

# ANÁLISIS MORFOMÉTRICO COMPUTACIONAL DE LAVADO BRONCOALVEOLAR DE CABALLOS FINA SANGRE DE CARRERA CON HEMORRAGIA PULMONAR INDUCIDA POR EJERCICIO

## COMPUTARIZED MORPHOMETRIC ANALYSIS OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE OF THOROUGHBRED HORSES WITH EXERCISE INDUCED PULMONARY HAEMORRHAGE

SIMÓN COX SÁNCHEZ; CARLOS GONZÁLEZ R.<sup>1</sup>; SERGIO CARVAJAL

### ABSTRACT

*The technique of bronchoalveolar lavage (BAL) was used to quantify the presence of erythrocytes and other indicators of haemorrhage of small airways in 60 Thoroughbred horses between 3 and 6 years of age, in training and competition at a race track. Two hours after a 1000 mts test exercise an endoscopic examination of upper airways was carried out. The animals were grouped according to clinical signs as follows: 20 animals without endoscopic signs of haemorrhage and without other associated clinical signs (group A); 20 animals with clinical signs of intolerance to exercise and presence of blood in trachea to endoscopic examination (group B) and 20 animals with signs of intolerance to exercise but without haemorrhage to endoscopy (group C). Samples by BAL were obtained two days after the 1000ts exercise test.*

*Free erythrocytes and hemosiderophages were counted in each sample, a differential count of leukocytes and a measurement of the amount of hemosiderine contained in hemosiderophages was also performed. Free erythrocytes and hemosiderophages were found in 100% of the analysed samples, including the animals of group A. The percentage of free erythrocytes, hemosiderophages and hemosiderine turned out to be significantly different for the three groups under study ( $P < 0.05$ ), with a low percentage for horses of group A, extremely high in the group B and very variable for group C.*

*With regard to PMN Neutrophils, a significantly smaller count was obtained in group A with regard to the group B and C ( $P < 0.05$ ), but differences were not significant among these last two groups ( $P > 0.05$ ). The incidence and severity of the haemorrhage, based on the values obtained through BAL, were very similar to those obtained in studies carried out in the north hemisphere. The bronchoalveolar lavage turned out to be a simple technique that provides important information to evaluate distal airways in search of lung haemorrhage episodes associated to intolerance to exercise. BAL allows the evaluation of signs associated to previous haemorrhages, degree and type of inflammatory changes at the alveolar level and phagocytic overload of alveolar macrophages.*

**KEY WORDS:** Bronchoalveolar lavage (BAL), exercise induced pulmonary haemorrhage (EIPH).

**PALABRAS CLAVE:** Lavado broncoalveolar (LBA), hemorragia pulmonar inducida por ejercicio (HIPIE).

### INTRODUCCIÓN

La hemorragia pulmonar inducida por ejercicio (HIPIE), como su nombre lo sugiere, es una extrava-

sación de componentes sanguíneos desde el capilar pulmonar al espacio alveolar inducida por el ejercicio intenso. La elevada carga atlética a la que están sometidos los caballos fina sangre de carrera (FSC) impone limitaciones al funcionamiento cardiorrespiratorio, lo que se traduce en un gran incremento de presión en el circuito pulmonar durante el ejercicio. En ciertas ocasiones, este incremento de presión supera la capacidad de resistencia de la membrana alveolocapilar, produ-

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Casilla 2, Correo 15, La Granja, Santiago, Chile.

Financiamiento Proyecto FIV 3719-2

ciendo la ruptura de estas estructuras con la consiguiente hemorragia. Este problema afecta directamente a la actividad hípica debido a que produce una disminución del rendimiento, necesidad de medicación, pérdida de días de entrenamiento y descalificación de caballos (Erickson, 2000).

La epistaxis, por lo general es bilateral y se observa sólo en un 3% de los caballos de carreras (Pascoe *et al.*, 1981), ya que generalmente la sintomatología de HPIE es escasa con manifestaciones solo a nivel traqueal o bronquioalveolar. Por esto, es necesario realizar pruebas diagnósticas que evidencien la HPIE a este nivel, y además permitan evaluar el grado de inflamación y deterioro pulmonar, realizar un diagnóstico diferencial con otras enfermedades que también cursan con hemorragia pulmonar y valorar la presencia de diversas alteraciones inflamatorias de las vías aéreas terminales (trastornos alérgicos e infecciosos).

El examen endoscópico traqueal es una buena alternativa para el diagnóstico de esta condición. Raphael y Soma (1982) encontraron sangre a nivel ventral de la tráquea en un 75% de los caballos sometidos a competencia. Sin embargo, tiene la limitación de ser incapaz de evaluar el deterioro pulmonar y de detectar aquellos casos con manifestación de HPIE sólo a nivel alveolar. Así, la técnica de lavado broncoalveolar (LBA) se presenta actualmente como una buena posibilidad de adquirir información sobre el sitio de origen de la hemorragia, permitiendo analizar las poblaciones celulares presentes en vías aéreas terminales y espacios alveolares (Fogarty, 1990a). Se ha publicado que la presencia de hemosiderofagos y eritrocitos libres, como indicadores de HPIE en LBA de caballos en competencia activa, es de un 95 a 100% (Fogarty, 1990b; Moore y Cox, 1996).

El lavado broncoalveolar (LBA) es una técnica simple, barata y segura (Mansmann, 1998). Ésta puede ser realizada por cualquier veterinario calificado, sin requerir de equipos sofisticados ni destrezas específicas. La técnica consiste en instilar una solución salina en un bronquio secundario o terciario a través de un videoendoscopio de 2 m o un catéter para lavado broncoalveolar, para después recuperarla y analizarla citológicamente.

El análisis de la citología broncoalveolar no sólo puede pesquisar casos incipientes de hemorragia y diferenciar entre hemorragias antiguas y recientes, sino que además puede proveer información muy útil para diferenciar y evaluar distintas enfermedades que afectan las vías aéreas bajas (Moore y Cox, 1996).

