UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

TESIS DOCTORAL

DETERMINACIONES LABORATORIALES NO CONVENCIONALES INDICATIVAS DE ALTO RIESGO EN EL CABALLO

María Martín Cuervo

PROGRAMA DE DOCTORADO

Biomarcadores de la Salud y Estados Patológicos

2017

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

TESIS DOCTORAL

DETERMINACIONES LABORATORIALES NO CONVENCIONALES INDICATIVAS DE ALTO RIESGO EN EL CABALLO

María Martín Cuervo

PROGRAMA DE DOCTORADO

Biomarcadores de la Salud y Estados Patológicos

2017

Directores:

Fdo. L. Javier Ezquerra Calvo

Fdo. Rafael Barrera Chacón

A mis padres, Angel y Paqui, y a mi hermana Patri, porque sin ellos nada hubiera sido posible y, aunque estén lejos, los tengo siempre muy presentes.

Agradecimientos

En esta primera sección quiero mostrar mi más profundo agradecimiento a todos los que han hecho posible este estudio cuyo resultado final es esta tesis doctoral.

En primer lugar quiero mostrar mi agradecimiento al Profesor Luis Javier Ezquerra Calvo, el director de mi tesis, al Profesor Rafael Barrera Chacón, codirector de la misma y a la Profesora Esther Durán, tutora del programa, no sólo por su ayuda en este trabajo sino también por su dedicación al trabajo clínico y al tiempo que dedican a la formación de las personas involucradas en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura.

Al Profesor Joaquín Jiménez Fragoso, de quien quiero destacar su amor por la enseñanza a veterinarios, estudiantes y propietarios, y su gran paciencia. Siempre está dispuesto a repetir cualquier explicación las veces que sea necesario.

Al doctor y diplomado ECVS Alfonso Gracia Calvo, mi compañero todos estos años "en la primera línea del frente". Él siempre ha estado cuando le he necesitado y me ha ayudado a ver las cosas desde otro punto de vista, menos negativo.

A Imma Roquet, mi compañera en esos últimos años, por su ayuda y sus ganas de organizar actividades.

A los Profesores Miguel Ángel Vives Vallés y María Cinta Mañé Seró por su amistad y el cariño con el que me han acogido y sus buenos consejos. No os imagináis lo mucho que me habéis aportado en lo personal y profesionalmente.

A Marta, Cristina, Miguel y Miguelito que me han enseñado que existe vida fuera del hospital y me animan cuando llego a horas intempestivas a entrenar.

A Robert y Marisa, por su amistad y porque siempre han estado cuando los he necesitado.

A todos los compañeros de pequeños animales, Dra. Verónica Vieítez Muñoz, Dra. Nieves Pastor Sirvent, D. Alejandro Gutiérrez Villalba, Dña. Ana Ramírez Pérez, Dr. Francisco Javier Duque Carrasco, Dña. Patricia Ruiz Tapia y la Profesora Concepción Zaragoza Bayle. Ellos son parte de la familia que formamos en el hospital.

A todos los veterinarios internos que han colaborado con este proyecto, recibiendo los caballos y tomando las muestras.

A D. Jesús Quintanilla Salas, D. Juan Abel Baca Salas, Dña. Verónica Barrera Romero, Dña. Noelia Tejero Mateos, D. Julián Iglesias Vázquez, Dña. Francisca María Morgado Sévolo y Dña Yolanda Sánchez Durán, Todos ellos son una parte fundamental para que el Hospital Clínico Veterinario donde se ha llevado a cabo este trabajo, funcione.

A todos los estudiantes internos que han colaborado en la preparación y cuidado de los animales.

A mis amigos de lejos, Marta M, Marta Peli, Bego, MiniPili y David, que siempre están ahí cuando vuelvo y que a pesar de la distancia y lo poco que nos vemos, entre nosotros nunca pasa el tiempo.

A mi gente de Córdoba, que han sufrido mi residencia y que siempre me transmiten alegría y ganas de vivir. Iñaki, te incluyo en la gente de Córdoba, junto a Carmen, Toñi, Alejandro, Balta, Chavo, y resto del personal. Gracias por hacerme sentir en casa.

Mención especial quiero hacer al Profesor Escolástico Aguilera, mi mentor y mi supervisor durante el programa de residencia y al Profesor Manuel Novales, al que debo gran parte de mi formación académica. Cuanto aprendí en esos “3 meses”.

A la Dra. Elisa Díez, mi amiga y mi compañera en el camino de la veterinaria, porque es la parte sensata de esta historia, la que encuentra un razonamiento lógico a las situaciones de la vida. Gracias por estar ahí siempre que te he necesitado.

A mis padres, a quien tengo que agradecer el que hayan estado ahí en todo momento, ayudándome emocional y económicamente. Ellos son los que se han quedado sin verme en Navidad, verano, y Semana Santa, un año tras otro, esperando a que terminara. Ellos son los que han hecho esta tesis.

A Pelu, Souji y Kat-Ana, porque día a día son los que me aguantan y me sufren.

Lista de Abreviaturas

- Aá: anglo-árabe
- ATP: Adenosisn Trifosfato
- cAMP: adenosin monofosfato cíclico
- CCR2: C-C chemokine receptor type 2
- CCL2: chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) o monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1)
- CDE: Caballo de Deporte Español
- CD14: cluster of differentiation 14
- CD62L: L-selectina
- Células NK: Natural Killer
- Células Th: Células T Helper
- CID: coagulación intravascular diseminada
- Colitis DD: Colitis Dorsal derecha
- CSFs: Colony Stimulation Factor o Factor estimulante de colonias)
- cTnI: Troponina cardíaca I
- cTnT: Troponina cardíaca T
- CV: coeficiente de Variación
- CX3CR1: chemokine receptor 1
- CXCL9: Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
- CXCL14: Chemokine (C-X-C motif) ligand 14
- DDPB: desplazamiento Dorsal del Paladar Blando
- DDD: Desplazamiento Dorsal Derecho
- EDTA-K: tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid
- EPO: eosinofil-peroxidasa
- H: hembra
- ID: Intestino delgado
- IG: Intestino grueso

- IFN-γ: Interferon gamma

- LBP: Lipolisacharid Binding Protein

- LDH: enzima Lactato deshidrogenasa

- LPS: endotoxinas o cadenas de lipopolisacáridos

- NAD: nicotinamida-adenina-dinucleótido

- M: Macho

- MC: Macho castrado

- MBP: proteína básica principal

- MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

- MIP -1α: macrophage inflammatory protein-1

- NK: Natural Killer

- NLRs: receptores NOD o "nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors"

- OCD: osteocondritis disecante

- PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno

- ppm: pulsaciones por minuto

- POC: Point-of-Care

- PRá: Pura raza Árabe

- PRE: Pura Raza Española

- PSI: Pura Sangre Inglés

- PSL: Pura sangre Lusitano

- RAO: Recurrent Airways Obstruction. Obstrucción recurrentes de vías bajas.

- rpm: respiraciones por minuto

- SRIS: Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica

- TGFβ: "transforming growth factor-β" o factor de crecimiento transformante-β

- TLRs: receptores tipo toll o "toll-like receptors"

- TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

I. Introducción

A pesar de los avances experimentados por la medicina equina en los últimos años, y al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico precoz, los procesos infecciosos que desencadenan una respuesta inflamatoria sistémica continúan representando la principal causa de enfermedad y muerte en los caballos (Peek *et al*. 2006, Werners et al. 2005, Cohen *et al.* 1994, Hoffman *et al.* 1992). La inflamación sistémica del organismo en respuesta a una invasión microbiana puede causar un rápido deterioro del individuo a pesar de que se haya eliminado al patógeno.

