

## TECNICA DE LAVADO BRONQUIOALVEOLAR EN BORREGOS ANESTESIADOS PARA COLECCION DE CELULAS PULMONARES

FRANCISCO MORALES A. \*

EMILIO TRIGO TAVERA \*

HECTOR SANCHEZ-MEJORADA P. \*

ALICIA V. MENDEZ GUERRERO \*

Con el desarrollo de las técnicas de lavado bronquioalveolar (LBA) en los últimos años, se ha impulsado en forma intensiva el estudio de las características inmunológicas y biológicas de los macrófagos alveolares (MA) del pulmón, (Hocking, Golde, 1979a; Hocking, Golde, 1979b; Hunninghake, Gadek y Kawanami, 1979). Este tipo de LBA se desarrolló en un principio en animales de laboratorio por Myrvik, Leake y Fariss (1961) con la utilización de conejos como fuente de MA. La técnica consistía en sacrificar al animal por medio de embolia de aire, ya con el animal muerto, se extraían los órganos de la cavidad torácica, para después llenar los pulmones a través de la tráquea y bronquios con solución salina balanceada de Hartman (SSB). Con los pulmones distendidos con SSB, se aplicaba a éstos un masaje ligero y se recolectaba la solución de lavado, esta maniobra se repetía una vez y se mezclaban las dos muestras de fluido colectado que contenía a las células bronquioalveolares (CBA).

\* Proyecto en Diagnóstico Veterinario, Sector Pecuario, INIFAP-SARH, Km. 15.5 de la Carr. México-Toluca, D. F., C.P. 05110.

Téc. Pec. Méx. Vol. 25, No. 1 (1987).

A partir del primer informe de esta técnica en la literatura, se han publicado un gran número de modificaciones al procedimiento. Se han empleado diversos aditamentos como catéteres y tubos para canular la tráquea (Goremberg y Daniele, 1976; Sone y Fidler, 1980), también se ha usado una gran variedad de soluciones de lavado (Brain y Frank, 1973; Holt, 1979), y se han efectuado lavados múltiples (Brain y Frank, 1968; Brain, 1970). Además se han aplicado técnicas de lavado *in situ* (Maxwell, Dietz y Marcus, 1976; Medin, Osebold y Zee, 1976). En la actualidad Maulderly (1977) describe la utilización de animales vivos, tales como animales pequeños de laboratorio para realizar LBA. Este tipo de técnicas *ante-mortem* de LBA ofrece la ventaja de que a través de ellas se puede obtener una información secuencial por medio de lavados seriados en el mismo individuo.

El empleo de técnicas similares a la descrita por Maulderly (1977) en animales de mayor tamaño es más seguro aun cuando se utilizan volúmenes mayores de fluido para realizar el lavado (Carlens, 1949; Wasserman,

Blank y Fletcher, 1968 y Klystra, Rausch y Hall, 1971). Dentro de las técnicas **ante-mortem**, se han desarrollado métodos que incluyen el uso de catéteres de lumen doble o sencillo y de bronquioscopios de fibras ópticas. Con los catéteres de lumen doble se produce una separación funcional de las zonas pulmonares llenas de gas y de solución de lavado. El lavado de un segmento ocurre a través de un canal, mientras que la ventilación ocurre a través del otro (Carlens, 1949).

Dyer, Liqitt y Leid (1983), describen también el uso de un catéter de lumen doble para obtener CBA por medio de LBA en equinos.

Finley, Swenson y Curran (1967), Harris, Swenson y Johnson (1970), utilizaron un catéter perforado el cual pasaron hasta la zona de bronquios segmentales para hacer LBA en humanos, mientras que Kaltreider, Turner y Salmon (1975), introdujeron un catéter similar al arriba mencionado, a través de un tubo endotraqueal para depositar la punta de aquél en un bronquio segmental de un perro. Harmsen, Birmingham y Engen (1979) adaptaron esta técnica en cerdos. Otra pequeña modificación es la descrita por Muggenburg y Mauderly (1975), en la que utilizaron un tubo endotraqueal para anestésiar, ventilar y lavar pulmones de perros. La separación del pulmón lavado y el pulmón ventilado se llevó a cabo por medio de posición y gravedad. El perro fue colocado en decúbito lateral y el pulmón inferior fue lavado, mientras que el pulmón superior fue ventilado. Esta misma técnica es descrita en primates no humanos por Castello, Emmert y Denson (1979).