El presente estudio ha sido diseñado con el objeto de aportar antecedentes que permitan dilucidar qué ocurre en el espacio alveolar posterior al episodio hemorrágico. Para cumplir este objetivo se realizaron lavados broncoalveolares en caballos en entrenamiento activo después de un episodio de ejercicio extremo. Posteriormente, se analizaron las poblaciones celulares presentes en estos lavados.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CABALLOS

En las dependencias del Club Hípico de Santiago e Hipódromo Chile se obtuvo muestra de LBA a un total de 60 caballos FSC de edades entre 3 y 6 años, de los cuales 23 fueron hembras, 12 machos castrados y 25 machos enteros. Todos los animales muestreados fueron sometidos a un ejercicio de 1.000 m a velocidad máxima, cercana a los 60 km/h. Durante este ejercicio se realizó una medición cronométrica de los 1.000 m y de los últimos 200 m recorridos, además se realizó una medición de la frecuencia cardiaca y respiratoria a través de auscultación en reposo y luego hasta los 20 min. posejercicio.

Después de 90 minutos de realizado este ejercicio se efectuó un examen endoscópico (Endoscopio Olympus Q140, 110 cm x 9 mm, USA) y posteriormente, dentro de 48 h se procedió a tomar la muestra de lavado broncoalveolar.

Los animales muestreados fueron distribuidos en 3 grupos homogéneos en edad y sexo (Tabla 1).

*Grupo A o Control:* 20 caballos sin signos de intolerancia al ejercicio ni signos de sangramiento endoscópico.

*Grupo B:* 20 caballos con signos de intolerancia al ejercicio y signos de sangramiento endoscópico.

*Grupo C:* 20 caballos con signos de intolerancia al ejercicio y que no presentaron signos de sangramiento endoscópico.

TABLA 1

<i>Grupo</i>	<i>Intolerancia al ejercicio</i>	<i>Sangramiento endoscópico</i>
A	NO	NO
B	SÍ	SÍ
C	SÍ	NO

La intolerancia al ejercicio fue definida por la aparición de los siguientes signos:

Fatiga de finalización o disminución de velocidad sorpresiva durante el ejercicio, es decir, una disminución cronométrica de la velocidad igual o superior a 2 m/seg en los últimos 200 m.<sup>1</sup> (Pascoe, 2002).

Dificultad en la recuperación cardiorrespiratoria después del ejercicio extremo, es decir, incapacidad de recuperar el doble de la basal, o sea, 80 latidos cardíacos por minuto y 30 ciclos respiratorios por minuto, antes de 20 minutos posejercicio (Rose y Evans, 1986; Pascoe, 2002).

Tos ocasional, estertores pulmonares o secreciones variables durante los primeros 20 min. posejercicio (Rose y Evans, 1986; Pascoe, 2002).

Para el grupo C fueron seleccionados sólo aquellos caballos que han mostrado episodios repetidos de intolerancia al ejercicio por un periodo superior a un mes y que han corrido satisfactoriamente antes de manifestar intolerancia. De este modo se pretendió minimizar los factores "no médicos" que condicionan el rendimiento. Además se eligió, para este grupo, sólo aquellos animales en que han sido descartadas patologías cardíacas, a través de electrocardiograma; patologías musculoesqueléticas a través de mediciones enzimáticas, bloqueos diagnósticos, rayos X, ultrasonido, o el examen que correspondiera según los prediagnósticos. También quedaron excluidos ejemplares con obstrucciones mecánicas de las vías aéreas superiores, como son la hemiplejía laríngea, desplazamiento del paladar blando, atrapamiento epiglótico y otros.

No se presentaron en este estudio animales con sangramiento endoscópico que no manifestaran signos de intolerancia al ejercicio.

#### OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Para la obtención y procesamiento de la muestra se utilizó el método descrito por Mansmann, 2002. Cada animal fue manejado con un axial (puro), y en 12 de los 60 casos fue necesario sedar con Xylazina en dosis de 0,5 mg/kg (Rompum, Bayer) por vía endovenosa. Un catéter para LBA equino (Equine BAL Catheter, Bivona Medical Technologies, USA) fue introducido por vía nasal, pasando por el meato ventral y tráquea hasta las

vías aéreas distales, fijando el catéter donde éste no avanzó más. Una vez que el catéter estuvo fijado en un bronquio, una bolsa ubicada en el extremo distal del tubo fue inflada con 5 ml de aire para formar un sello dentro del bronquio, luego 60 ml de solución de NaCl al 0,9% (suero fisiológico) estéril a 37 °C fueron instilados a través del catéter. El líquido fue rápidamente recuperado generando vacío con jeringas de 60 ml. Se consideró apropiada aquella muestra en que se recuperó más del 50% del fluido instilado y se observó espuma en su superficie. La muestra obtenida fue almacenada en tubos estériles de 60 ml con anticoagulante EDTA.

Cada muestra fue calificada de acuerdo a su turbidez en grados de 1 a 4, siendo: 1 café suave; 2 rosado; 3 rojo pálido, y 4 rojo o rojo fuerte (McKane *et al.*, 1993).

#### PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

De la muestra completa se extrajo el volumen necesario para un recuento de células nucleadas y eritrocitos totales en hemocitómetro o cámara de Neubauer. Luego la muestra fue centrifugada a 800 G por 5 minutos, el precipitado resultante fue resuspendido utilizando el volumen de NaCl al 0,9% necesario para obtener 1.000 células por ml.

A continuación fueron extraídos 100 ml para someterlo a citocentrifugación a 800 G por 5 minutos (Eppendorf Centrifuge Mod. 5403). Se obtuvieron 2 frotis, los cuales fueron fijados y sometidos a tinción. Uno de éstos fue teñido con tinción policrómica Papanicolau, la cual permitió visualizar los gránulos de homosiderina y el otro fue teñido con tinción Wright-Giemsa, la cual permitió identificar apropiadamente los distintos grupos celulares.

