluido, más allá del volumen en el espacio muerto de la sonda o endoscopio, se puede deber a que los mismos queden posicionados en una bifurcación bronquial o que la tos produzca un cambio en la posición hacia otro segmento pulmonar resultando en la aspiración de aire, y ocasionalmente puede ocurrir que la sonda quede tan apretada en la vía aérea que no se pueda aspirar ni aire ni líquido, apreciando un efecto de vacío en la jeringa al intentar aspirar, en cuyo caso se deberá aspirar al mismo tiempo que se retrocede la sonda unos centímetros (McGorum y Dixon, 1994).

Las complicaciones de esta técnica son mínimas, y se considera que no produce disturbios significativos en la función pulmonar, aun así, hay autores que indican reposo y monitoreo por 24-48 hs luego del procedimiento (Hewson y Arroyo, 2015). Ocasionalmente puede desencadenar inflamación, hiperemia de la mucosa, hemorragia pulmonar leve, tos transitoria y se han observado aumentos de la temperatura rectal luego de menos de 24hs de realizado el BAL, sin efectos clínicos aparentes (McGorum y Dixon, 1994; Lessa y col., 2005). Si el animal desarrolla fiebre acompañada de depresión y falta de apetito, está indicada una reevaluación y posible tratamiento de infección pulmonar (Hewson y Arroyo, 2015).

Aún no se ha establecido un intervalo apropiado de tiempo para la repetición del BAL que permita evitar los efectos del mismo en la citología. Hay autores que no encontraron cambios significativos en el porcentaje de neutrófilos realizado el BAL a distintos intervalos de tiempo con la técnica de la sonda a ciegas; e indican que se pueden tomar muestras seriadas con un intervalo de 24hs sin afectar la citología (Tee y col., 2012). Mientras que otros detectaron una respuesta inflamatoria neutrofílica en el pulmón lavado dentro de las 48hs de realizado el procedimiento. Esta respuesta generalmente se limita al pulmón y segmento lavado, pero también se ha descrito en el pulmón contralateral (Hewson y Viel, 2002).

## 1.2 Procesamiento de la muestra

Las muestras son mayoritariamente obtenidas a campo generando una demora en su análisis hasta que llegan al laboratorio (Hodgson y Hodgson, 2007). El BALF obtenido se puede colocar en tubos de vidrio solos o con EDTA para la preservación de la morfología celular y recuento de células nucleadas (Hewson y Viel, 2002; Hoffman, 2008). El procesamiento para el análisis citológico debe ser realizado dentro de las 8hs pos recolección si se mantiene a temperatura ambiente, para minimizar el deterioro celular y la proliferación bacteriana. Este tiempo se puede extender a 24hs en caso de muestras refrigeradas a 4°C (Pickles y col., 2002). Sin embargo, hay reportes de disminución en el porcentaje de mastocitos a las 8hs a 4°C (Richard y col., 2010). Si la muestra no puede ser procesada antes de las 24hs, se recomienda la fijación con igual volumen de etanol 40% o formalina 10% al momento de colecta para eliminar la proliferación bacteriana y preservar la viabilidad celular (Pickles y col., 2002). Esto permite retrasar el procesamiento de la muestra hasta una semana, pero no es recomendada debido a que dificulta el estudio citológico por alteración de la morfología celular y no permite la utilización de tinciones tipo Romanowsky (Pickles y col., 2002).

Debido a que la muestra es colectada en solución salina, usualmente contiene células diluidas en baja concentración y muy pocas proteínas. La celularidad puede ser mejorada centrifugando la muestra mediante citocentrífugas o macrocentrífugas (Zinkl, 2001). El método más común de procesamiento del BALF es la citocentrifugación, la cual produce una monocapa celular uniforme en un área focal del portaobjeto. Si bien permite evaluar un número adecuado de células de manera rápida y eficiente, se pueden perder otros componentes no celulares como el moco (Hewson y Arroyo, 2015). Aun no hay un protocolo estandarizado en relación a la velocidad y el tiempo necesario (Pickles y col., 2002). La citocentrifugación no debería afectar significativamente el número de neutrófilos, pero se asocia a mayores porcentajes de macrófagos, mastocitos y eosinófilos, y produce una reducción en la proporción de linfocitos (Hoffman, 2008; Richard y col., 2010). El uso de citocentrifugación a altas velocidades produciría menor daño celular y pérdida de linfocitos (Hewson y Viel, 2002). Es importante que cada laboratorio desarrolle su método estándar de procesamiento de la muestra y establezca sus rangos de referencia personales (Hoffman, 2008).

En la práctica veterinaria, la citocentrífuga es difícil de tener debido a su alto costo, por lo que existe la alternativa de utilizar macrocentrífugas y luego realizar extendidos. Se considera que esta técnica es confiable para el diagnóstico de enfermedad pulmonar neutrofílica, ya que no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de neutrófilos comparándolo con la citocentrífuga (Pickles y col., 2002). En

este caso, se centrifuga la muestra a 1000-1500 rpm por 5-10 minutos, descartando el sobrenadante por inversión gentil del tubo y resuspendiendo el pellet ya sea por golpes suaves del tubo o mediante una pipeta. La muestra concentrada se utilizara para realizar extendidos que deberán secar al aire rápidamente para evitar alteraciones en la morfología celular (Hewson y Viel, 2002).

La técnica utilizada para la realización del extendido puede ser la misma que para sangre entera (extendiendo por medio de otro portaobjetos a 45° y evitando realizar excesiva presión al extender para no romper las células), la cual es recomendada en caso de muestras muy concentradas, o por simple inclinación del portaobjetos en diferentes direcciones en caso de muestras con menos celularidad (Hewson y Viel, 2002). La técnica del extendido, a diferencia del citospin, da células más redondas, pequeñas, oscuras y con apariencia tridimensional, haciendo sus características morfológicas menos distintivas (Hoffman, 2008). En el caso de muestras muy turbias, con moco o de color rojo oscuras, se puede realizar un extendido directo de la muestra sin centrifugación previa o la dilución de la misma con solución salina para facilitar la posterior lectura (Hodgson y Hodgson, 2007).

Se recomienda realizar varios extendidos de la misma muestra (4-8 portaobjetos) aunque luego solo se colorean dos. Las tinciones utilizadas de rutina incluyen Wright-Giemsa, Diff-Quick, May-Grünwald Giemsa o Leishman. Las tinciones Romanowsky rápidas, como el Diff-Quick, no son apropiadas para la detección de mastocitos ya que colorea débilmente los gránulos metacromáticos (Hughes y col., 2003; Richard y col., 2010). Ocasionalmente los extendidos extras serán utilizados, en caso de problemas de tinción, por ruptura o pérdida de los extendidos originales, o para realizar tinciones especiales para mejor identificación celular (Hewson y Viel, 2002).

Entre las tinciones especiales se puede nombrar a la tinción de Gram para identificación bacteriana, la esterasa no especifica para diferenciar linfocitos grandes de macrófagos inmaduros, azul de toluidina para los gránulos metacromáticos de los mastocitos y azul de Prusia de Perl, para la hemosiderina. Luego de la tinción se puede aplicar un cubreobjetos, que nos permite guardar el preparado por más tiempo, para poder usarlo de futura referencia en caso que se desee monitorear la respuesta del paciente al tratamiento (Hewson y Viel, 2002).

## **1.3 Evaluación de la muestra**

### **1.3.1 Examen Macroscópico**

En un principio se debe inspeccionar la muestra macroscópicamente, esto se realiza mirando el recipiente a contraluz y girándolo gentilmente para poder detectar las características del mismo en relación al color, olor, turbidez y presencia de flóculos, detritos o partículas en suspensión (Hewson y Arroyo, 2015). Un fluido normal es incoloro, claro o levemente turbio con espuma, la cual indica la presencia de surfactante y por lo tanto, una correcta toma de muestra a partir del alvéolo (Hewson y Viel, 2002).

En caso de equinos con enfermedad de las vías aéreas inferiores, la turbidez del líquido obtenido varía desde claro a opaco. Un líquido turbio con material floculento refleja moco, células y detritos celulares dentro de los bronquios y alvéolos. El BALF debe ser inoloro, una muestra con olor pútrido puede asociarse a infección anaerobia o necrosis del tejido pulmonar. En relación al color, este varía según el número y proporción de eritrocitos, células nucleadas y la presencia de otras sustancias como hemoglobina. Por eso es una característica útil para orientarnos hacia la afección presente; por ejemplo, podemos encontrarnos con fluidos rosados o rojos, por presencia de eritrocitos o hemoglobina libre que puede indicar hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio reciente, o un color amarronado debido a la presencia de hemosiderina en caso de hemorragias viejas (Hodgson y Hodgson, 2007; Hoffman, 2008).

Otro punto importante a evaluar es el moco en las vías aéreas inferiores, analizando, en el caso que sea posible, el líquido obtenido del BAL junto con los hallazgos endoscópicos, permitiendo una estimación más precisa de la cantidad y calidad del moco presente. El BALF de equinos normales es translucido con pocas hebras finas de moco claro. Citológicamente en tinciones con Diffquick, se deben observar escasas cantidades de moco, las cuales aparecen como hebras finas rosadas a azules claras de material amorfo o fibrilar. La cantidad de moco en las vías aéreas inferiores aumenta en casos de irritación pulmonar, visible en el BALF como moco denso de color gris a cremoso. En la citología se observará moco grueso, fuertemente basófilo o en forma de moldes de las vías aéreas terminales llamados espirales de Curshmann, los cuales se encuentran aumentados en condiciones crónicas generalmente con leucocitos degenerados atrapados dentro (Hodgson y Hodgson, 2007).

### **1.3.2 Recuento Celular Total**

La cuantificación del número total de células por microlitro de muestra puede ser realizado manualmente utilizando un hemocitómetro (Cámara de Neubauer) o

mediante un contador celular automático. Los resultados de este último deben ser interpretados con cautela ya que el amplio rango de tamaños celulares y los acúmulos de células epiteliales dentro de la muestra puede exceder el rango de calibración de lectura de la máquina, subestimando el conteo celular total. También se debe prestar atención de remover el exceso de moco y detritos celulares por filtración previo a la lectura, lo cual se asocia a una dramática reducción en el conteo celular total y pérdida de ciertos tipos celulares como macrófagos, mastocitos y células epiteliales (Hewson y Viel, 2002).

El conteo celular total es preciso cuando las muestras se toman sin previa infusión de fluido, lo cual no es posible en caso del BAL, donde la concentración celular es diluida por el líquido de lavaje (Hodgson y Hodgson, 2007). Se ha intentado controlar el efecto de la dilución en el recuento total mediante el cálculo estimado de la proporción relativa del fluido de revestimiento epitelial (PELF de sus siglas en inglés: Pulmonary Epitelial Lining Fluid) en el BALF, a través de la medición de una molécula de referencia, como la albumina o urea. Aun así, este cálculo depende de múltiples factores como el volumen total infundido, el volumen de fluido recuperado, el tiempo que el fluido instilado permaneció dentro del alveolo, el sitio de lavaje (bronquio versus alvéolo) y la presencia de patologías pulmonares (Hewson y Viel, 2002). De manera alternativa, un método para controlar la dilución es mediante el uso de rutina de una técnica estandarizada, sitios establecidos de lavaje y recuperación del 40-80% del fluido instilado (Hodgson y Hodgson, 2007).

Los valores de referencia del conteo celular total normal varían entre distintos laboratorios y técnicas utilizadas, pero los reportes indican valores  $<300-1000 \times 10^6/ \text{ml}$  (Richard y col., 2010). El amplio intervalo de valores considerados normales junto con lo expuesto anteriormente limita el uso del recuento celular total en la interpretación de resultados de las muestras (Cian y col., 2015).

### **1.3.3 Recuento Celular Diferencial-Relativo**

La interpretación de la citología del tracto respiratorio se basa en el porcentaje de las distintas poblaciones celulares presentes en la muestra, lo cual será determinado mediante la realización de un recuento diferencial de al menos 200 a 500 células consecutivas (Hewson y Viel, 2002). Se ha comprobado que la determinación del porcentaje de neutrófilos en el BALF es altamente fiable, pero para aumentar la confiabilidad en el conteo de mastocitos y eosinófilos puede ser necesario la evaluación de un número mayor de células (Fernandez y col., 2013). La realización del conteo celular diferencial es más sencillo y rápido que el conteo absoluto, sin embargo, este último refleja más precisamente un desvío en la población celular; ya que grandes cambios en los tipos celulares predominantes, particularmente neutrófilos y linfocitos, pueden enmascarar desvíos de células menos prevalentes como los

eosinófilos o mastocitos. Esto nos permite realzar la limitación de usar el recuento celular relativo para la evaluación de células que normalmente se encuentran en número limitado en el tracto respiratorio bajo (Hughes y col., 2003).

Previo al conteo, todo el portaobjetos deberá ser examinado a menor (objetivo 10x) y mayor aumento (objetivo 40x) para identificar discrepancias regionales dentro del preparado. Esto usualmente ocurre en relación a filamentos de moco (las células inflamatorias quedan atrapadas en el moco y no se detectan en otro lado del preparado) y entre la base y punta del extendido. Si se detectan estas discrepancias, se deberá intentar incluir cada diferente región durante el recuento diferencial (Hodgson y Hodgson, 2007). En caso de haber realizado tanto citospin como extendidos directos, ambos deberán ser comparados, debido a que, si bien es más simple la lectura del citospin, puede llevar a la subestimación de ciertos tipos celulares (Hewson y Viel, 2002). Si el extendido es evaluado por un citólogo con experiencia, la utilización del objetivo 40x es suficiente. Sin embargo, de ser evaluado por alguien con menor experiencia, el recuento diferencial final deberá ser realizado bajo aceite de inmersión (100x) para evaluar las características morfológicas específicas de cada célula (Hodgson y Hodgson, 2007).

Se cree que caballos con diferentes perfiles citológicos de BAL desarrollan un rango similar de signos clínicos (Christley y Rush, 2007). Hay reportadas grandes variaciones en la proporción de las células inflamatorias en el BALF de animales sanos. Los valores de referencia para cada población celular en el BALF fueron determinados por diversos estudios en los últimos 20 años. La comparación entre distintas investigaciones resulta difícil debido a diferencias en la técnica de colección, procesamiento de la muestra, localización geográfica y población de equinos estudiados (Apéndice 1, Tabla 6) (Hewson y Viel, 2002).

Un hallazgo de interés es que en general los caballos estabulados tienen mayor proporción de células inflamatorias, usualmente acompañado por un incremento en la cantidad de moco, probablemente en respuesta a irritación de bajo grado por agentes inhalados que no contribuyen con una disminución de la función respiratoria. Sin embargo, si esta situación se prolonga en el tiempo, esta irritación puede actuar como un factor de riesgo para el desarrollo de patologías respiratorias permanentes (Hodgson y Hodgson, 2007).

Otra variable a tener en cuenta en la interpretación de la citología del BALF es la edad del animal, ya que se da un aumento progresivo en la proporción de linfocitos y un correspondiente descenso en macrófagos, con la edad (Hostetter y col., 2017).

Aun es necesario establecer valores de corte para equinos en diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, se considera que el BALF como valores de referencia para equinos sanos debería tener: <5% neutrófilos, <2% mastocitos y <0.5% eosinófilos. En el caso de las proporciones de linfocitos y macrófagos, los

rangos reportados son más amplios, 30–60% y 40–70% respectivamente, por lo tanto, es más difícil establecer valores de corte (Hodgson y Hodgson, 2007). Con respecto a la presencia de células epiteliales, estas deberían ser informadas, teniendo en consideración cambios en su morfología, pero no se las incluye en el recuento diferencial (Richard y col., 2010).

### 1.3.4 Células

#### 1.3.4.1 *Macrófagos*

Los macrófagos son células residentes del alvéolo con la capacidad de transformarse en células inflamatorias activas (Zinkl, 2001). Son las células más abundantes en el BALF de equinos normales, varían en tamaño desde aproximadamente 15 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una alta proporción citoplasma: núcleo ( $\approx 3:1$ ) y citoplasma basófilo claro espumoso (Hewson y Viel, 2002). Típicamente los macrófagos no activos tienen un núcleo oval indentado con un patrón de cromatina homogéneo, aunque puede ser pleomórfico, variando entre elongado, redondo, o lobulado. Estas células pueden contener vacuolas o material fagocitado (eritrocitos, células apoptóticas, esporas fúngicas, hemosiderina, partículas de polen, etc.) dentro del citoplasma. En baja cantidad estos detritos son considerados normales ya que los macrófagos alveolares constituyen uno de los primeros mecanismos de defensa pulmonar (Hodgson y Hodgson, 2007).



Figura 2: Macrófagos no activados en el BALF.  
May-Grünwald-Giemsa (100X).

Los macrófagos activos tienen citoplasma abundante, más basófilo, con márgenes irregulares y vacuolas y/o cuerpos de inclusión prominentes. Los macrófagos con citoplasma finamente vacuolado no se consideran anormales pero un marcado aumento en la vacuolización o vacuolas grandes que distorsionan la célula y desplazan el núcleo, usualmente solo se presentan en caso de enfermedad pulmonar (Hodgson y Hodgson, 2007). Además, es posible hallar macrófagos multinucleados, también llamados células gigantes multinucleadas, que son producto de la fusión de dos o más macrófagos. Si bien se pueden encontrar en poca cantidad en el BALF de animales sin evidencia de inflamación; un aumento en su número constituye un hallazgo importante en

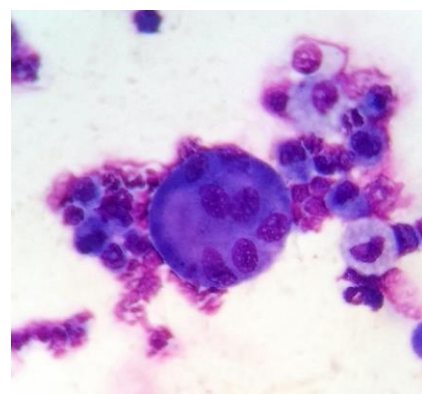


Figura 3: Célula gigante multinucleada en el BALF.  
May-Grünwald-Giemsa (100X).

procesos inflamatorios pulmonares crónicos, pudiendo representar una respuesta inmune Th2 (Linfocito T *helper* 2).

Toda causa de hemorragia en el tracto respiratorio caudal a la laringe resulta en el desarrollo de hemosiderófagos, pero la causa más común es la hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (HPIE). La presencia de eritrocitos y hemosiderófagos se asocian a HPIE mientras que en caso de hemorragia iatrogénica al momento de la toma de muestra solo encontraríamos eritrocitos libres (Hodgson y Hodgson, 2007). Los hemosiderófagos son macrófagos que contienen hemosiderina fagocitada en forma de gránulos, visualizado como pigmentos dentro de vacuolas citoplasmáticas cuyo color varía según el tiempo transcurrido, comenzando como verde oliva en caso de hemorragias recientes hasta llegar al marrón dorado. El azul Prusia de Perl es la tinción de elección para demostrar la presencia de hemosiderina en el citoplasma de los macrófagos, confirmado por la tinción positiva del hierro férrico (Hewson y Viel, 2002).

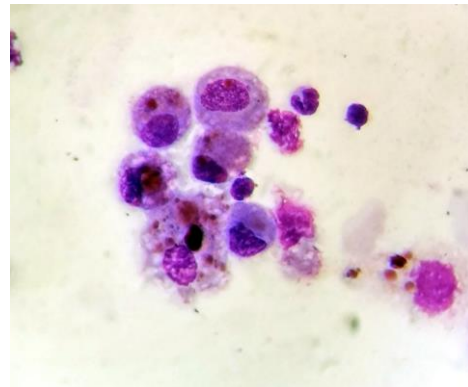


Figura 4: Hemosiderófagos en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X).

Si bien se ha reportado una buena correlación entre la presencia de hemosiderófagos en el BALF y hemorragias pulmonares en los lóbulos caudodorsales a la necropsia, estas células se observan en un gran porcentaje de los caballos en entrenamiento, incluyendo aquellos clínicamente sanos (McKane y col., 1993). El número aceptable de hemosiderófagos en el BALF es controversial porque puede no reflejar la cantidad de sangre presente en las vías aéreas. Además, pueden permanecer meses luego de la hemorragia pulmonar y por lo tanto su número y la cantidad de hemosiderina debe ser interpretada con cautela en conjunto con otras pruebas diagnósticas (Hodgson y Hodgson, 2007).

#### 1.3.4.2 Linfocitos

Los linfocitos se caracterizan por ser esféricos con un núcleo densamente teñido, que puede tener una pequeña escotadura y mínima cantidad de citoplasma basófilo. En el BALF de un equino normal se observa una población mixta de linfocitos pequeños (6 $\mu$ m de diámetro y núcleo denso) y linfocitos más grandes (10-15  $\mu$ m de diámetro y núcleo más laxo) (Hewson y Viel, 2002). La interpretación de un aumento en el número de

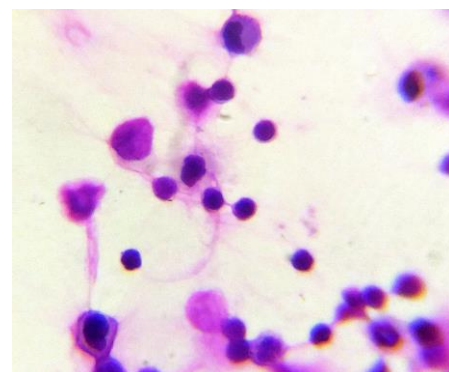


Figura 5: Linfocitos en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X).



linfocitos es complicada debido al amplio rango observado en el BALF de equinos normales (Hodgson y Hodgson, 2007). Aunque se han reportado aumentos en caballos de carrera con intolerancia al ejercicio y tos crónica, su significado aun no es claro (McGorum y Dixon, 1994). El intervalo de referencia para equinos normales varía considerablemente entre reportes, con un rango entre 28-68% del recuento diferencial. Esto puede reflejar diferencias en la técnica e interpretación, así como diferencias significativas en el tipo de ambiente donde se mantiene al caballo (pastura vs establo), o probablemente fallas en la identificación de enfermedad subclínica de las vías aéreas (Hewson y Viel, 2002).

#### 1.3.4.3 Neutrófilos

Los neutrófilos se caracterizan por su núcleo lobulado multisegmentado, citoplasma poco teñido y tamaño celular de 10-12  $\mu\text{m}$  de diámetro (Hewson y Viel, 2002). Los neutrófilos que ingresan a las vías aéreas no vuelven a la circulación y por lo tanto es común encontrar una baja proporción de neutrófilos viejos (hipersegmentados o picnóticos) en el BALF, así como fagocitosis de neutrófilos por macrófagos. Existe una buena correlación entre un aumento en la proporción de neutrófilos en el BALF y evidencia histológica de inflamación pulmonar. Su aumento se puede relacionar con ORA, IPA, HPIE, infecciones virales agudas, bronquitis crónica y enfermedad pulmonar obstructiva asociada a pasturas de verano (Hodgson y Hodgson, 2007).

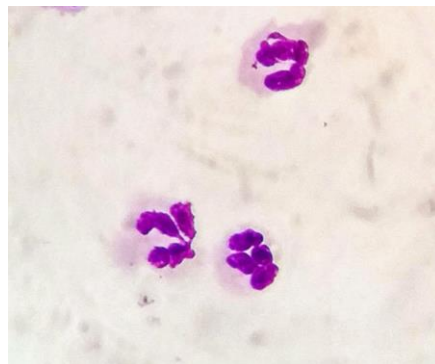


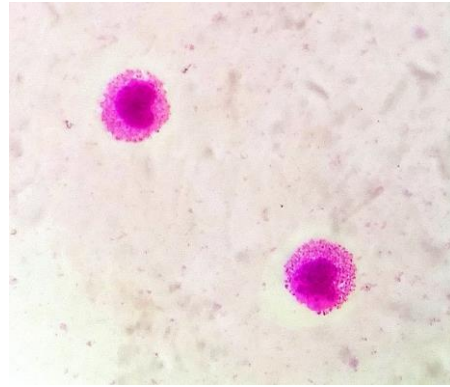
Figura 6: Neutrófilos en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X).

Se debe estudiar cuidadosamente la morfología para poder diferenciar entre una etiología bacteriana y una enfermedad inflamatoria no infecciosa. En casos de neumonía séptica se detectarán signos de degeneración celular como cariólisis, pérdida de segmentación del núcleo, cariorrexis, disminución en la intensidad de tinción del núcleo (de violeta a rosado) y lisis celular. Por lo contrario, los neutrófilos del BALF obtenido de equinos con IPA u ORA, preservan bien su morfología celular, si bien pueden encontrarse signos de apoptosis celular, caracterizados por condensación del núcleo y mínimo citoplasma (Hewson y Viel, 2002). En ocasiones es posible observar neutrófilos en banda a causa de inflamación aguda (Hodgson y Hodgson, 2007).

#### 1.3.4.4 Mastocitos

Los mastocitos son células de tamaño variable que contienen múltiples gránulos metacromáticos dentro del citoplasma. Se pueden encontrar con grados

variables de degranulación, dependiendo de la técnica de procesamiento y la presencia de hiperreactividad de las vías aéreas, lo cual dificulta su identificación. Por lo tanto, es común el uso de tinciones especiales como el azul de toluidina que permiten acentuar los gránulos metacromáticos. La observación del preparado primero a menor aumento también ayuda en la interpretación de la prevalencia de los mastocitos, los cuales generalmente se encuentran rodeados de los gránulos liberados en forma de un halo violeta brillante (Hewson y Viel, 2002).



*Figura 7: Mastocitos en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X).*

Los porcentajes de mastocitos son mayores en el BALF que en el aspirado traqueal, lo cual hace al BAL la técnica de elección para su detección y cuantificación. Un aumento en el porcentaje de mastocitos en el BALF ha sido correlacionado con aumento de la hiperreactividad en la prueba de broncoprovocación con histamina en caballos con intolerancia al ejercicio (Hewson y Viel, 2002).

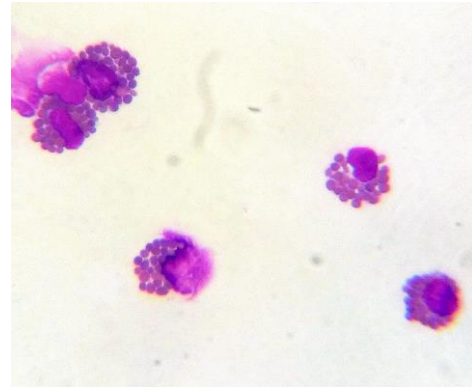
#### **1.3.4.5 Células Basofiloideas**

Son células con una fuerte apariencia metacromática a la tinción Wright-Giemsa, de tamaño variable, redondas a ovoides con gránulos basófilos citoplasmáticos grandes con forma de uva. Los gránulos son de 10 a 20 veces más grandes que los de los mastocitos y usualmente se visualizan libres entre los filamentos de moco. Hay reportes de tinciones especiales con formalina y azul de toluidina para su detección. Son raramente observadas en el BALF de equinos normales, sin embargo, su número aumenta en casos de IPA u ORA (generalmente observado con un aumento concomitante de mastocitos). Hasta el momento, su significancia clínica es desconocida, aunque algunos investigadores consideran que se trata de células migradoras de la lámina propia, que pasan a través del epitelio respiratorio a la luz de las vías aéreas como un mecanismo de defensa no específico (McGorum y Dixon, 1994; Hewson y Viel, 2002).