Corstvet, Rummage y Homer (1982) utilizaron un tubo simple de plástico que introdujeron a través de la cavidad oral de becerros para recolectar CBA. Trigo y col., (1984a) presentan

una modificación a esta técnica en ganado bovino adulto, con la introducción de un tubo simple de polipropileno por la cavidad nasal hasta depositar la punta de este tubo en el pulmón.

Con la aparición de bronquioscopios de fibras ópticas flexibles, el LBA en humanos en la actualidad se practica en forma rutinaria (Reynolds y Newball, 1974; Reynolds, Atkinson y Newball, 1975; Whitcomb, 1979; Daniele, Altose y Rowlands, 1975; y Haslem, Turton y Lukosek, 1980). Los pacientes son tranquilizados y un agente anestésico es aplicado en la laringe. La punta del bronquioscopio es introducido en forma intranasal hasta que esta se coloca en un bronquiolo subsegmental del pulmón. Células bronquioalveolares de primates no humanos (Kazmierowski, Fauci y Reynolds, 1976) y becerros (Markham y Wilkie, 1980), han sido obtenidas bajo técnicas similares.

El propósito del presente estudio es el de describir una técnica para realizar LBA en ganado ovino ya que de los informes existentes sobre CBA en ovinos, las células utilizadas fueron recolectadas en forma **pos-mortem**. (Davies y Penwarden, 1981; Sutherland, Gray y Wells, 1983; Trigo, 1984b).

El objetivo de este estudio fue el de desarrollar un procedimiento que se pudiera llevar a cabo en borregos vivos para obtener muestras de la población de CBA en una forma seriada sin producir daño a los animales a quienes se les practica el lavado bronquioalveolar.

Se utilizaron cuatro borregos Tabasco adultos, sanos al examen clínico, de dos a tres años de edad, los cuales tuvieron libre acceso a agua y alimento. Estos animales fueron mantenidos en corrales techados y con piso de concreto.

Para la recolección de CBA, a cada borrego se le administró anestesia disociativa, con la utilización de hidrocioruro de xilazina\* como preanestésico a una dosis de 0.6 mg/kg de peso, aplicado por vía intramuscular. Bajo el efecto del tranquilizante, se administró ketamina\*\* por vía intravenosa a una dosis de 5.0 mg/kg de peso (Cendejas, 1979). Ya anestesiado, el animal se colocó en decúbito dorsal y fue intubado a través del esófago con una sonda de polivinil de 1.5 cm de diámetro y 100 cm de longitud. Con la ayuda de un abrebocas de metal y un laringoscopio con hoja de número tres se retrajo la glotis para introducir a la tráquea un tubo de Polipropileno con un diámetro externo de 0.6 cm y 0.3 cm de diámetro interno y con una longitud de 60 cm (Figura 1). Al extremo libre del tubo se conectó una jeringa de plástico de 20 ml, para introducir alícuotas de ese volumen de una solución salina suplementada con glucosa al 1% y a temperatura ambiente. Con la misma jeringa enseguida se recolectó la solución que contenía las CBA. Este procedimiento se repitió cinco o seis veces, en total se introdujeron de 100 a 120 ml de la solución del lavado.

La solución con las CBA fue depositada en tubos de centrifuga de polivinil y fueron colocados en baño de agua con hielo. Después de la obtención de la solución de lavado se procedió a retirar la sonda endotraqueal. Para contrarrestar el efecto de la anestesia se administró efedrina\*\*\* a una dosis de 35 mg/kg de peso por vía subcutánea.

El número total de células/ml fue determinado por conteo directo en una cámara cuenta glóbulos de Neubauer. La viabilidad de las células fue determinada por medio de la técnica

de exclusión de azul de Tripan al 2%.

El tiempo que permanecieron los animales bajo el efecto de la anestesia, con una dosis única de Xilazina-Ketamina, fue de 10 a 15 min, después de la aplicación de efedrina los animales se recuperaron en un lapso menor a 45 min. En uno de los animales hubo la necesidad de administrar una dosis adicional de ketamina (150 mg) para lograr un efecto anestésico.