#### EVALUACIÓN CITOLÓGICA

Los frotis citocentrifugados y teñidos fueron examinados utilizando todos los rangos de objetivo del microscopio óptico, realizándose un recuento diferencial de 300 células, siendo expresadas como porcentaje relativo para cada grupo celular encontrado. Además se realizó una estimación del área de hemosiderina total, utilizando análisis morfométrico computarizado. Para cumplir este objetivo se digitalizaron las imágenes de 5 campos de 200X por muestra, con una resolución de 512 X 480 píxeles, mediante una videocámara digital (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetic, USA) montada

<sup>1</sup> Martínez, R. [Comunicación Personal], Facultad Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

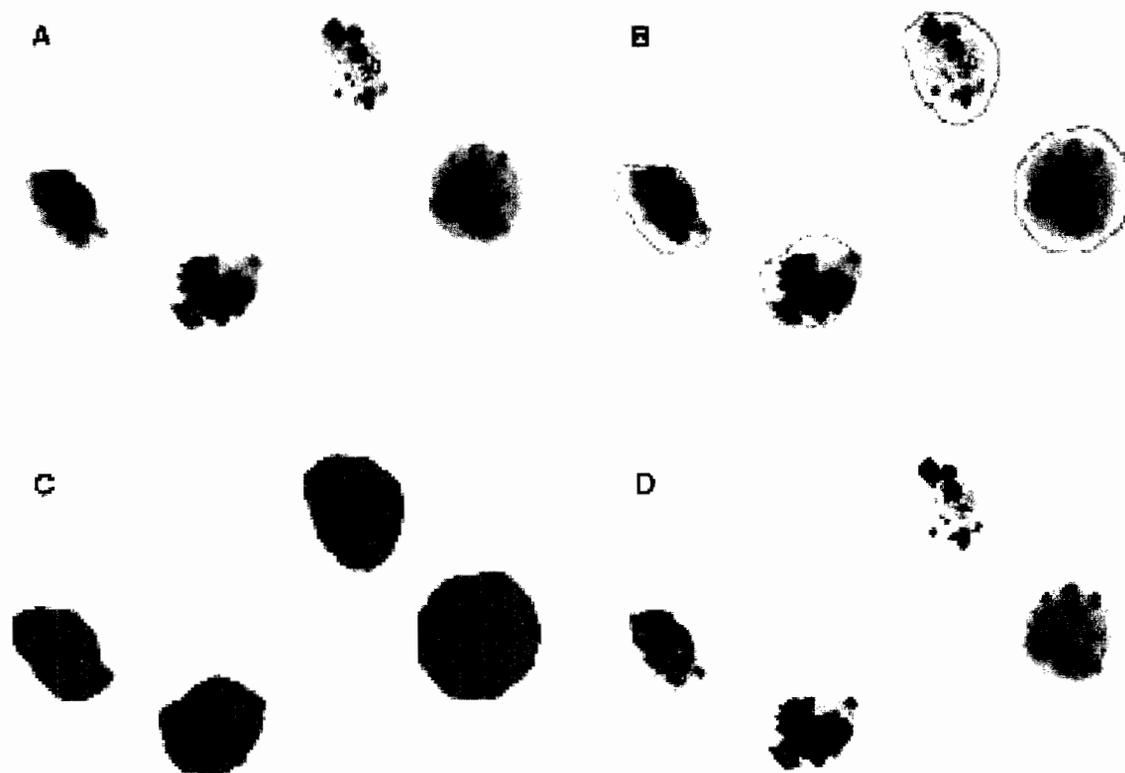


Figura 1.

Secuencia que ejemplifica los pasos del análisis morfométrico computacional. Pap, 200X: A) imagen previa al análisis, B) contorno marcado de macrófagos, C) área total de macrófagos (sumatoria del área de cada macrófago) y D) área que abarca la hemosiderina en la muestra.

en un microscopio óptico científico (Nikon Eclipse E-600) y conectada a un computador con un software morfométrico (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA). Luego se procedió a medir el área total que abarcan los macrófagos y el área de hemosiderina contenida en la imagen (Fig. 1), para luego ser expresado como un índice (Índice H/M), el cual indicaría el porcentaje promedio de hemosiderina contenida en los macrófagos de la muestra.

#### ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se comparó la diferencia entre los recuentos de eritrocitos, hemosiderófagos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y área total de hemosiderina, para cada grupo. Para detectar una diferencia significativa con un 5% de error, se definió un tamaño de muestra (n) de 20 caballos por grupo.

Los datos distribuidos en forma normal fueron sometidos a análisis de varianza para definir las dife-

rencias entre grupos, luego fueron sometidos a la Prueba de Tukey para comparar los grupos. Los datos que no se distribuyeron en forma normal, como fue el caso de los eosinófilos y macrófagos totales, fueron sometidos a la Prueba de Kruskal-Wallis para definir las diferencias entre grupos, luego fueron sometidos a la prueba STP para comparar los grupos.

#### RESULTADOS

##### ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL LBA

El volumen promedio de fluido recuperado para los 3 grupos en estudio fue de  $40,72 \pm 3,80$  ml (promedio  $\pm$  desviación estándar).

Las muestras obtenidas desde el grupo A presentaron una turbidez promedio de  $1,20 \pm 0,41$ , las del grupo B  $2,65 \pm 0,49$  y las del grupo C  $1,70 \pm 0,66$ , existiendo diferencias significativas entre estos tres grupos ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 1).

GRÁFICO 1  
TURBIDEZ PROMEDIO EN MUESTRAS DE LBA DE EQUINOS FSC,  
SEGÚN PRESENCIA DE SANGRE EN TRÁQUEA E INTOLERANCIA AL EJERCICIO

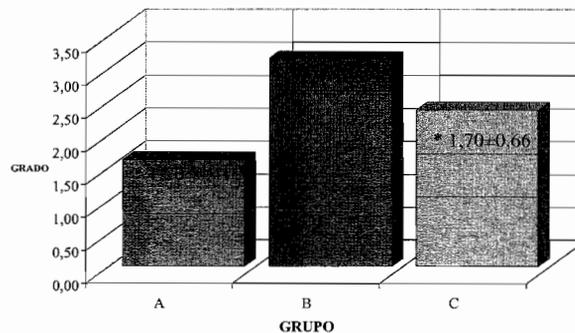
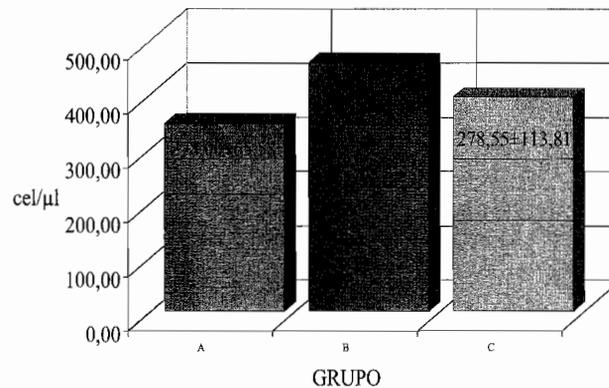


GRÁFICO 2  
CÉLULAS LEUCOCITARIAS EN LBA DE EQUINOS FSC,  
SEGÚN PRESENCIA DE SANGRE EN TRÁQUEA E INTOLERANCIA AL EJERCICIO



\* promedio ± desviación estándar.