Tradicionalmente se ha utilizado el recuento leucocitario y el análisis diferencial de leucocitos en sangre periférica para valorar tanto procesos infecciosos como procesos inflamatorios en los caballos. Sin embargo, su interpretación no es fácil, pues sus modificaciones dependen de numerosos factores. Siguiendo los pasos de las investigaciones más recientes llevadas a cabo en medicina humana, desde hace algunos años se está valorando en medicina veterinaria el valor diagnóstico y pronóstico de diversas proteínas de fase aguda en sangre (Dondi *et al*. 2015, Andersen *et al*. 2011, Krakowski *et al*. 2011, Busk 2010, Fazio *et al*. 2010). Sin embargo, en medicina equina, su uso está prácticamente restringido a grandes hospitales y centros de investigación, ya que la metodología necesaria no es la habitual en un laboratorio de análisis clínicos y los reactivos necesarios hacen que estas determinaciones resulten económicamente muy caras. En este sentido, existen algunos estudios (Steinbicker *et al*. 2011, Sihler *et al*. 2010, Steinvil *et al*. 2010) que indican que el análisis cuantitativo de hierro plasmático permite predecir en fases tempranas procesos inflamatorios, y de forma más exacta que el simple recuento leucocitario (Barrera *et al*. 2009). El hierro plasmático presenta además la ventaja de que se puede realizar en analizadores de sangre convencionales y a un precio asequible. La combinación de los diferentes marcadores de inflamación permite marcar la diferencia entre procesos quirúrgicos y médicos en pacientes equinos a su llegada al hospital y tomar decisiones en función de la gravedad.

La troponina cardiaca I se ha empleado en medicina humana y veterinaria como marcador de perfusión miocárdica (Rossi *et al*. 2014). Actualmente es un parámetro en desarrollo en las Unidades de Cuidados Intensivos, ya que se ha podido demostrar su valor diagnóstico y pronóstico en pacientes con sepsis o con endotoxemia (Røsjø *et al.* 2011, Lim *et al.* 2006, Arlati *et al*. 2000), así como en caballos con diferentes patologías gastrointestinales (Nath *et al*. 2012, Radcliffe *et al.* 2012). En este sentido, muchos de estos pacientes, que presentan cuadros graves de septicemia o endotoxemia, pueden

desarrollar problemas hemostáticos debido a alteraciones de la coagulación. El Dímero D, un producto de degradación de la fibrina, aumenta de forma significativa en pacientes críticos y en aquéllos que presentan peor pronóstico (Shorr *et al.* 1999). Se han observado incrementos de las concentraciones plasmáticas de este marcador en caballos con alteraciones digestivas que desarrollan coagulación intravascular diseminada (CID) (Monreal *et al*. 2000, Welch *et al.* 1992), en caballos con endotoxemia grave (Cesarini *et al*. 2010, Dunkel *et al.* 2010) y en potros sépticos (Armengou et al. 2008).

En definitiva, actualmente no contamos con ningún parámetro laboratorial que nos permita diferenciar caballos con lesiones quirúrgicas de aquéllos que requieren exclusivamente tratamiento médico. Es por ello que parte de este trabajo va encaminado a la búsqueda de marcadores que nos permitan distinguir a los pacientes que requieren cirugía, ya que el pronóstico empeora cuanto más tiempo se tarde en tomar una decisión. Además, los procedimientos quirúrgicos en los pacientes equinos son más costosos que en otras especies, puesto que el tamaño de estos supone un gasto mayor en material y en instrumental específico. Es muy importante conocer el pronóstico de estos pacientes antes de someterlos a una cirugía, frecuentemente costosa y no exenta de riesgos, para poder informar a los propietarios del posible desenlace. En estos casos los marcadores de pronóstico juegan un papel fundamental, ya que nos alertan del alto riesgo que presentan estos caballos antes de ser sometidos a un procedimiento quirúrgico.

La necesidad de buscar marcadores rápidos, fiables y que no impliquen gastos económicos importantes para los propietarios, ha hecho que se desarrolle este trabajo, en el que se incluyen la búsqueda de nuevos biomarcadores, la comparación de estos con otros más tradicionales (como p. ej. el lactato) y la validación de diferentes técnicas y equipos para poder cuantificarlos. Además, la integración de los parámetros con más relevancia clínica en paneles o tablas de valoración nos permitiría contribuir en el desarrollo de sistemas informatizados, como ya existen en la Unidades de Cuidados Intensivos en medicina humana, como el SOFA o el APACHE.

II. Revisión bibliográfica

II.1. LEUCOCITOS

II.1.1. Recuento total y diferencial y causas que lo modifican

El estudio cuantitativo y cualitativo de la población leucocitaria en la sangre proporciona información muy importante en el diagnóstico de numerosos procesos patológicos en el caballo, y tradicionalmente se ha utilizado en la evaluación de la inflamación. Los leucocitos de la sangre periférica son parte integral del sistema inmune innato y adaptativo. La inmunidad innata (inespecífica) la componen el complemento y la mayoría de las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos). El sistema inmune adaptativo se basa en la respuesta específica de los linfocitos frente a antígenos individuales (Carrick y Begg 2008).

Los leucocitos de la sangre incluyen: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. Son células que se mueven continuamente por el organismo a través del torrente circulatorio y tienen habilidad para migrar a través de los tejidos. En general, las células sanguíneas de los mamíferos derivan de células madres que se encuentran localizadas en la médula ósea. La célula madre pluripotencial se puede diferenciar en células madres mieloides o linfoides. Las mieloides son las precursoras de los eritrocitos, plaquetas, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Las linfoides son las precursoras de las células B, T y NK o *Natural Killer* (Tizard 2009). Estas células pueden presentar dos tipos de alteraciones principalmente: cuantitativas y cualitativas. En las primeras, y de forma general, se incluyen dos procesos, leucocitosis y leucopenia.

La leucocitosis consiste en un aumento del número de leucocitos en la circulación periférica por encima de los rangos de referencia. Entre sus causas se incluyen infecciones bacterianas y víricas, lesiones traumáticas, quemaduras, estrés, administración de corticoides (Burguez *et al*. 1983), procesos inmunomediados, liberación de epinefrina, exceso de producción (neoplasias de médula ósea), migración anormal o imposibilidad de migrar (deficiencia en la adhesión) y alteraciones en su capacidad funcional (Sellon 2004, Jackson 2007). El término leucopenia hace referencia a un descenso en el número de leucocitos circulantes por debajo de los límites considerados fisiológicos. Sus causas comprenden infecciones masivas (bacterianas o víricas), endotoxemia, lesiones severas y fallo en la síntesis (alteraciones de la médula ósea) (Cowell y Tyler 2002, Blood y Radostits 1989).

II.1.2. Neutrófilos

Son las células nucleadas más abundantes de la sangre del caballo (Latimer y Prasse 2003, Stockham y Scott 2002). En caballos sanos, suponen el 50-70% del recuento leucocitario total. Se distribuyen en dos reservas: circulante y marginal. Ambas reservas son iguales en tamaño; sin embargo, cuando se realiza una extracción de sangre mediante venipuntura, sólo se están valorando los neutrófilos circulantes. Normalmente, los neutrófilos circulan por la sangre durante 12 horas y después se marginan y migran a los tejidos periféricos, donde mueren regulados mediante apoptosis y son fagocitados por macrófagos tisulares.