Se realizaron 19 LBA en los que fue introducida una medida de  $107 \pm 15$  ml de solución de lavado, de la que se recuperó cerca del 60%. La media de la viabilidad de la CBA colectadas fue de  $87.1\% \pm 9.3\%$  y el número de células colectadas por ml tuvo una media de  $10.2 \pm 7.45/10^4$  células.

El recuento diferencial de las células recolectadas efectuado en 10 animales fue de  $73.5 \pm 7.8\%$  de macrófagos;  $20.6 \pm 6.8\%$  de linfocitos,  $5.8 \pm 2.8\%$  de polimorfonucleares y  $0.1 \pm 0.3\%$  de eosinófilos.

El tiempo que permanecieron los animales bajo el efecto de la anestesia concuerda con los informes en la literatura (Cendejas, 1979). La técnica utilizada en este trabajo, para recolectar CBA es más o menos sencilla, ya que el tiempo y manejo a que fueron sometidos los animales fue mínimo y tiene la ventaja de no utilizar aparatos tan sofisticados como en los trabajos realizados por Mauderly (1977) y Rebar, De Nicola y Muggenburg (1980).

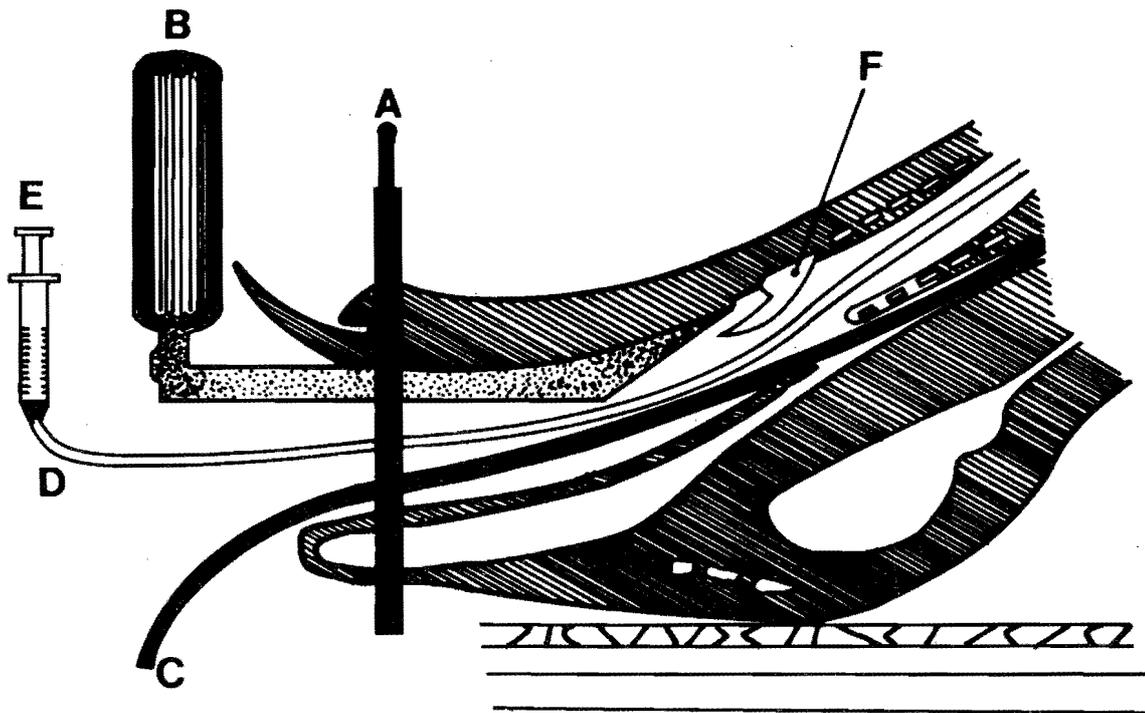
La sonda esofágica fue empleada con el fin de evitar la timpanización del animal, así como el regurgitamiento y mantener la cavidad oral libre de alimento. El tubo para realizar el LBA fue firme, a su vez de textura con suavidad suficiente y con punta roma para permitir una recolección eficiente sin producir daño en el animal al ser éste introducido en las vías aéreas. Se consideró que no

\* Rompun - Bayer de México, S. A.