#### **1.3.4.6 Eosinófilos**

Los eosinófilos son células de 10 -15  $\mu\text{m}$  de diámetro fácilmente identificables por sus gránulos grandes, acidófilos, refráctiles dentro del citoplasma (Hewson y Viel, 2002). Se encuentran en números bajos en el BALF de equinos normales. Aumentos en su proporción se pueden observar en casos de infecciones parasitarias, en cuyo caso su número aumenta hasta un 85% de las células totales. Elevaciones más sutiles en el número de estas células se interpretan como evidencia de hipersensibilidad de tipo I

en respuesta a alérgenos inhalados (Hodgson y Hodgson, 2007). Un aumento del porcentaje de estas células suele ir acompañado de un incremento en el número de mastocitos, lo cual se cree que refleja la quimiotaxis de los eosinófilos en respuesta a la degranulación de los mastocitos. Por lo tanto, un número elevado de eosinófilos en el BALF es un hallazgo transitorio, y raramente repetible aun cuando se realice un segundo BAL dentro de las 24hs de la primera toma de muestra (Hewson y Viel, 2002). Se ha correlacionado la eosinofilia en el BALF con un aumento en la hiperreactividad de las vías aéreas en reposo en caballos de carrera con historial de baja performance (Hare y Viel, 1998). Si bien los eosinófilos son importantes en el asma humano, su rol en el asma equino requiere el estudio de su relación en la generación y liberación de citoquinas específicas relevantes en la reacción alérgica de las vías aéreas (Hewson y Viel, 2002).



*Figura 8: Eosinófilos en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X).*

#### **1.3.4.7 Células Epiteliales**

Es posible encontrar diferentes tipos de células epiteliales dependiendo del sitio de colecta, lo cual ayuda a confirmar el sitio de toma de muestra o la potencial contaminación proveniente de otras áreas. Las células epiteliales posibles de encontrar en el BALF incluyen: células epiteliales columnares ciliadas, no ciliadas, cuboidales y células caliciformes (Hodgson y Hodgson, 2007).

Las células columnares ciliadas se caracterizan por su núcleo basal y sus cilias apicales. En ocasiones se observa un pedículo basal en forma de cono, particularmente en células epiteliales removidas debido a trauma en la mucosa durante la toma de muestra. El aumento en el número de células epiteliales es relativamente raro. Se puede producir junto con un aumento en las células inflamatorias en caso de infecciones virales (Hewson y Viel, 2002). Es importante detectar cambios en la morfología de estas células. Cambios leves pueden ocurrir en animales normales como son las alteraciones nucleares y la pérdida de algunas cilias, que representan el recambio celular normal. En casos de enfermedad pulmonar, se han descrito cambios que incluyen vacuolización e hinchazón citoplasmática, degeneración nuclear,

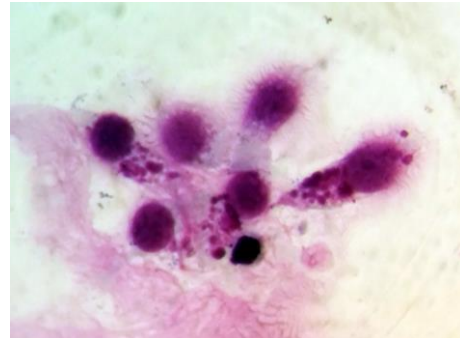


*Figura 9: Acumulo de células epiteliales columnares ciliadas en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X).*

hipocromasia y núcleo picnótico. Procesos inflamatorios crónicos producen metaplasia escamosa, displasia o hiperplasia celular, y agentes irritantes producen aumento del tamaño nuclear y agrupamiento de células epiteliales ciliadas que representan fragmentos de la mucosa bronquial hiperplásica. En infecciones virales están descritas las inclusiones intranucleares o citoplasmáticas, pero son un hallazgo inconsistente, como también lo es la pérdida de la placa ciliar resultando en células esféricas con núcleo picnótico fragmentado (Hodgson y Hodgson, 2007).

El BALF de caballos con IPA u ORA en un estado agudo de exacerbación también puede contener células epiteliales con pérdida de cilias y daño citoplasmático, sin embargo, la separación de la placa ciliar entera es raramente evidenciable en estos casos (Hewson y Viel, 2002).

Las células caliciformes varían en forma y tamaño dependiendo del número de gránulos secretorios dentro del citoplasma, generalmente tienen forma similar a las células columnares con el núcleo basal pero no presentan cilias y a veces es posible observar gránulos acidófilos de moco (Zinkl, 2001).

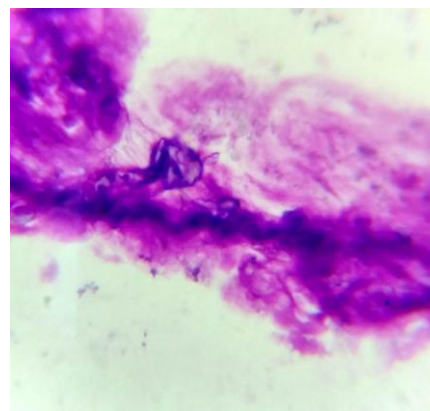


*Figura 10: Acumulo de células caliciformes y epiteliales columnares ciliadas en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X).*

Por último, las células cuboidales se caracterizan por una alta proporción núcleo:citoplasma, con un núcleo redondo central de tamaño pequeño a mediano con cromatina finamente granular y moderada cantidad de citoplasma. Las células columnares provienen de las vías aéreas mayores (tráquea y bronquio) y las células cuboidales de las vías aéreas menores (bronquio- bronquiolo) (Hodgson y Hodgson, 2007).

### **1.3.5 Otros Hallazgos:**

Es importante al momento de la interpretación de la muestra, también reconocer otros elementos no celulares como la cantidad y calidad del moco, que debe ser evaluado teniendo en cuenta el tipo de célula predominante atrapada dentro del mismo (Hewson y Arroyo, 2015). Este puede aparecer como filamentos, estructuras granulares (que representan partículas de moco recientemente liberadas de las células caliciformes) o formando los espirales de Curschmann (Zinkl, 2001; Hewson y Viel, 2002).



*Figura 11: Espiral de Curschmann en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X).*

En ocasiones se encuentran sustancias que

no pertenecen a las vías aéreas bajas, las cuales son resultado de contaminación durante el procedimiento o inhalación de material que no ha podido ser expulsado por la acción mucociliar del epitelio respiratorio. Un hallazgo frecuente son células epiteliales escamosas provenientes de la boca, faringe o fosas nasales. Estas células son grandes, aplanadas y pueden aparecer dobladas en sí mismas, se tiñen levemente basófilas o acidófilas, su núcleo es picnótico o fragmentado, los bordes celulares son rectos con esquinas prominentes y pueden presentar bacterias adheridas a la superficie (Zinkl, 2001).

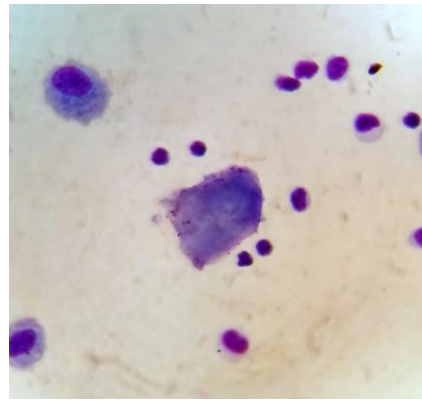


Figura 12: Célula epitelial escamosa, linfocitos y macrófagos en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X).

Otros contaminantes incluyen bacterias, material vegetal (polen), elementos fúngicos y cristales, los cuales son comunes de encontrar como consecuencia de cualquier patología que produzca una disminución del barrido mucociliar. Las bacterias pueden ser patógenas o contaminantes de las vías aéreas superiores, boca o medio ambiente. En casos de contaminación orofaríngea se encuentran distintas variedades de microorganismos, variando en forma y tamaño. Una fuerte evidencia de contaminación es dada por la presencia de la bacteria *Simonsiella*, comensal orofaríngeo. La evaluación citológica asociada a los signos clínicos permitirá determinar la significancia de la presencia de bacterias u otros elementos. Por ejemplo, si hay evidencia de inflamación acompañada de contaminación oral/faríngea, se podría sospechar de neumonía por aspiración (Zinkl, 2001).

También, es posible encontrar hongos saprofitos contaminantes, en forma de hifas, esporas o macroconidias, en el BALF de equinos estabulados, como por ejemplo *Alternaria spp.*, que indican exposición a partículas del forraje y medio ambiente. El material fúngico o vegetal inhalado puede encontrarse extra o intracelular (Zinkl, 2001; Hodgson y Hodgson, 2007).



Figura 13: Espora de *Alternaria spp.* en el BALF. May-Grünwald-Giemsa (100X).

Es de suma importancia tener en consideración que se pueden producir cambios en la morfología celular a causa de retrasos en el procesamiento de la muestra o por el centrifugado de muestras no fijadas, lo cual puede llevar a una interpretación citológica errada (Cian y col., 2015). Los macrófagos pueden vacuolarse in vitro y fagocitar eritrocitos, complicando la diferenciación entre hemorragias verdaderas y muestras contaminadas con sangre. Las células nucleadas pueden manifestar cambios como hipersegmentación o picnosis, los cuales son similares en casos de procesos inflamatorios crónicos (Hodgson y Hodgson, 2007).



## **1.4 Interpretación de la citología de BAL**

La citología del líquido del lavaje broncoalveolar es un método de diagnóstico preciso y práctico para evaluar la enfermedad respiratoria baja. Ciertas condiciones se asocian con una composición celular alterada del BALF. Dentro de las enfermedades que cursan con disminución de la función pulmonar, en las cuales el análisis del BALF es útil para llegar al diagnóstico y/o monitorear la respuesta al tratamiento, nos encontramos con el ORA, IPA Y HPIE (Hostetter, 2017). Sin embargo, no debe ser interpretada de manera aislada, sino que debe ser relacionada con la historia clínica, signología y los resultados de otras pruebas complementarias diagnósticas.

### **1.4.1 Hemorragia Pulmonar**

Este evento está caracterizado por la presencia de eritrocitos libres y 24hs posteriores a la hemorragia se pueden observar macrófagos que contienen eritrocitos en su interior (eritrofagocitosis). Ambos pueden recuperarse en el BAL hasta 14 días luego de la hemorragia, con eritrocitos en bajo número todavía presentes a los 21 días (Cian y col., 2015). Si bien es común encontrar poca cantidad de eritrocitos en las muestras colectadas de equinos normales, lo que generalmente refleja una mínima hemorragia iatrogénica causada durante la toma de muestra; en estos casos el sobrenadante debe ser claro, sin evidencia de hemolisis y no se encuentran eritrofagocitosis (Hodgson y Hodgson, 2007).

#### ***1.4.1.1 Hemorragia Pulmonar Inducida por el Ejercicio***

La HPIE es una causa común de baja performance en caballos que desarrollan ejercicios de alta exigencia como los pura sangre de carrera, cuartos de milla y caballos de trote (Depecker, 2014). Resulta de una disrupción mecánica de la pared de los capilares pulmonares debido a una falla por estrés causada por excesiva presión transmural, creada por una presión intracapilar muy alta (predominantemente a causa de alta presión sanguínea) y baja presión intraalveolar (generada por la marcada presión intrapleurales negativa asociada a la inspiración), durante el ejercicio (Sullivan, S. 2015).

Se encuentran disponibles varias técnicas para el diagnóstico, pero no se ha establecido un método estándar de oro, clínico o de laboratorio (Richard y col., 2010). El BAL permite identificar y evaluar la HPIE mediante la cuantificación de eritrocitos y hemosiderófagos, permitiendo recuperar material de los lóbulos caudodorsales de los pulmones, localización más común de las hemorragias por esfuerzo, debido a que esta región pulmonar recibe un mayor flujo de sangre durante el ejercicio (Lessa y col., 2007; Sullivan, S. 2015). El conteo de eritrocitos en el BALF fue propuesto como un método semicuantitativo para evaluar la severidad de la HPIE, pero se ha fallado en

demostrar su utilidad, debido a que la detección de eritrocitos puede deberse a otras causas, incluyendo la técnica en sí (Richard y col., 2010).

En relación a la proporción de hemosiderófagos en el BALF, parece ser la forma más sensible para la detección y evaluación de la severidad de la HPIE, permitiendo la identificación de pequeñas cantidades de sangre y posibilitando la detección de hemorragias de hasta 4 semanas luego del episodio de sangrado (Mckane y col., 1993). Se considera que los hemosiderófagos aumentan en el BALF una semana pos ejercicio, manteniéndose en niveles altos por tres-cuatro semanas (Michelotto y col., 2013). Además, esta técnica tiene la ventaja de no requerir el examen inmediato luego del ejercicio extenuante, ni evaluaciones múltiples como ocurre con la endoscopia (Depecker y col., 2014). Doucet y Viel (2002) propusieron el cálculo del score de hemosiderina en macrófagos alveolares para la detección de HPIE pero desafortunadamente, este implica la evaluación de la cantidad de hemosiderina presente dentro de 300 macrófagos alveolares, lo cual lleva mucho tiempo, haciéndolo poco útil para el diagnóstico de rutina (Cian y col., 2015).

Se podría orientar un pronóstico en equinos con HPIE a través de la identificación de células inflamatorias en el BALF. La presencia de hemosiderófagos junto con otro tipo de células inflamatorias, indicaría un pronóstico pobre (Michelotto y col., 2013).

La asociación entre IPA y HPIE es controversial. Hay dos formas potenciales por las que la inflamación de las vías aéreas puede contribuir a la HPIE: la inflamación y broncoconstricción tienen el potencial de causar obstrucción intratorácica de las vías aéreas y por lo tanto mayor presión negativa pleural (intra-alveolar); y la presencia de sangre en los espacios alveolar e intersticial potencialmente causa inflamación y fibrosis, lo cual puede perpetuar la HPIE (Sullivan y Hinchcliff, 2015). Algunos estudios reportan un aumento de riesgo de HPIE cuando hay inflamación de las vías aéreas inferiores (Newton y Wood, 2002), pero otros autores no encontraron correlación entre el número de hemosiderófagos y neutrófilos en el BALF de equinos con IPA, ni asociación entre HPIE y la cantidad de mucus (Couetil y col., 2016).

#### **1.4.2 Inflamación Séptica**

La inflamación séptica de las vías aéreas inferiores esta frecuentemente asociada a signos clínicos sistémicos, como fiebre, depresión, disminución del apetito y pérdida de peso (Cian y col., 2015). La hematología, bioquímica sanguínea y estudios radiográficos generalmente ayudan con el diagnóstico (Couetil y col., 2007). Esta información debe ser tenida en consideración al momento de la evaluación citológica ya que los cambios observados en el BALF de caballos con inflamación séptica y no séptica muchas veces son similares y su distinción puede no ser posible

únicamente por medio de la citología (Cian y col., 2015). Además, el valor diagnóstico de la citología del BALF en estos casos es limitado, ya que generalmente es un proceso pulmonar localizado y es posible que la muestra tomada por BAL sea de una porción del pulmón no afectada (McGorum y Dixon, 1994).

La inflamación séptica se caracteriza por una marcada infiltración de neutrófilos en las vías aéreas, aumentando en el BALF a más del 40% y muchas veces llegando a casi el 100% (Cian y col., 2015). En caso de neumonías bacterianas, los neutrófilos aparecen degenerados y en algunos casos se pueden observar bacterias intra y extracelulares. La presencia de bacterias intracelulares es considerada consistente con infección, mientras que las bacterias extracelulares pueden reflejar contaminación ambiental y/o infección. Así mismo, la ausencia de bacterias en la citología no descarta una infección, especialmente cuando los neutrófilos son el tipo celular predominante y los hallazgos clínicos apoyan una etiología bacteriana. Si bien la especie bacteriana no puede ser determinada por la citología del BALF, esta nos permite clasificarlas según su forma en bacilos o cocos y se puede realizar la tinción de Gram para obtener más información (Cian y col., 2015). Los patógenos más comunes en equinos son: *Streptococcus zooepidermicus* (coco Gram positivo, que se presenta aislado o en cortas cadenas), *Rhodococcus equi* (cocobacilo Gram positivo intracelular con forma de semilla de sandía, afecta a potrillos), bacilos Gram negativos entre los que se puede incluir *Pasteurella spp.*, *Actinobacillus spp.*, y Enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.*); y bacterias anaerobias (*Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides spp.*, y *Clostridium spp.*) (Zinkl, 2001).

Si bien la inflamación séptica se asocia comúnmente a infecciones bacterianas, puede ocurrir a causa de una variedad de etiologías, incluyendo agentes fúngicos, protozoarios, parasitarios y virales (Cian y col., 2015).

La infección fúngica también puede resultar en un infiltrado neutrofílico, aunque se han reportado aumentos de eosinófilos y macrófagos. Los hongos pueden tener características morfológicas que permitan una identificación citológica presuntiva. Se los puede dividir en hongos patógenos primarios (por ejemplo: *Cryptococcus spp.*, *Blastomyces spp.*, *Histoplasma spp.*, *Coccidioides spp.*) y hongos oportunistas que usualmente solo afectan a equinos inmunocomprometidos (por ejemplo: *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Fusarium spp.*) (Cian y col., 2015). Otro agente de neumonía en potrillos inmunodeprimidos es *Pneumocystis carinni*, y fueron descritos dos casos con reacción inflamatoria mixta de neutrófilos y macrófagos en el BALF (Zinkl, 2001).

En casos de infecciones virales, ha sido descrito un aumento en linfocitos y alteraciones en las células epiteliales (Cian y col., 2015). Sin embargo, no es común encontrar infecciones virales primarias sin complicación bacteriana secundaria y por lo tanto, muchos de los animales presentaran inflamación bacteriana neutrofílica (Zinkl, 2001).



La bronquitis y neumonía parasitaria disminuyeron en prevalencia gracias al uso difundido de antihelmínticos. Los dos parásitos más comunes son *Parascaris equorum* en caballos jóvenes y *Dictyocaulus arnfieldi* en adultos. En estos casos se podría hallar aumentos en el número de eosinófilos y macrófagos alveolares activados en el BALF (Hodgson, 2006).

### **1.4.3 Inflamación No Séptica**

Dentro de las enfermedades respiratorias bajas no infecciosas, donde el lavaje bronco-alveolar se considera una herramienta diagnóstica fundamental, se encuentra la Inflamación de las Pequeñas Vías Aéreas (IPA) y la Obstrucción Recurrente de las Vías Aéreas (ORA).

Actualmente se reconoce que estas entidades, representan un espectro de enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en caballos similar al asma humano en muchos aspectos (Couëtil y col., 2016). Si bien el asma en humanos ha sido considerado tradicionalmente una enfermedad alérgica resultando en una inflamación eosinofílica de las vías aéreas, hay estudios que reportan que más de la mitad de los casos de asma en humanos se caracterizan por tener como célula inflamatoria predominante a los neutrófilos, posiblemente como resultado de una sensibilidad no alérgica a partículas de contaminación ambiental, endotoxinas inhaladas, ozono y otras toxinas. El asma en humanos llamado “ocupacional”, puede tener relevancia en la medicina equina considerando las altas cargas de polvo y endotoxinas en el ambiente de caballos estabulados. Tanto en equinos como en humanos, todavía no está claro si la inflamación de las vías aéreas inferiores resulta de aeroalérgenos o de una hipersensibilidad a toxinas inhaladas; o si en realidad estos son dos procesos distintos con diferente causa, tratamiento y desenlace (Nolen-Walston y col., 2013). El reconocimiento de que el término ‘asma’ no está únicamente reservado para describir la enfermedad pulmonar alérgica en el hombre es fundamental en la aceptación de esta nomenclatura en la medicina equina (Apéndice 1, Tabla 7) (Pirie y col., 2016).

La fisiopatología básica sugiere que diferentes perfiles de células inflamatorias pueden ser el resultado de diferentes etiologías. La respuesta alérgica clásica que implica una hipersensibilidad de tipo I a aeroalérgenos, involucra una respuesta celular T-helper 2, caracterizada por la expresión mediada por IgE de IL-4, IL-5 y IL-13, que son responsables del reclutamiento de eosinófilos y mastocitos; mientras que un infiltrado neutrofílico puede ser producido por una respuesta no alérgica T-helper 1 a partículas aéreas inhaladas, enfermedad viral o una respuesta no específica a IL-8 (Nolen-Walston y col., 2013). Asumiendo una idéntica exposición, la heterogeneidad en la inflamación de las vías aéreas puede ser un reflejo de la variación normal de la

respuesta a los componentes inhalados del polvo. Estos componentes no solo incluyen alérgenos tipo I y II, sino también, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP`s), como por ejemplo endotoxinas, ácido murámico,  $\beta$ -glucanos y péptidos bacterianos. La respuesta a los PAMP`s no requiere de sensibilización previa y la variación en la respuesta depende de la dosis y variación genética en la respuesta inmune del individuo (Richard y Robinson, 2016).

La patogénesis del asma equino no está completamente definida. Una variedad de agentes etiológicos puede estar involucrada y su contribución al desarrollo de esta enfermedad varía según las condiciones ambientales durante y luego del entrenamiento, la alimentación, el alojamiento, la estación del año, la presencia de agentes infecciosos y variaciones genéticas (Couëtil y col., 2016). Aunque clínicamente parecería haber un componente de hipersensibilidad en el asma equino aún no hay evidencia clara de una hipersensibilidad tipo I (Mazan, 2015).

La hipersensibilidad broncopulmonar de tipo I y tipo III son los factores etiopatogénicos que se señalan como principales del ORA, pero también hay evidencia de que una hipersensibilidad tipo retrasada, involucrando las células T CD4, sea un importante mecanismo en esta enfermedad (van der Haegen y col., 2005; Moran y col., 2006; Mazan, 2015). Otros mediadores inflamatorios y citoquinas fueron identificados en el ORA pero el resultado final es un infiltrado inflamatorio en las vías aéreas, remodelación profunda con hiperplasia de células epiteliales y caliciformes, hipertrofia o hiperplasia variable del musculo liso, y fibrosis alveolar (Mazan, 2015). Esta remodelación de las vías aéreas (proliferación del musculo liso y aumento de la matriz extracelular), ocurre tanto en el ORA como en el asma humano, y es considerado una consecuencia de la inflamación crónica de las vías aéreas, llevando a un menor diámetro de las mismas, broncoespasmo y taponamiento por moco (Richard y Robinson, 2016).

Es probable que el IPA involucre varios factores que actúen sinérgicamente o secuencialmente para iniciar y perpetuar la inflamación pulmonar (Richard y Robinson, 2016). El rol de las infecciones bacterianas y virales en la etiología del IPA es controversial. Los agentes no infecciosos son clave su desarrollo y diversos estudios identificaron la estabulación como factor de riesgo ya que estos equinos están potencialmente expuestos a altas concentraciones de partículas aéreas (orgánicas e inorgánicas, incluyendo hongos, moho, endotoxinas,  $\beta$ -D-glucanos, microorganismos, ácaros, material vegetal y polvo) y gases nocivos (Berndt y col., 2010; Couëtil y col., 2016). Sin embargo, la contribución de estos factores a la aparición de IPA es solo parcialmente conocida, a diferencia del RAO donde hay gran cantidad de evidencia clínica y experimental para sostener que los alérgenos y endotoxinas del heno y camas en la estabulación son factores causales de la enfermedad (Couëtil y col., 2016). Es posible que la exposición a toxinas inhaladas (especialmente endotoxinas

del polvo del establo) o a virus respiratorios, pueda estar asociado a una distribución estacional de la inflamación neutrofílica de las vías aéreas con el pico en los meses de invierno. Esto se debería a que los caballos durante el invierno pasan más tiempo dentro del establo, el cual tiende a estar más cerrado y menos ventilado, aumentando la exposición al polvo y endotoxinas (Nolen-Walston y col., 2013). Hay que tener en consideración que la estabulación ha sido asociada a inflamación neutrofílica de las vías aéreas en caballos sanos sin signos evidentes de enfermedad respiratoria (Lessa y col., 2007). Por otro lado, caballos de carrera clínicamente normales mostraron un aumento en el porcentaje de eosinófilos en el BALF realizado en verano, presuntamente debido a altas concentraciones de aeroalérgenos ambientales durante los meses de primavera y verano (Nolen-Walston y col., 2013). También se puede mencionar otra patología ligada al verano-primavera y región geográfica específica (sur de Estados Unidos), llamada “obstrucción recurrente de las vías aéreas asociada a la pastura de verano”, la cual ocurre en relación a un clima cálido húmedo y altas concentraciones de esporas fúngicas y polen; y se caracteriza por una inflamación exclusivamente neutrofílica en el BALF. Sin embargo, hay estudios que no han podido asociar la estación del año al perfil citológico del BALF (Nolen-Walston y col., 2013; Mazan, 2015).

El panel del American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) eligió el término “síndrome del asma equino” para referirse a caballos con leve (IPA) a severa (ORA) enfermedad respiratoria baja (Couëtil y col., 2016). Es importante no usar el nombre ‘asma equino’ como un término general para ambas enfermedades sino que se debe diferenciar entre leve-moderado y severo (Barton y Gehlen, 2016; Bullone y Lavoie, 2017). Esta nueva clasificación, publicada en el año 2016, implica que caballos con presentaciones clínicas similares (tos crónica, exceso de moco, baja performance) pueden variar ampliamente en términos de severidad de la enfermedad. Es importante recalcar que el “asma equino” es un proceso dinámico, y equinos con signos respiratorios leves pueden progresar hasta desarrollar ORA. Sin embargo, no debe ser interpretado como una progresión inevitable de la enfermedad, en donde los caballos con IPA siempre desarrollan ORA con el tiempo (Couëtil y col., 2016). La mayoría de los caballos con IPA se recuperan, aunque caballos con signos respiratorios leves a moderados, como tos ocasional y descarga nasal, pueden ser indicadores fenotípicos tempranos para un mayor riesgo de desarrollar ORA, una enfermedad con base genética (Richard y Robinson, 2016).

La adopción de este nuevo término proporciona una amplia definición fenotípica que permite la subcategorización de la enfermedad según la presencia o ausencia de esfuerzo respiratorio en reposo (Apéndice 1, Tabla 8) (Pirie y col., 2016). El término ‘asma severo’ (anteriormente llamado ORA) está restringido a caballos adultos con marcada inflamación de las pequeñas vías aéreas y obstrucción asociada

a tos frecuente, aumento del esfuerzo respiratorio en reposo e intolerancia al ejercicio; afectando principalmente a caballos de más de 7 años de edad. Es la repetividad de los episodios de exacerbación aguda lo cual le da su nombre y la obstrucción se revertiría con terapia broncodilatadora y cambios ambientales (Couëtil y col., 2016). Los signos clásicos son: fosas nasales distendidas, descarga nasal mucopurulenta, tos espasmódica, aumento en el esfuerzo espiratorio (en casos graves también esfuerzo inspiratorio) con mayor componente abdominal o respiración paradójica, disnea y levantamiento abdominal (línea de esfuerzo por hipertrofia de los músculos rectoabdominales). A la auscultación se pueden escuchar rales sibilantes y crepitantes, así como aumento del campo pulmonar por atrapamiento del aire (Mazan, 2015). Además, se caracteriza por severa neutrofilia en el BALF y acumulación de mucus traqueal (grado endoscópico >2/5) (Couëtil y col., 2016).

Mientras que el término 'asma leve-moderado' (anteriormente llamado IPA) se aplica a equinos de cualquier edad (generalmente más jóvenes) con signos clínicos sutiles, como baja performance y tos ocasional crónica (> 4 semanas), pero con respiración normal en reposo, evidencia de exceso de moco traqueobronquial y o aumento en la proporción de neutrófilos, eosinófilos, y/o mastocitos en el BALF (Pirie y col., 2016; Couëtil y col., 2016).

La tos es el indicador más sensible de inflamación pulmonar y se considera que cuanto más frecuente la tos, más severa la inflamación neutrofílica (Richard y Robinson, 2016). La tos puede ocurrir en reposo o más frecuentemente al principio del ejercicio, pero la ausencia de tos no descarta la presencia de IPA. La auscultación usualmente no revela anormalidades, aunque en algunos casos puede haber un aumento de los sonidos respiratorios y rales sibilantes durante las maniobras de respiración (Couëtil y col., 2016).