Los neutrófilos circulantes son células redondeadas de aproximadamente 10-20 µm de diámetro (Figura 1). El citoplasma está formado por gránulos de pequeño tamaño que contienen diferentes tipos de enzimas. Unos contienen mieloperoxidasas, lisozimas, elastasas, β-glucoronidasas, y catepsinas B. Otros carecen de mieloperoxidasa, pero contienen lisozimas, colagenasas y lactoferrina (Tizard 2013).

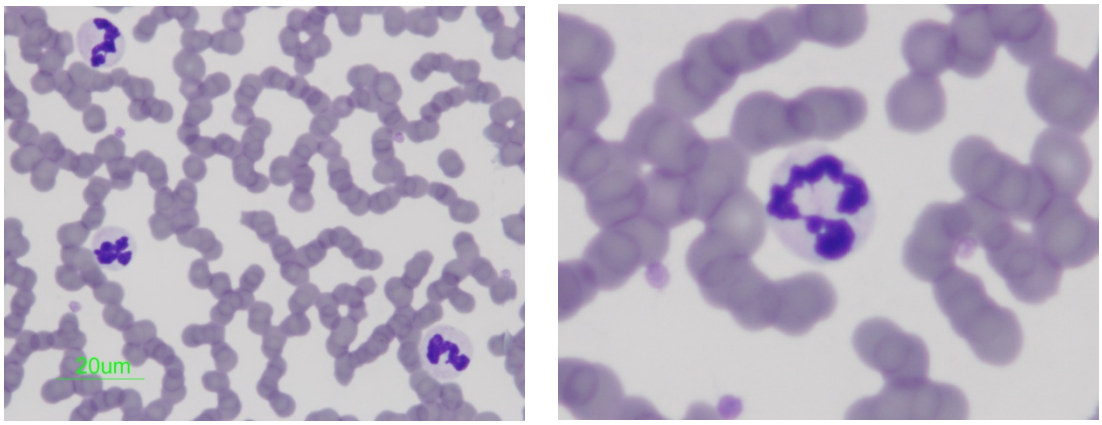


Figura 1. Neutrófilos en la sangre de un caballo sano. Se puede observar el característico núcleo multilobulado y la cromatina intensamente teñida. Tinción con Diff-Quick (X 100). Laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx.

Los neutrófilos maduros contienen aparato de Golgi, algunas mitocondrias, pocos ribosomas y retículo endoplasmático rugoso (Figura 2).

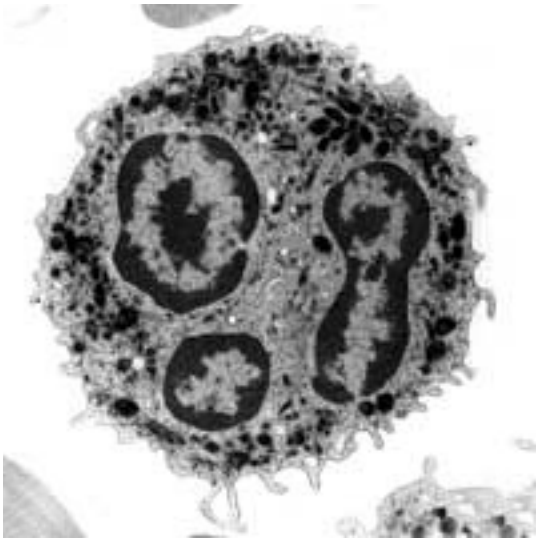


Figura 2: Imagen de un neutrófilo visualizado mediante microscopía electrónica en la que pueden observarse los orgánulos citoplasmáticos y el núcleo (http://www.cmif.osu.edu/Microscopy-TEM).

En el centro del citoplasma se observa un núcleo irregular multilobulado. Los nutrófilos tóxicos (Figura 3), especialmente los neutrófilos en banda (Figura 4) y los metamielocitos, se pueden confundir con los monocitos, ya que presentan un núcleo bilobulado y/o citoplasma ligeramente basófilo (Cowell *et al*. 2002). En ocasiones presentan un citoplasma espumoso y pueden contener cuerpos de Döhle (partículas azuladas, periféricas, que se corresponden con restos del RNA nuclear y que se forman como consecuencia de una maduración defectuosa secundaria a aumentos de las demandas). La desviación a la izquierda consiste en un incremento del número de neutrófilos en banda y formas juveniles en la sangre periférica

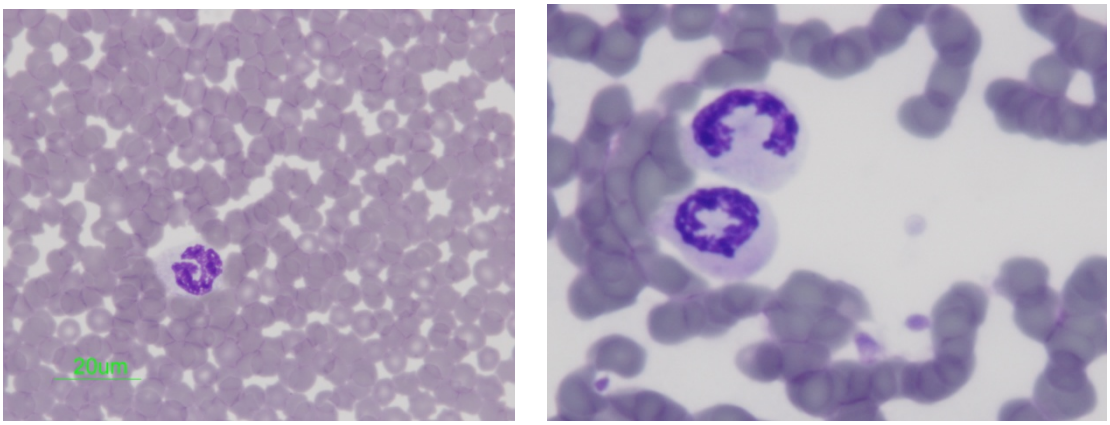


Figura 3: Neutrófilos tóxicos, con el núcleo bilobulado y el citoplasma ligeramente basófilo. Vacuolas fagocíticas que confieren al neutrófilo un aspecto espumoso. Ambas imágenes corresponden a un frotis sanguíneo de un caballo con endotoxemia. Tinción con Diff-Quick (X 100). Laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx.

Los neutrófilos circulantes pueden adherirse temporalmente a las células endoteliales vasculares y regresar a la reserva circulante o adherirse firmemente al endotelio y migrar dentro de los tejidos. La marginación se incrementa rápidamente cuando son estimulados por citoquinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (FNT) y la IL-8, el Factor Activador Plaquetario (PAF) o productos bacterianos (p. ej., endotoxinas). Estos mediadores proinflamatorios estimulan la síntesis y la expresión de la L-selectina sobre los neutrófilos y las E-selectina y P- selectina sobre las células endoteliales y plaquetas. El principal papel de las selectinas es formar uniones más firmes entre los neutrófilos y el endotelio.

La neutrofilia hace referencia al incremento del número de neutrófilos en sangre por encima de los valores normales. Entre las causas más frecuentes se incluyen infecciones bacterianas o víricas, daño tisular, estados inflamatorios agudos o crónicos, estrés, administración de corticosteroides (Feedman *et al*. 2000, Burguez *et al*. 1983), enfermedades inmunomediadas, migraciones anormales (déficit en la adhesión), funcionamiento anormal (fallo en la fagocitosis) y exceso de producción en la médula ósea (neoplasia de médula ósea). En general, la mayoría de los trastornos que producen neutrofilia pueden asociarse alternativamente con neutropenia.