A: Controles sanos.

B: FSC con intolerancia al ejercicio y sangre en tráquea a la endoscopia.

C: FSC con intolerancia al ejercicio y sin sangre en tráquea a la endoscopia.

#### ANÁLISIS CITOLÓGICO

El recuento de células leucocitarias totales en cámara de Neubauer (Fig. 2) fue de  $278,00 \pm 65,58$  células por  $\mu\text{l}$  para el grupo A,  $341,50 \pm 114,81$  cel/ $\mu\text{l}$  para el grupo B y de  $278,55 \pm 113,81$  cel/ $\mu\text{l}$  para el grupo C. Para esta variable no se encontró diferencias significativas entre los grupos analizados ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 2). Se observó exfoliación de algunas células epiteliales bronquiolares (Fig. 4), que no se consideraron en el recuento.

Como macrófagos totales se consideraron tanto aquellos con hemosiderina (Fig. 7) como los sin hemosiderina (Fig. 3). En el recuento diferencial de células leucocitarias presentes en las muestras obtenidas desde los 20 caballos clasificados en el grupo A, predominaron los macrófagos totales con un  $69,59 \pm 5,89\%$ . Para el grupo B fue de un  $64,34 \pm 8,41\%$  y para el grupo C fue de un  $61,16 \pm 9,31\%$ . El análisis estadístico de esta variable no mostró diferencias significativas entre los tres grupos analizados ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 3).

El recuento de linfocitos fue de un  $24,70 \pm 3,99\%$  para el grupo A,  $22,10 \pm 5,64\%$  para el grupo B y de un  $26,82 \pm 6,64\%$  para el grupo C. No mostrándose diferencias significativas entre los grupos analizados ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 4).

Con respecto los polimorfonucleares neutrófilos, se obtuvo un  $5,44 \pm 2,43\%$  para el grupo A, un  $13,11 \pm 6,87\%$  para el grupo B y un  $11,73 \pm 7,09\%$

GRÁFICO 3  
 PORCENTAJE DE MACRÓFAGOS PRESENTES EN LBA DE EQUINOS FSC,  
 SEGÚN PRESENCIA DE SANGRE EN TRÁQUEA E INTOLERANCIA AL EJERCICIO

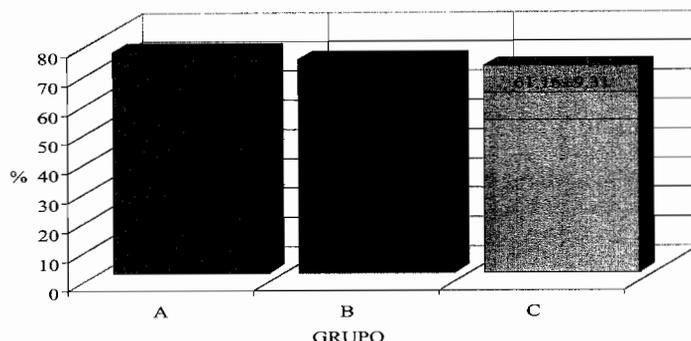
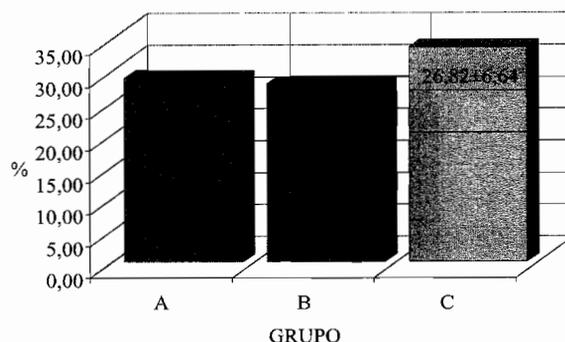


GRÁFICO 4  
 PORCENTAJE DE LINFOCITOS PRESENTES EN LBA DE EQUINOS FSC,  
 SEGÚN PRESENCIA DE SANGRE EN TRÁQUEA E INTOLERANCIA AL EJERCICIO



para el grupo C. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa del grupo A con respecto a los grupos B y C ( $P < 0,05$ ), no encontrándose diferencia significativa entre el grupo B y C ( $P > 0,05$ ). (Gráfico 5).

El recuento de polimorfonucleares eosinófilos (Fig. 5) fue de un  $0,20 \pm 0,60\%$  para el grupo A,  $0,55 \pm 0,84\%$  para el grupo B y de un  $0,64 \pm 1,05\%$  para el grupo C. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) para esta variable.

La presencia de eritrocitos libres en la muestra se encontró en un 100% de los animales analizados. Ocasionalmente estos eritrocitos se encontraban formando rosetas con macrófagos (Fig 6). Con respecto al total de células presentes en el conteo en cámara de Neubauer, los eritrocitos se presentaron en un  $27,46 \pm 10,48\%$  del total de células para el grupo A,  $61,14 \pm 12\%$  para el grupo B y en un  $46,16 \pm 16,68\%$  para el grupo C. El análisis estadístico de esta variable mostró diferencias significativas

( $P < 0,05$ ) entre los tres grupos de equinos analizados (Gráfico 6).

Cuando se analiza el porcentaje de hemosideróforos con respecto al total de macrófagos de las muestras el resultado para el grupo A fue de un  $24,78 \pm 9,72\%$ , mientras que para los grupos B y C fue de un  $73,02 \pm 13,97$  y  $56,95 \pm 23,93 \%$ , respectivamente. El análisis estadístico demostró una diferencia significativa entre los tres grupos analizados (Gráfico 7).

#### ANÁLISIS MORFOMÉTRICO COMPUTACIONAL

El índice H/M, lo cual correspondería al área de los macrófagos cubierta por hemosiderina fue para el grupo A de  $8,5 \pm 6 \%$ , para el grupo B de  $31,1 \pm 6 \%$  y para el grupo C de  $22,7 \pm 12 \%$ . El análisis estadístico reveló para esta variable diferencias significativas entre los tres grupos de animales analizados (Gráfico 8).