\*\* Ketalar - La Campana, S.A. de C.V.

\*\*\* Refrina - Hoechst, S.A.

FIGURA 1. INTUBACION ENDOTRAQUEAL PARA LA OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE OVINOS.



A, ABREBOCAS; B, LARINGOSCOPIO; C, SONDA ESOFAGICA; D, SONDA ENDOTRAQUEAL;  
E, JERINGA; F, EPIGLOTIS.

produjo daño a los tejidos pulmonares al no observarse evidencia clínica de neumonía en un período de 30 días posteriores al lavado.

Se utilizó solución salina como fluido de lavado debido a que la colección de células ha sido mayor cuando las soluciones de lavado son libres de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  (Brain y Frank, 1973; Huber, Edmunds y Finley, 1971). El volumen recuperado de la solución de lavado fue menor que el obtenido por Castello, Emmert y Denson (1979), Mauderly (1977), Rebar, De Nicola y Muggenburg (1980), y Trigo (1984a), quienes describieron valores superiores al 60%; sin embargo, el volumen recuperado en este trabajo fue suficiente para la determinación de la población celular y la evaluación de macrófagos alveolares *in vitro* (datos no mostrados), así como para la evaluación de la viabilidad de estas células. Estos datos fueron similares a los presentados en la literatura (Castello, Emmert y Denson, 1979; Mauderly, 1977; Rebar, De Nicola y Muggenburg, 1980; Dyer, Liqitt y Leid, 1983).

En el presente estudio, los LBA fueron practicados cada tercer día sin observarse evidencia clínica de enfermedad en los animales. Los cambios morfológicos y cardiovasculares que produce la solución salina son por lo general agudos y pasajeros. Enseguida del lavado o durante el mismo, se describen cambios consistentes en hipoxia, desbalance de la ventilación-perfusión, taquipnea, hipotensión, disminución de la salida cardíaca y bradicardia (Silbaugh, Muggenburg y Mauderly, 1977; Francois, Konopka y Sgroi, 1978; Muggenburg, Mauderly y Pickerell, 1972; Huber, Edmunds y Finley, 1971; Muggenburg, Mauderly y Halliwell, 1980).

Desde el punto de vista histológico, se puede producir edema peribron-

quial y perivascular, dilatación capilar y atelectasia focal (Brightwell, Ellander y Newman, 1979; Muggenburg, Mauderly y Pickerell, 1972; Huber, Edmunds y Finley, 1971). Sin embargo, se informa que estos efectos son pasajeros debido a que a las 48 horas después del lavado, el tejido pulmonar recupera su estructura y función normal (Muggenburg, Mauderly y Pickerell, 1972; Huber, Edmunds y Finley, 1971 y Muggenburg, Mauderly y Halliwell, 1980).

Consideramos que el método de LBA desarrollado en este trabajo es sencillo, rápido y por no producir complicaciones después del lavado este método tendrá aplicaciones prácticas dentro del área de investigación que involucra evaluación y funcionalidad de las células asociadas a la defensa del pulmón y el esclarecimiento de sus mecanismos. La mayor ventaja de este sistema es que se puede obtener un número considerable de células sin producir daño alguno al animal.

### Agradecimiento

Los autores agradecen al Sr. Guillermo Barreto Mejía del Proyecto Sistema de Referencia en Diagnóstico Veterinario del INIFAP su colaboración en el teñido de las células para su conteo diferencial.

### SUMMARY

A technique for bronchio-alveolar lavage in anesthetized sheep is described. The sheep were anesthetized with xilazine followed by the administration of ketamine (0.6 mg/kg of body weight and 5 mg/kg of body weight). With the help of a laryngoscope, a polypropilene tube was introduced through the oral cavity into the trachea. One hundred to one hundred twenty milliliters of saline solution with 1% of glucose were introduced

and recovered in small aliquots of 20 ml. The quantity of cells per milliliter was  $10.2 \pm 7.4/10^4$ . From the collected cells,  $73.5 \pm 7.8\%$  were alveolar macrophages. Thirty days after the bronchio-alveolar lavage, there was not clinical evidence of lung damage.