La neutropenia o descenso del número de neutrófilos circulantes por debajo de los límites fisiológicos, se produce normalmente por infecciones sobreagudas, endotoxemia, lesiones graves y fallo en la producción (radiación, fármacos citotóxicos y enfermedades de la médula ósea). Experimentalmente, la administración de endotoxinas en caballos provoca neutropenia en 90 minutos y se tardan de 6 a 18 horas en recuperar los valores normales de neutrófilos circulantes (Ward *et al*. 1987).

Los neutrófilos constituyen la primera célula fagocítica que llega al foco de inflamación (forma parte de la primera línea defensiva) y es un componente clave del sistema inmune innato. Son atraídos por agentes quimiotácticos, incluidos el complemento C5a, IL-8, citoquinas (FNT), leucotrienos (p. ej. LTB4) y productos microbianos (Brown *et al*. 2006), y migran a través de la matriz extracelular, tras adherirse a los endotelios vasculares. Estos procesos son mediados por la expresión de selectinas y moléculas de adhesión sobre la superficie de los neutrófilos y las células endoteliales como consecuencia de la liberación local de proteasas (Figura 4). La fagocitosis de patógenos en el foco de inflamación se lleva a cabo mediante un proceso

denominado opsonización. Además, los neutrófilos que han sido activados por citoquinas (FNT e IL-6) o productos bacterianos (endotoxinas), expresan un incremento en el número de receptores con alta afinidad por la inmunoglobulina G (CD64, CD16 y CD32), endotoxina (CD14) y el componente del complemento C3b, el cual favorece la habilidad del neutrófilo para fagocitar patógenos (Wegenka *et al*. 1993). La fagocitosis desencadena la fusión del fagosoma con los gránulos citoplasmáticos y se liberan mediadores proinflamatorios, incluyendo TNF, IL-1, IL-6, IL-8, y (MIP)-2 para atraer más neutrófilos y monocitos (Cavaillon 1994). Los neutrófilos que han fagocitado organismos sufren apoptosis, son retirados por los macrófagos tisulares y la respuesta inflamatoria se encamina a reducir la síntesis de IL-17 y del Factor estimulante de colonias G (G-CSF). En procesos con respuesta inflamatoria muy intensa, los monocitos o macrófagos son incapaces de retirar todos los neutrófilos apoptóticos, de tal forma que estos liberan metabolitos tóxicos dentro de los tejidos que exacerban la respuesta inflamatoria. Su migración está estimulada por factores quimiotácticos, como la LTB4, la IL-8 y la cistina-X-cistina (Cole *et al*. 1996, Shimizu *et al*. 1993).

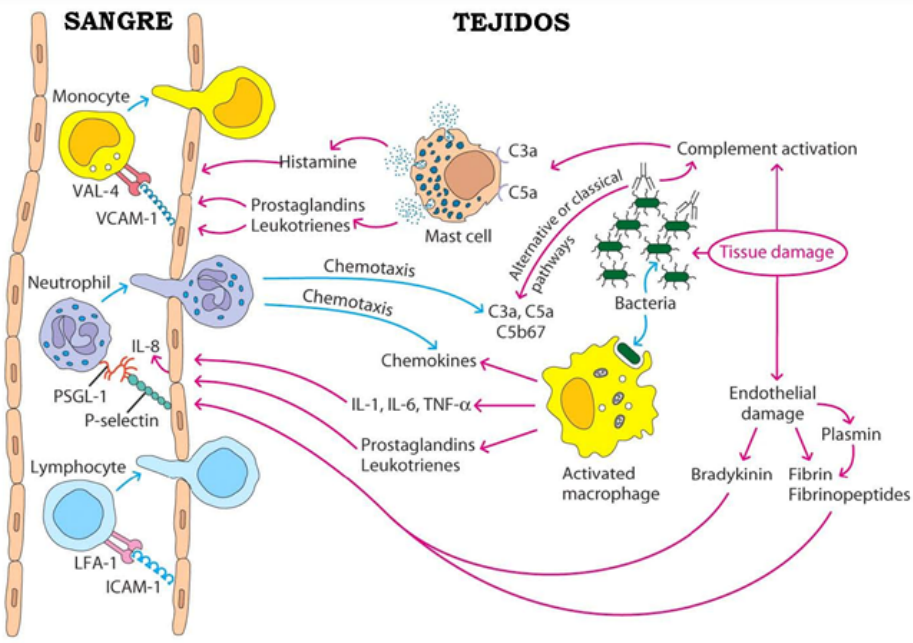


Figura 4: Esquema que representa la adhesión y migración de los neutrófilos en los endotelios vasculares y a través de los tejidos, así como su activación en respuesta a un proceso inflamatorio (http://epidemiologiamolecular.com/defensa-innata-patogenos-infecciosos/).

Un aumento en la demanda de los neutrófilos puede originar una depleción de su número en la sangre (neutropenia). Muchas de las citoquinas que inician el incremento en la demanda también producen proliferación de las células progenitoras de neutrófilos

en la médula ósea. El número de neutrófilos presentes en la circulación es un equilibrio entre la demanda y el aporte. Las demandas en exceso pueden provocar una marcada neutropenia, seguido de un incremento en el número de neutrófilos circulantes (neutrofilia). Si el exceso de demanda se mantiene, la neutropenia también se mantiene y aumenta el número de neutrófilos inmaduros en banda, produciendo una desviación a la izquierda. La neutropenia mantenida con desviación a la izquierda se asocia a pronóstico grave o reservado (Brown *et al*. 2006). En contraste, demandas mantenidas de bajo grado o inflamaciones crónicas, provocan un aumento de la síntesis en médula ósea. Sin embargo, la médula ósea equina responde rápidamente equilibrando la demanda y es raro encontrar neutrofilia en presencia de inflamación crónica.

II.1.3. Eosinófilos

Componen el 0-3% del recuento leucocitario total en caballos sanos. Normalmente se asocian a infecciones parasitarias y respuestas de hipersensibilidad, y son capaces de regular la muerte de los helmintos mediante anticuerpos, complemento y linfocitos T. Son células polimorfonucleares, de tamaño ligeramente superior a los neutrófilos. Los gránulos citoplasmáticos se tiñen intensamente con la eosina, por eso reciben este nombre (Figura 5). Los eosinófilos, y los receptores para la potente quimocina eosinofílica eotaxina, están presentes en grandes cantidades en el tracto gastrointestinal equino, y el número de eosinófilos presentes puede estar relacionado con la carga parasitaria por ciatostomos (Collobert-Laugier *et al.* 2002).