GRÁFICO 5

PORCENTAJE DE NEUTRÓFILOS PRESENTES EN LBA DE EQUINOS FSC, SEGÚN PRESENCIA DE SANGRE EN TRÁQUEA E INTOLERANCIA AL EJERCICIO

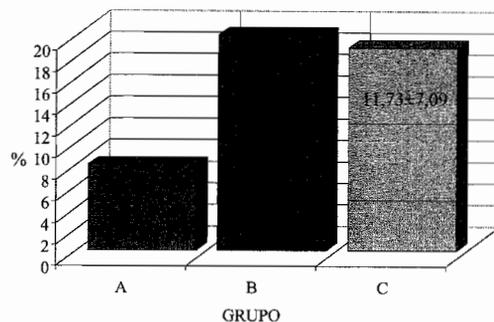
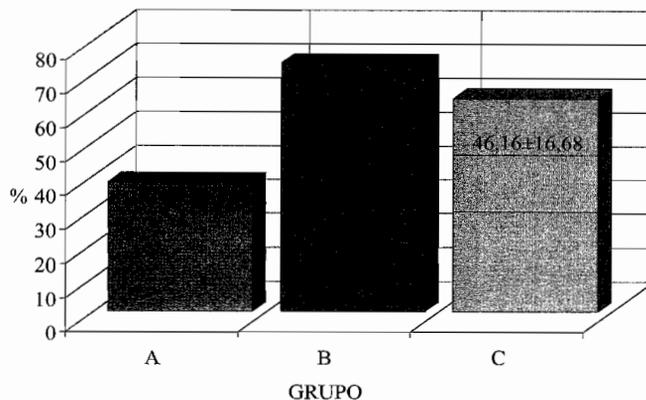


GRÁFICO 6

PORCENTAJE DE ERITROCITOS LIBRES CON RESPECTO AL NÚMERO DE CÉLULAS TOTALES PRESENTES EN LBA DE EQUINOS FSC, SEGÚN PRESENCIA DE SANGRE EN TRÁQUEA E INTOLERANCIA AL EJERCICIO



## DISCUSIÓN

### *Características de la muestra*

La técnica utilizada en este estudio para extraer fluido broncoalveolar resultó ser simple y segura. El volumen recuperado ( $40,72 \pm 3,83$ ) coincide con los datos expuestos por Mansmann (1998), donde se describe la técnica utilizada. Más aún, en ninguno de los animales muestreados fue necesario repetir el procedimiento por obtención de una muestra insuficiente. Al igual que en varios estudios realizados anteriormente, no se presentaron hemorragias iatrogénicas o problemas posteriores al procedimiento.

Varios estudios realizados a principios de los años 90 (Hare *et al.*, 1994; Lapointe *et al.*, 1994, Clark *et al.*, 1995) utilizaron volúmenes de fluido de entre 200 a 500 ml para realizar un lavado. Sin embargo, el uso de es-

tos volúmenes se considera impracticable en condiciones de terreno. Moore y Cox (1996) demostraron que el volumen utilizado influye en el recuento celular diferencial, encontrándose menores recuentos de macrófagos y mayores recuentos de PMN neutrófilos cuando se utilizan grandes volúmenes de fluido. Por otra parte, nuestros datos concuerdan con Mansmann (1998), quien demostró que la técnica donde se emplean 60 ml de fluido es consistente cuando se utilizan los mismos volúmenes cada vez y entrega resultados comparables y confiables, además de ser fácilmente aplicable en condiciones de terreno.

La turbidez resultó ser significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre los tres grupos analizados, indicando los caballos no sangradores y sin signos de intolerancia (Controles), se obtiene fluido broncoalveolar de tonalidad café pálido (80% resultó

GRÁFICO 7  
 PORCENTAJE DE HEMOSIDERÓFAGOS CON RESPECTO AL NÚMERO DE MACRÓFAGOS PRESENTES EN LBA DE EQUINOS FSC, SEGÚN PRESENCIA DE SANGRE EN TRÁQUEA E INTOLERANCIA AL EJERCICIO

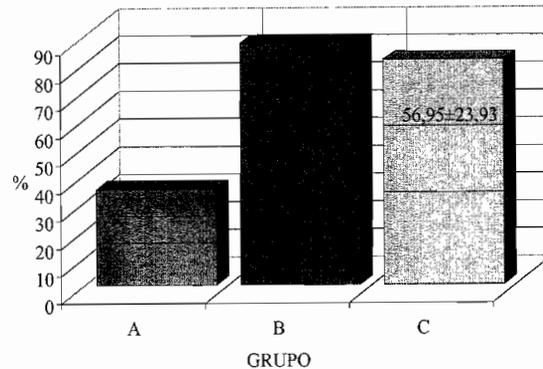
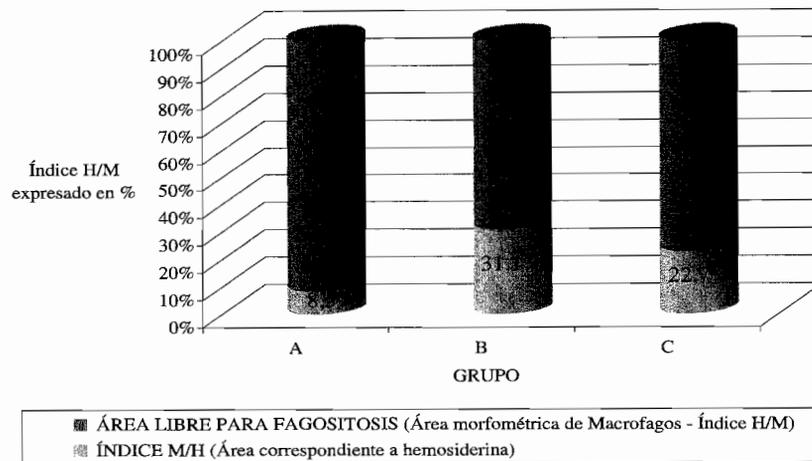


GRÁFICO 8  
 ÍNDICE H/M O ÁREA PROPORCIONAL DE HEMOSIDERINA PRESENTE EN LBA DE EQUINOS FSC, SEGÚN PRESENCIA DE SANGRE EN TRÁQUEA E INTOLERANCIA AL EJERCICIO



ser grado 1). Aquellos caballos con hemorragia a la endoscopia presentan un color rojo pálido (65% con turbidez grado 3 y 35% con turbidez grado 2). El grupo de animales con intolerancia al ejercicio (grupo C) resultó ser el grupo más heterogéneo con respecto a la turbidez de la muestra, siendo un 40% (8/20) de las muestras de este grupo de turbidez grado 50% (10/20) de turbidez grado 2 y un 10% (2/20) de turbidez grado 3. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por McKane *et al.* (1993) y Mansmann (1998). La tur-

bidez se presenta como un dato bastante importante como parámetro de evaluación de la calidad de la muestra y como un dato preliminar en el diagnóstico de hemorragia pulmonar. Sin embargo, tiene la limitación de no ser un parámetro completamente objetivo por la naturaleza de su sistema de calificación. Para mejorar el sistema de medición de este parámetro se podría estudiar la utilización de un espectrofotómetro, lo cual permitiría una evaluación más precisa.