#### LITERATURA CITADA

BRAIN, J.D., FRANK, N.R. 1968. Recovery of free cells from rat lungs by repeated washings. *J. Appl. Physiol.* 25:63.

BRAIN, J.D., 1970. Free cells in the lungs: Some aspects of their role: Quantitation and regulation. *Arch. Intern. Med.* 126:477.

BRAIN, J.D. FRANK, N.R. 1973. Alveolar macrophage adhesion: Wash electrolyte composition and free cell yields. *J. Appl. Physiol.* 34:75.

BRIGHTWELL, J., ELLANDER, M., NEWMAN G.E. 1979. The kinetics of macrophage and surfactant replacement in hamster lung following bronchopulmonary lavage. *J. Pathol.* 128:133.

CARLENS, E., 1949. A new flexible double-lumen catheter for bronchspirometry. *J. Thorac. Surg.* 18:742.

CENDEJAS, S.J., 1979. Anestesia disociativa en ovinos. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México, D. F.

CORSTVET, R.E., RUMMAGE, J.A., HOMER, J.T., 1982. Recovery of pulmonary alveolar macrophages from nonanesthetized calves. *Am. J. Vet. Res.* 43:2253.

DANIELE, R.P., ALTOSE, M.D., ROWLANDS, D.T. 1975. Immunocompetent cells from the lower respiratory tract of normal human lungs. *J. Clin. Invest.* 56:986.

DAVIES, D.H., PENWARDEN, R.A., 1981. The Phagocytic cell response of the ovine lung to *Pasteurella haemolytica*. *Vet. Microbiology* 6:183.

DYER, R.M., LIGGITT, H.D., LEID, R.W., 1983. Isolation and partial characterization of equine alveolar macrophages. *Am. J. Vet. Res.* 44: 2379.

FINLEY, T.N., SWENSON, E.W., CURRAN, W.S. 1967. Bronchopulmonary lavage in nor-

mal subjects and patients with obstructive lung disease. *Am. Int. Med.* 66:651.

FRANCOIS, R.A., KONOPKA, R., SGROI, V. 1978. Changes in ventilation and perfusion in anesthetized dogs following lobar lavage with saline solution. *Chest.* 74:552.

GOROMBERG, D.J., DANIELE, R.P. 1976. Characterization of Immunocompetent cells recovered from the respiratory tract and tracheobronchial lymph node of normal guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 114:1099.

HARMSSEN, A.G., BIRMINGHAM, J.R., ENGEN R.L. 1979. A method for obtaining swine alveolar macrophages by segmental pulmonary lavage. *J. Immunol. Methods.* 27:199.

HARRIS, J.O., SWENSON, E.W., JOHNSON, J.E. 1970. III. Human alveolar macrophages: Comparison of phagocytic ability, glucose utilization and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *J. Clin. Invest.* 49:2086.

HASLEM, P.L., TURTON, C.W.G., LUKOSZEK, A. 1980. Bronchoalveolar lavage fluid cell counts in cryptogenic fibrosing alveolitis and their reaction to therapy. *Thorax* 35:328.

HOCKING, W.G. y GOLDE, D.W. 1979a. The pulmonary alveolar macrophage. *N. Engl. J. Med.* 301:580.

HOCKING, W. G. y GOLDE, D.W., 1979b. The pulmonary alveolar macrophage. *N. Engl. J. Med.* 301:639.

HOLT, P.G., 1979. Alveolar macrophages. I. A simple technique for the preparation of high numbers of viable alveolar macrophages from small laboratory animals. *J. Immunol. Methods* 27:189.

HUBER, G.L., EDMUNDS, H., FINLEY, T.N. 1971. Effect of experimental saline lavage on pulmonary mechanics and morphology. *Am. Rev. Respir. Dis.* 104:337.

HUNNINGHAKE, G.W., GADEK, J.E., KAWANAMI, O. 1979. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: Evaluation by broncho-alveolar lavage. *Am. J. Pathol.* 97:149.

KALTREIDER, H.B., TURNER, F.N., SALMON, S.E. 1975. A canine model for comparative study of respiratory and systemic immunologic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 111:257.