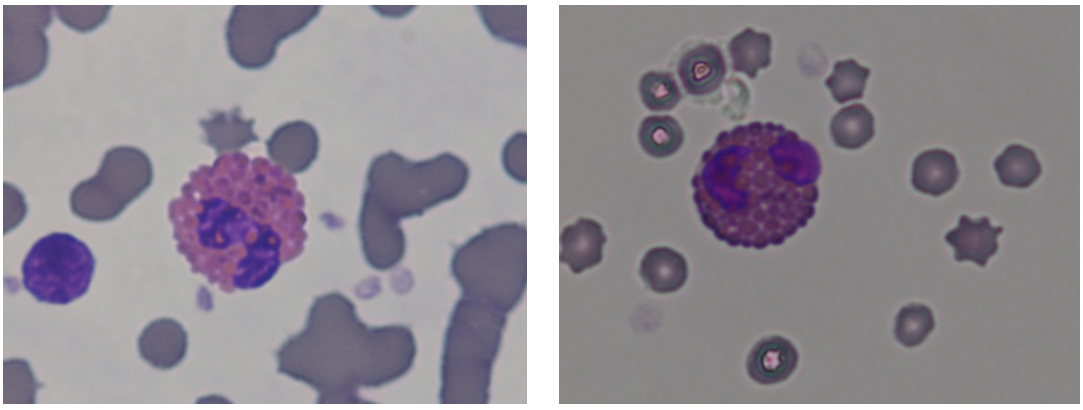


Figura 5: Eosinófilos en la sangre de un caballo sano. Se pueden observar eosinofilos con los característicos gránulos citoplásmáticos intensamente teñidos con eosina. Tinción con Diff-Quick (X 100). Laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx.

Se unen a la IgE y son activados por los complejos antígeno-IgE para liberar el contenido de sus gránulos. Existen dos tipos de gránulos citoplasmáticos. Los gránulos primarios son de pequeño tamaño y contienen arilsulfatasa, peroxidasa y fosfatasa ácida. Los gránulos cristaloides son de gran tamaño, y están formados por un núcleo (que contiene la proteína básica principal o MBP) y una matriz periférica que contiene eosinofil-peroxidasa (EPO), proteína eosinofílica catiónica y neurotoxina derivada de los eosinófilos. Estas proteínas, localizadas dentro de los gránulos, son citotóxicas para los parásitos y para las células de los mamíferos, y cuando se liberan inducen una respuesta inflamatoria. Los eosinófilos son primariamente células exocíticas más que fagocíticas: las sustancias químicas citotóxicas almacenadas en los gránulos se liberan mediante activación eosinofílica sobre la superficie de las células diana o parásitos (Figura 6). La MBP de los gránulos es también capaz de inducir la liberación de histamina de basófilos y mastocitos. A pesar de que los gránulos eosinofílicos contienen una significativa cantidad de peroxidasa, se diferencian de la neutrofilperoxidasa y es ineficaz para destruir bacterias. Son bactericidas menos eficaces que los neutrófilos. Sin embargo, tienen un papel crucial en los procesos alérgicos cutáneos (Hubert 2006, Weston *et al*. 2006, Benarafa *et al.* 2002).

Los eosinófilos son liberados de la médula ósea bajo el control primario de la IL-5 (Sampson 2000) y están presentes en la circulación varios días. Pasado este tiempo, migran dentro de los tejidos, principalmente piel, tracto gastrointestinal y pulmones. Ocasionalmente, se acumulan en gran cantidad en el tracto gastrointestinal del caballo y pueden causar cólico, diarrea o enteropatía granulomatosa con pérdida de proteínas. En raras ocasiones, la infiltración eosinofílica se dispersa a través de multitud de órganos, en cuyo caso los caballos pueden presentar pérdida de peso, diarrea, lesiones en la piel y disfunción hepática (Nimmo *et al.* 1985).

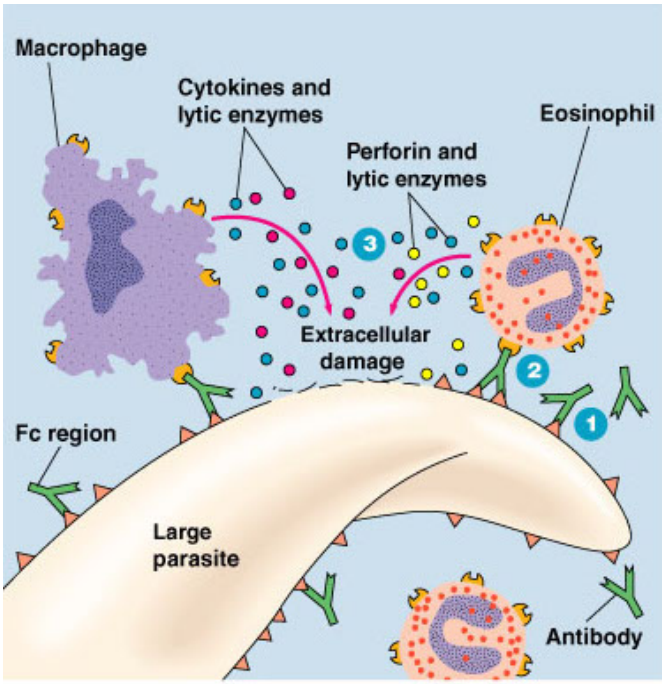


Figura 6: Esquema que representa la adhesión y liberación de enzimas citotóxicas de los eosinófilos frente a los parásitos (http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap17/ss5.htm).

La eosinofilia, o aumento en el número de eosinófilos circulantes por encima de los valores de referencia, se debe a parasitismo, reacciones de hipersensibilidad (Simson y Foster 2000), síndrome eosinofílico sistémico (Nimmo *et al*. 1985) y exceso de producción anormal (neoplasia mieloide). Se ha descrito eosinofilia mieloproliferativa en el caballo (Morris *et al*. 1984) y también se ha observado una marcada eosinofilia en caballos con linfosarcomas y carcinomas de células transicionales (Duckett y Mathews 1997).

La eosinopenia, o descenso del número de eosinófilos en sangre, se ha descrito en personas que padecen Cushing (Uchida *et al.* 1995), formando parte del leucograma de estrés (Jackson 2007), en crisis hipoglucémicas (Godlowski 1948), diabetes (Uchida *et al*. 1995) y embolismo pulmonar (Fernex 1964).

II.1.4 Basófilos

Son células poco comunes en la sangre periférica del caballo. Constituyen el 0,5% de los leucocitos en la sangre circulante. Reciben el nombre por la intensa afinidad de sus gránulos citoplasmáticos por los colorantes básicos, como la hematoxilina (Pohlman

2000). Los gránulos contienen moléculas vasoactivas similares a las encontradas en los mastocitos. Tienen un tamaño aproximado de 10 µm de diámetro (Figura 7). Intervienen en el desarrollo de la hipersensibilidad inmediata y retardada, a través de la liberación de mediadores como histamina. Pueden liberar heparina e inhibir la hemostasis, pero también pueden ser una fuente de calicreína (Holgate 2000). Existe una pequeña cantidad de basófilos almacenados en médula ósea, que tarda 2-3 días en producirlos y liberarlos. Los basófilos tienen una vida media de 6 horas en el torrente circulatorio, migran al interior de los tejidos, donde permanecen de 10 a 12 días, y después mueren (Pohlman 2000). El aumento de los basófilos circulantes puede producirse en procesos alérgicos, inflamatorios o neoplásicos, o en asociación con hiperlipemia.