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la combinación del examen clínico, endoscopia de las vías aéreas, colecta de muestras del tracto respiratorio inferior para citología, pruebas para evaluar la función pulmonar, broncoprovocación y la evaluación de la respuesta al tratamiento. También en algunos casos se indica otros métodos complementarios como radiografías, ecografía y análisis de sangre para descartar otras patologías (Cian y col., 2015; Mazan, 2015). La endoscopia permite descartar comorbilidades que contribuyan a la intolerancia al ejercicio, como patologías de tracto respiratorio superior, y refleja la inflamación de las vías aéreas bajas mediante la evaluación de los grados de: espesor o engrosamiento del tabique de la carina, acumulación de moco en tráquea y acumulación de moco en bronquios (Koblinger y col., 2011; Mazan, 2015). Tanto ORA como IPA se caracterizan por exceso de mucus en las vías aéreas (Couëtil y col., 2016) y un alto grado de moco en las vías aéreas bajas probablemente involucre una inflamación neutrofílica pulmonar (Koblinger y col., 2011). Las radiografías demostraron una leve correlación en el RAO

con aumento en el patrón intersticial y bronquial tanto como engrosamiento traqueal; sin embargo, no se correlaciona bien con los resultados del BAL o las pruebas de función pulmonar en caso de IPA y solo es útil para descartar comorbilidades (Mazan, 2015). Los signos clínicos y hallazgos de laboratorio pueden ser sutiles o estar ausentes en caballos con ORA durante el periodo de remisión (Couëtil y col., 2016). El examen del BALF es considerado superior al lavaje transtraqueal en términos de especificidad y sensibilidad para confirmar el diagnóstico de ORA (Cian y col., 2015). Es importante tener en cuenta que la inflamación pulmonar definida como un aumento mayor al 5% de neutrófilos en el BALF no se correlaciona bien con la inflamación propuesta como un aumento mayor al 20% de neutrófilos en el lavaje transtraqueal, y por lo tanto, este último no es un buen representante de lo que ocurre en las pequeñas vías aéreas. Es imposible hacer una distinción definitiva entre IPA y ORA basada en la citología del BALF (Mazan, 2015).

En un comienzo, se asociaba al ORA con valores superiores a 5% de neutrófilos en el BALF (McGorum y Dixon, 1994). Sin embargo, actualmente se considera que los perfiles de BALF de caballos con asma severo, usualmente muestran moderada a severa neutrofilia (>25% de neutrófilos), disminución del porcentaje de linfocitos y macrófagos alveolares y presencia de moco, que se puede presentar en la citología en una forma de espirales de Curschmann's (Couëtil y col., 2016). En algunos casos es posible observar un incremento en el número de eosinófilos, aunque en la mayoría de los casos el porcentaje de mastocitos y eosinófilos no se encuentra aumentado (Wilkins y Woolums, 2009; Cian y col., 2015). También se pueden hallar acúmulos de células epiteliales hiperplásicas, aumento en el número de células caliciformes, disminución en la cantidad de surfactante (espuma) recuperado y partículas, por ejemplo de polen, dentro de macrófagos alveolares (Zinkl, 2002; Mazan, 2015). Existe concordancia entre el porcentaje de neutrófilos encontrados en el BAL y la gravedad de los síntomas clínicos de estos animales (Moran y col., 2009). Se debe tener en consideración que en caballos que se encuentran en remisión de ORA, la citología del BALF puede ser normal. Para diferenciarlos de equinos normales se puede realizar el BAL luego de mantenerlos al menos 4-5hs en un establo mal ventilado, con cama y alimento de mala calidad, lo cual induce un aumento de los neutrófilos en el BALF y otros signos clínicos característicos (McGorum y Dixon, 1994; Barton y Gehlen, 2016).

Por otro lado, la citología del BALF de caballos con IPA se caracteriza usualmente por aumento en el número total de células nucleadas, neutrofilia leve a moderada, eosinofilia y/o mastocitosis. La ausencia de valores de corte oficiales en el recuento diferencial para la clasificación de IPA se debe a las variaciones citológicas asociadas a diferencias en la técnica de BAL y el método para el conteo celular (Couëtil y col., 2016). Antes se consideraba que los equinos padecían IPA cuando

tenían valores superiores a 5% de neutrófilos, 2% de mastocitos y/o 1% de eosinófilos en el BALF (Couëtil y col., 2007). Sin embargo, se demostró que estos valores eran muy restrictivos y que valores de corte más altos aumentaban la concordancia entre ambos pulmones (Depecker y col., 2014; Orard y col., 2016). Actualmente, el ACVIM adopto el criterio de que más allá de la técnica utilizada, valores citológicos de >10% neutrófilos, >5% mastocitos y >5% eosinófilos se consideran característicos de IPA (Couëtil y col., 2016). Se reconocen distintos fenotipos de IPA basado en los signos clínicos y edad de presentación, algunos de los cuales están asociados a células inflamatorias específicas en el BALF (Couëtil y col., 2016). Aparentemente, el predominio de un solo tipo celular ocurre en etapas tempranas de la inflamación pulmonar y a medida que avanza la respuesta inflamatoria nos encontramos con una respuesta celular mixta (Michelotto y col., 2013). Un aumento de mastocitos ha sido asociado a hiperreactividad de las vías aéreas, obstrucción pulmonar subclínica e intolerancia al ejercicio, mientras que IPA neutrofílica generalmente se asocia a tos y moco traqueal (Couëtil y col., 2016). Esto puede representar dos patogénesis diferentes, distintos estadios de la misma enfermedad o eventos transitorios dentro de la vida del animal (Bedenice y col., 2008). Por lo tanto, todavía debe estudiarse si estas variaciones se deben a las diferencias en la actividad deportiva o entrenamiento, son por efecto de la temperatura y condiciones ambientales o se deben a diferentes técnicas de colecta y análisis del BALF. Con respecto a la edad, la eosinofilia en el BALF se encuentra comúnmente en caballos jóvenes (menos de 5 años de edad), mientras que la neutrofilia se diagnostica en caballos viejos (más de 7 años de edad). La IPA eosinofílica es menos frecuente y parece estar relacionada a una hiperreactividad por exposición al polvo; a diferencia de la causada por parasitismo o neumonía eosinofílica idiopática, donde la eosinofilia es severa y persistente (Couëtil y col., 2016).

La significancia clínica de la inflamación detectada en el BALF requiere de nuevas investigaciones para establecer rangos normales de los diferentes tipos de células presentes y establecer la relación entre el grado y tipo de inflamación broncoalveolar, lesiones pulmonares específicas, severidad de la enfermedad, respuesta al tratamiento y pronóstico en relación a la progresión y reversibilidad (Bullone y Lavoie, 2017).

## **2. Hipótesis Y Objetivos**

### **2.1 Hipótesis de trabajo**

#### **Hipótesis 1**

Existen diferencias en la citología del BALF entre equinos con y sin signología de enfermedad respiratoria baja ingresados al Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

#### **Hipótesis 2**

La citología del BALF se ve modificada luego de un período de estabulación de treinta días en aquellos animales asintomáticos provenientes del campo.

### **2.2 Objetivo General**

Realizar una descripción y comparación de la citología del BALF en función de los signos clínicos de equinos ingresados en el Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales del Hospital Escuela de la FCV, UNLP y describir las diferencias encontradas en aquellos animales que permanecieron estabulados en el mismo por un período de 30 días.

#### **2.2.1 Objetivos Particulares**

- Realizar un examen macro y microscópico del líquido obtenido a partir del lavaje bronco-alveolar y determinar el recuento celular diferencial relativo.
- Detectar diferencias en la citología del BALF entre los equinos con y sin signología de afección de las vías aéreas inferiores.
- Establecer diferencias en el recuento celular relativo de los equinos asintomáticos provenientes del campo luego de ser sometidos a un régimen de estabulación de treinta días.

### **3. Materiales Y Métodos**

El presente trabajo está conformado por dos bloques diferentes relacionados secuencialmente entre sí. El primero de los mismos es sobre la comparación de la citología del BALF entre equinos con y sin signos clínicos de enfermedad respiratoria baja. El segundo bloque es un estudio descriptivo y comparativo de los recuentos celulares relativos obtenidos en el BALF de equinos provenientes del campo, antes y después de ser sometidos a un régimen de estabulación de un mes.

#### ***Bloque Uno***

Se procedió a analizar y comparar la citología del líquido obtenido a través de lavaje broncoalveolar en dos grupos de equinos, uno conformado por aquellos que presentaban signos de enfermedad respiratoria inferior y otro compuesto por aquellos sin signología.

Los animales incluidos fueron 12 pacientes externos o residentes del Hospital Escuela de la FCV-UNLP, que estuvieron sujetos a las normativas vigentes de esta institución. Por este motivo están debidamente registrados en la planilla de historias clínicas, donde se detallaron los exámenes clínicos, estudios complementarios y los tratamientos sugeridos y/o realizados.

El grupo de equinos sintomáticos se conformó con aquellos pacientes ingresados durante el período de duración del estudio, que cumplieran con el criterio de inclusión previsto para este grupo (ver debajo). Estos animales fueron sometidos a la realización de un único BAL al momento del ingreso o cuando fue indicado por el clínico responsable.

El grupo de animales asintomáticos fue conformado por pacientes del hospital ingresados por motivos ajenos al sistema respiratorio y por los equinos que habitualmente residen en el Hospital Escuela durante el ciclo lectivo por lo que se conocen sus antecedentes de salud. Los mismos fueron evaluados y sometidos a la toma de muestra al día inmediato posterior a su llegada desde el campo, lugar en el que habían permanecido por 90 días antes de su reingreso al servicio.

#### ***Bloque Dos***

Esta parte del trabajo fue realizada a consecuencia de los hallazgos de la citología del BALF en los equinos asintomáticos. Debido a que en algunos casos el BAL inicial presentaban valores que no se ajustaban a los esperados, se tomó la decisión de reevaluar la citología luego de un mes de estabulación. En cinco de los seis equinos pertenecientes al grupo de animales asintomáticos se tomaron dos muestras con un intervalo de un mes. Estos cinco equinos asintomáticos habían permanecido a campo durante los tres meses previos a la inclusión en este estudio. El



primer BAL se realizó a las 24hs de ingresados al Hospital Escuela, luego de un viaje de 40 minutos y de pasar la noche estabulados en las instalaciones del servicio en cama de viruta.

A partir de ese momento fueron sometidos al régimen de estabulación de los equinos residentes en el hospital. Al mes de ingresados y realizado el primer BAL, se repitió el examen físico completo y el BAL para evaluar nuevamente la citología en el caso de que permanecieran asintomáticos o desarrollaran signología respiratoria.

### **3.1 Animales**

La población en estudio consistió de 12 equinos (3 hembras y 9 machos), edad promedio 9,4 años (rango 3–17 años), de diferentes razas (incluyendo SPC, Silla Argentino y mestizos) y diferente utilidad o actividad (carrera, salto, trabajo, policía montada o docencia en la facultad); ingresados al Hospital Escuela de la FCV, UNLP, entre los meses de febrero y mayo del año 2017. Estos fueron divididos en dos grupos: 6 caballos con y 6 sin signología de enfermedad respiratoria baja.

Se incluyeron tanto equinos externos como residentes del Hospital Escuela de la FCV-UNLP. En el caso de estos últimos el alojamiento consistió en corral al aire libre durante el día (en ocasiones compartido con otros caballos) y estabulación de noche en box individuales, amplios, con cama de viruta y buena ventilación. Los animales se alimentaron con una dieta estipulada en el 1,5% de su peso corporal, compuesta por al menos un 60% de fardo de alfalfa dividido en tres comidas a lo largo del día y dos raciones diarias de avena, administradas en el suelo en forma seca, y con acceso al agua ad-libitum.

Cada equino fue registrado en una historia clínica que contiene los datos del animal (edad, sexo, raza, utilidad/actividad), el tiempo de internación y la anamnesis, incluyendo el tipo de alojamiento (a campo o estabulado, tipo de cama y ventilación), alimentación (tipo, calidad, frecuencia y forma de administración), historial de viaje reciente e historia clínica previa, con particular atención en los antecedentes de enfermedades respiratorias o baja performance.

Todos los animales fueron sometidos a un examen físico completo (incluyendo estado general del animal, actitud, temperatura rectal, linfonódulos y auscultación cardíaca y abdominal) con particular atención en el sistema respiratorio. Este incluyó la evaluación de la frecuencia, patrón, ritmo y profundidad de la respiración, auscultación de la tráquea y tórax, tanto solo como con bolsa de reinspiración (Apéndice 2, Figuras 3 y 4); reflejo tusígeno, detección de secreción nasal y otros hallazgos indicadores de dificultad respiratoria como la línea de esfuerzo. Luego se realizaron los métodos complementarios necesarios en relación al cuadro y de acuerdo a la prescripción del Médico Clínico responsable del caso, como hematología y bioquímica sanguínea,

radiografías, ecografías y endoscopias; para por último proceder a la realización del BAL.

En aquellos caballos sometidos a endoscopias se evaluó subjetivamente el espesor del tabique de la carina buscando evidenciar la presencia de edema. Además se utilizó un criterio de clasificación semi-cuantitativo para el acumulo de moco traqueal basado en 5 grados según Gerber y col. (2004): Grado 0 Nada (tráquea limpia), 1 Leve (pequeñas gotas únicas o múltiples), 2 Moderada (gotas grandes no confluentes), 3 Marcada (confluente, en chorro), 4 Grande (formación de charcos) y 5 Extrema (cantidad profusa).

### **3.1.1 Criterios de inclusión**

Los equinos fueron asignados al grupo de animales asintomáticos a partir de un examen físico en el cual todos los parámetros estuvieran dentro del rango de referencia y sin particularidades a la auscultación ni en las maniobras semiológicas específicas.

El criterio de inclusión para conformar el grupo de animales con signos de enfermedad respiratoria baja se definió, cómo lo establecen los consensos internacionales al respecto, por la presencia de algunos o todos los signos clínicos asociados a afecciones de la vía aérea inferior: tos espontánea o el reflejo tusígeno positivo que desencadene un acceso de tos paroxístico; auscultación de estertores traqueales y/o rales pulmonares; cambios en el patrón, frecuencia o profundidad de la respiración; descarga nasal; acumulo de secreciones en la tráquea; baja performance y retardo en el tiempo de recuperación pos ejercicio.

En el caso del reflejo tusígeno (positivo, con uno o dos accesos simplemente) y la descarga nasal (cuando escasa) serán tenidos en consideración en aquellos casos en que se encuentren combinados con otro signo respiratorio.

### **3.2 Técnica del lavado broncoalveolar**

La maniobra se realizó dentro de un brete, los caballos fueron sedados con Xilacina (1mg/kg de peso vivo, endovenosa) y sujetados con mordaza (Apéndice 2, Figura 5). En casos de caballos con signología severa de ORA o marcada hiperreactividad de las vías aéreas, se combinó con Butorfanol (0,01 mg/kg, endovenoso).

La toma de muestra se realizó mediante una sonda de lavado bronco-alveolar (Mila® BAL300 y SurgiVet® BAL300; ambos de 2,5 mm de diámetro interno, 10 mm de diámetro externo y 300 cm de largo) previamente desinfectada en clorhexidina por 20 minutos y luego enjuagada con solución fisiológica estéril atemperada (Apéndice 2, Figuras 1 y 2). Se colocó la sonda por el ollar a través del meato nasal ventral hacia la

nasofaringe para acceder a la tráquea y en el momento en que el animal realizo un acceso de tos, se instilaron aproximadamente 10 ml de Lidocaína al 1% (obtenida mediante la dilución de la lidocaína al 2% en solución fisiológica estéril), esperando unos minutos hasta abolir el reflejo tusígeno para poder continuar avanzando la sonda. Se continuó ingresando por tráquea e instilando lidocaína cada vez que el animal tosía hasta que la sonda hizo tope y no se podía seguir avanzando. En ese momento se insufló el balón de la sonda con 8 ml de aire para sellar la vía y fijarla, y se comenzó con el lavado broncoalveolar, primero aspirando el líquido residual y luego introduciendo la solución fisiológica estéril y atemperada a 37°C en alícuotas de 60 ml y recuperando el líquido cada vez, hasta completar un volumen de 300ml. Tanto la instilación del líquido como su recuperación se realizaron con jeringas de 60 ml a presión constante, succionando gentilmente y dejando de aspirar cuando se sentía resistencia (Apéndice 2, Figura 6).

### **3.3 Procesamiento de la muestra**

Las muestras se procesaron dentro de las primeras 4 horas de obtenidas. Primero se evaluó macroscópicamente en relación a su aspecto, volumen recuperado, turbidez, color, presencia de moco y espuma. Se consideraron adecuadas cuando se recuperó más del 50% del líquido infundido y presentaban surfactante visualizado en forma de espuma (Apéndice 2, Figura 7). Luego se realizó la separación de las células del sobrenadante mediante centrifugación con una macrocentrífuga (Macrocentrífuga "Arcano" TDL80-2B) a 1000 rpm durante 10 minutos (Apéndice 2, Figuras 8 y 9) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el sobrenadante residual, mezclando suavemente (Apéndice 2, Figuras 10 y 11). Luego se realizaron 4 extendidos para cada BAL, con la técnica del frotis sanguíneo, dejándolos secar al aire a temperatura ambiente y coloreándolos con May Grünwald - Giemsa (MGG) (Apéndice 2, Figuras 12 y 13).

### **3.4 Evaluación Citológica**

Todos los portaobjetos fueron examinados utilizando un microscopio óptico (Microscopio Nikon Eclipse E400), primero a menor (objetivo 10x) y mayor aumento (objetivo 40x) para identificar discrepancias regionales dentro del preparado. Luego se realizó el recuento en las áreas del preparado donde las células se encontraban adecuadamente separadas, sin tener en cuenta las grandes aglomeraciones de células o las células atrapadas dentro de las hebras de moco. Se contaron 300 células consecutivas bajo aceite de inmersión (100x), siendo expresadas como porcentaje relativo para cada grupo celular encontrado. Las células fueron identificadas como macrófagos, macrófagos activos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y

hemosiderófagos. Los eritrocitos y las células epiteliales no fueron incluidas en el recuento diferencial, pero si fueron identificados y registrados. Además, se prestó atención en el reconocimiento de otros elementos no celulares como la cantidad (ausente, leve, moderada o abundante) y calidad del moco siendo evaluado teniendo en cuenta el tipo de célula predominante atrapada dentro del mismo, los espirales de Curschmann, esporas fúngicas, bacterias intra o extracelulares y otros hallazgos.

### **3.4.1 Criterios en la interpretación de la citología del BALF**

Los valores de referencia utilizados para la citología del BALF en equinos sanos fueron basados en el último consenso (año 2016) sobre inflamación de las pequeñas vías aéreas de equino, del American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) y en los estudios publicados que utilizaron un volumen de infusión de 250 ml (de Almeida y col., 2015; Robinson y col., 2003). Quedando definido como valores normales:  $\pm$  60% de macrófagos,  $\pm$  35% de linfocitos,  $\leq$ 5% de neutrófilos,  $\leq$ 2% de mastocitos y  $\leq$ 1% de eosinófilos.

El criterio utilizado para definir el asma leve-moderado (IPA) fueron valores citológicos de  $>$ 10% neutrófilos,  $>$ 5% mastocitos y  $>$ 5% eosinófilos, mientras que asma severo (ORA) queda definido como  $>$  25% de neutrófilos (Tabla 1).

**Tabla 1** Valores de referencia utilizados para la interpretación de la citología del BALF.

<b>Células</b>	<b>Normal</b>	<b>Asma leve-moderado (IPA)</b>	<b>Asma severo (ORA)</b>
<i>Macrófagos</i>	60%		
<i>Linfocitos</i>	35%		
<i>Neutrófilos</i>	$\leq$ 5%	$>$ 10%	$>$ 25%
<i>Mastocitos</i>	$\leq$ 2%	$>$ 5%	
<i>Eosinófilos</i>	$\leq$ 1%	$>$ 5%	

### **3.5 Análisis de datos**

La asociación entre los resultados obtenidos en la celularidad de los lavajes bronco-alveolares y la presencia o no de signos clínicos se realizará de manera descriptiva, exponiéndose los resultados en forma de gráficos y/o tablas y discutiéndose comparativamente los mismos.

## 4. Resultados

### 4.3 Animales Sintomáticos

#### 4.3.1 Equino 1

Reseña: Macho castrado, 10 años de edad, mestizo, zaino oscuro, 500kg de peso, actividad deportiva (salto).

Alojamiento en corral de día y estabulado de noche en cama de viruta con buena ventilación, ración a base de forraje (alfalfa o pastura) que se administra en el piso o pastera y avena administrada en comederos altos.

Anamnesis: Dificultad respiratoria luego del ejercicio (línea de esfuerzo) y accesos de tos paroxística. Antecedentes de neumonía hace dos años y tos crónica con descarga nasal intermitente.

Signos Clínicos: FR: 17, patrón costoabdominal, Reflejo tusígeno positivo, rales mixtos en ambos hemitórax a la auscultación con bolsa de reinspiración.

Métodos complementarios:

Radiología: Aumento de opacidad pulmonar a expensas de patrón mixto, intersticial y bronquial, en forma difusa. Más marcado el patrón intersticial con infiltrado peribronquial en bronquios mayores, medianos y pequeños. Mayor opacidad pulmonar, intersticial en área perihiliar (Apéndice 3, Figura 1).

Endoscopia en reposo: Cavidad nasal derecha con moco fluido en leve cantidad, hiperplasia linfoidea faríngea, desplazamiento dorsal del paladar blando intermitente presentando úlcera en el borde libre con una zona esclerosada y epiglotis ligeramente retraída en su vértice. La tráquea presenta secreción mucosa fluida (Grado 4) y carina levemente edematosa (Apéndice 3, Figura 2).

#### **Análisis BALF** (Apéndice 3, Figura 3 y 4)

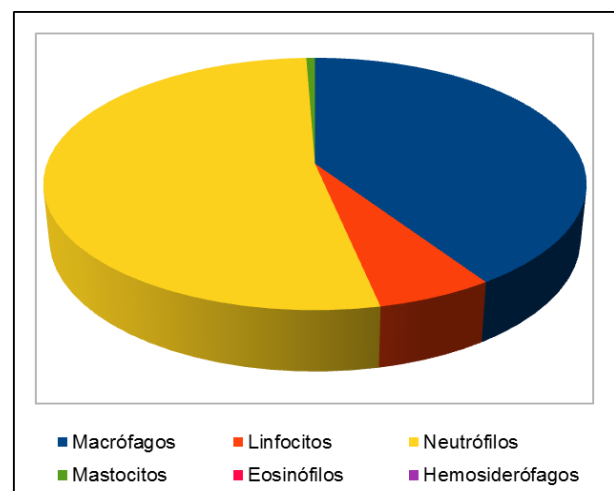
Examen Macroscópico:

- Volumen Recuperado: 80%
- Color: claro, translucido
- Turbidez: moderada
- Espuma: moderada

Examen Citológico:

Células	Recuento Relativo (%)
Macrófagos	40,7
Macrófagos Activados	77,9
Linfocitos	6
Neutrófilos	52,7
Mastocitos	0,6
Eosinófilos	–
Hemosideróforos	–

**Gráfico 1:** Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 1.



Observaciones: abundantes hebras de moco con predominio de macrófagos y neutrófilos en su interior. Presencia de abundantes células gigantes multinucleadas.

### 4.3.2 Equino 2

**Reseña:** Hembra, 3 años de edad, mestiza, zaina, utilizada para trabajo (cartonera). Alojamiento en galpón de noche a veces en cama de viruta con buena ventilación, ración a base de pasto y avena, administrada en el piso.

**Anamnesis:** Moco y tos, aumentando durando la noche.

**Signos Clínicos:** FR 40, patrón respiratorio abdominal, ritmo aumentado y profundidad disminuida, Reflejo tusígeno positivo, estertores traqueales y rales mixtos, principalmente crepitantes en ambos hemitórax a la auscultación.

**Métodos complementarios:**

**Radiología:** Aumento de opacidad pulmonar a expensas de patrón intersticial en forma difusa. Infiltrado peribronquial en forma esporádica (Apéndice 3, Figura 5).

**Endoscopia en reposo:** Cavidad nasal derecha con leve cantidad de moco. Tráquea con presencia de secreción mucosa fluida (Grado 3) y carina levemente edematosa (Apéndice 3, Figura 6).

**Análisis BALF** (Apéndice 3, Figura 7 y 8)

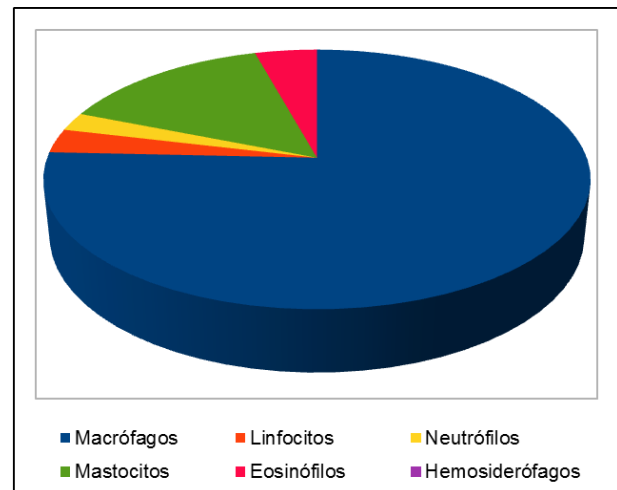
**Examen Macroscópico:**

- Volumen Recuperado: 60%
- Color: claro, translucido
- Turbidez: moderada
- Espuma: moderada

**Examen Citológico:**

Células	Recuento Relativo (%)
Macrófagos	75,7
Macrófagos Activados	97,8
Linfocitos	3
Neutrófilos	2,3
Mastocitos	14,7
Eosinófilos	4,3
Hemosiderófagos	—

**Gráfico 2:** Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 2.



**Observaciones:** abundantes hebras de moco con predominio de macrófagos en su interior. Presencia de abundantes células epiteliales en grupos y células caliciformes.

### 4.3.3 Equino 3

**Reseña:** Hembra, 14 años de edad, silla argentino, alazán, 644 kg de peso, utilizada por la policía montada.

Estabulado todo el día en cama de viruta con buena ventilación, ración a base de forraje que se administra en el piso y avena administrada en comederos altos.

**Anamnesis:** 10 días de internación debido lesión en miembro posterior derecho.

**Signos Clínicos:** FR: 8, patrón costoabdominal, Reflejo tusígeno positivo, leves rales mixtos en ambos hemitórax a la auscultación con bolsa de reinspiración.

**Métodos complementarios:**

**Radiología:** Aumento de opacidad pulmonar a expensas de patrón mixto, intersticial y bronquial, en forma difusa. Más marcado el patrón intersticial con infiltrado peribronquial difuso (Apéndice 3, Figura 9).

**Análisis BALF** (Apéndice 3, Figura 10 y 11)

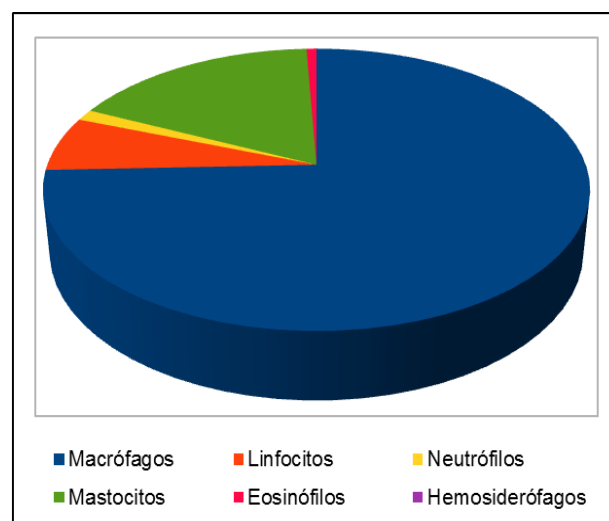
**Examen Macroscópico:**

- Volumen Recuperado: 80%
- Color: claro, translucido
- Turbidez: escasa
- Espuma: escasa

**Examen Citológico:**

Células	Recuento Relativo (%)
Macrófagos	74,4
Macrófagos Activados	76,7
Linfocitos	6,3
Neutrófilos	1,3
Mastocitos	17,3
Eosinófilos	0,7
Hemosiderófagos	–

**Gráfico 3:** Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 3.



**Observaciones:** escasa cantidad de hebras de moco con predominio de macrófagos en su interior.

#### 4.3.4 Equino 4

**Reseña:** Macho castrado, 9 años de edad, mestizo, picaso oscuro, 550kg de peso, actividad de paseo.

Alojamiento en corral de día y estabulado de noche en cama de viruta con buena ventilación, ración a base de forraje que se administra en el piso y avena administrada en comederos.