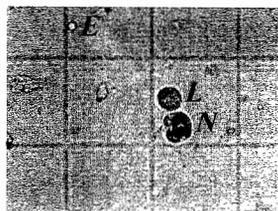


Fig. 2. Recuento de células totales en hemocitómetro. Se observa un eritrocito (E), un linfocito (L) y un PMN neutrófilo (N). PAP 200x.

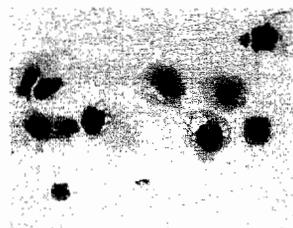


Fig. 3. Macrófagos alveolares sin hemosiderina PAP. 200x.

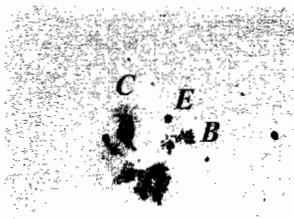


Fig. 4. Presencia de células epiteliales cilíndricas ciliadas (C), eritrocitos (E) y bacterias cocáceas (B). PAP. 200x.

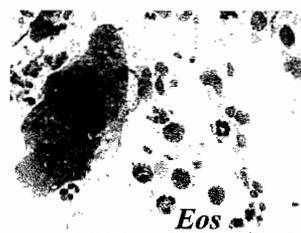


Fig. 5. Restos celulares necróticos y presencia de eosinófilos (Eos). PAP. 200x.

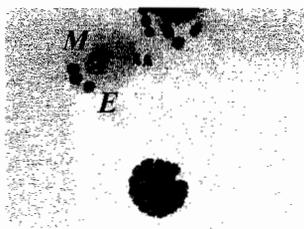


Fig. 6. Presencia de macrófagos alveolares (M), rodeados de eritrocitos (E), en hemorragia reciente PAP. 200x.



Fig. 7. Presencia de pigmentos oscuros (hemosiderina) en citoplasma de macrófagos en hemorragia antigua Giemsa 200x.

## RECUESTO CELULAR

El recuento celular de leucocitos totales se realizó al igual que en otros estudios anteriores sólo como un método para obtener una dilución de leucocitos correcta para un recuento diferencial objetivo. El valor de leucocitos totales extraídos desde un LBA resulta ser muy variable entre los diferentes animales, por lo cual no es un parámetro del cual se pudiera deducir alguna información importante. Esta observación concuerda con lo descrito en diversos estudios reali-

zados anteriormente (Fogarty y Buckley, 1991; McKane *et al.*, 1993; Mansmann, 1998).

Macrófagos y linfocitos fueron las células nucleadas más frecuentes en los tres grupos analizados. Juntos, estos dos grupos celulares representan alrededor del 90% de las células nucleadas, siendo 2/3 macrófagos y 1/3 linfocitos (Tabla 2). Esta información es consistente con otros estudios realizados a poblaciones de FSC en entrenamiento (Fogarty y Buckley, 1991; McKane *et al.*, 1993). Sin embargo, en un estudio realizado utilizando 50

TABLA 2  
 RECUENTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN LAVADOS BRONCOALVEOLARES  
 DE EQUINOS FSC EN ENTRENAMIENTO ACTIVO

Grupo	Macrófagos(%)	Linfocitos(%)	Neutrófilos(%)	Eosinófilos(%)	Hemosiderófagos*(%)
A(n=20) Controles sanos	69,59 ± 5,89	24,70 ± 3,99	5,44 ± 2,43	0,20 ± 0,62	24,78 ± 9,72
B (n=20) Sangre en tráquea	64,34 ± 8,41	22,10 ± 5,64	13,11 ± 6,87 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,84	73,02 ± 13,97 <sup>a</sup>
C (n=20) Intolerancia al ejercicio	61,16 ± 9,31	26,82 ± 6,64	11,73 ± 7,09 <sup>a</sup>	0,64 ± 1,05	56,95 ± 23,93 <sup>a</sup>
Promedio Total	65,03 ± 8,61	24,54 ± 5,78	10,09 ± 6,68	0,46 ± 0,86	51,58 ± 16,22

\* % Porcentaje de macrófagos con hemosiderina.

<sup>a</sup>Diferencia significativa con respecto al grupo A.

caballos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Derksen *et al.*, 1989), la proporción de macrófagos y linfocitos fue menor, debido a un aumento en la proporción de neutrófilos.

Al igual como lo exponen los estudios anteriores, la proporción de macrófagos y linfocitos en nuestro estudio cambia principalmente por la variación dada por otro grupo celular ya sea neutrófilos o eosinófilos. Por lo cual el número de macrófagos y linfocitos se mantendría constante, por lo tanto no se considerarían buenos indicadores para mostrar el estado clínico de las vías aéreas distales (Tabla 2).

El alto porcentaje de PMN neutrófilos encontrado en aquellos animales que presentan sangre en tráquea a la endoscopia (grupo B) apoyaría la hipótesis de que la respuesta inflamatoria podría ser causa o consecuencia de HPIE, dado que la presencia de sangre en las vías respiratorias de caballos sanos origina alteraciones funcionales y morfológicas similares a las que se desarrollan en los caballos que sufren procesos inflamatorios bronquiales (McKane *et al.*, 1993). El grupo de animales que presenta signos de intolerancia al ejercicio y que no manifiesta hemorragia a la endoscopia (grupo C) no mostró diferencias con respecto a los animales del grupo B. Los altos recuentos de neutrófilos en el grupo C se podrían explicar ya sea por el desarrollo de un proceso inflamatorio de las vías aéreas bajas dado por un proceso alérgico y/o infeccioso, o bien dado por una respuesta inflamatoria posterior a una hemorragia.