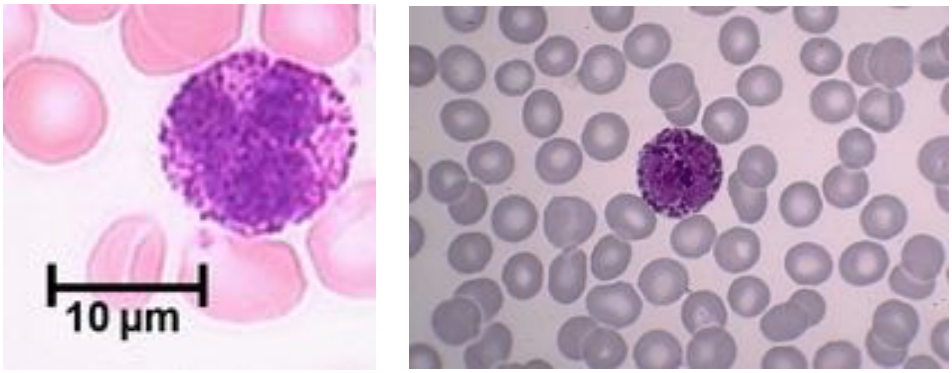


Figura 7: Basófilos en la sangre de un caballo sano. Se pueden observar basófilos con los característicos gránulos citoplásmáticos intensamente teñidos con hematosilina. Tinción con Diff-Quick (X 100) (http://fce-study.netdna-ssl.com/2/images/upload-flashcards/89/00/44/7890044_m.jpg).

II.1.5. Linfocitos

Los linfocitos componen el segundo gran grupo de leucocitos en sangre periférica. Son las principales células del sistema inmune adaptativo. Son redondeados, de pequeño tamaño, y tienen un diámetro aproximado de 7 a 15 µm (Figura 8). Existen subpoblaciones que no pueden ser identificadas por su estructura, pero que pueden ser identificadas por sus moléculas de superficie y por su comportamiento. Los patrones que expresan las moléculas de superficie se denominan inmunofenotipo. Mediante su análisis es posible identificar las subpoblaciones de linfocitos.

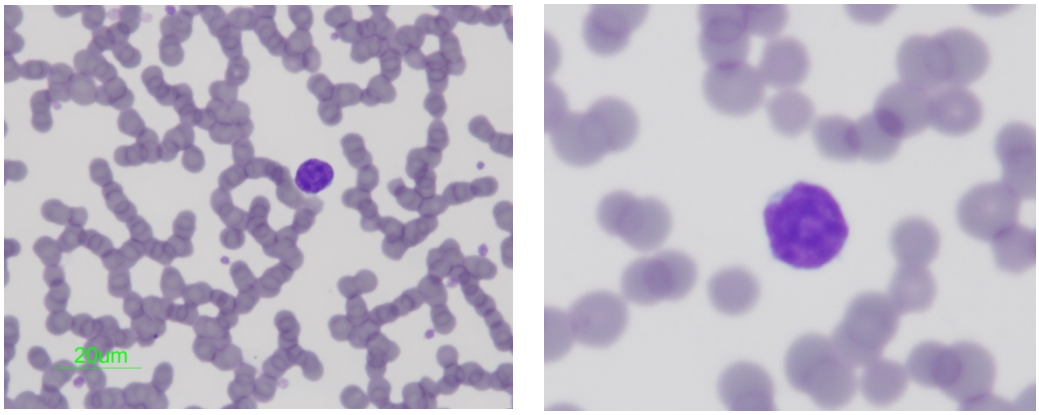


Figura 8: Linfocitos en la sangre de un caballo sano. Se observar linfocitos no reactivos. Tinción con Diff-Quick (X 100). Laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx.

Se dividen en grupos: linfocitos B, linfocitos T y células NK. A diferencia de otros leucocitos circulantes, son capaces de proliferar. Cada clase de linfocito sólo puede ser diferenciada mediante la identificación de marcadores de superficie celulares específicos y de receptores que definen la función celular (Carrick *et al*. 2008).

Los linfocitos B se distinguen por la expresión de las moléculas de inmunoglobulinas sobre su superficie celular. Representan el 15% de la población de linfocitos circulantes y predominan en la circulación como células inactivas que expresan IgD e IgM en la superficie celular (Lunn *et al.* 2004, Stobo 1988). Requieren un estímulo apropiado mediante las células T colaboradoras. A pesar de que son principalmente células efectoras del sistema inmune humoral, también tienen un papel como células reguladoras (Ronacardlo y Battaglia 2007, Scharnagl y Klade 2007, Mizoguchi y Bhan 2006), ya que pueden producir citoquinas, como IL-10, que restaura el equilibrio entre las células Th1 y Th2 e inhiben directamente la cascada de la coagulación. Además, producen "transforming growth factor-β" o factor de crecimiento transformante-β (TGFβ), el cual induce apoptosis sobre las células T-efectoras. Estas células B reguladoras específicas también tienen otras propiedades, como producir anticuerpos que se unen a factores de la inflamación solubles, cómo el complemento, actuando como células presentadoras de antígenos, y son capaces de aumentar la tasa de células apoptóticas que pueden liberar componentes proinflamatorios y antígenos.

Las funciones de los linfocitos T son más complejas, y las diferentes subclases son determinadas por marcadores celulares superficiales que cada tipo de célula expresa. Estos marcadores de superficie son el reflejo de la función de cada tipo de célula.

Aproximadamente el 80% de los linfocitos circulantes son células T, y se caracterizan por la expresión del complejo CD3. Además, el 90% expresan moléculas de CD4 o CD8. Las células que poseen una molécula CD4 tienen un receptor para células T (TCR) que reconoce al MHC clase I-asociado a antígenos (Figura 9).

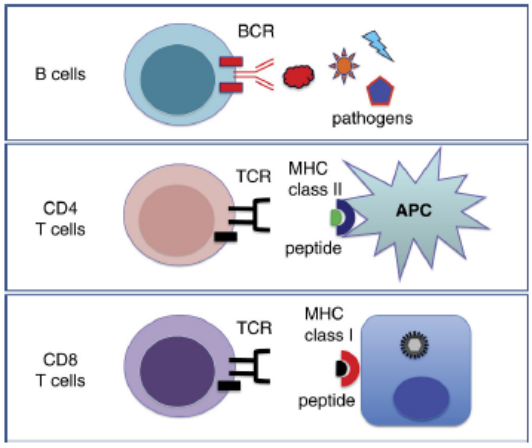


Figura 9: Esquema que muestra el reconocimineto de los antígenos por parte de las diferentes subpoblaciones de linfocitos (Felippe, 2016).

Los linfocitos T + CD8 son predominantemente citotóxicos, y los T+CD4 son células colaboradoras en la diferenciación de las células B y están involucradas en respuestas de hipersensibilidad retardada. Pueden a su vez subclasificarse en células Th1 y Th2 de acuerdo con las citoquinas que cada tipo celular produce. Las células Th1 producen IFNγ e IL-2, los cuales participan en la inmunidad mediada por células. Las células Th2 producen IL-4 e IL-5, las cuales son las citoquinas implicadas en la inducción de la producción de anticuerpos. Además hay otra subclase de linfocitos T que representan aproximadamente el 10% de los linfocitos T circulantes y que no se limitan a reconocer clases del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y a expresar formas diferentes de TCR. Estos linfocitos pueden ser CD8+ o CD4-/CD8- y son generalmente responsables de la citotoxicidad no dependiente de anticuerpos. El 5% restante de linfocitos circulantes no expresan ni CD3 ni inmunoglobulinas en su superficie. A estas células se las denomina “natural killer” o “null cells” y son importantes linfocitos citotóxicos. A pesar de que esta clasificación de las células T es útil y ayuda a definir su papel, en muchas enfermedades el paradigma CD4+/CD8+ y Th1 /Th2 puede ser limitante y los actuales conceptos continúan evolucionando (Marasco y Sui 2007, Ronacardlo y Battaglia 2007, Scharnagl y Klade 2007, Chaouat et al. 2004) .