**Motivo de consulta:** tos crónica

**Anamnesis:** hace un año ingreso al hospital con un cuadro de tos crónica y dificultad respiratoria, se realizó endoscopia, y radiografía pero no se pudo realizar el BAL porque colapso durante el estudio mostrando mucosas cianóticas. Se lo diagnostica con ORA y se indica tratamiento ambiental y sintomático. Al mes se realiza un control, demostrando una clara mejoría en los signos clínicos, radiológicos y endoscópicos.

**Signos Clínicos:** FR: 12, patrón costoabdominal con leve predominio abdominal, secreción nasal serosa en cantidad moderada que luego de realizado el BAL aumenta y pasa a ser mucosa, Reflejo tusígeno positivo, rales crepitantes al final de la inspiración en ambos hemitórax en la región bronquial y alveolar a la auscultación con bolsa de reinspiración, presenta línea de esfuerzo marcada.

**Métodos complementarios:**

**Hematología:** Leucocitos: 12.100 células/μL (Neutrófilos: 75%, Neutrófilos en banda: 1%, Linfocitos: 21%, Monocitos: 3%)

**Radiología:** Aumento de opacidad pulmonar difuso, a expensas de patrón mixto, intersticial y bronquial con infiltrado peribronquial y gran demarcación de las paredes de los mismos (Apéndice 3, Figura 12).

**Análisis BALF** (Apéndice 3, Figura 13, 14 y 15)

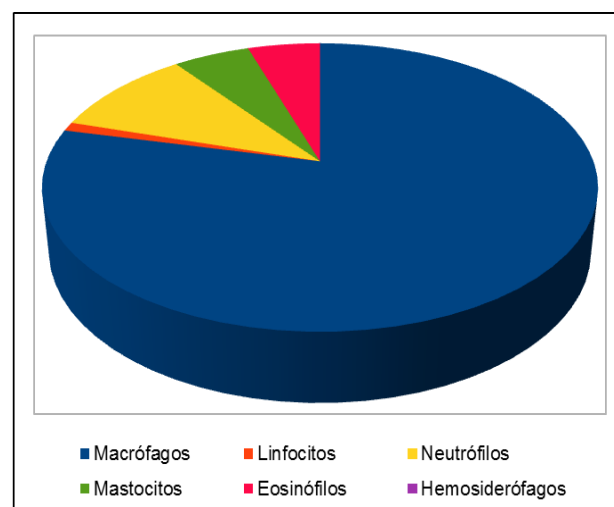
**Examen Macroscópico:**

- Volumen Recuperado: 57%
- Color: claro, translucido
- Turbidez: moderada con floculos moco
- Espuma: moderada

**Examen Citológico:**

Tipo Celular	Recuento Relativo (%)
Macrófagos	78,7
Macrófagos Activados	95,8
Linfocitos	1
Neutrófilos	10
Mastocitos	5,3
Eosinófilos	5
Hemosiderófagos	—

**Gráfico 4:** Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 4.



**Observaciones:** abundantes hebras de moco con predominio de macrófagos en su interior. Presencia de células gigantes multinucleadas.



### 4.3.5 Equino 5

**Reseña:** Macho entero, 8 años de edad, SPC, zaino, actividad de deporte (carrera). Estabulado todo el día en cama de viruta con buena ventilación, ración a base de forraje que se administra en pastera y avena administrada remojada en comederos altos.

**Anamnesis:** hace 10 días corrió y tuvo un sangrado leve por ollares. Historial de sangrador crónico. Última carrera demostró baja performance.

**Signos Clínicos:** FR: 16, patrón costoabdominal, secreción nasal serosa en cantidad moderada, Reflejo tusígeno positivo, rales crepitantes al final de la inspiración en ambos hemitórax en la región caudodorsal más evidente en hemitórax izquierdo.

#### Métodos complementarios:

**Radiología:** Se observa un área radiodensa en la porción caudodorsal del lóbulo diafragmático en las inmediaciones de la terminación del bronquio principal. A semeja un área de fibrosis pulmonar, compatible con un cuadro de HPIE (Apéndice 3, Figura 16).

#### **Análisis BALF** (Apéndice 3, Figura 17, 18 y 19)

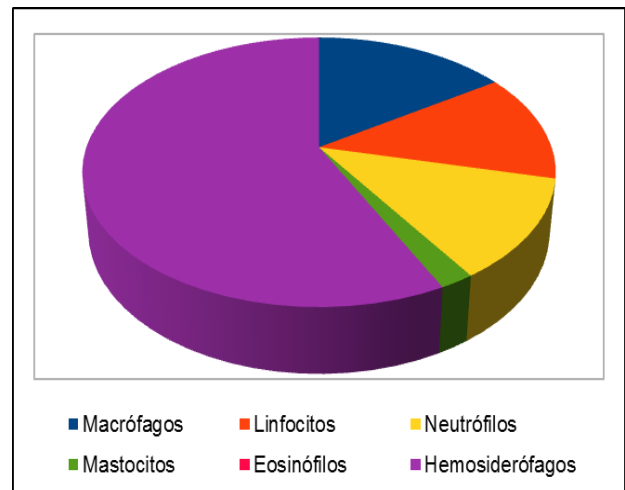
##### Examen Macroscópico:

- Volumen Recuperado: 76,7%
- Color: levemente rosado anaranjado
- Turbidez: moderada con flóculos rojo anaranjados
- Espuma: moderada

##### Examen Citológico:

Tipo Celular	Recuento Relativo (%)
Macrófagos	15,7
Macrófagos Activados	59,6
Linfocitos	13
Neutrófilos	12
Mastocitos	2
Eosinófilos	–
Hemosiderófagos	57,3

**Gráfico 5:** Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 5.



**Observaciones:** cantidad moderada de hebras de moco con predominio de hemosiderófagos en su interior. Presencia de células epiteliales en escasa cantidad, eritrofagocitosis y eritrocitos sueltos en cantidad moderada.

### 4.3.6 Equino 6

**Reseña:** Hembra, 8 años de edad, poni mestizo, tobiana negra, 130 kg de peso, utilizada como mascota.

Alojamiento a campo, ración a base de pasto y avena.

**Motivo de consulta:** dificultad respiratoria.

**Anamnesis:** Lleva 18 días internada a causa de un cuadro respiratorio grave con historial de moco y dificultad respiratoria previo de aproximadamente 10 días. Al momento del ingreso presentaba mucosas cianóticas, disnea, rales en ambos hemitórax, pleurodinia, descarga mucopurulenta de un ollar y fiebre. La hematología dio 9500 leucocitos/ $\mu$ L (Neutrófilos: 77%, Linfocitos: 18%, Monocitos: 4%, Eosinófilos: 1%). El estudio radiológico reveló aumento de la opacidad pulmonar a expensas de un patrón mixto muy marcado, bronquial e intersticial, difuso. Se comenzó con tratamiento antibiótico, antiinflamatorio y broncodilatador.

**Signos Clínicos:** FR: 36, patrón abdominal levemente superficial, tos espontánea en reposo, reflejo tusígeno positivo (tos paroxística), secreción nasal serosa leve del ollar derecho y mucoserosa del ollar izquierdo, estertores traqueales y rales sibilantes y crepitantes severos en ambos hemitórax a la auscultación.

**Métodos complementarios:**

**Radiología:** Mejoría respecto al primer estudio, con aumento de radiolucidez en forma difusa y demarcación bronquial e intersticial, este último menos marcado (Apéndice 3, Figura 20).

**Endoscopia en reposo:** Presencia de secreción mucosa traqueal en escasa cantidad (Grado 2). Carina levemente edematosa. Se observa un marcado broncoespasmo al ingresar a vías aéreas más estrechas (Apéndice 3, Figura 21).

**Hematología:** Leucocitos: 14900 células/ $\mu$ L (Neutrófilos: 86%, Linfocitos: 14%)

**Análisis BALF** (Apéndice 3, Figura 22, 23 y 24)

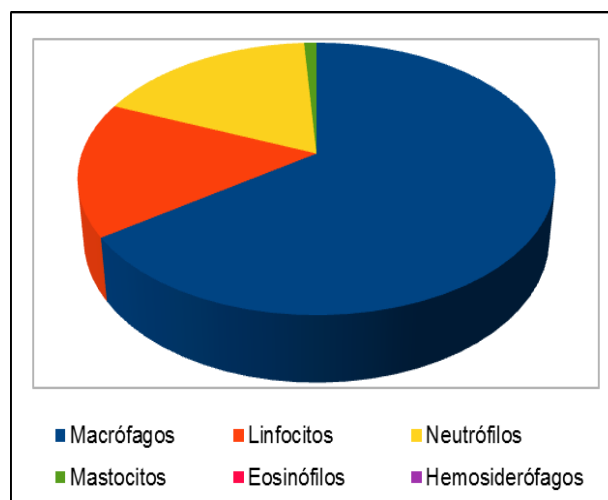
**Examen Macroscópico:**

- Volumen Recuperado: 78%
- Color: claro, translucido
- Turbidez: moderada con abundantes flóculos de moco
- Espuma: moderada

**Examen Citológico:**

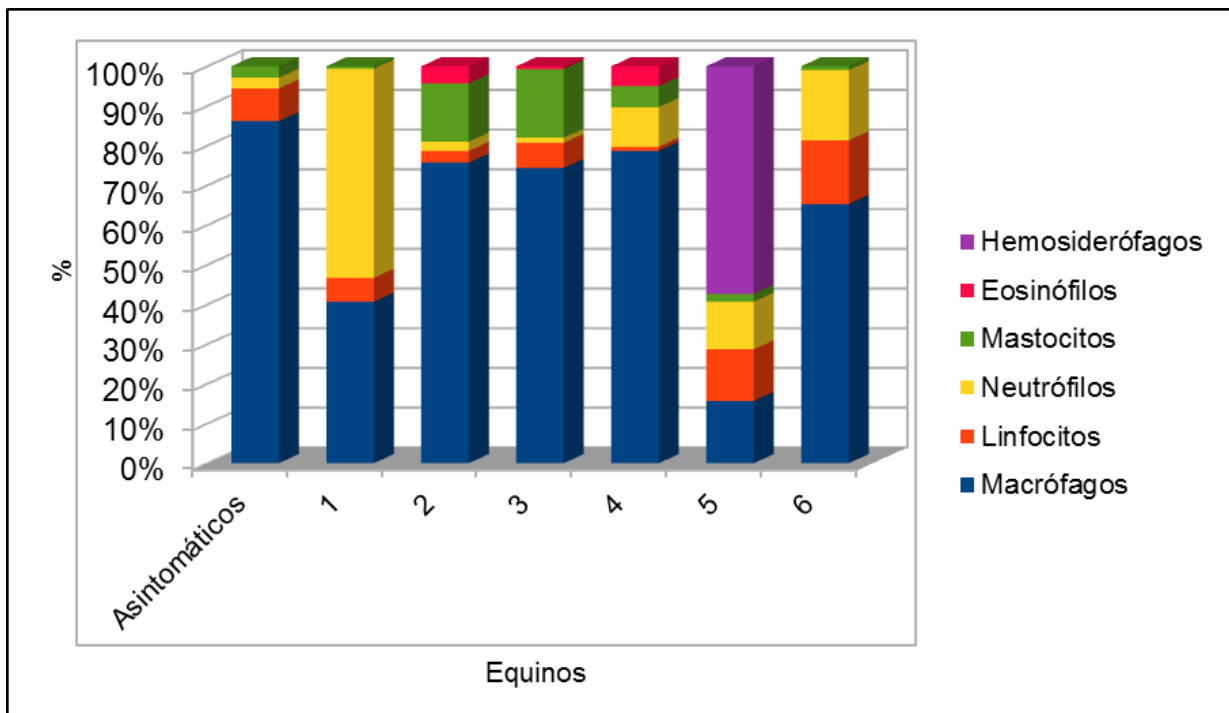
Tipo Celular	Recuento Relativo (%)
Macrófagos	65,3
Macrófagos Activados	68,4
Linfocitos	16
Neutrófilos	17,7
Mastocitos	1
Eosinófilos	
Hemosiderófagos	

**Gráfico 6:** Recuento celular relativo del BALF del equino sintomático 6.



Observaciones: Abundante cantidad de hebras de moco con presencia de espirales de Curschmann. Se evidencia una elevada cantidad de células en el interior de las hebras de moco, siendo los neutrófilos las células predominantes. Macrófagos activados con citoplasma espumoso, otros con material fagocitado en su interior y moderada cantidad de células multinucleadas. Dentro de los neutrófilos, escasa cantidad de células en banda y moderada cantidad de neutrófilos con cambios degenerativos (tumefacción nuclear, pérdida de segmentación del núcleo y cariorrexis). Presencia de bacterias extracelulares e intracelulares, con forma bacilar y en abundante cantidad. Escasa cantidad de glóbulos rojos libres y células epiteliales sueltas con pérdida de cilias.

**Gráfico 7:** Comparación del promedio del recuento celular relativo del 1er BAL de los animales asintomáticos con cada animal sintomático (1-6)



#### 4.1 Animales Asintomáticos (Primer BAL, Día 0)

Los equinos pertenecientes al grupo de animales asintomáticos presentaron parámetros clínicos dentro del rango de referencia, tres de ellos mostraron descarga nasal serosa en escasa cantidad (equinos 2, 3 y 5) y otro reflejo tusígeno positivo (equino 6), con un solo acceso de tos, los cuales no fueron tenidos en consideración ya que no se encontraban combinados con otro signo respiratorio.

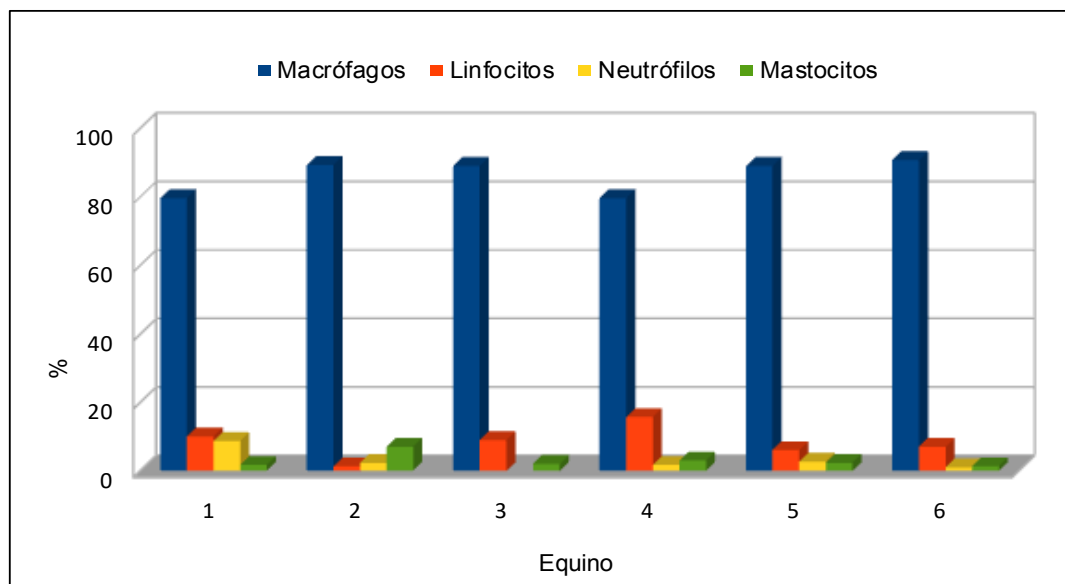
De los equinos que componen el grupo, cinco de ellos (equino 1 al 5) habían pasado los últimos tres meses a campo (no estabulados) y 24 horas previas a la realización del BAL habían viajado juntos en un trailer cerrado durante aproximadamente 40 minutos, pasando esa noche estabulados en cama de viruta dentro del hospital. Con respecto al equino '6', este llevaba diez días de internación (siguiendo el régimen de alojamiento y alimentación descrito anteriormente) y se corresponde al equino que tuvo reflejo tusígeno positivo, por lo cual el clínico decidió la realización de un estudio radiológico que indicó aumento de la opacidad pulmonar a expensas de un patrón intersticial difuso y demarcación peribronquial de algunos pequeños bronquios en forma esporádica.

En relación al BAL, el volumen recuperado fue en promedio de 66% (rango: 50–85%) y en todos los casos el líquido obtenido fue translucido, incoloro, con espuma y levemente turbio con escasa cantidad de flóculos claros. Los hallazgos citológicos y el recuento celular relativo de cada equino se encuentran detallados en la tabla 2 y el gráfico 1 (Apéndice 4, Figura 1, 3, 5, 7, 9 y 11). El Rango y promedio del recuento celular relativo esta expresado en la tabla 3 y el gráfico 2.

**Tabla 2:** Resultados de la citología del primer BAL de los equinos asintomáticos.

Equino	Recuento Celular Diferencial (%)						Observaciones
	Macrófagos totales	Macrófagos activados	Linfocitos	Neutrófilos	Mastocitos	Eosinófilos	
1	79,6	50,6	10	8,7	1,7	_	Moderada cantidad de hebras de moco, células caliciformes y células epiteliales
2	89,3	81,7	1,3	2,3	7	_	Escasa cantidad de hebras de moco
3	89	54,3	9	_	2	_	Escasa cantidad de hebras de moco
4	79,6	69,9	15,7	1,7	3	_	Abundante cantidad de hebras de moco
5	89	80,9	6	2,7	2,3	_	Escasa cantidad de hebras de moco, abundantes células caliciformes y epiteliales, macrófagos con abundante cantidad material fagocitado en su interior
6	90,7	84,2	7	1	1,3	_	Abundante cantidad de hebras de moco, células multinucleadas gigantes y abundantes células epiteliales

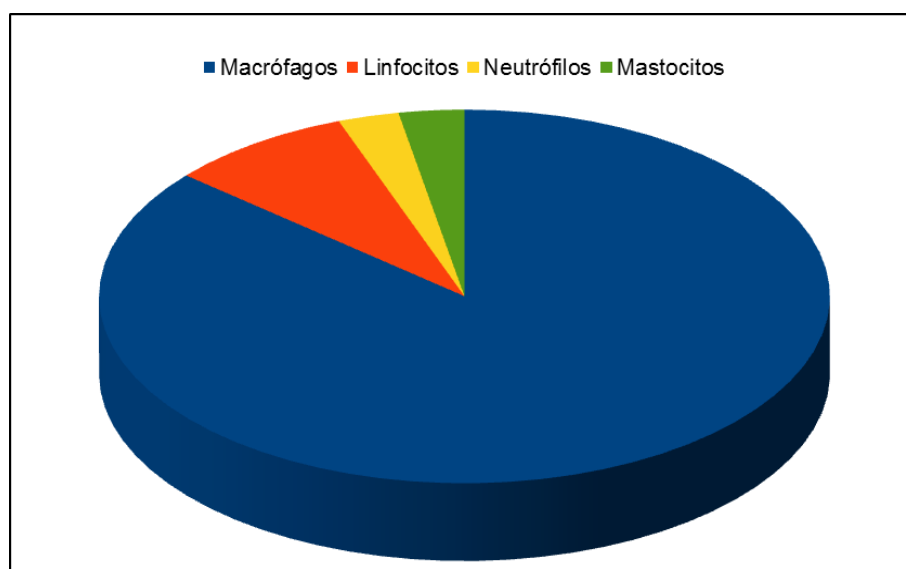
**Gráfico 8:** Recuento celular relativo de la citología del primer BAL de los equinos asintomáticos.



**Tabla 3:** Rango y promedio del recuento celular relativo del primer BAL de los equinos asintomáticos.

Células	Rango (%)	Promedio (%)
<b>Macrófagos totales</b>	79,6 – 90,7	86,2
<b>Macrófagos activados</b>	50,6 – 84,2	70,3
<b>Linfocitos</b>	1,3 – 15,7	8,2
<b>Neutrófilos</b>	0 – 8,7	2,7
<b>Mastocitos</b>	1,3 - 7	2,9

**Gráfico 9:** Valores promedio del recuento celular relativo del primer BAL del grupo de equinos asintomáticos.



## **4.2 Animales asintomáticos luego de un mes estabulados** **(Segundo BAL, Día 30)**

Los cinco equinos pertenecientes al grupo de animales asintomáticos que habían pasado los últimos tres meses a campo fueron sometidos al régimen de estabulación de los equinos residentes en el Hospital Escuela de la FCV-UNLP. A partir de un periodo de tiempo superior al mes de ingresados y realizado el primer BAL, se repitió el examen físico completo y el lavaje obteniendo los resultados expresados en la Tabla.

El examen físico no reveló ningún cambio con respecto al primero, permitiendo mantener a estos animales bajo la definición establecida de animales asintomáticos. El único hallazgo correspondió a descarga nasal en escasa cantidad, muco-serosa en el equino 1 y serosa en el equino 5. El BALF recuperado fue en promedio un 63% del líquido infundido (rango: 56%-73%) y el aspecto macroscópico de todas las muestras fue similar al del primer BAL. La citología del segundo BAL de cada equino se encuentra detallada en la tabla 4 (Apéndice 4, Figura 2, 4, 6, 8, 10) y el rango y promedio del recuento celular relativo del grupo de equinos se puede observar en la tabla 5. La comparación entre el primer y segundo BAL se encuentra expresada en los gráficos 3 al 8.

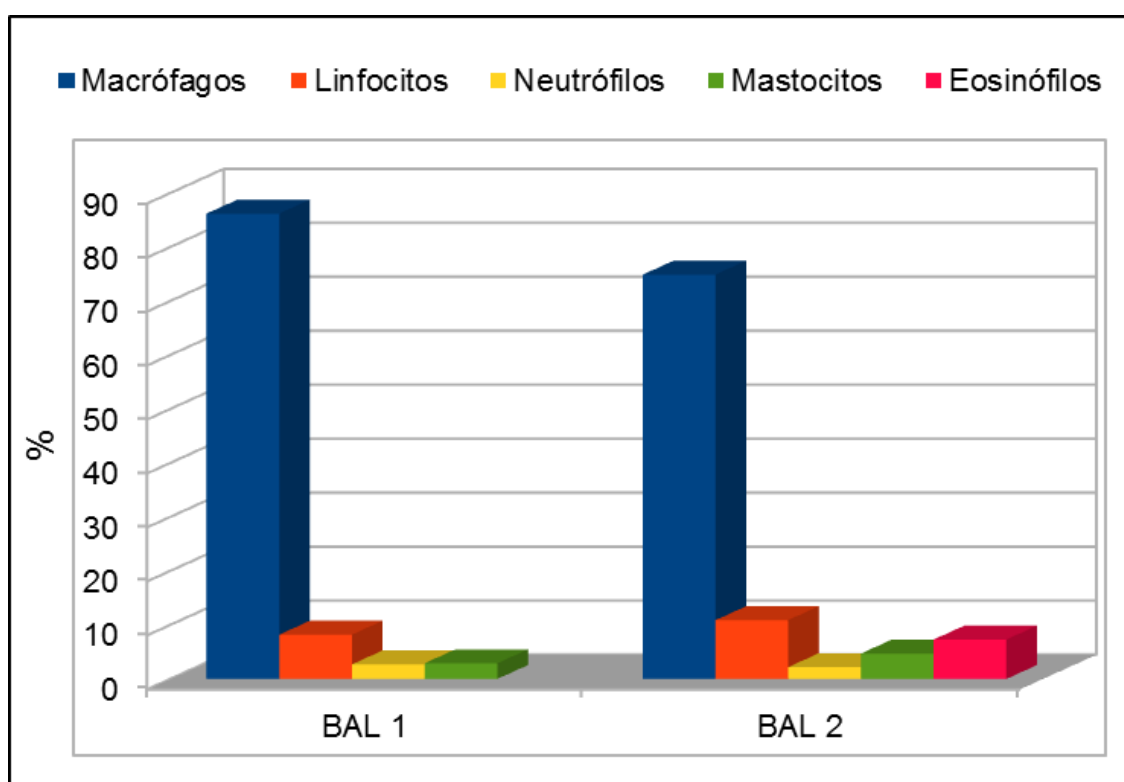
**Tabla 4:** Resultados de la citología del segundo BAL de los equinos asintomáticos.

Equino	Recuento Celular Diferencial (%)						Observaciones
	Macrófagos totales	Macrófagos activados	Linfocitos	Neutrófilos	Mastocitos	Eosinófilos	
1	55,6	93	11,7	0,7	4	28	Moderada cantidad de hebras de moco.
2	80,4	71,3	6,3	1	8	4,3	Escasa cantidad de hebras de moco y células gigantes multinucleadas.
3	92	87,3	2,7	1	4	0,3	Moderada cantidad de hebras de moco y células gigantes multinucleadas.
4	80,7	78,5	14,7	1,6	2	1	Abundante cantidad de hebras de moco.
5	66	83	19,3	6,7	5,3	2,7	Moderada cantidad de hebras de moco, células gigantes multinucleadas y macrófagos con abundante cantidad material fagocitado en su interior

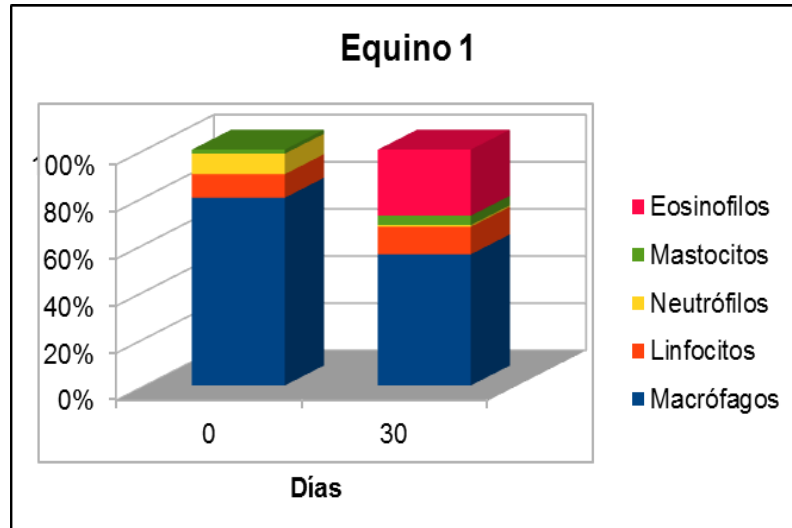
**Tabla 5:** Rango y promedio del recuento celular relativo del segundo BAL de los equinos asintomáticos.