Los recuentos de eosinófilos en este estudio concuerdan con lo expresado en estudios anteriores donde la presencia de eosinófilos se dio como un factor muy escaso y variable, por lo que no se pudo entregar una interpretación clara.

En el presente estudio, un 100% de las muestras presentó eritrocitos. Fogarty y Buckley (1991), utilizando 11 caballos FSC en entrenamiento activo, encontraron este hallazgo en un 95% de los animales. McKane *et al.*, 1993, utilizando 62 caballos FSC en entrenamiento activo, encontró eritrocitos libres en un 73% de los animales muestreados; este último autor utilizó para su estudio caballos de edades entre 1 y 5 años, siendo éstos como promedio menores a los utilizados en el presente estudio (3-6 años). Esto podría explicar la diferencia con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

La presencia de hemosiderófagos en este estudio, al igual que estudios anteriores, fue de un 100% de los animales muestreados. El 24,78% de hemosiderófagos encontrado en el grupo de controles sanos (grupo A) indicaría que incluso aquellos animales sometidos a entrenamiento que no presentan ningún signo clínico sufren también de hemorragia pulmonar. La diferencia mostrada en caballos con intolerancia al ejercicio sin signos de hemorragia a la endoscopia (grupo C) concuerda con las observaciones de Fogarty y Buckley (1991), donde la presencia de hemosiderófagos aumentó significativamente cuando se observaron signos de intolerancia al ejercicio.

## ANÁLISIS MORFOMÉTRICO COMPUTACIONAL

Los hemosiderófagos de un LBA son un buen indicador de hemorragia pulmonar tanto reciente como de cierta antigüedad; sin embargo, hay que ser cauteloso cuando se utilizan los hemosiderófagos como único indicador de HPIE. Esto se relaciona, por un lado, con el hecho de que en casi todos los casos la distribución de la hemosiderina fagocitada tiende a ser bastante homogénea, distribuyéndose entre la mayoría de los macrófagos presentes, por lo tanto un alto porcentaje de hemosiderófagos no necesariamente implica una gran cantidad de hemosiderina total (Meyer, 1998). Así, cuando se cuentan los hemosiderófagos presentes en una muestra y se expresa sólo como porcentaje de macrófagos totales, se podría sobreestimar la magnitud o grado de compromiso de la capacidad fagocítica de esta población. Por otra parte, la metabolización de la hemosiderina dentro del macrófago es muy lenta, manteniéndose por un periodo superior a 3 ó 4 semanas (Meyer, 1998). Por lo tanto, en un caballo que sufre de hemorragias repetidas, los macrófagos tendrán cada vez una menor capacidad de fagocitar los eritrocitos, ya que estarán acumulando hemosiderina en su interior, después de cada episodio.

El análisis morfométrico computacional entregó información relacionada con dos hechos importantes: A) Cantidad total de hemosiderina acumulada en la muestra, la cual incluiría a todos los episodios de hemorragia desde 4 semanas previas a la realización del LBA. B) La reserva de capacidad fagocítica de macrófagos alveolares, determinada la superficie citoplasmática libre de hemosiderina, de esta población celular.

En el presente estudio, aquellos caballos sin signos clínicos (controles) tuvieron niveles de hemosiderina bastante bajos como promedio (8,5 %), lo cual indica que su reserva de capacidad fagocítica de macrófagos alveolares es del orden del 91,5%, en otras palabras, como promedio los macrófagos tienen el 91,5% de su citoplasma disponible para fagocitosis y las hemorragias previas se acumulan en un 8,5% del citoplasma de los macrófagos totales (Gráfico 8). Al analizar el otro extremo, los animales del grupo B o sangradores tuvieron como promedio niveles de hemosiderina del orden del 31%, lo que significa que su reserva es del 69%. Siendo esta cifra significativamente inferior con respecto al grupo A, podríamos deducir que en aquellos animales donde la hemorragia migró a tráquea, las hemorragias previas (desde 4 semanas) se han

acumulado, abarcando ya el 31% del área disponible para fagocitosis, además de esto, presentan recuentos de eritrocitos y PMN neutrófilos significativamente superiores, lo cual se relacionaría a un mayor deterioro de la superficie alveolar.

El grupo C fue más variable, presentándose un 55% (11/20) de animales, en los cuales se observan altos porcentajes de hemosiderina acompañados de altos niveles de eritrocitos libres, hallazgos que explicarían los signos de intolerancia al ejercicio, basándose en un claro episodio reciente o antiguo de HPIE. En 2 de estos 11 casos se presentaron también altos recuentos de neutrófilos, lo que se atribuiría al desarrollo de respuesta inflamatoria que podría estar relacionada al episodio hemorrágico, ya sea como causa o consecuencia. En un 35% (7/20) de los casos de este grupo se presentaron bajos porcentajes de hemosiderina y de eritrocitos libres (más cercanos a los presentados en el grupo A), pero sí se presentaron altos recuentos de neutrófilos, por lo tanto, en estos casos, los signos de intolerancia al ejercicio se explicarían más bien por un proceso inflamatorio de las vías aéreas bajas o EPOC.

## RESUMEN

La técnica de lavado broncoalveolar fue utilizada para cuantificar la presencia de eritrocitos y otros indicadores de hemorragia de vías aéreas inferiores en 60 Equinos Fina Sangre de Carrera de edades entre 3 y 6 años sometidos a entrenamiento y competencia en el Hipódromo Chile y Club Hípico de Santiago. Se realizó un ejercicio de prueba de 1.000 m a todos los animales muestreados. Luego de 2 horas se realizó un examen endoscópico de las vías respiratorias superiores. Los animales fueron agrupados según signos clínicos encontrándose: 20 animales sin hemorragia a la endoscopia y sin otros signos presuntivos (grupo A), 20 animales que presentan signos de intolerancia al ejercicio y presencia de sangre en tráquea a la endoscopia (grupo B) y 20 animales que presentan signos de intolerancia al ejercicio pero sin hemorragia a la endoscopia (grupo C). Las muestras de LBA fueron obtenidas a dos días de realizado el ejercicio.

Se realizó un recuento de eritrocitos libres y hemosiderófagos presentes en cada muestra, un recuento diferencial de leucocitos y una medición de la cantidad de hemosiderina. Eritrocitos libres y hemosiderófagos fueron encontrados en el 100% de las muestras analizadas, incluyendo los animales del gru-

po control sano. El porcentaje de eritrocitos libres, hemosiderófagos y hemosiderina resultó ser significativamente diferente entre los tres grupos analizados ( $P < 0,05$ ), resultando ser bajos en aquellos caballos sanos (grupo A), extremadamente altos en el grupo que mostró sangre en tráquea al final de la competencia (grupo B) y muy variables entre los animales que mostraron signos de intolerancia al ejercicio durante o después de la competencia (grupo C).