El incremento del número de linfocitos circulantes por encima del rango de referencia

(linfocitosis) en el caballo incluye excitación, ejercicio, exceso de producción anormal (neoplasia linfoide) y, menos frecuentemente, estimulación inmune. Los caballos jóvenes normalmente tienen un porcentaje más alto de linfocitos circulantes que los adultos (McFarlane *et al.* 2001, McFarlane *et al.* 1998).

Las causas de linfopenia (descenso del número de linfocitos circulantes por debajo de los límites) incluyen la administración de corticoides, estrés, infección viral, endotoxemia, infecciones bacterianas sobreagudas e inmunodeficiencias (p. ej. la inmunodeficiencia combinada severa y el síndrome del pony Fell).

II.1.6. Monocitos

Los monocitos representan normalmente menos del 10% de los leucocitos circulantes. Estas células son las precursoras de los macrófagos tisulares y tienen actividad fagocitaria primaria. Eliminan células seniles y apoptóticas. En este proceso participan gran cantidad de receptores de membrana que reconocen proteínas específicas que se expresan en la superficie de las células de edad avanzada. Son los leucocitos de mayor tamaño en sangre circulante. El núcleo puede tener diferentes formas: oval, bilobulado, en herradura, trilobulado o irregular (Figura 10). La cromatina está menos condensada que en los neutrófilos. Las vacuolas son poco frecuentes y son más comunes en muestras cuya preparación se ha retrasado.

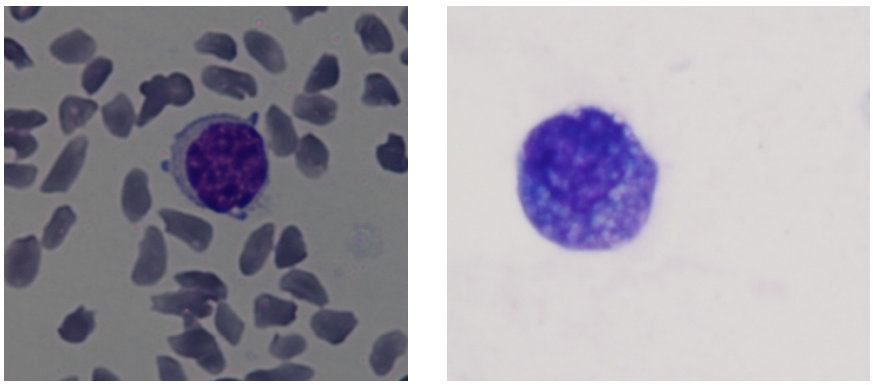


Figura 10: Monocitos en la sangre de un caballo sano. Tinción con Diff-Quick (X 100). Laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx.

Los macrófagos poseen tanto receptores tipo toll o "toll-like receptors" (TLRs) como receptores NOD o "nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors" (NLRs) por lo que son capaces de detectar invasiones de virus y bacterias. Responden

mediante la producción de citoquinas, siendo las más importantes las IL-17, IL-22, el IFN-γ y el TNF-α (Figura 11). Los receptores de la superficie de los macrófagos que son importantes en el reconocimiento de las células apoptóticas incluyen el receptor scavenger-A, el receptor scavenger-B, CD14 y la vitronectina (Cavaillon y Minou 2005).

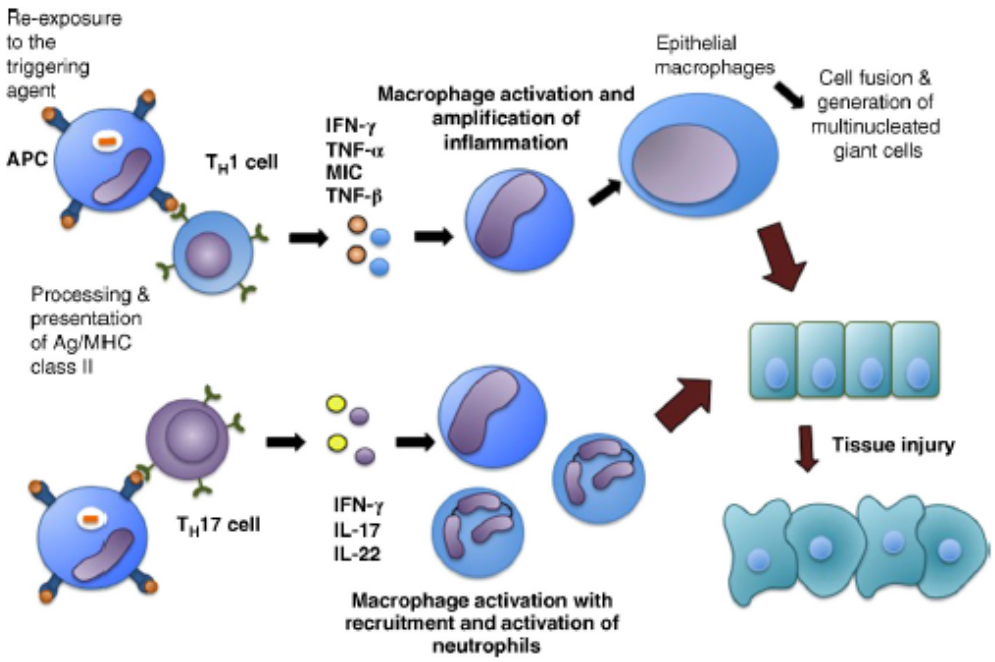


Figura 11: Esquema que muestra la activación, reclutamiento y amplificación de la respuesta inflamatoria mediada por los macrofagos, así como las principales citoquinas involucradas (Costa, 2016).

Durante las infecciones, los monocitos tienen un papel fundamental por su capacidad de destruir e ingerir microbios y secretar gran cantidad de mediadores de la inflamación. Al igual que los neutrófilos, los monocitos y macrófagos tienen la capacidad de fagocitar patógenos y formar fagosomas, los cuales se fusionan con los lisosomas citoplasmáticos que contienen componentes microbicidas. Los microorganismos y los "patrones moleculares asociados a patógenos" interactúan con los receptores de la superficie celular o con señales intracelulares, para inducir la síntesis de gran cantidad de mediadores de la inflamación, incluyendo eicosanoides, TNF, IL-1, IL-6 y IL-8. Son también una fuente importante de CSFs (G-CSF, GM-CSF) y citoquinas (IL-1, IL-3 y TNF) que regulan la hematopoyesis. Los monocitos y los macrófagos crean un vínculo importante entre los sistemas de inmunidad innata y adquirida porque son las primeras células presentadoras de antígenos, procesando sustancias extrañas y asociándolas con el MHC, moléculas de clase I o de clase II. Esto permite al material extraño inducir una

activación específica de linfocitos-T, un componente crítico del sistema de inmunidad adquirida. En respuesta a esta activación, los monocitos y macrófagos expresan patrones funcionales especializados que se engloban en dos categorías principales.

Tradicionalmente los monocitos activados y los macrófagos están bajo la regulación del interferon-γ y son conocidos como macrófagos M1. En contraste, los macrófagos que son regulados por la IL-4, IL-13 y IL-10 son denominados Células Activadas Alternativas o macrófagos M2. Los macrófagos activados tienden a producir citoquinas proinflamatorias y están involucradas en destrucción tisular y actividad antimicrobiana. Los macrófagos que se han activado de manera alternativa son responsables de la presentación de antígenos y de la cicatrización y reparación de tejidos y heridas (Mantavani *et al.* 2007).