Células	Rango (%)	Promedio (%)
<b>Macrófagos totales</b>	55,6 - 92	74,9
<b>Macrófagos activados</b>	71,3 - 93	82,6
<b>Linfocitos</b>	2,7 - 19,3	10,9
<b>Neutrófilos</b>	0,7 - 6,7	2,2
<b>Mastocitos</b>	2 - 8	4,7
<b>Eosinófilos</b>	0,3 - 28	7,3

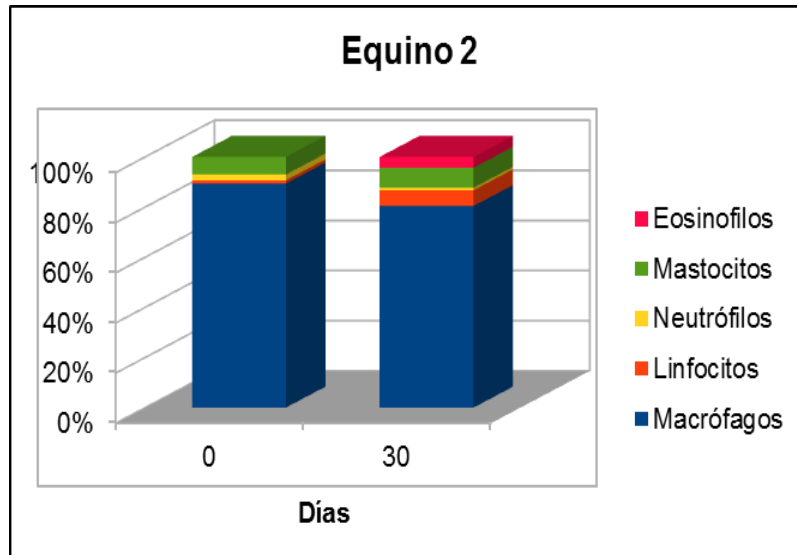
**Gráfico 10:** Comparación del promedio del recuento celular relativo del primer y segundo BAL de los equinos asintomáticos.



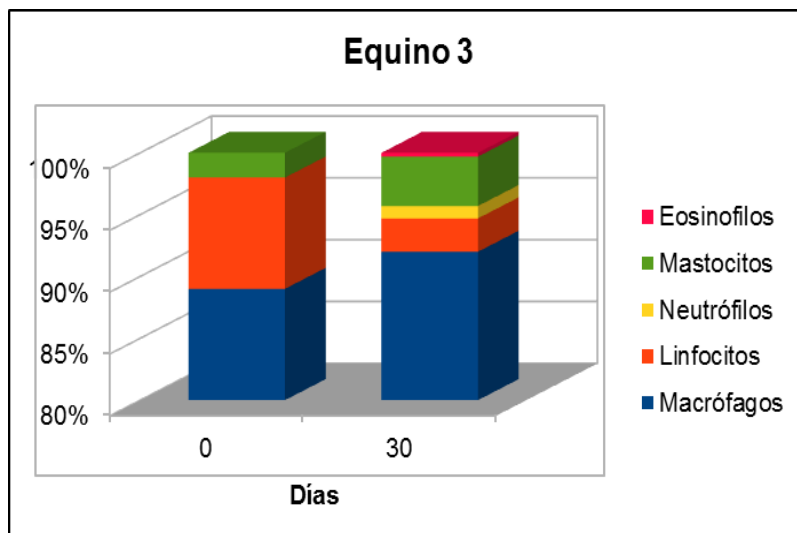
**Gráfico 11:** Comparación del recuento celular relativo del primer (día 0) y segundo BAL (día 30) del equino asintomático 1.



**Gráfico 12:** Comparación del recuento celular relativo del primer (día 0) y segundo BAL (día 30) del equino asintomático 2.

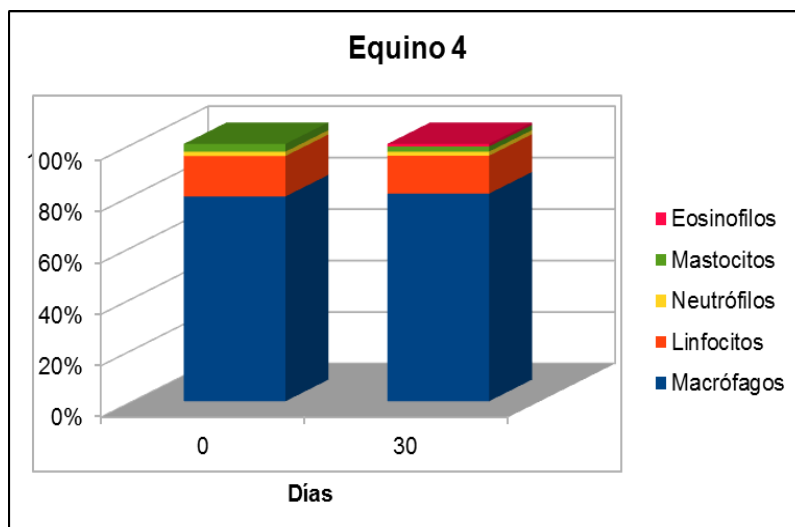


**Gráfico 13:** Comparación del recuento celular relativo del primer (día 0) y segundo BAL (día 30) del equino asintomático 3.

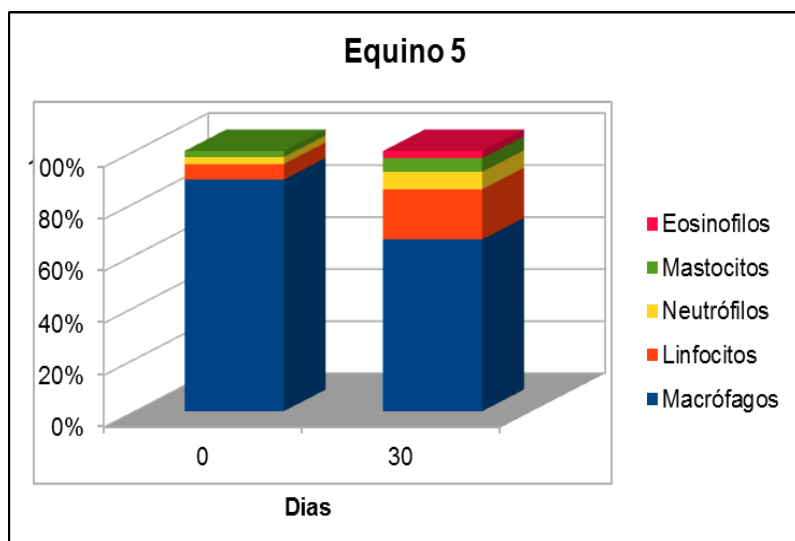




**Gráfico 14:** Comparación del recuento celular relativo del primer (día 0) y segundo BAL (día 30) del equino asintomático 4.



**Gráfico 15:** Comparación del recuento celular relativo del primer (día 0) y segundo BAL (día 30) del equino asintomático 5.



## 5. Discusión

En este trabajo se realizó la técnica de lavado broncoalveolar en pos de evaluar la citología presente en diferentes tipos de animales, independientemente de que tuvieran signos clínicos de afección respiratoria o no, con el fin de comparar estos hallazgos con aquellos establecidos internacionalmente como referencia. En este sentido, en la evaluación del BALF se consideraron tanto los aspectos macro como microscópico del mismo, a fin de detectar variaciones entre aquellos animales clínicamente sanos respecto de los que presentaron algún signo respiratorio en el examen.

Comenzando con el examen macroscópico, todas las muestras del grupo de animales asintomáticos, mostraron características normales, recuperando líquido claro espumoso, indicando la presencia de surfactante y por lo tanto una correcta toma de muestra desde las porciones alveolares. Por lo contrario, en los animales sintomáticos, se observó en cinco de ellos un aumento de la turbidez con presencia de flóculos y moco más evidente, uno de estos con una coloración anaranjada-rojiza, indicando la posible presencia de glóbulos rojos. El volumen recuperado vario ampliamente en ambos grupos, no pudiendo de esta manera asociarse bajos volúmenes recuperados a alteraciones de las vías aéreas, como el asma severo, a diferencia de lo descrito por diversos autores (Hodgson y Hodgson, 2007; Jean y col., 2011).

Los animales sintomáticos presentaron una amplia variación en la citología del BALF, con distintos incrementos relativos en las células inflamatorias, pero en todos los casos superando ampliamente los valores de referencia para animales sanos y el promedio de los animales asintomáticos, tanto del primero como segundo BAL.

Siguiendo el criterio propuesto para la interpretación de la citología del BALF pero sin tener en consideración los signos clínicos específicos, tres de los equinos sintomáticos entrarían dentro de la clasificación de asma leve-moderado y uno dentro del asma severo.

El equino 1 diagnosticado como asmático severo a causa de un notorio aumento en la proporción de neutrófilos coincide en muchos aspectos con las características descritas para esta enfermedad (animal adulto con tos frecuente, intolerancia al ejercicio con exacerbación de la signología respiratoria luego del mismo, rales pulmonares y moco traqueal >2/5), sin embargo no presentó la principal signología para diferenciarlo del asma leve-moderado que se corresponde a un evidente esfuerzo respiratorio en reposo. Además, otro detalle que difiere en lo encontrado comúnmente por otros autores (Hodgson y Hodgson, 2007; Jean y col., 2011) en los casos de animales con ORA, es que se recuperó un alto porcentaje del líquido infundido. Estas variaciones podrían explicarse por el hecho de que al momento del examen clínico y lavaje, el equino no se encontrara en uno de los

estadios de exacerbación del asma severo, aunque en este caso la citología de BALF tendría que haber estado más cercana a los valores normales, según fue descrito en otros trabajos de investigación (McGorum y Dixon, 1994; Barton y Gehlen, 2016). Por último, es interesante destacar que el cuadro de tos frecuente que presentaba el animal coincide con un aumento en la proporción de neutrófilos, relación establecida previamente por diversos autores (Richard y Robinson, 2016).

En el caso de los tres equinos cuya citología permite situarlos como asmáticos leve-moderados, nos encontramos con un amplio rango de severidad de signos clínicos, edad de presentación y recuento diferencial del BALF, lo cual nos permitiría reconocer los distintos fenotipos descritos por Couetil y col. Sin embargo, no hay exacta concordancia con los mismos. En el equino 2 por ejemplo, que es un animal joven con signología respiratoria severa y antecedentes de tos y moco, la citología presentó un aumento marcado de mastocitos y leve de eosinófilos, lo que coincidente con su edad, no lo es con su signología, ya que estos autores asociaron la tos y moco traqueal con neutrofilia en el BALF. Además, en este caso el equino presentó esfuerzo respiratorio en reposo, lo que como fue mencionado anteriormente, se asocia a asma severo y no asma leve-moderado.

Algo similar ocurrió en el equino 3, cuya citología también se caracterizó por una marcada mastocitosis pero en este caso no se evidenció esfuerzo respiratorio en reposo, correspondiéndose a un caso subclínico de asma. En este caso la discordia con lo descrito en la bibliografía se encuentra en su edad (14 años) en cuyo caso sería más común encontrar neutrófilos como célula inflamatoria predominante y no mastocitos.

Por último el equino 4 presentó una inflamación mixta, con valores de neutrófilos, mastocitos y eosinófilos en el límite inferior de lo considerado característico del asma leve. Este animal había sido diagnosticado previamente con asma severo y tratado correspondientemente, y si bien al momento del examen clínico y BAL no presentó signología respiratoria grave, su edad, cuadro clínico e historial permiten continuar clasificándolo como asmático severo en remisión, presentado una citología cercana a los valores normales, evento característico de estos casos. Además, otra posible explicación se encuentra en lo descrito por Michelotto y col. (2013), quienes describen que el predominio de un solo tipo celular ocurre en etapas tempranas de la inflamación pulmonar y a medida que avanza la respuesta inflamatoria nos encontramos con una respuesta celular mixta.

El equino 5 es un clásico caso de HPIE, caracterizado por un predominio de hemosiderófagos, así como también de glóbulos rojos libres y eritrofagocitosis. Es interesante mencionar el aumento en la proporción de neutrófilos, el cual si bien no es muy marcado, es indicador de inflamación pulmonar. La causa de este aumento resulta compleja de identificar ya que se puede producir como respuesta inflamatoria a

la presencia de sangre en los alveolos e intersticio o también existe la posibilidad de que el equino presentara asma previo al sangrado, considerando a esta enfermedad como la afección de base y una probable causa de la HPIE debido a la inflamación y broncoespasmo que genera. Esto estaría de acuerdo con los estudios que reportan un aumento de neutrófilos junto con los hemosiderófagos (Sánchez y col., 2004), apoyando la hipótesis de que una inflamación de las vías aéreas podría ser causa o consecuencia de una hemorragia pulmonar. Resultaría interesante realizar un nuevo BAL luego de que el pulmón se haya recuperado del episodio de sangrado para ver cómo es la citología del animal en reposo, pudiendo de este modo diagnosticar si verdaderamente presenta asma. Sin embargo, esto requeriría meses de reposo ya que los hemosiderófagos se encuentran en el BALF varios meses posteriores al sangrado y de esta manera excede el periodo de investigación de este trabajo.

Por último, el equino 6 presento una citología completamente diferente a las descritas anteriormente. Fue el caso clínico con sintomatología más grave, estando contraindicado el BAL al momento del ingreso debido a la marcada disnea, hipoxemia, debilidad y presencia de mucosas cianóticas. Luego de 18 días de tratamiento con antibióticos (por 9 días), antiinflamatorios y broncodilatadores, y frente a una notoria mejoría de los signos, se decide realizar el BAL, utilizando 10 minutos antes broncodilatadores inhalatorios (Salmeterol + Fluticasona). Si bien el recuento diferencial solo evidenció un aumento moderado de neutrófilos, son los detalles citológicos y otros hallazgos, lo que hacen interesante este caso. Primero se debe destacar la gran cantidad de moco recuperado en el BAL, el cual a la observación microscópica demostró tener atrapado en su interior una abundante cantidad de células, en su mayoría neutrófilos, lo cual nos lleva a desconfiar del recuento celular relativo realizado en las células libres, fuera del moco, dudando de la valoración real del porcentaje solo moderadamente aumentado que presentaron los neutrófilos. El hallazgo de células epiteliales con pérdida de cilias y los macrófagos activos, ya sea en forma de células multinucleadas, macrófagos con citoplasma espumoso o con contenido en su interior, se puede asociar tanto a cuadros infecciosos como inflamatorios crónicos, lo que no ayuda a establecer el diagnóstico definitivo. En el caso de los neutrófilos, se encontró una baja cantidad de neutrófilos en banda, generalmente asociados a inflamación aguda, y otros con cambios degenerativos, así como presencia de bacterias intracelulares, lo cual lleva a inferir que se trata de una inflamación séptica. Si bien en caso de infecciones, la bibliografía hace referencia a aumentos de neutrófilos más marcados con porcentajes mayores al 40% (Cian y col., 2015), también esta descrito que en casos de infección persistente generalmente disminuye el número de neutrófilos y aumenta el porcentaje de macrófagos (Zinkl, 2001). Por lo contrario, los espirales de Curschmann's se asocian a procesos crónicos (Couëttil y col., 2016; Jean y col., 2011; Hodgson y Hodgson, 2007), pudiendo indicar

una patología de base alérgica, complicada con un proceso infeccioso. Esto nos permite recalcar lo observado por Cian y col. (2015), quienes hacen hincapié en que la citología del BAL puede no ser suficiente para la distinción entre la inflamación séptica y no séptica, ya que los hallazgos muchas veces son similares. Por lo tanto, la signología, hematología y bioquímica sanguínea debe tener mayor peso al momento de diagnosticar una infección pulmonar. Teniendo en cuenta que este caso en un comienzo presentó signología que orienta el diagnóstico hacia una infección, como la fiebre que presentó al ingreso, y que ya no se encontraba con antibióticos hacía varios días, se podría haber realizado primero un lavaje o aspiración transtraqueal con el objetivo de obtener muestras para cultivo bacteriano, ya que una de las principales desventajas del BAL es la imposibilidad de realizar cultivos a partir de la muestra obtenida. Aun así, el BAL resulta una herramienta útil para distinguir, si existiera, una enfermedad primaria de base alérgica.

Analizando el grupo de equinos sintomáticos en conjunto, la teoría de que diferentes perfiles citológicos de BAL se correlacionan con determinados signos clínicos (Christley y Rush, 2007), no pudo ser comprobada, debido a amplias variaciones en la historia y signología de los equinos y el escaso número de animales en estudio.

En el caso de la relación establecida por diversos autores (de Almeida y col., 2015; Hoffman, 2011; Bedenice y col., 2008; Robinson y col., 2003;) entre la tos crónica y la proporción de neutrófilos, esta fue evidenciada en dos de los tres animales con esta signología, mientras que la relación entre este signo y el porcentaje de macrófagos, descrito por Michelotto y col. (2013) no fue tan clara ya que los tres casos presentaron una proporción de macrófagos menor al promedio de los animales asintomáticos, aunque es importante aclarar que dos de estos casos demostraron un muy alto número de macrófagos activos y células gigantes multinucleadas, lo cual es igualmente evidencia de inflamación pulmonar. Con respecto al acumulo de moco traqueal, confirmado solamente en tres de los equinos a falta de examen endoscópico en el resto, no se pudo correlacionar a ningún tipo de célula inflamatoria, presentándose tanto en casos de inflamación neutrofílica, mastocítica o mixta. Esto último concuerda con lo expuesto por Richard y col. (2010) pero difiere con Koblinger y col. (2011) que correlaciono el acumulo de moco traqueal de manera positiva al porcentaje de neutrófilos y de manera negativa al porcentaje de mastocitos.

Moran y col. (2009) encontraron concordancia entre el porcentaje de neutrófilos en el BALF y la gravedad de los síntomas clínicos, sin embargo en este trabajo esta relación no fue observada, encontrando animales con alta neutrofilia pero signos moderados (equino sintomático 1) y animales con leve aumento de neutrófilos y severa signología respiratoria (equino sintomático 2, 4 y 6). Otro dato a tener en cuenta es lo descrito por Fernandez y col. (2013) y también observado en este

trabajo, donde la inflamación leve a moderada de las vías aéreas inferiores observada en la citología del BALF se caracteriza más frecuentemente por un aumento en mastocitos y/o eosinófilos, pero no en neutrófilos.

A pesar del número reducido de equinos de este estudio, no se encontró relación entre la edad del animal y la presencia de asma leve-moderado o severo, aunque si cabe destacar que todos los animales vivían estabulados.

Este trabajo apoya la teoría propuesta por Mazan (2015) de que es imposible la diferenciación definitiva entre asma leve-moderado y asma severo únicamente en base a la citología del BALF y que estos estadios del asma equino no son fáciles de separar, aun contando con otros métodos complementarios de diagnóstico, debido a las similitudes clínicas y citológicas que presentan. Quedando en manifiesto la naturaleza dinámica de esta enfermedad en relación al ambiente, clima, época del año y factores intrínsecos del animal (Couëttil y col., 2016).

En relación a los otros métodos complementarios realizados en los equinos sintomáticos, cabe mencionar los estudios radiológicos, los cuales en todos los casos demostraron alteraciones. En los equinos 1, 2, 3 y 4 con diagnóstico presuntivo de asma, y el equino 6 considerado asmático con complicación de una infección bacteriana, los hallazgos descritos fueron generalmente aumento de opacidad pulmonar a expensas de patrón intersticial, bronquial o mixto, pero en todos los casos en forma difusa. Si bien se presentaron patrones anormales en las radiografías, estos no pudieron ser asociados a una citología particular del BALF, ni permitieron diferenciar entre asma leve-moderado y asma severo, ni la inflamación séptica de la no séptica. Sin embargo, la excepción fue el equino 5 con HPIE, donde los hallazgos fueron completamente distintos, con una lesión focalizada en caudo-dorsal.

El grupo de animales asintomáticos también presentó una gran variabilidad en el recuento celular diferencial. Los macrófagos alveolares fueron la célula predominante en las muestras obtenidas, resultado coincidente con los reportes bibliográficos (Hoffman y col., 2002; Viel y Hewson, 2003; Hodgson y Hodgson, 2007), sin embargo en todos los casos supero ampliamente el valor de referencia del 60%. En este estudio, se diferenció a los macrófagos activos de los macrófagos inactivos, tomando en cuenta ciertas características morfológicas de los mismos. No hay reportes que diferencien entre estos diferentes estados de los macrófagos y por lo tanto no se han establecido valores de corte para los macrófagos activos. Sin embargo, está descrito un aumento de células multinucleares gigantes en casos de inflamación pulmonar crónica, así como un aumento en la proporción de macrófagos en caballos de carrera con tos crónica (Michelotto y col., 2013). En este trabajo se encontró que aún los caballos asintomáticos presentaban más del 50% de los macrófagos activos, algunos de ellos con material fagocitado en su interior así como en forma de células gigantes multinucleadas. Si bien no hay investigaciones que

orienten hacia el significado de altos niveles de macrófagos activos en equinos asintomáticos, es posible inferir que un alto nivel de activación de estas células podría deberse a la presencia de agentes potencialmente nocivos para el pulmón y el consecuente incremento de la actividad macrofágica.

En relación a los linfocitos se evidencio una baja proporción de los mismos si se considera que los valores de referencia rondan el 35%, sin embargo no hay reportes que indiquen el límite inferior a ser considerado normal y diversos autores coinciden en que estas células junto con los macrófagos no son realmente relevantes para el diagnóstico de la enfermedad pulmonar difusa y por lo tanto no se le debe adjudicar importancia al momento de la interpretación del recuento diferencial (Hoffman, 2008; Couëtil y col., 2007; Pickles et al., 2002). En la bibliografía se ha descrito, particularmente en medicina humana, la dificultad en la diferenciación entre los macrófagos pequeños inactivos y los linfocitos grandes (Hewson y Viel, 2002), lo cual puede ser una posible explicación para el bajo porcentaje de linfocitos encontrado en las muestras.

Otra característica a destacar es la presencia de células epiteliales y caliciformes en la mitad de los animales que componen el grupo asintomático, las cuales no fueron incluidas en el recuento diferencial, si bien se las tuvo en cuenta al momento de la lectura, no detectando alteraciones morfológicas en las mismas. La relevancia de este tipo celular radica en que en los procesos inflamatorios, su descamación y recambio se encuentra incrementado y sobre todo se observan alteraciones en la morfología de las mismas. Esto último, sumado al recuento celular diferencial, puede arrojar una idea de la magnitud del proceso pulmonar presente.

Con respecto al resto de las células inflamatorias, el promedio de neutrófilos se mantuvo dentro del rango normal, si bien uno de los casos presento un aumento leve por sobre el valor de referencia. Los mastocitos se encontraron presentes en todas las muestras, con un amplio rango de valores, ocupando el promedio un lugar levemente superior al valor promedio considerado normal por los reportes internacionales, con tres casos levemente por sobre el límite del valor de referencia. Por último, ningún equino asintomático presento eosinófilos al momento del primer BAL.

Por lo tanto, cuatro de los seis animales asintomáticos (equinos 1, 2, 4 y 5) presentaron un aumento leve en el número de neutrófilos y/o mastocitos. Sin embargo, teniendo en cuenta el criterio utilizado internacionalmente para definir el asma en esta especie, solo el equino 2 debería ser clasificado como asma leve-moderado. La presencia de más del 5% de mastocitos en su BALF nos permite diagnosticar a este animal como asmático asintomático o subclínico. En el caso de los equinos 1, 4 y 5, con el mismo criterio, no pueden ser considerados como asintomáticos “sanos” o asintomáticos “con asma” desde el punto de vista citológico, ya que los valores de mastocitos se encuentran entre los valores de corte para ambos estados.

Es importante destacar que estos cuatro equinos asintomáticos que presentaron una citología anormal, junto con el equino 3 (citológicamente normal) habían pasado los últimos 3 meses a campo y previa realización del BAL, habían sido transportados en tráiler en un viaje de 30 minutos y pasado aproximadamente 12 horas estabulados. Este cambio en el ambiente podría explicar el aumento en células inflamatorias, ya que el pulmón responde rápidamente a nivel citológico frente a estímulos ambientales.

En la segunda etapa de estudio de los animales asintomáticos se utilizó a los cinco animales provenientes del campo (que incluía a los cuatro asintomáticos con citología anormal) y luego de más de un mes de un régimen de estabulación, se repitió el BAL para evaluar nuevamente la citología en el caso de que permanecieran asintomáticos o desarrollaran signología respiratoria. De esta manera, se pudo estudiar la utilidad de realizar muestras pareadas en equinos normales y casos cuya citología del BALF se encontraba entre los valores de corte para animales sanos y asmáticos, además de evaluar la evolución en la citología del animal asmático subclínico, luego de permanecer estabulado y sin tratamiento.

Como resultado se observó que si bien todos se mantuvieron sin sintomatología durante todo este período, hubo claras alteraciones en la citología del BALF a los treinta días de estabulación. Un hallazgo interesante, fue el aumento en la cantidad de hebras de moco en algunos de los animales. Si bien el moco traqueal no fue evaluado por endoscopia, fue observado macroscópicamente al momento de la recuperación del fluido de lavado y luego en los preparados citológicos. Esto coincide con lo descrito por Hodgson y Hodgson (2007), para equinos estabulados sin signos respiratorios; en relación al aumento en la cantidad de moco, sin que existan cambios citológicos o solo haya un leve aumento en el número de neutrófilos y gran porcentaje de macrófagos activados.

Al comparar los promedios del primer y segundo BAL, se evidencia una disminución en el porcentaje de macrófagos totales (destacándose un aumento en la proporción de los macrófagos activos y mayor presencia de células gigantes multinucleadas), junto con un leve aumento en los linfocitos. Para explicar este hallazgo debe tenerse en cuenta que el conteo celular realizado es relativo y no absoluto, por lo cual una disminución en el número de macrófagos se podría deber a un aumento en el número de otra célula inflamatoria y viceversa, sin ser necesariamente relevante al momento del análisis de datos. Aun así, estos cambios demuestran un mayor nivel de reactividad pulmonar, sobre todo al considerar el aumento de la proporción de macrófagos activos.

Continuando el análisis, se evidenció una leve disminución en el promedio de neutrófilos en el segundo BAL y un aumentó considerablemente en el porcentaje de mastocitos, duplicando el valor promedio del primer BAL. Si bien el aumento en la



proporción de mastocitos ha sido correlacionado con hiperreactividad de las vías aéreas (Hewson y Viel, 2002), este hallazgo debe ser interpretado con cautela debido a que también fue reportado en equinos clínicamente sanos (Hodgson y Hodgson, 2007).

El cambio más notorio se dio en la proporción de eosinófilos, ausentes en el primer BAL y luego no solo presentes en todos los equinos sino que, además, por encima del valor de referencia en tres de los cinco casos (equinos 1, 2 y 5). Se debe recalcar que en cuatro casos se produjo la aparición de eosinófilos junto con un aumento concomitante en el recuento de mastocitos. Esto se puede interpretar como una respuesta de hipersensibilidad tipo 1 a alérgenos inhalados (Hodgson y Hodgson, 2007) y concuerda con lo descrito por Hewson y Viel (2002) quienes atribuyen este hallazgo a la quimiotaxis de los eosinófilos en respuesta a la degranulación de los mastocitos. Por otro lado, un trabajo demostró que caballos de carrera clínicamente normales mostraron un aumento en el porcentaje de eosinófilos en el BALF realizado en verano, presuntamente debido a altas concentraciones de aeroalérgenos ambientales durante los meses de primavera y verano (Nolen-Walston y col., 2013). Si bien en este trabajo las muestras fueron tomadas a principio de otoño, esta descrito que en esta estación se encuentran mayor número de partículas en el ambiente, lo cual se asocia a altos niveles de polvo inhalado e inflamación de las vías aéreas, tanto en animales con baja performance como asintomáticos (Nolen-Walston y col., 2013).

El equino 1 demostró un valor superior al 5% de eosinófilos y por lo tanto fue considerado, a partir de este momento, como asmático leve sub-clínico. El equino 2 que fue clasificado como asmático asintomático a partir del primer BAL, mantuvo luego de 30 días niveles altos de mastocitos, ratificando de esta manera su diagnóstico inicial. En el caso 3 los mastocitos duplicaron su valor inicial y se produjo un leve aumento de neutrófilos y eosinófilos, pero manteniéndose dentro del rango normal para estas células, considerándolo, al igual que en el primer BAL como un equino citológicamente normal. El equino número 5, por otro lado, sufrió un aumento de neutrófilos, mastocitos y eosinófilos, superando los valores de referencia para estas células. En este caso el aumento de los mastocitos fue suficiente para superar el valor de corte establecido para el asma leve-moderado, pudiendo clasificarse a este animal como asmático asintomático, luego de un mes de estabulación. La excepción a este cuadro de modificaciones en la citología luego de un mes de estabulación fue observada en el equino 4 que presentó un 1% de eosinófilos y una sutil disminución de mastocitos, manteniéndose dentro de los rangos normales para todos los tipos celulares.