Con respecto a los PMN neutrófilos, se obtuvo un recuento significativamente menor en el grupo A con respecto a los grupos B y C ( $P < 0,05$ ), no encontrándose diferencia significativa entre estos dos últimos grupos ( $P > 0,05$ ).

La incidencia y severidad de la hemorragia, basándose en los valores obtenidos a través de LBA, fueron muy similares a los obtenidos en estudios realizados en el hemisferio norte. El lavado broncoalveolar resultó ser una técnica simple que proporciona una valiosa información para la evaluación de las vías aéreas distales frente a episodios de hemorragia pulmonar e intolerancia al ejercicio, permitiendo evaluar la presencia de hemorragias previas, grado de compromiso inflamatorio de la superficie alveolar y capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares.

#### BIBLIOGRAFÍA

- CLARK CK, LESTER GD, VETRO T, 1995. Bronchoalveolar lavage in horses: effect of exercise and repeated sampling on cytology. *Aust Vet J* 1995; 72:249-252.
- COOK WR, 1974. Epistaxis in the racehorse. *Equine Vet J* 1974; 6:45-58.
- DERKSEN FJ, BROWN CM, SONEA I, 1989. Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. *Equine Vet J* 1989; 21:23-26.
- ERICKSON HH, 2000. A review of exercise-induced pulmonary hemorrhage and new concepts for prevention. In: *Proceedings of the Ann Conv Am Assoc Equine Pract* 2000; 46:193-196.
- FOGARTY U, 1990A. Bronchoalveolar lavage technique for routine diagnosis purposes. *Equine Vet Educ* 1990; 2: 102-104.
- FOGARTY U, 1990B. Evaluation of a bronchoalveolar lavage technique. *Equine Vet J* 1990; 22:174-176.
- FOGARTY U, BUCKLEY, T, 1991. Bronchoalveolar lavage finding in horses with exercise intolerance. *Equine Vet J* 1991; 23:434-437.
- HARE JE, VIEL L, O'BYRNE PM, 1994. Effect of sodium cromoglycate on light racehorses with elevated metachromatic cell numbers on bronchoalveolar lavage and reduced exercise tolerance. *J Vet Pharmacol Therap* 1994; 17:237-244.
- HOFFMAN AM, MAZAN MR, ELLENBERG S, 1998. Association between bronchoalveolar lavage cytologic features and airway reactivity in horses with a history of exercise intolerance. *Am J Vet Res* 1998; 59:176-181.
- JONES JH, SMITH BL, TYLER WS, 1993. Why do horses bleed? Source and cause of exercise-induced pulmonary hemorrhage in horses. In: *Proceedings of the Int EIPH Conf* 1993;22-23.
- LANGSETMO I, FEDDE MR, MEYER TS, 2000. Relationship of pulmonary arterial pressure to pulmonary hemorrhage in exercising horses. *Equine Vet J* 2000; 32:379-384.
- LAPOINTE JM, VRINS A, MCCARVILL E, 1994. A survey of exercise-induced pulmonary hemorrhage in Quebec Standardbred racehorses. *Equine Vet J* 1994; 26:482-485.
- MANSMANN RA, 1998. How to perform bronchoalveolar lavage (BAL) in practice. In: *Proceedings of the 44th AAEP Convention*, 1998, pp. 186-188.
- MARLIN DJ, 2001. Exercise-induced pulmonary hemorrhage: a global review of recent findings. In: *Proceedings of the World Equine Airways Symposium* 2001; 2:1-10.
- MCGORUM BC, DIXON PM, 1994. The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine vet educ.* 1994; 6:203-209.
- MCKANE SA, CANFIELD PJ, ROSE RJ, 1993. Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of Thoroughbred racehorses in training. *Aust Vet J* 1993; 70:401-404.
- MEYER TS, 1998. Quantification of exercise-induced pulmonary hemorrhage with bronchoalveolar lavage. *Equine Vet J* 1998; 30(4):284-288.
- MOORE BR, COX JH, 1996. Diagnostic use of bronchoalveolar lavage in horses. *Equine Pract* 1996; 18(5):7-15.
- PASCOE JR, FERRARO GL, CANNON JH, 1981. Exercise-induced pulmonary hemorrhage in racing Thoroughbreds: a review study. *Am J Vet Res* 1981; 42:703-707.
- PASCOE JR, MCCABE AE, FRANTI CE, 1985. Efficacy of furosemide in the treatment of exercise-induced pulmonary hemorrhage in Thoroughbred racehorses. *Am J Vet Res* 1985; 46:2000-2003.
- PASCOE JR, 2002. Exercise induced pulmonary hemorrhage (EIPH) In: *Large Animal Internal Medicine*, Smith BP, 2002, third edition, part 2-5:526-529.
- RAPHEL CF, SOMA LR, 1982. Exercise-induced pulmonary hemorrhage in Thoroughbreds after racing and breeding. *Am J Vet Res* 1982; 43:1123-1127.
- ROSE RJ, EVANS DL, 1986. Cardiovascular and respiratory function in the athletic horse. *Equine Exercise Physiology* 2 (Guillespie)1986:1-24.
- SCHROTER RC, MARLIN DJ, DENNY E, 1998. Exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH) in horses results from locomotory impact induced trauma a novel, unifying concept. *Equine Vet J* 1998; 30:186-192.
- SWEENEY CR, ROSSIER Y, ZIEMER EL, 1992. Effect of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *Am J Vet Res* 1992; 53:1376-1379.
- TAKAHASHI T, HIRAGA A, OHMURA H, 2001. Frequency of and risk factors for epistaxis associated with exercise-induced pulmonary hemorrhage in horses: 251. 609 race starts (1992-1997). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218:1462-1464.
- WEST JB, MATHIEU-COSTELLO O, 1999. Structure, strength, failure, and remodeling of the pulmonary blood-gas barrier. *Annu Rev Physiol* 1999; 61:543-572.
- WHITWELL JE., GREET TR, 1984. Collection and evaluation of tracheobronchial lavage in horses. *Equine Vet J* 1984; 16:499-508.