- KASTELLO, M.D., EMMERT, A.D., DENSON, R.F. 1979. Recovery of alveolar macrophages from rhesus and cynomolgus macaques by lung lavage. *Am. J. Vet. Res.* 40:271.
- KAZMIEROWSKI, J.A., FAUCI, A.S., REYNOLDS, H.Y. 1976. Characterization of lymphocytes in bronchial lavage fluid from monkeys. *J. Immunol.* 116:515.
- KLYSTRA, J.A. RAUSCH, D.C., HALL, K.D., 1971. Volume controlled lung lavage in the treatment of asthma, bronchiectasis and mucoviscidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 103:651.
- MARKHAM, R.J.F., WILKIE, B.N., 1980. Interaction between *Pasteurella haemolytica* and bovine alveolar macrophages: Cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. *Am. J. Vet. Res.* 41:18.
- MAUDERLY, J. L., 1977. Bronchopulmonary lavage of small laboratory animals. *Lab. Anim. Sci.* 27:255.
- MAXWELL, K.W., DIETZ, T., MARCUS, S. 1964. An *in situ* method for harvesting guinea pig alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 89:579.
- MEDIN; N.I., OSEBOLD, J.W., ZEE, Y.C. 1976. Procedure for pulmonary lavage in mice. *Am. J. Vet. Res.* 37:237.
- MUGGENBURG; B.A. MAUDERLY, J.L., PICKERELL, J.A., 1972. Pathophysiologic sequelae of bronchopulmonary lavage in the dog. *Am. Rev. Respir. Dis.* 166:219.
- MUGGENBURG, B.A., MAUDERLY, J.L. 1975. Lung lavage using a single-lumen endotracheal tube. *J. Appl. Physiol.* 38:922.
- MUGGENBURG, B.A., MAUDERLY, J.L. HALLIWELL, W.H. 1980. Cardiopulmonary function and morphologic changes in Beagle dogs after multiple lung lavages. *Arch. Environ. Health*, 35:87.
- MYRVIK, Q.N., LEAKE, E.S. FARISS, B. 1961. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit. A technique to procure them in a high state of purity. *J. Immunol.* 86:128.
- REBAR, A.H. DE NICOLA, D.B., MUGGENBURG, B.A. 1980. Bronchopulmonary lavage cytology in the dog; Normal Findings. *Vet. Pathol.* 17: 294.
- REYNOLDS, H.Y., NEWBALL, H.H. 1974. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavages. *J. Lab. Clin. Med.* 84:559.
- REYNOLDS, H. Y., ATKINSON, J.P., NEWBALL, H.H., 1975. Receptors for immunoglobulin and complement on human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 114:1813.
- SILBAUGH, S.A., MUGGENBURG, B.A., MAUDERLY, J.L. 1977. Cardiopulmonary function in dogs during lung lavage and unilateral hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 43:778.
- SONE, S., FIDLER, I.J., 1980. Tumor cytotoxicity of rat alveolar macrophages activated *in vitro* by endotoxin. *J. Reticuloendothel. Soc.* 27:269.
- SUTHERLAND, A.D. GRAY, E., WELLS, P.W. 1983. Cytotoxic effect of *Pasteurella haemolytica* on ovine bronchoalveolar macrophages *in vivo*. *Vet. Microbiology*, 8:3.
- TRIGO, E., LIGGITT, H.D., BREEZE, R.G., LEID, R.W., SILFLOW, R.M. 1984a. Bovine pulmonary-alveolar macrophages: *Antemortem* recovery and *in vitro* evaluation of bacterial phagocytosis and killing. *Am. J. Vet. Res.* 45:1842.
- TRIGO, F.J., BREEZE, R.G., LIGGITT, H.D., EVERMANN, J.F., TRIGO, E. 1984b. Interaction of bovine respiratory syncytial virus and *Pasteurella haemolytica* by bovine pulmonary macrophages. *Am. J. Vet. Res.* 45:1671.
- WASSERMAN, K., BLANK, N. FLETCHER, G. 1968. Lung lavage (alveolar washings) inalveolar proteinosis. *Am. J. Med.* 44:611.
- WITHCOMB, M.E., 1979. Characterization of antibody dependent cytotoxicity mediated by human alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 120:1269.