Un caso interesante para estudiar con mayor detenimiento es el equino asintomático 1 clasificado, luego de la estabulación, como asmático leve-moderado subclínico debido a un notorio aumento en la proporción de eosinófilos en el segundo

BAL. Casos similares de eosinofilia en el BALF, fueron descritos anteriormente por otros autores (Moran y col., 2009; Riihimäki y col., 2008; Hare y Viel, 1998). Aun así, cabe destacar que si bien los eosinófilos son importantes en el asma humano, su rol en el asma equino aun no fue definido (Hewson y Viel, 2002) y en este caso el aumento fue tan marcado que se evaluaron otras posibles causas, como parasitismo pulmonar o un cuadro poco frecuente en equinos denominado eosinofilia pulmonar idiopática (McGorum y Dixon, 1994). Sin embargo, en estas afecciones la eosinofilia generalmente es más severa y persistente. Por lo tanto, en este equino, la causa parece ser el efecto aditivo de las numerosas citoquinas producidas en los primeros estadios de una reacción de hipersensibilidad tipo I en el pulmón (Hare y Viel, 1998), ya que en un lavado posterior (tercer BAL realizado una semana más tarde) los eosinófilos volvieron a valores normales y se produjo un aumento en linfocitos y neutrófilos. Esto concuerda con lo descrito por Hewson y Viel (2002) y Riihimäki y col. (2008), quienes consideran que un número elevado de eosinófilos en el BALF es un hallazgo transitorio, y raramente repetible aun cuando se realice un segundo BAL dentro de las 24hs de la primera toma de muestra. A pesar de que el equino estaba desparasitado, un efecto concomitante de una parasitosis no puede ser descartado ya que no se realizaron estudios parasitológicos de heces ni del BALF y los antígenos parasitarios son particularmente buenos inductores de células T helper de tipo 2 (TH-2) cuya activación es necesaria para que se produzca la inflamación alérgica en el pulmón (Moran y col., 2009). Resulta importante aclarar que a la semana de realizado el segundo BAL el equino comenzó con signología de dificultad respiratoria caracterizada por episodios de taquipnea, respiración abdominal superficial, secreción nasal serosa, rales crepitantes en ambos hemitórax y secreción mucosa fluida (Grado 3) en tráquea. Debido a esto, se indicó otro lavaje bronco-alveolar (no mostrado) que evidenció los siguientes resultados: macrófagos: 37,3% (67% de los mismos activados), linfocitos: 51,7%, neutrófilos: 9%, mastocitos: 1,7% y eosinófilos: 0,3%. En este caso los linfocitos se encuentran aumentados en relación tanto al BAL anterior como al valor de referencia y el valor promedio de los animales asintomáticos obtenidos en este trabajo, pero se encuentran dentro del valor considerado normal por algunos autores debido al amplio rango observado en animales sanos. Esto hace que la interpretación de este hallazgo sea difícil y su significancia permanece desconocida (Michelotto y col., 2013). Aun así, y teniendo en cuenta la signología de este caso clínico, un porcentaje tan alto de linfocitos junto a un aumento moderado de neutrófilos puede llevar a pensar en un diagnóstico diferencial de infección respiratoria viral, acompañada de una infección bacteriana secundaria o cuadro de asma leve. Sin embargo, en este caso no se han observado las alteraciones clásicas en las células epiteliales ni ningún otro signo, como la fiebre o aumento de los leucocitos en la hematología, que oriente hacia una inflamación séptica viral o bacteriana, en cuyo

último caso además sería común encontrar cambios degenerativos en los neutrófilos y/o presencia de bacterias intracelulares. En el caso particular de este equino diagnosticado con asma leve-moderado a partir del segundo BAL, se da la particularidad de que al momento de la signología respiratoria documentada, la citología no concuerda con lo establecido como característico de esta enfermedad por el último consenso internacional, aunque hay reportes más antiguos de linfocitosis en casos de asma leve (IPA) (Richard y col., 2010; Holcombe y col., 2005) y en caballos de carrera con intolerancia al ejercicio o tos crónica (Michelotto y col., 2013).

Teniendo en cuenta la evolución de los animales asintomáticos, se podría inferir que la estabulación produce un aumento en la actividad macrofágica y en el número de neutrófilos, mastocitos y eosinófilos; ya sea de manera conjunta o particular, con todas las combinaciones que esto permite. Todos estos cambios se produjeron sin sintomatología en equinos sin historial de enfermedad respiratoria. En otras investigaciones se ha asociado la estabulación a un aumento en el nivel de polvo inhalado (Nolen-Walston y col., 2013) y se ha descrito la heterogeneidad en la inflamación de las vías aéreas inferiores en equinos con idéntica exposición, como un reflejo de la variación normal de la respuesta a los distintos componentes inhalados del polvo, los cuales no solo incluyen alérgenos tipo I y II, sino también patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) (Richard y Robinson, 2016). Esto nos permite asociar la estabulación a una inflamación leve, neutrofílica, mastocítica, eosinofílica o mixta, en animales sin signos de enfermedad respiratoria inferior. Lo cual está en concordancia a lo descrito por otros autores, como Hodgson y Hodgson que detallan una mayor proporción de células inflamatorias en caballos estabulados, usualmente acompañado por un incremento en la cantidad de moco, probablemente en respuesta a irritación de bajo grado por agentes inhalados que no contribuyen con una disminución de la función respiratoria. Por lo tanto este cambio se lo adjudican a una defensa normal frente al aumento en la exposición a partículas, endotoxinas y/o aeroalérgenos (Holcome, 2005; Lessa y col., 2007). Sin embargo, si esta situación se prolonga en el tiempo, esta irritación puede actuar como un factor de riesgo para el desarrollo de afecciones respiratorias permanentes como el asma equino (Couëttil y col., 2016; Nolen-Walston y col., 2013; Hodgson y Hodgson, 2007). Esto último se evidenció en uno de los equinos de este trabajo (asintomático 1), el cual demostró de manera asintomática una inflamación eosinofílica al mes de estabulado y luego a los 40 días de estabulado comenzó a desarrollar signos clínicos.

Analizando el grupo de caballos asintomáticos, cabe destacar el aumento de mastocitos en la mayoría de los animales. Este tipo de alteraciones fueron reportadas en animales sanos previamente y su aumento fue considerablemente menor a los incrementos observados en la citología de los animales sintomáticos (Hodgson y Hodgson, 2007). Debido a que los signos clínicos asociados al asma leve no son

específicos y pueden estar ausentes, es posible encontrar formas subclínicas de la enfermedad (Richard y col., 2010), caracterizada por otros autores como un infiltrado neutrofílico discreto, a veces con incremento conjunto en el número de mastocitos y eosinófilos (Couëtil y col., 2016; Sad y col., 2013). Esto permite dejar en discusión la clasificación de los animales asintomáticos de este estudio como asmáticos subclínicos, debido al aumento moderado de mastocitos en el BALF. Otro factor a tener en cuenta fue descrito por Depecker en el 2014, cuando concluyó que la muestra obtenida de un solo pulmón es suficiente para diagnosticar IPA o HPIE cuando la citología del BALF revela los cambios tomados como característicos de estas enfermedades. Sin embargo, para clasificar a un equino como “normal”, el análisis del BALF de un solo pulmón no es suficiente y es necesario tomar muestras de ambos pulmones, revelando ambas citologías un perfil normal. En este trabajo se realizó solo un lavaje a ciegas, por lo que en el caso de los animales asintomáticos con citología normal tanto en el primer como segundo lavaje, no se puede confirmar que se trate de animales normales y no subclínicos. Resulta interesante considerar a futuro la opción de realizar muestras pareadas con la técnica a ciegas, si no está disponible la opción endoscópica de toma de muestra de ambos pulmones, en caso de animales normales o anormales subclínicos, para confirmar el estado pulmonar.

Es interesante recalcar que en ninguno de los casos, sintomáticos o asintomáticos, hubo complicaciones a causa del BAL. Si bien algunos de los equinos sintomáticos presentaron tos transitoria inmediatamente posterior al procedimiento o aumento de la secreción nasal, ninguno presentó signos de infección pulmonar.

Por último cabe aclarar detalles en la técnica utilizada que pudieron influir en los resultados obtenidos. En el caso de este trabajo, si bien se realizó la técnica de toma de muestra de manera similar a otros autores, para el procesamiento de la misma se optó por macrocentrifuga en lugar de citocentrífuga que es el método más utilizado en las publicaciones internacionales, pudiendo ser esto una de las causas de la diferencia obtenida en los valores de la citología al compararla con otras investigaciones similares. Esto fue descrito anteriormente por Pickles y col. (2002) y Hoffman (2008), quienes expusieron que existían diferencias en el conteo diferencial al usar distintos métodos de centrifugación, debido probablemente a mayor fragilidad de algunos tipos celulares y variación en la distribución de las células en el portaobjetos. Sin embargo, las principales diferencias reportadas fueron en el porcentaje de macrófagos y linfocitos, siendo consideradas insignificantes para el diagnóstico de la enfermedad pulmonar. Si bien también se encontraron variaciones en el porcentaje de mastocitos y eosinófilos, la diferencia no fue significativa y además, se consideró que ambas técnicas eran confiables para el diagnóstico de la enfermedad pulmonar neutrofílica. Con respecto al método de lectura de los preparados, en este trabajo se optó por el recuento de 300 células consecutivas en las áreas del preparado donde las

células se encontraban adecuadamente separadas, sin tener en cuenta las células atrapadas dentro de las hebras de moco, y si bien esto fue considerado un método de confianza, existen estudios (Fernandez y col., 2013) que indican que la confiabilidad del porcentaje de mastocitos y eosinófilos es baja debido a la baja proporción de estas células en el BALF y que se requiere el conteo de un número mayor de células (500 células) para aumentar la confiabilidad de los resultados. Esto resulta impráctico en la clínica diaria y por lo tanto requiere de nuevas investigaciones sobre otras metodologías de lectura que permitan aumentar la confiabilidad de los resultados de manera sencilla y rápida. Por otra parte, la realización del conteo celular diferencial es más práctico que el conteo absoluto, sin embargo, este último refleja más precisamente un desvío en la población celular; ya que grandes cambios en los tipos celulares predominantes, particularmente neutrófilos y linfocitos, pueden enmascarar desvíos de células menos prevalentes como los eosinófilos o mastocitos. Esto nos permite realzar la limitación de usar el recuento celular relativo para la evaluación de células que normalmente se encuentran en número limitado en el tracto respiratorio bajo (Hughes y col., 2003).

## 6. Conclusiones

Si bien en las últimas dos décadas hubo importantes avances en el estudio de la enfermedad pulmonar en equinos y considerables progresos en los métodos diagnósticos complementarios, es fundamental aclarar que estas técnicas no reemplazan el examen físico completo (Michelotto y col., 2013). Aun así, frente a situaciones como la baja performance sin signos respiratorios específicos, estos métodos complementarios permiten detectar precozmente alteraciones pulmonares (Couëtil y col., 2001; Hodgson and Hodgson, 2007). Es importante tener en cuenta la evaluación citológica de las vías aéreas como parte de la rutina en la clínica equina, ya que las afecciones pulmonares juegan un rol significativo en la salud y desempeño de equinos de distintas edades y actividades deportivas, especialmente en el caso del asma o HPIE, que pueden presentarse de manera indetectable clínicamente. Además, no solo permiten orientar el diagnóstico sino también la severidad, pronóstico y prevalencia de estas enfermedades. Sin embargo, hay que tener en consideración que la aspiración transtraqueal debe ser el método de elección en caso de sospecha de neumonía o pleuroneumonía (Michelotto y col., 2013). En caso de equinos con baja performance o tos persistente, estos deberían ser evaluados por ambas técnicas, BAL y aspiración transtraqueal para obtener información completa del estado de las vías aéreas (Hodgson and Hodgson, 2007).

Este trabajo permitió ratificar que el BAL es una técnica segura y útil en la clínica equina para el diagnóstico de la enfermedad pulmonar difusa (Rush y Mair, 2004) y tiene la ventaja de poder ser realizada a campo. Si bien se reconoce que es lo suficientemente sensible para la detección de inflamación de las vías aéreas bajas a nivel citológico, la falta de concordancia de algunos de los resultados obtenidos con otras investigaciones confirma el mayor inconveniente actual de esta técnica que se basa en la falta de un método estandarizado de muestreo y procesamiento. En la bibliografía se encuentran amplias variaciones en el volumen y técnica para la instilación y recuperación del líquido de lavado, en la elección de una alícuota o el total de muestra a analizar y en la forma de conservación, procesamiento y lectura de la misma. Está comprobado que todas estas variaciones producen alteraciones en el recuento celular relativo y no existen valores de referencia establecidos para cada variación, lo que torna difícil la comparación entre los resultados de distintas investigaciones y por lo tanto disminuye la confiabilidad de los valores de corte utilizados para el diagnóstico de algunas enfermedades, como por ejemplo el asma equino.

Además hay que tener en cuenta que no solo se pueden encontrar variaciones en la citología a causa de la técnica en sí, sino también en relación a otros factores, desde intrínsecos de cada animal, como por ejemplo la edad, raza, actividad que

desarrolla y momento de realización del BAL (antes o después del ejercicio); hasta la localización geográfica, tipo de alojamiento, alimentación y condiciones climáticas como la temperatura ambiental o estación del año. Aun así, se considera que si se utiliza siempre la misma técnica, estandarizando los métodos en cada laboratorio o practica donde se realice y estableciendo rangos de referencia personales, el BAL nos permite orientar el diagnóstico, seguir la evolución del caso y evaluar la respuesta al tratamiento.

Es importante tener en consideración que el resultado obtenido a partir de la citología del BALF, representa no solo una porción limitada del pulmón, sino un momento particular en la población celular del mismo. Esto resulta interesante, debido a que el tipo de células estudiadas en el BALF no se encuentran fijas sino que aparecen en respuesta a distintos estímulos, siendo posibles cambios en la citología en pocas horas en respuesta a alteraciones en el ambiente u otros factores de los equinos. Por lo tanto sería interesante conocer más sobre la cinética celular, para de esta manera poder inferir situaciones previas y posteriores a los hallazgos puntuales del BAL.

Si bien la interpretación de la citología del BALF ha mejorado considerablemente en los últimos años en relación al diagnóstico y estudio de los mecanismos fisiopatogénicos subyacentes en las enfermedades pulmonares, este trabajo permite dejar en evidencia la dificultad en correlacionar cambios sutiles en la citología del BALF de equinos asintomáticos con enfermedad asmática subclínica. Encontrando casos donde los valores de referencia establecidos por los consensos internacionales, no permitían considerar a estos animales como asintomáticos “sanos” o asintomáticos “con asma” desde el punto de vista citológico, ya que los valores celulares relativos encontrados se hallaban entre los valores de corte para ambos estados. Es decir, existe una brecha entre los valores considerados normales y los valores considerados diagnósticos de la enfermedad, que justifica un estudio más detallado del caso y la necesidad de realizar muestras seriadas cuando la citología del BAL no sea lo suficientemente clara y amerite un seguimiento del paciente. Además, si bien en todos los equinos sintomáticos se hallaron alteraciones citológicas, hay que recalcar que la citología del BAL debe ser interpretada en manera conjunta con la historia, examen clínico y otros métodos complementarios.

## Apéndice 1

**Tabla 6:** Valores de referencia (promedio  $\pm$  DS) de la citología del fluido del lavado broncoalveolar (BALF) en equinos 'control' (Richard y col., 2010).

Autor	Numero de Equinos	Criterio para estado de salud respiratoria	Volumen de Solución Salina (ml)	Tinción	Recuento celular total (mm <sup>-3</sup> )	Recuento Celular Diferencial (%)						
						Neutro	Eos	Mast	Linfo	Macro	Hemo	Epi
Derksen et al. (1989)	10	Historia	300	Wright Giemsa	182 $\pm$ 578	8.9 $\pm$ 3.8	<1.0	1.2 $\pm$ 0.9	43.0 $\pm$ 8.5	45.0 $\pm$ 8.8	n.d.	3.5 $\pm$ 2.2
Fogarty y Buckley (1991)	11	Historia	120	May-Grünwald Giemsa	n.d.	7.0 $\pm$ 3.3	0.0 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.6	28.0 $\pm$ 5.8	65.0 $\pm$ 6.2	21.0a $\pm$ 19.0	n.d.
McKane et al. (1993)	62	Asintomático	65	Romanosky	832 $\pm$ 578	8.8 $\pm$ 6.4	0.5 $\pm$ 3.1	n.d.	31.3 $\pm$ 9.3	59.0 $\pm$ 9.7	19.7a $\pm$ 23.8	0.4 $\pm$ 0.8
Moore et al. (1995)	6	Endoscopia en ejercicio	300	Wright	153 $\pm$ 17	3.8 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 2.0	0.3 $\pm$ 0.7	28.3 $\pm$ 2.9	64.8 $\pm$ 11.2	n.d.	n.d.
Clark et al. (1995)	10	Asintomático	200	Romanosky	92.1 $\pm$ 142	5.9 $\pm$ 4.6	0.5 $\pm$ 0.9	0.8 $\pm$ 1.8	36.7 $\pm$ 14.8	56.0 $\pm$ 13.0	n.d.	n.d.
Couëtil and Denicola (1999)	10	Endoscopia en ejercicio	250	Wright	445 $\pm$ 142	3.8 $\pm$ 5.5	2.0 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 0.3	22.9 $\pm$ 7.4	68.8 $\pm$ 8.8	16.6 $\pm$ 19.4	n.d.
Couëtil et al. (2001)	9	Historia Endoscopia	250	Wright	321 $\pm$ 100	6.8 $\pm$ 2.7	0.3 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.8	31.4 $\pm$ 13.0	57.1 $\pm$ 10.3	n.d.	n.d.
Holcombe et al. (pastura) (2001)	14	Asintomático	300	Romanosky	94 $\pm$ 47	3.6 $\pm$ 3.5	0.7 $\pm$ 1.7	6.6 $\pm$ 5.1	42.6 $\pm$ 11.5	41.0 $\pm$ 10.8	n.d.	8.1 $\pm$ 6.5
Holcombe et al. (establo) (2001)	14	Asintomático	300	Romanosky	89 $\pm$ 39	10.3 $\pm$ 8.1	1.2 $\pm$ 2.2	4.4 $\pm$ 3.9	37.0 $\pm$ 9.8	41.4 $\pm$ 9.7	n.d.	8.4 $\pm$ 9.0
Couroucé-Malblanc et al. (2002)	14	Historia Evaluación clínica	120	May-Grünwald Giemsa	517 $\pm$ 229	15.1 $\pm$ 2.8	0.0 $\pm$ 0.0	2.1 $\pm$ 1.4	26.2 $\pm$ 6.5	50.2 $\pm$ 10.4	1.1 $\pm$ 2.5	3.4 $\pm$ 5.4
Gerber et al. (2003)	26	Historia Evaluación clínica	n.d.	n.d.	105 $\pm$ 40	9.1 $\pm$ 7.9	1.3 $\pm$ 5.1	5.0 $\pm$ 2.7	33.9 $\pm$ 8.3	47.8 $\pm$ 10.3	n.d.	3.8 $\pm$ 2.5
Mazan et al. (2005)	16	Citología de BALF	500	Wright-Giemsa	n.d.	2.5 $\pm$ 1.5	0.6 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.5	44.2 $\pm$ 12.5	49.4 $\pm$ 9.5	n.d.	n.d.
Richard et al. (2009)	15	Endoscopia en ejercicio , Citología	250	May-Grünwald Giemsa	255 $\pm$ 81	5.1 $\pm$ 2.0	0.3 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	20.4 $\pm$ 9.9	61.9 $\pm$ 16.9	3.2 $\pm$ 7.3	0.0 $\pm$ 0.0

Neutro: neutrófilos; Eos: eosinófilos; Mast: mastocitos; Linfo: linfocitos; Macro: macrófagos; Hemo: hemosiderófagos; Epi: células epiteliales; n.d.: no determinado.

**Tabla 7:** Similitudes y diferencias entre el asma equino y humano. (Barton y Gehlen, 2016)

	Asma Equino Leve-Moderado (IPA)	Asma Equino Severo (ORA)	Asma Humano Leve	Asma Humano Severo
Hipersensibilidad De Las Vias Aereas	Si	Si	Si	Si
Obstruccion De Las Vias Aereas	Subclinica	Parcialmente reversible	Reversible	Parcialmente reversible
Origen Ambiental	Si	Si	Si	Si
Origen Genetico	Sin datos	Si	Si	Pruebas contradictorias
Disfuncion Del Musculo Liso Bronquial	Sin datos	Si	Si	Si
Remodelacion De La Matriz Extracelular	Pruebas contradictorias	Si	Si	Si
Neutrofilia En Vias Aereas	Subtipo Neutrofilico	Si	Endotipo Neutrofilico	Si
Eosinofilia En Vias Aereas	Subtipo Eosinofilico	No	Si	Si



**Tabla 8:** Características típicas del síndrome del asma equino. (Couëtil y col., 2016)

Características		Síndrome del Asma Equino	
		IPA (Asma Equino Leve-Moderado)	ORA (Asma Equino Severo)
<b>Presentación Clínica</b>	<i>Edad de comienzo</i>	Usualmente jóvenes y edad media, pero se puede observar a cualquier edad.	Usualmente mayores de 7 años.
	<i>Signos clínicos</i>	Tos ocasional, baja performance, sin aumento de esfuerzo respiratoria en reposo. Signos crónicos (por lo menos 4 semanas de duración)	Tos regular a frecuente, intolerancia al ejercicio, aumento de esfuerzo respiratorio en reposo. Los signos y severidad pueden varían con el tiempo, generalmente limitan la actividad.
	<i>Tiempo de evolución</i>	Con frecuencia mejoran espontáneamente o con tratamiento. Bajo riesgo de reaparición.	Típicamente duran semanas a meses antes del diagnóstico. Usualmente mejoran con control ambiental estricto y tratamiento. No se puede curar, pero se pueden controlar los signos.
	<i>Historia</i>	Exposición a ambiente estabulado. La susceptibilidad genética no ha sido investigada.	Exposición a polvo o alérgenos en el establo o pastura. Algunos casos tienen historial familiar de asma equino. Los signos clínicos pueden ser estacionales.
<b>Confirmación Diagnostica</b>	<i>Endoscopia de las vías aéreas (en reposo y dinámica)</i>	Exceso de moco en el árbol traqueo-bronquial (score >2/5 para caballos de carrera y >3/5 para caballos de deporte o placer).	Exceso de moco en el árbol traqueo-bronquial
	<i>Citología de las vías aéreas</i>	Aumento leve en los neutrófilos, eosinófilos y/o células metacromáticas del BALF	Aumento moderado a severo de neutrófilos en el BALF
	<i>Función Pulmonar</i>	Sin evidencia de limitaciones del flujo de aire basado en la técnica del catéter esofágico con balón (DPmax <10 cm H <sub>2</sub> O). Limitación del flujo de aire usando métodos sensibles. Hiperreactividad de las vías aéreas.	Limitación moderada a severa del flujo de aire durante la exacerbación de la enfermedad basada en la técnica del catéter esofágico con balón (DPmax >15 cm H <sub>2</sub> O). Reversible con broncodilatadores o cambio ambiental. Hiperreactividad de las vías aéreas.

## Apéndice 2: Materiales y Métodos

### Materiales



**Figura 1:** Materiales necesarios para la realización del BAL.



**Figura 2:** Sondas para lavado broncoalveolar.  
(A) SurgiVet® BAL300.  
(B) Mila® BAL300.

### Examen Físico y BAL



**Figura 3:** Auscultación del tórax.



**Figura 4:** Auscultación del tórax con bolsa de reinspiración.



**Figura 5:** Introducción de la sonda para BAL en el equino sedado, con mordaza y dentro de un brete.

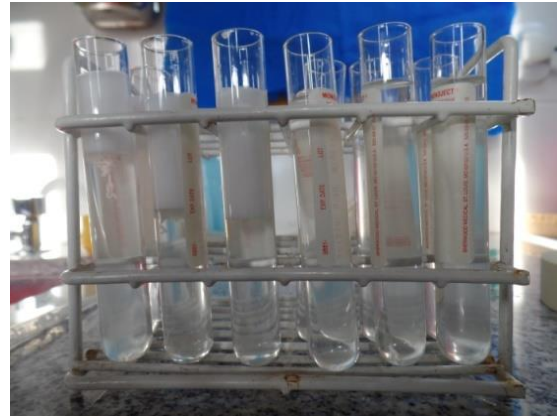


**Figura 6:** Recuperación del líquido del BAL.

## Procesamiento de la muestra



**Figura 7:** Líquido obtenido del BAL.



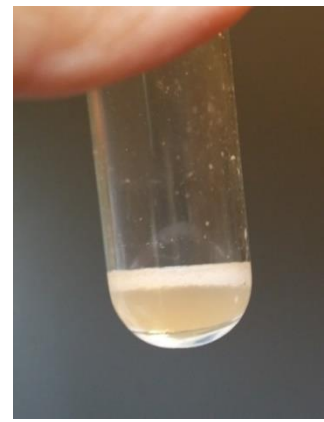
**Figura 8:** Muestra del BALF en los tubos para su centrifugado.



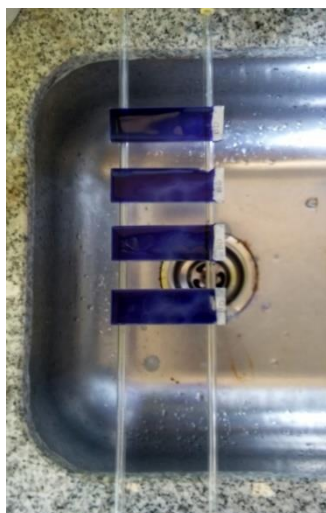
**Figura 9:** Centrifugado del BALF en macrocentrifuga.



**Figura 10:** Pellet obtenido de la centrifugación del BALF.



**Figura 11:** Muestra para realizar el extendido, luego de descartar el sobrenadante y resuspender el pellet.



**Figura 12:** Coloración de los extendidos con May Grünwald – Giemsa.



**Figura 13:** Extendidos coloreados listos para ser observados al microscopio.

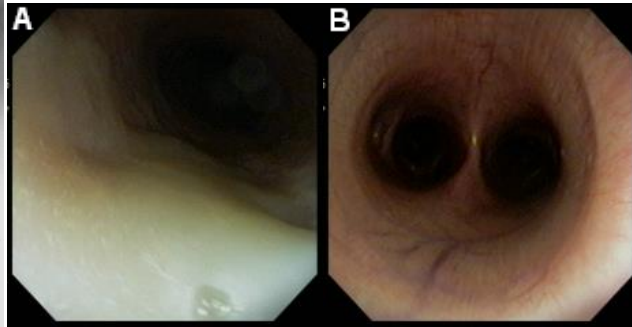


## Apéndice 3: Equinos Sintomáticos

### Sintomático 1



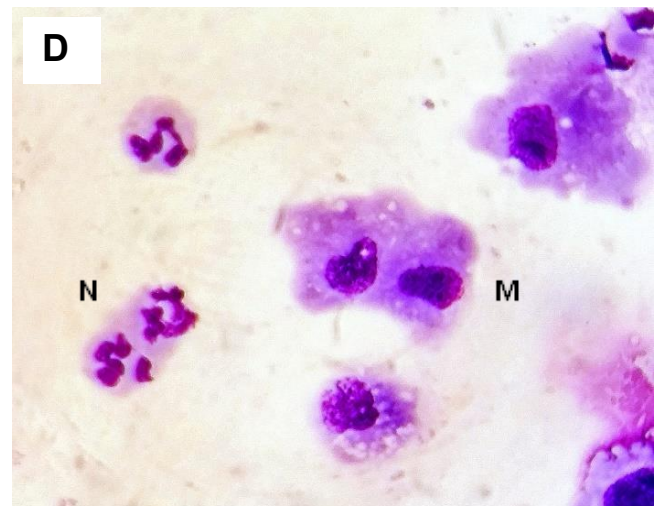
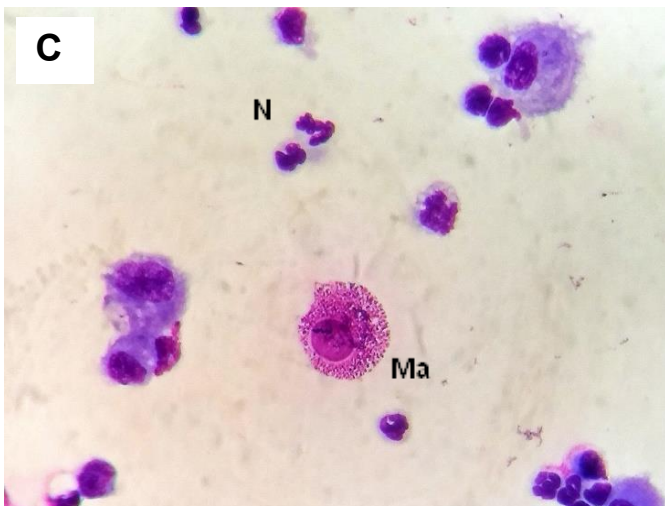
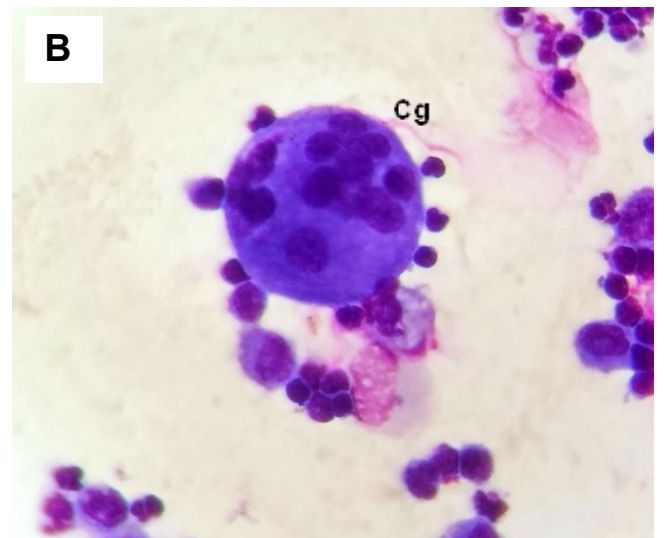
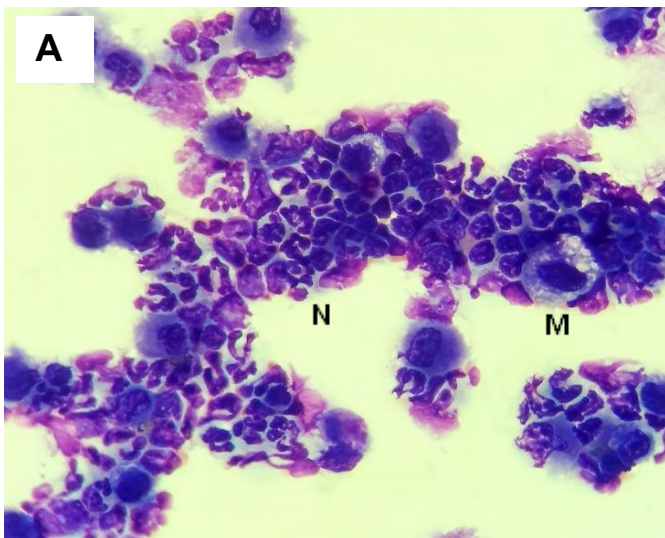
**Figura 1:** Radiología del equino sintomático 1.



**Figura 2:** Endoscopia del equino sintomático 1. Se observa secreción mucosa traqueal fluida (Grado 4) (foto A) y carina levemente edematosa (foto B).

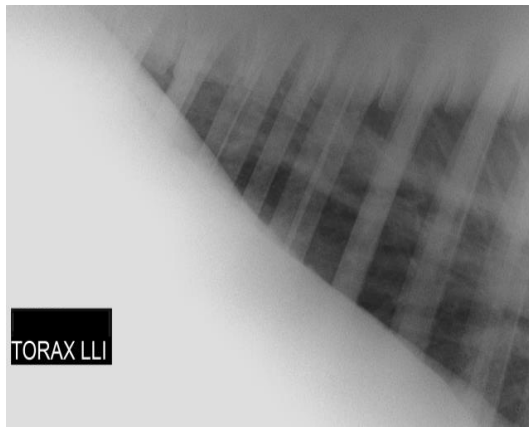


**Figura 3:** Pellet obtenido de la centrifugación del BALF del equino sintomático 1.

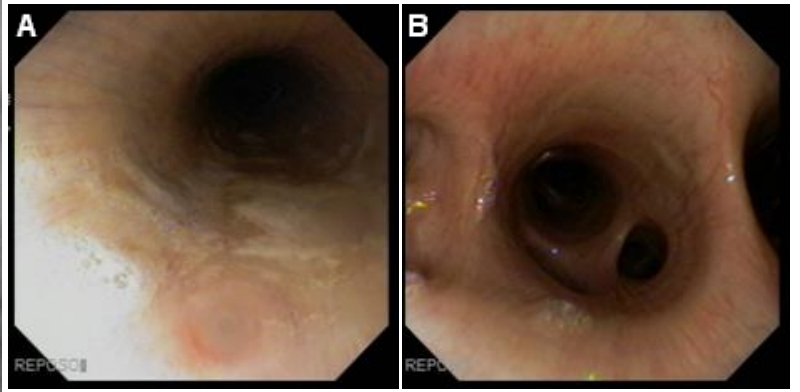


**Figura 4:** Citología del BALF del equino sintomático 1. Nótese la presencia de macrófagos activados (M), células gigantes multinucleadas (Cg) (foto B), neutrófilos (N) (foto A, C y D), mastocitos (Ma) (foto C) y hebras de moco (foto B). (MGG, 100X)

## Sintomático 2



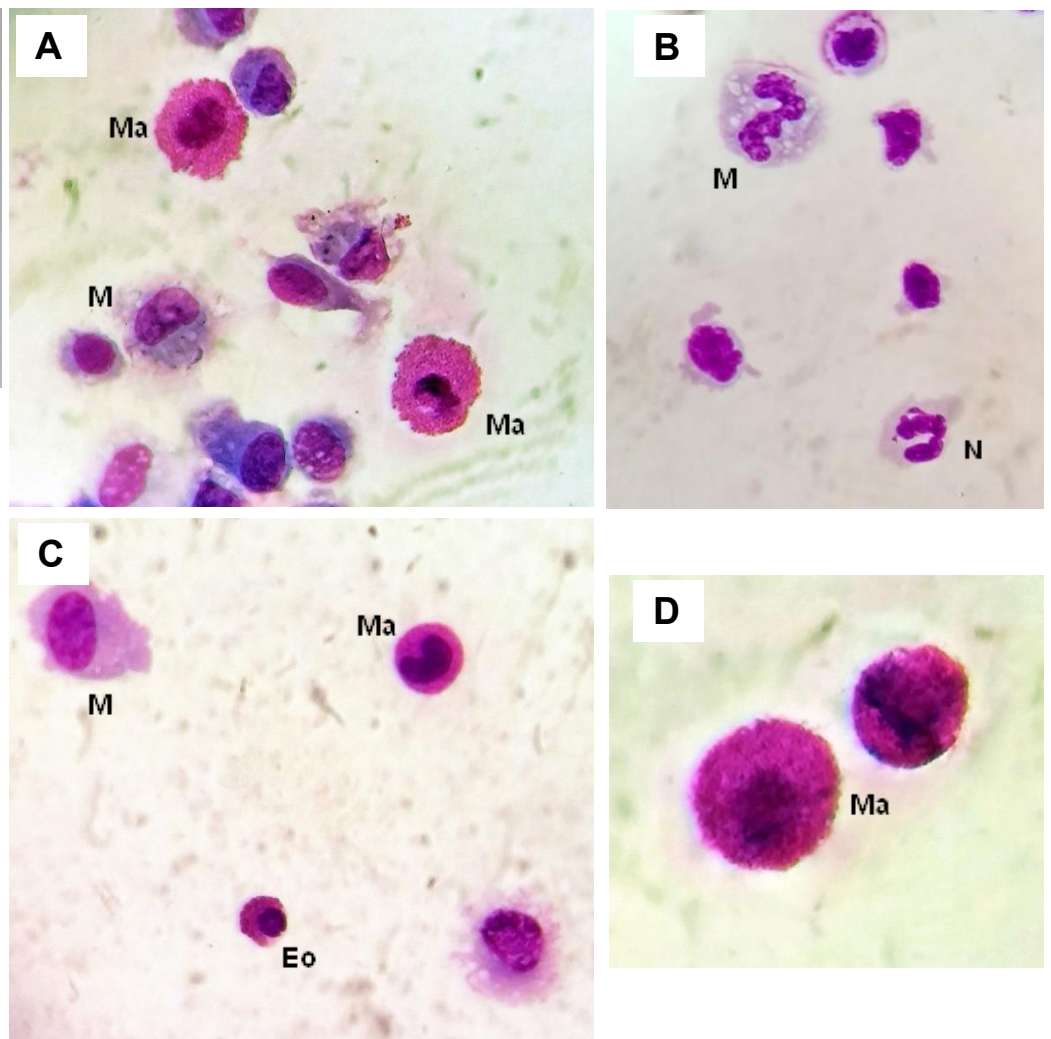
**Figura 5:** Radiología del equino sintomático 2.



**Figura 6:** Endoscopia del equino sintomático 2. Se observa secreción mucosa traqueal fluida (Grado 3) (foto A) y carina levemente edematosa (foto B).



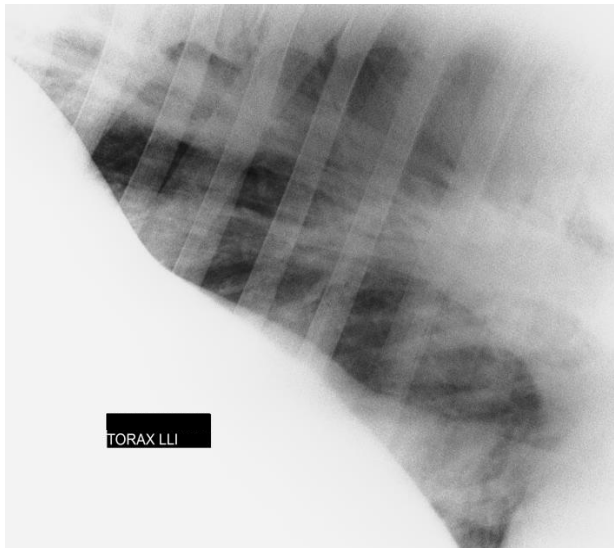
**Figura 7:** Pellet obtenido de la centrifugación del BALF del equino sintomático 2.



**Figura 8:** Citología del BALF del equino sintomático 2. Nótese la presencia de macrófagos activados (M), neutrófilos (N) (foto B), mastocitos (Ma) (foto A, C y D) y eosinófilos (Eo) (foto C).



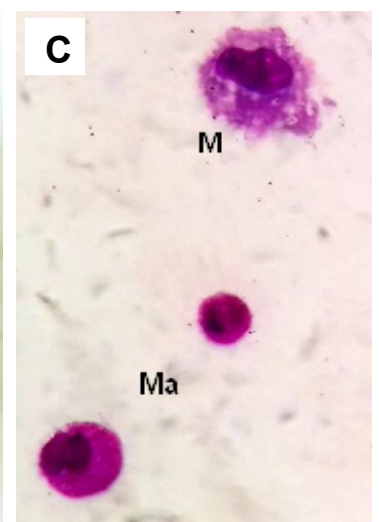
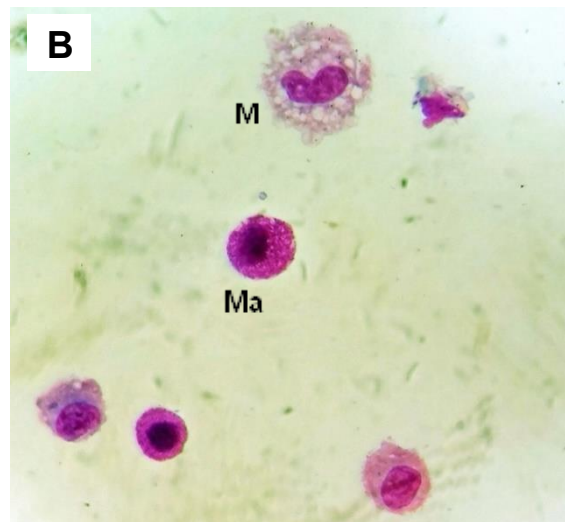
### Sintomático 3



**Figura 9:** Radiología del equino sintomático 3.

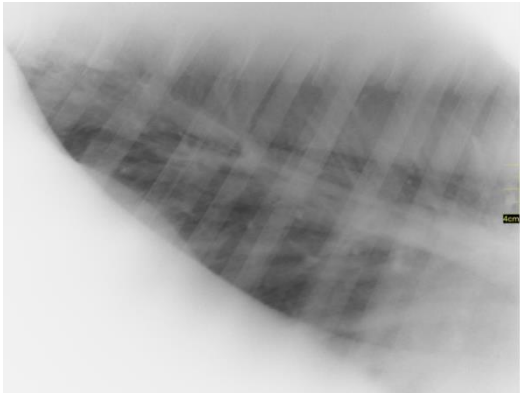


**Figura 10:** Pellet obtenido de la centrifugación del BALF del equino sintomático 3.

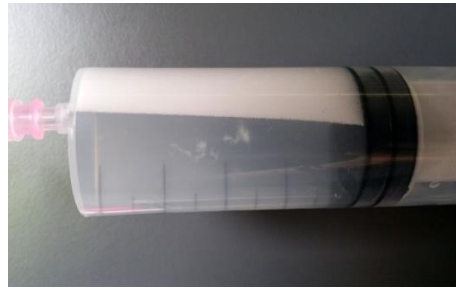


**Figura 11:** Citología del BALF del equino sintomático 3. Nótese la presencia de macrófagos activados (M) (foto B y C) y mastocitos (Ma) (foto A, C y D). (MGG, 100X)

## Sintomático 4



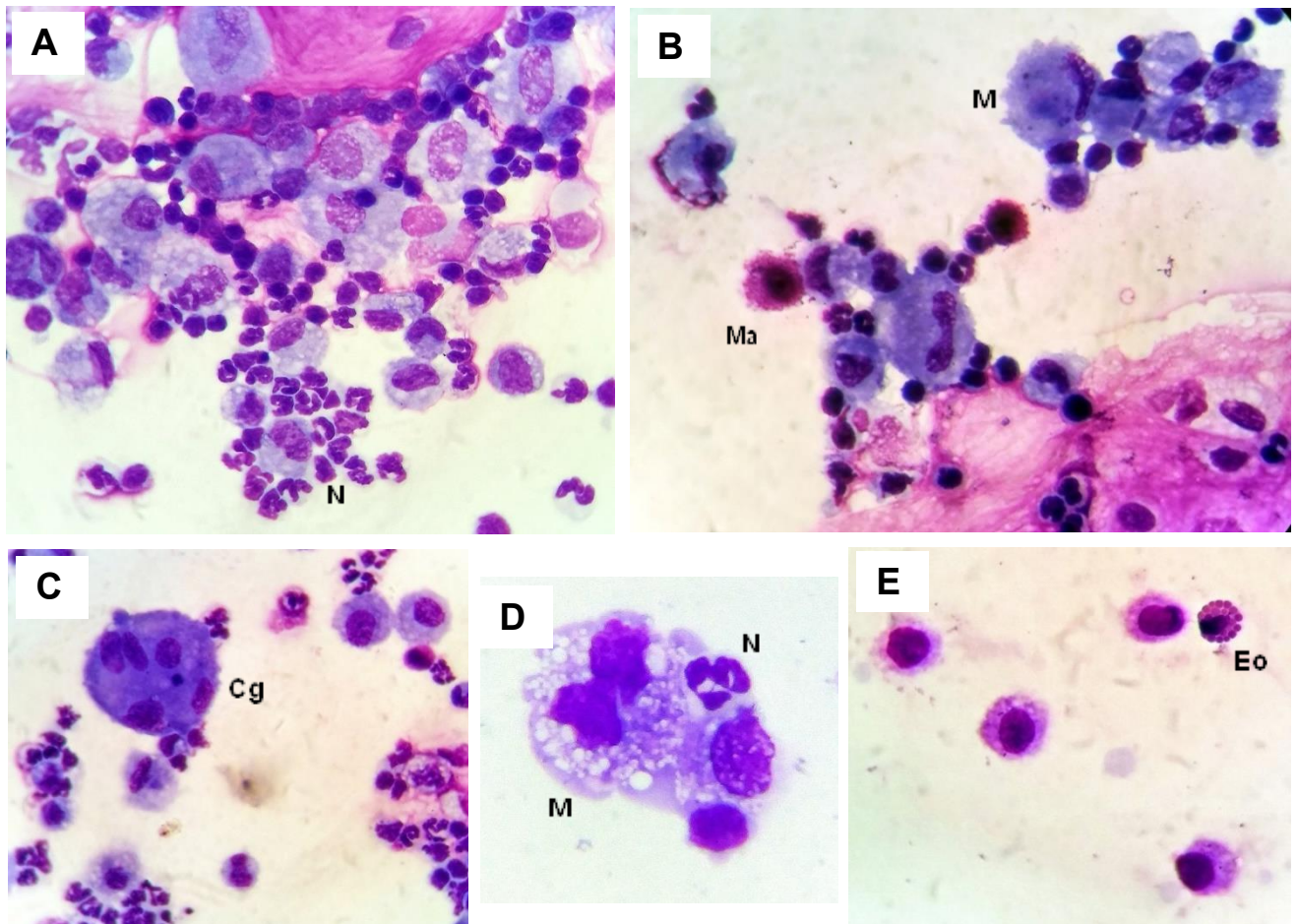
**Figura 12:** Radiología del equino sintomático 4.



**Figura 13:** Aspecto macroscópico del BALF del equino sintomático 4. Nótese la turbidez moderada y los flóculos de moco.



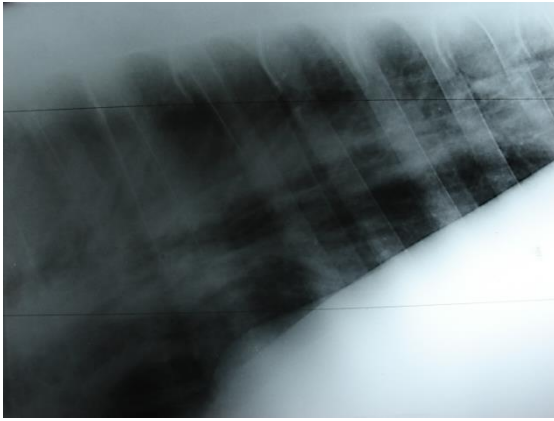
**Figura 14:** Pellet obtenido de la centrifugación del BALF del equino sintomático 4.



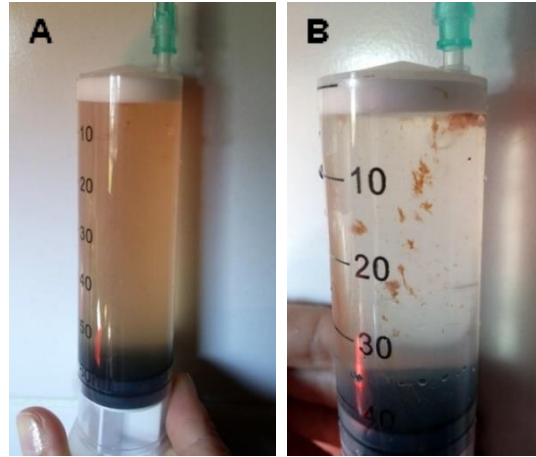
**Figura 15:** Citología del BALF del equino sintomático 4. Nótese la presencia de macrófagos activos (M), células gigantes multinucleadas (Cg) (foto C), neutrófilos (N), mastocitos (Ma) (foto B), eosinófilos (Eo) (foto E) y hebras de moco (foto A y B). (MGG, 100X)



## Sintomático 5



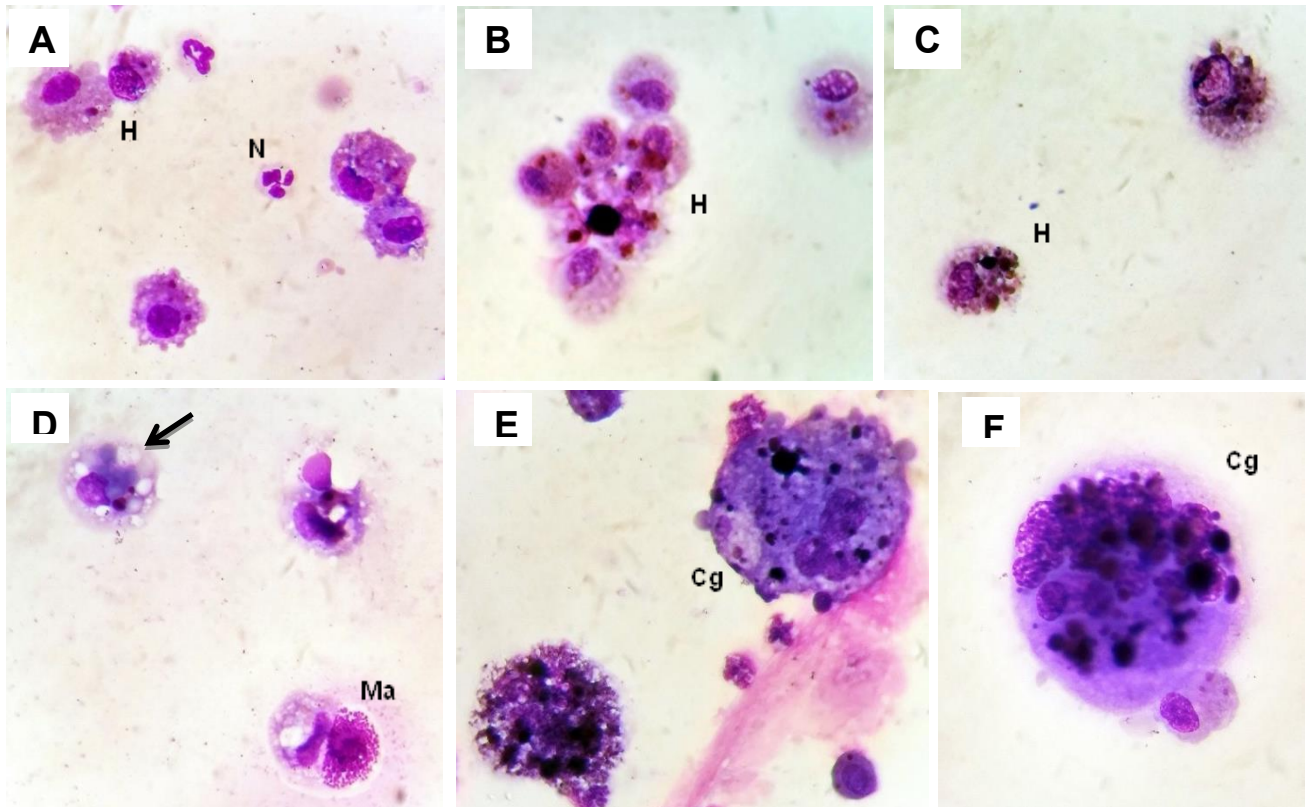
**Figura 16:** Radiología del equino sintomático 5.



**Figura 17:** Aspecto macroscópico del BALF del equino sintomático 5. Nótese la coloración rosada anaranjada (foto A) y la turbidez moderada con flóculos rojo anaranjados (foto B).



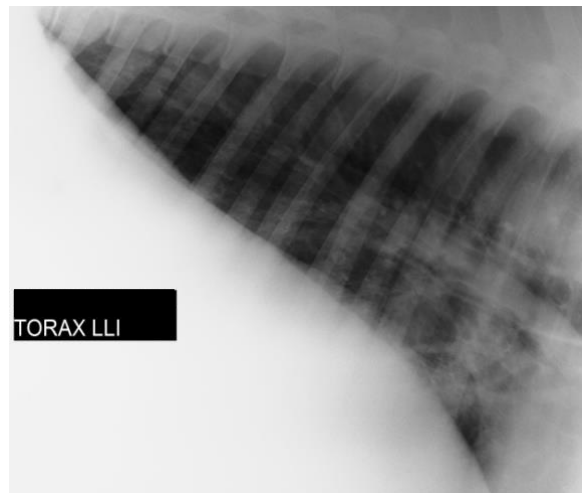
**Figura 18:** Pellet obtenido de la centrifugación del BALF del equino sintomático 5.



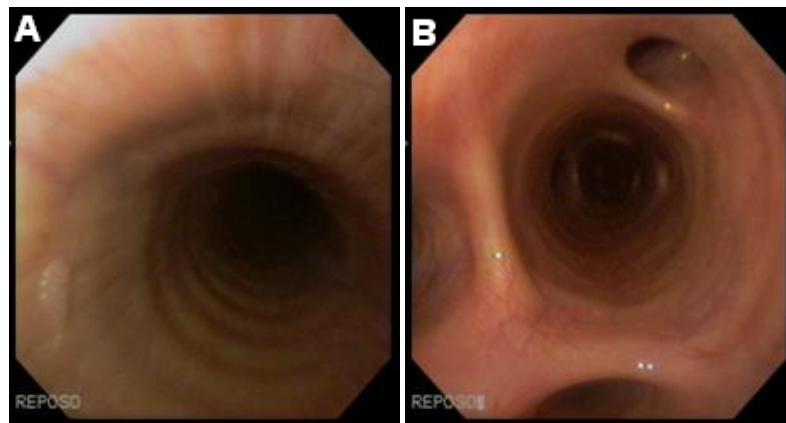
**Figura 19:** Citología del BALF del equino sintomático 5. Nótese la presencia de hemosiderófagos (H) que contienen gránulos, cuyo color varía desde el marrón dorado al negro. Se observa eritofagocitosis (flecha en foto D), células gigantes multinucleadas (Cg) (foto E y F), neutrófilos (N) (foto A), mastocitos (Ma) (foto D) y hebras de moco (foto E). (MGG, 100X)



## Sintomático 6



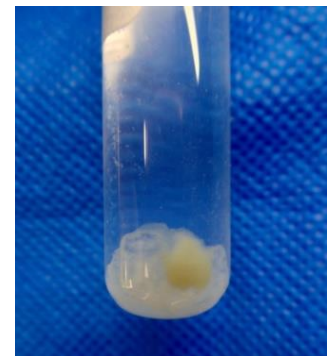
**Figura 20:** Radiología del equino sintomático 6.



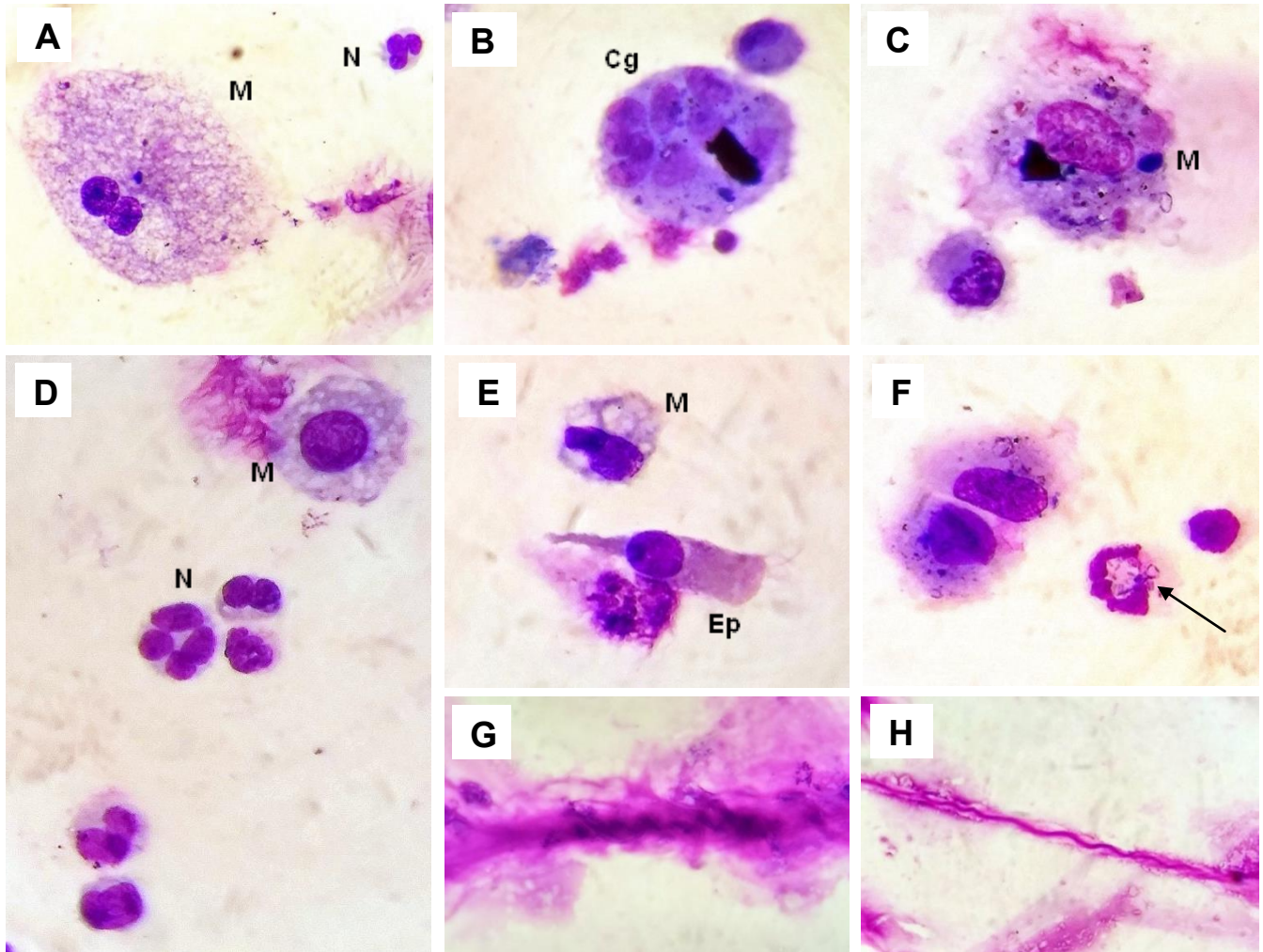
**Figura 21:** Endoscopia del equino sintomático 6. Se observa secreción mucosa traqueal (Grado 2) (foto A) y edema en la bifurcación bronquial (foto B).



**Figura 22:** Aspecto macroscópico del BALF del equino sintomático 6. Nótese la turbidez moderada y los abundantes floculos de moco.



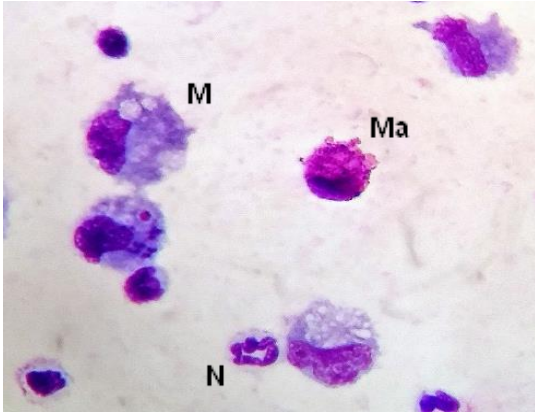
**Figura 23:** Pellet obtenido de la centrifugación del BALF del equino sintomático 6.



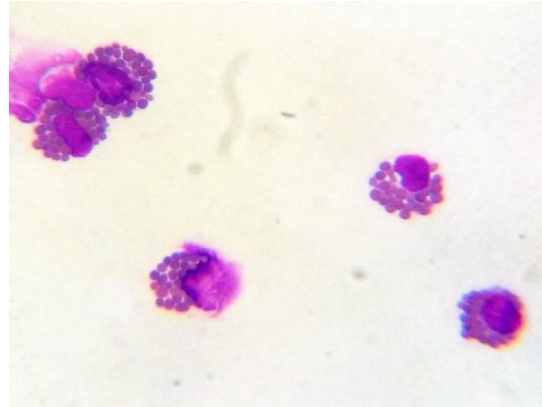
**Figura 24:** Citología del BALF del equino sintomático 6. Nótese la presencia de macrófagos activados (M) con citoplasma espumoso (foto A), macrófagos con material fagocitado en su interior (foto C) y células multinucleadas gigantes (Cg) (foto B). Se observan neutrófilos con cambios degenerativos (N) (foto D), bacterias intracelulares (Flecha en foto F) y células epiteliales (Ep) con pérdida de cilias (foto E). También presenta hebras de moco formando espirales de Curschmann (foto G y H). (MGG, 100X)

## Apéndice 4: Equinos Asintomáticos

### Equino 1

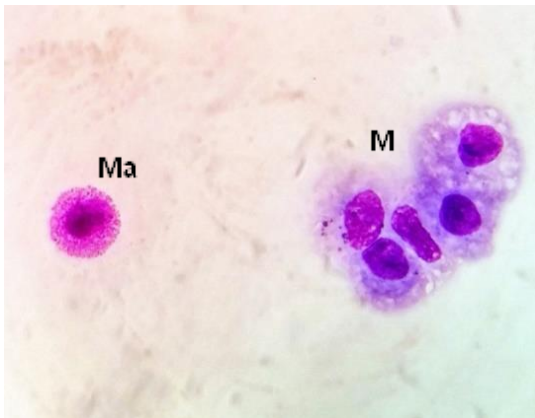


**Figura 1:** Primer BAL del equino asintomático 1. Nótese la presencia de macrófagos activos (M), neutrófilos (N) y mastocitos (Ma). (MGG, 100X)

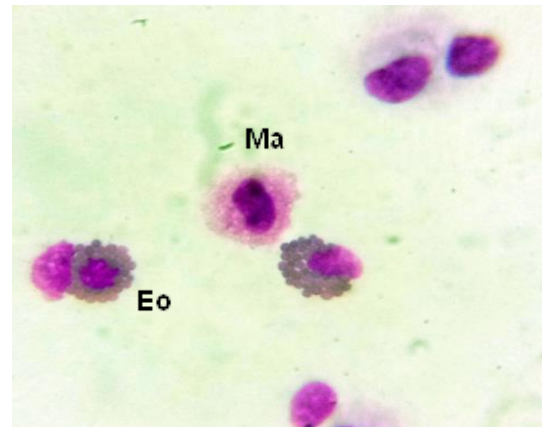


**Figura 2:** Eosinófilos en el segundo BAL del equino asintomático 1. (MGG, 100X)

### Equino 2

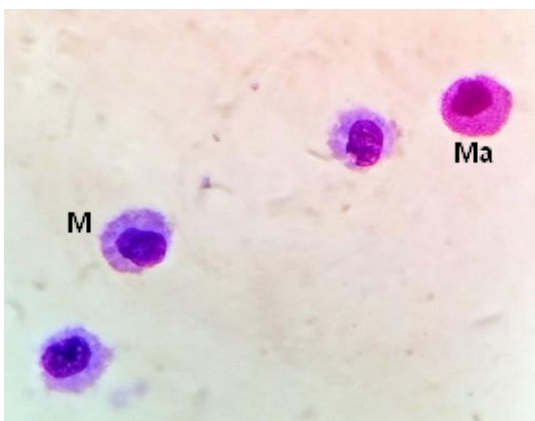


**Figura 3:** Macrófagos activos (M) y mastocito (Ma) en el primer BAL del equino asintomático 2. (MGG, 100X)

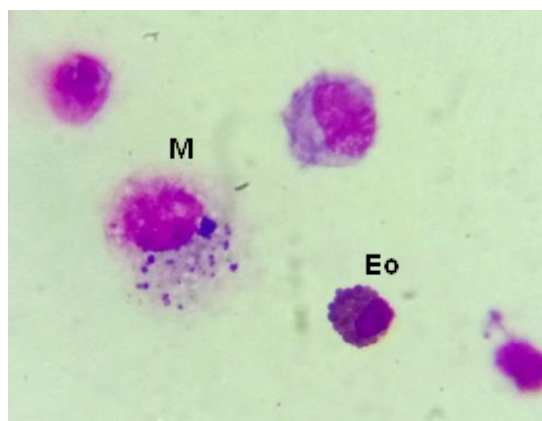


**Figura 4:** Segundo BAL del equino asintomático 2. Nótese la presencia de macrófagos activos, mastocitos (Ma) y eosinófilos (Eo). (MGG, 100X)

### Equino 3



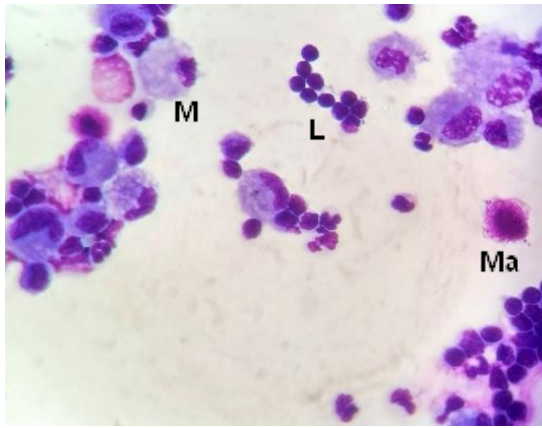
**Figura 5:** Primer BAL del equino asintomático 3. Se observan macrófagos activos (M) y un mastocito (Ma). (MGG, 100X)



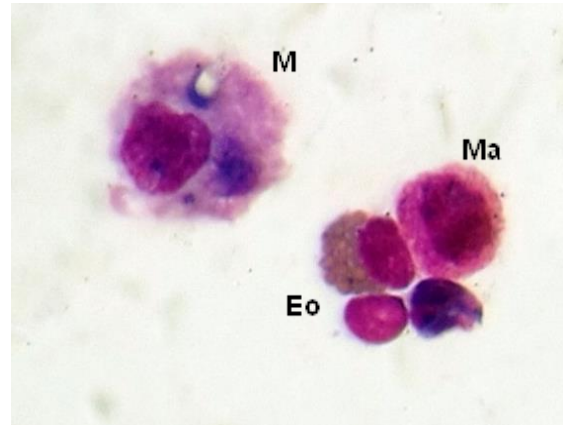
**Figura 6:** Macrófagos activos (M) Y eosinófilo (Eo) en el segundo BAL del equino asintomático 3. (MGG, 100X)



### Equino 4

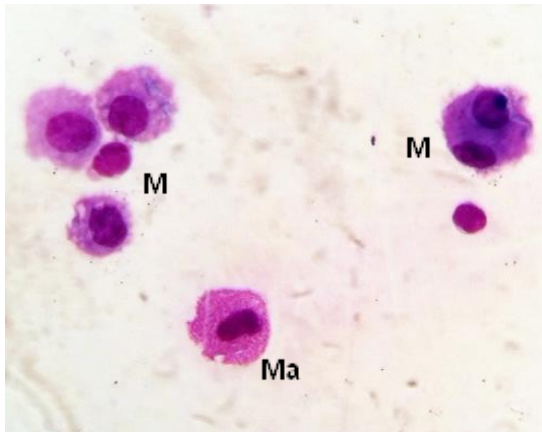


**Figura 7:** Primer BAL del equino asintomático 4. Nótese la presencia de macrófagos activos (M), linfocitos (L) y mastocitos (Ma). (MGG, 100X)

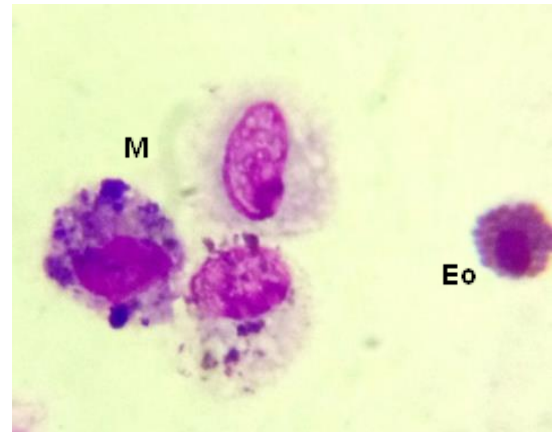


**Figura 8:** Macrófago activado (M), mastocito (Ma) y eosinófilo (Eo) en el segundo BAL del equino asintomático 4. (MGG, 100X)

### Equino 5

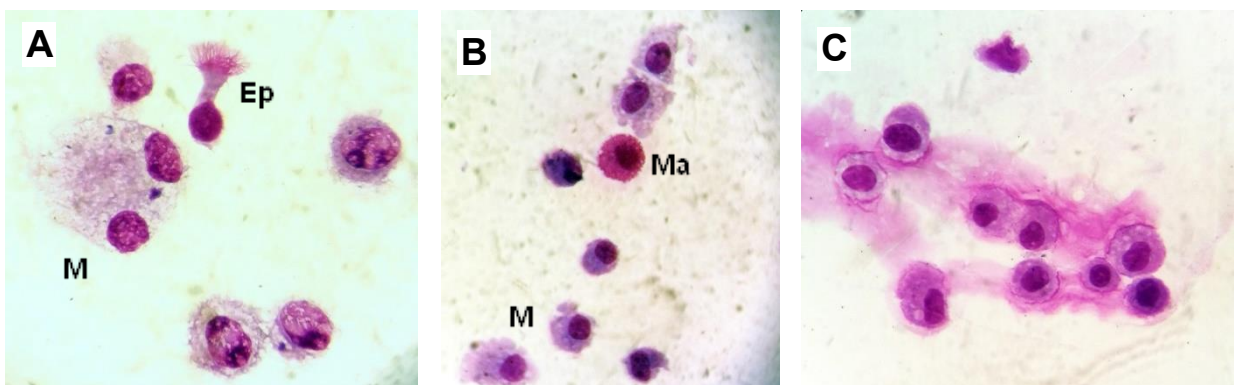


**Figura 9:** Macrófagos activos (M) y un mastocito (Ma) en el primer BAL del equino asintomático 5. (MGG, 100X)



**Figura 10:** Segundo BAL del equino asintomático 5. Se observan macrófagos activos (M) y eosinófilos (Eo). (MGG, 100X)

### Equino 6



**Figura 11:** Citología del BALF del equino asintomático 5. Nótese la presencia de macrófagos activos (M) en todas las fotos, célula epitelial (Ep) (foto A), mastocito (Ma) (foto B) y hebras de moco (foto C). (MGG, 100X)

## 7. Bibliografía

1. Ainsworth D. M., Grünig G., Matychak M. B., Young J., Wagner B., Erb H. N., Antczak D. F. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- $\gamma$  and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2003; 96(1): 83-91.
2. Barton A. K., Gehlen H. Pulmonary remodeling in equine asthma: what do we know about mediators of inflammation in the horse? *Mediators of Inflammation*, 2016. Dec 7;2016.
3. Bedenice D., Mazan M. R., Hoffman A. M. Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses diagnosed with inflammatory airway disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008; 22(4): 1022-1028.
4. Berndt A., Derksen F. J., Robinson N. E. Endotoxin concentrations within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture. *The Veterinary Journal*. 2010; 183(1): 54-57.
5. Buechner-Maxwell V., Murray M., Crisman M., Ley W., Saunders G., Walton A. Relationship of equine housing to large airway inflammation. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1996; 16(11): 502-506.
6. Bullone M., Lavoie J. P. Science-in-brief: Equine asthma diagnosis: Beyond bronchoalveolar lavage cytology. *Equine Veterinary Journal*. 2017; 49(3): 263-265.
7. Carman S., Rosendal S., Huber L., Gyles C., McKee S., Willoughb R. A., Lein D. Infectious agents in acute respiratory disease in horses in Ontario. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1997; 9(1): 17-23.
8. Chirstley R.M., Rush B.R. Inflammatory airway disease. En: McGorum B.C., Dixon P.M., Robinson N.E., Schumacher J. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Philadelphia: Saunders, 2007, p. 591-600.
9. Cian F., Monti P., Durham A. Cytology of the lower respiratory tract in horses: An updated review. *Equine Veterinary Education*. 2015; 27(10): 544-553.
10. Couëtill L.L., Cardwell J.M., Gerber V., Lavoie J.P., Léguillette R., Richard E.A. Inflammatory Airway Disease of Horses—Revised Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2016.

11. Couëtil L. L., Hoffman A. M., Hodgson J., Buechner-Maxwell V., Vie L., Wood J. L., Lavoie J. P. ACVIM Consensus Statement. *J Vet Intern Med.* 2007; 21: 356-361.
12. de Almeida S. R. P., Rocha D. C. C., Lopes A. C. A. M., Ademar J., Junior V., Junior P. V. M. The use of tracheal wash and bronchoalveolar lavage in the clinical examination of coughing horses. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.* 2015; 13: 79-87.
13. Depecker M., Richard E.A., Pitel P.H., Fortier G., Leleu C., Couroucé-Malblanc A. Bronchoalveolar lavage fluid in Standardbred racehorses: Influence of unilateral/bilateral profiles and cut-off values on lower airway disease diagnosis. *The Veterinary Journal.* 2014; 199(1): 150-156.
14. Derksen F. J., Brown C. M., Sonea I., Darien B. J., Robinson N. E. Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. *Equine Veterinary Journal.* 1989; 21(1): 23-26.
15. Doucet M. Y., Viel L. Alveolar macrophage graded hemosiderin score from bronchoalveolar lavage in horses with Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage and controls. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2002; 16(3): 281-286.
16. Fernandez N. J., Hecker K. G., Gilroy C. V., Warren A. L., Léguillette R. Reliability of 400-cell and 5-field leukocyte differential counts for equine bronchoalveolar lavage fluid. *Veterinary Clinical Pathology.* 2013; 42(1): 92-98.
17. Fogarty U. Evaluation of a bronchoalveolar lavage technique. *Equine Veterinary Journal.* 1990; 22(3): 174-176.
18. Fogarty U., Buckley T. Bronchoalveolar lavage findings in horses with exercise intolerance. *Equine Veterinary Journal.* 1991; 23(6): 434-437.
19. Gerber V., Straub R., Marti E., Hauptman J., Herholz C., King M., Robinson N. E. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Veterinary Journal.* 2004; 36(7): 576-582.
20. Hare J. E., Viel L. Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 1998; 12(3): 163-170.

21. Hewson J., Arroyo L. G. Respiratory disease: diagnostic approaches in the horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2015; 31(2): 307-336.
22. Hewson J., Viel L. Sampling, microbiology and cytology of the respiratory tract. LEKEUX, P. *Equine Respiratory Diseases*. Ithaca: International Veterinary Information Service. 2002. [Online]
23. Hinchcliff K. W., Couetil L. L., Knight P. K., Morley P. S., Robinson N. E., Sweeney C. R., Erck E. Exercise induced pulmonary hemorrhage in horses: American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2015; 29(3): 743-758.
24. Hodgson J.L., Hodgson D.R. Collection and analysis of respiratory tract samples. McGorum B.C., Dixon P.M., Robinson N.E., Schumacher J. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Philadelphia: Saunders. 2007, p. 119-150.
25. Hodgson J.L. Collection and interpretation of tracheal wash and bronchoalveolar lavage for diagnosis of infectious and non-infectious lower airway disorders. *Proceedings World Equine Veterinary Association*. 2006, p.71-77.
26. Hoffman A.M. Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2008; 24(2): 423-435.
27. Holcombe S. J. Epidemiology of Airway Inflammation and Mucus in Horses. In *American Association of Equine Practitioners*. 2005; 51: 337-340.
28. Hostetter S. J., Clark S. K., Gilbertie J. M., Wiechert S. A., Jones D. E., Sponseller B. A. Age- related variation in the cellular composition of equine bronchoalveolar lavage fluid. *Veterinary Clinical Pathology*. 2017.
29. Hughes K. J., Malikides N., Hodgson D. R., Hodgson J. L. Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses 1. Evaluation of cytological stains and the percentage of mast cells and eosinophils. *Australian Veterinary Journal*. 2003; 81(11): 681-684.
30. Jean D., Vrins A., Beauchamp G., Lavoie J.P. Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *American Journal of Veterinary Research*. 2011; 72(6): 838-842.
31. Koch C., Straub R., Ramseyer A., Widmer A., Robinson N. E., Gerber V. Endoscopic scoring of the tracheal septum in horses and its clinical relevance

- for the evaluation of lower airway health in horses. *Equine Veterinary Journal*. 2007; 39(2): 107-112.
32. Koblinger K., Nicol J., McDonald K., Wasko A., Logie N., Weiss M., Leguillette R. Endoscopic assessment of airway inflammation in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2011; 25(5): 1118-1126.
  33. Lessa D.A.B., Mori E., Viana E.B., dos Santos O.J., Moreira J.F.E., Fernandes W.R. Lavado broncoalveolar em eqüinos-revisão de literatura. Parte 1: Técnicas de colheita. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*. 2005; 8(2): 213-217.
  34. Lessa D.A.B., Mori E., Viana E.B., dos Santos O.J., Moreira J.F.E., Fernandes W.R. Lavado broncoalveolar em eqüinos-revisão de literatura-parte 2: Achados citológicos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*. 2007; 10(1): 31-38.
  35. Lucas R.G. Uso del lavado broncoalveolar y aspirado transtraqueal en campo. Indicaciones y valor diagnóstico en problemas de vías respiratorias bajas. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2012; 6(2): 83-87.
  36. Lugo J., Harkema J. R., Bartner L., Boruta D., Robinson N. E. Airway inflammation is associated with mucous cell metaplasia and increased intraepithelial stored mucosubstances in horses. *The Veterinary Journal*. 2006; 172(2): 293-301.
  37. Malikides N., Hughes K. J., Hodgson D. R., Hodgson J. L. Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses 2. Evaluation of the diagnostic significance of neutrophil percentage. *Australian Veterinary Journal*. 2003; 81(11): 685-687.
  38. Mazan M. R. Update on Noninfectious Inflammatory Diseases of the Lower Airway. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2015; 31(1): 159-185.
  39. McGorum B.C., Dixon P.M. The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine Veterinary Education*. 1994; 6(4): 203-209.
  40. McGorum B. C., Dixon P. M., Halliwell R. E. W., Irving P. Evaluation of urea and albumen as endogenous markers of dilution of equine bronchoalveolar lavage fluid. *Research in Veterinary Science*. 1993; 55(1): 52-56.



41. McKane S. A., Canfield P. J., Rose R. J. Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of Thoroughbred racehorses in training. *Australian Veterinary Journal*. 1993; 70(11): 401-404.
42. Michelotto Jr, P.V., Lessa D.A.B., da Silva K.M., Gawlowski K.R.S., Fernandes W.R. The airway fluid analysis—methods and interpretation for the athletic horse. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 2013; 20(1).
43. Morán G., Araya O., Folch H. Obstrucción recurrente de las vías aéreas en el caballo. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2006; 38(3): 207-217.
44. Morán G., Araya O., Ortloff A., Folch H. Características citológicas del lavado bronqueoalveolar y respuesta inmune humoral frente a *Aspergillus fumigatus* en caballos Chilotes con obstrucción recurrente de las vías aéreas. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2009; 41(1): 83-88.
45. Newton J. R., Wood J. L. N. Evidence of an association between inflammatory airway disease and EIPH in young Thoroughbreds during training. *Equine Veterinary Journal*. 2002; 34(S34): 417-424.
46. Nolen-Walston R.D., Harris M., Agnew M.E., Martin B.B., Reef V.B., Boston R.C., Davidson E.J. Clinical and diagnostic features of inflammatory airway disease subtypes in horses examined because of poor performance: 98 cases (2004–2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2013; 242(8): 1138-1145.
47. Orard M., Depecker M., Hue E., Pitel P.H., Couroucé-Malblanc A., Richard E.A. Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses. *The Veterinary Journal*. 2016; 207: 193-195.
48. Pickles K., Pirie R.S., Rhind S., Dixon P.M., McGorum B.C. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 1: Comparison of sequential and pooled aliquots. *Equine Veterinary Journal*. 2002; 34(3): 288-291.
49. Pickles K., Pirie R.S., Rhind S., Dixon P.M., McGorum B.C. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 2: Comparison of smear and cytocentrifuged preparations. *Equine Veterinary Journal*. 2002; 34(3): 292-296.
50. Pickles K., Pirie R.S., Rhind S., Dixon P.M., McGorum B.C. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 3: The effect of time, temperature and fixatives. *Equine Veterinary Journal*. 2002; 34(3): 297-301.

51. Pirie R. S., Couëtil L. L., Robinson N. E., Lavoie J. P. Equine asthma: An appropriate, translational and comprehensible terminology? *Equine Veterinary Journal*. 2016; 48(4): 403-405.
52. Richard E. A., Robinson N. E. Inflammatory Airway Disease Congress: One syndrome, multiple pathways: A Dorothy Russell Havemeyer Symposium. *Equine Veterinary Education*. 2016; 28(1): 9-12.
53. Richard E.A., Fortier G.D., Lekeux P.M., Van Erck E. Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly-performing horse. *The Veterinary Journal*. 2010; 185(2): 115-122.
54. Riihimäki M., Lilliehöök I., Raine A., Berg M., Pringle J. Clinical alterations and mRNA levels of IL-4 and IL-5 in bronchoalveolar cells of horses with transient pulmonary eosinophilia. *Research in veterinary science*. 2008; 85(1): 52-55.
55. Robinson N.E. International workshop on equine chronic airway disease Michigan State University 16–18 June 2000. *Equine veterinary journal*. 2001; 33(1): 5-19.
56. Robinson N. E., Berney C., Eberhart S., deFeijter-Rupp H. L., Jefcoat A. M., Cornelisse C. J., Derksen F. J. Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *American Journal of Veterinary Research*. 2003; 64(5): 550-557.
57. Rush B., Mair T. *Equine respiratory diseases*. Blackwell Science Ltd. 2004.
58. Sad E. P., Alencar N. X. D., Viscardi V., Costa M. F. D. M., Hess T. M., Lessa D. A. B. Cytology profile and age influence in the equine bronchoalveolar lavage in healthy and asymptomatic inflammatory airway disease. *Ciência Rural*. 2013; 43(3): 452-455.
59. Sánchez S. C., González C., Carvajal S. Análisis morfométrico computacional de lavado broncoalveolar de caballos fina sangre de carrera con hemorragia pulmonar inducida por ejercicio. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2004; 19(1-2).
60. Sullivan S., Hinchcliff K. Update on exercise-induced pulmonary hemorrhage. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2015; 31(1): 187-198.
61. Tee S. Y., Dart A. J., MacDonald M. H., Perkins N. R., Horadagoda N., Jeffcott L. B. 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*. 2012; 90(7): 247-251.
62. Van der Haegen A., Künzle F., Gerber V., Welle M., Robinson N. E., Marti E. Mast cells and IgE-bearing cells in lungs of RAO-affected horses. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2005; 108(3): 325-334.
63. Widmer A., Doherr M. G., Tessier C., Koch C., Ramseyer A., Straub R., Gerber V. Association of increased tracheal mucus accumulation with poor willingness to perform in show-jumpers and dressage horses. *The Veterinary Journal*. 2009; 182(3): 430-435.
64. Wilkins P. A., Woolums A. R. Diseases of the respiratory system. *Large Animal Internal Medicine*, 4ta edición. Ed: B.P., Smith, Mosby, Elsevier, St Louis, Missouri. 2005; p. 568-576.
65. Zinkl J. G. Lower respiratory tract. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse*. 2002; 2: 73-86.