Al contrario que los neutrófilos, hay un porcentaje mínimo de monocitos almacenados en la médula ósea. Por consiguiente, en respuesta a la inflamación se requiere la replicación de las células progenitoras en la médula ósea y su respuesta es mucho más lenta que la de los neutrófilos, los cuales se liberan rápidamente al torrente sanguíneo. Los monocitos circulan por la sangre entre 1 y 3 días. Existen dos poblaciones separadas en la circulación sanguínea, las cuales pueden ser identificadas por sus receptores de membrana. Un grupo tiene baja expresión de quimocina CX3CR1 y elevada expresión de quimocina CCR2 y L-selectina CD62L. Migran a través de tejidos inflamados. El segundo grupo tiene elevada la expresión de CX3CR1 y disminuida la de CCR2 y CD62L. Estas células migran por el tejido normal y llegan a transformarse en macrófagos residentes de vida larga, como células de Kupffer, macrófagos alveolares, células de microglía y pericitos (Mantavani *et al*. 2007, Cavaillon y Minou 2005). Para migrar a través de los tejidos, deben primero adherirse a la superficie del endotelio. La adhesión molecular de la superficie de los monocitos y del endotelio es esencial en este proceso. La adhesión al endotelio de los tejidos normales requiere la molécula de adhesión integrina-β2, mientras que la adhesión al endotelio de tejido inflamado es regulada mediante la adhesión intracelular de las moléculas 1 y 2, la molécula 1 de adhesión vascular, el antígeno 4 retardado, la L-selectina y la molécula de adhesión integrina-β2. La quimioatracción en el tejido sano es regulada por las quimocinas MIP -1α, CXCL14 y CX3CL1. A diferencia de los quimioatractivos (CCL2 y CXCL9) son responsables de la migración de los monocitos dentro del tejido inflamado (Figura 12).

La monocitosis se debe a inflamación crónica y aguda, infecciones bacterianas crónicas, estrés, administración de corticosteroides, enfermedades autoinmunes y exceso de producción anormal (neoplasias de la médula ósea).

La monocitopenia, como los monocitos no siempre se observan durante el examen de los frotis de sangre periférica en caballos sanos, puede ser un hallazgo normal.

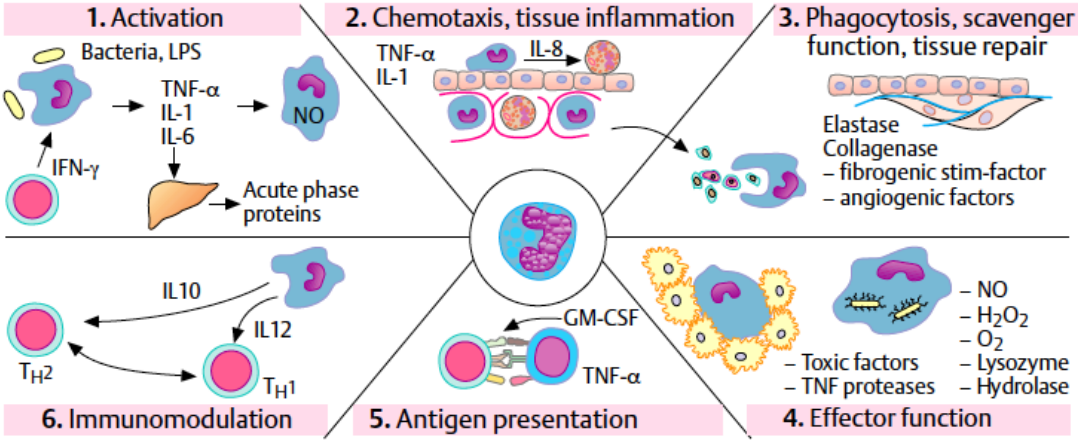
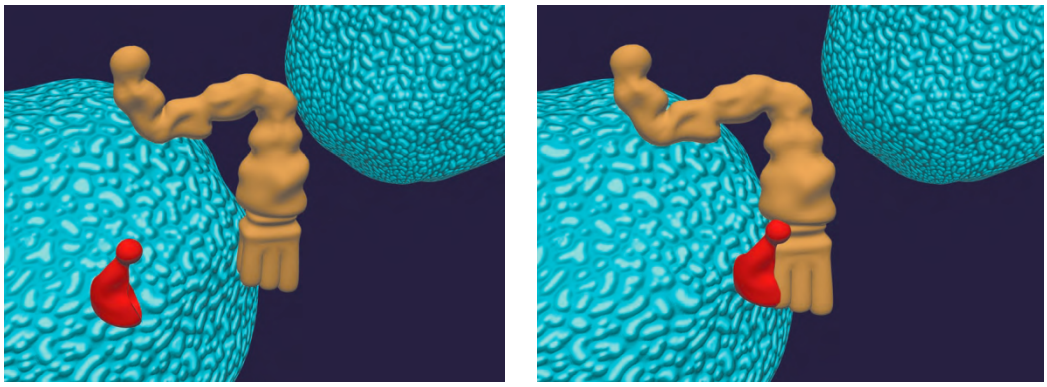


Figura 12: Esquema en el que se representan las diferentes funciones de los mocitos/macrófagos, así como las principales citoquinas implicada (Burmester y Pezzutto, 2003).

II.2. Papel de los leucocitos en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y en la endotoxemia

En infecciones graves o tras un daño tisular masivo, se producen grandes cantidades de citoquinas y oxidantes, que escapan al torrente circulatorio causando lo que se conoce con el término de SRIS. Los caballos tienen un sistema inflamatorio especialmente sensible frente a los productos de las paredes bacterianas Gram-negativas, es decir, las endotoxinas o cadenas de lipopolisacáridos (LPS). Bajo circunstancias normales, el intestino del caballo contiene numerosas poblaciones de bacterias gram-negativas. Las endotoxinas procedentes de estas bacterias son liberadas cuando éstas mueren o se multiplican rápidamente, por lo que el lumen intestinal contiene grandes cantidades de endotoxinas (MacKay 1992). La mucosa intestinal, que está formada por células epiteliales mucosales, anticuerpos y enzimas secretadas por estas células y bacterias residentes adyacentes, actúa como una barrera de forma eficiente, restringiendo la presencia de endotoxinas al lumen intestinal (Moore 1981). Las endotoxinas que consiguen atravesar la barrera intestinal se unen a proteínas plasmáticas específicas (LBP, Lipolisacharid Binding Protein), son neutralizadas por

anticuerpos circulantes o son retiradas de la circulación por macrófagos tisulares (Figura 13), principalmente las células de Kupffer hepáticas (MacKay 1992, Moore 1981). Las patologías que impiden el correcto funcionamiento de la barrera de la mucosa intestinal permiten el paso de endotoxinas a la cavidad peritoneal y a la circulación portal de forma masiva (MacKay 1992, Moore 1981). Esta disfunción puede ocurrir como consecuencia de un aporte sanguíneo insuficiente (lesiones estrangulantes o isquémicas del intestino), que causan una separación de las células epiteliales de la mucosa de la lámina propia subyacente, o en situaciones en las que existe inflamación de la paredes intestinales, principalmente en casos de colitis o enteritis (Steverin *et al.* 1994, Moore y Morris 1992, Morris 1991, King y Gerring 1988).



A B

Figura 13: Representación gráfica de una endotoxina (estructura de color marrón) y una proteina de unión a LPS (estructura de color rojo). De fondo se pueden observar dos fagocitos mononucleares. En la imagen B, se representa la unión de la región del lípido B de la endotoxina con la LBP ([a]Moore 2001).

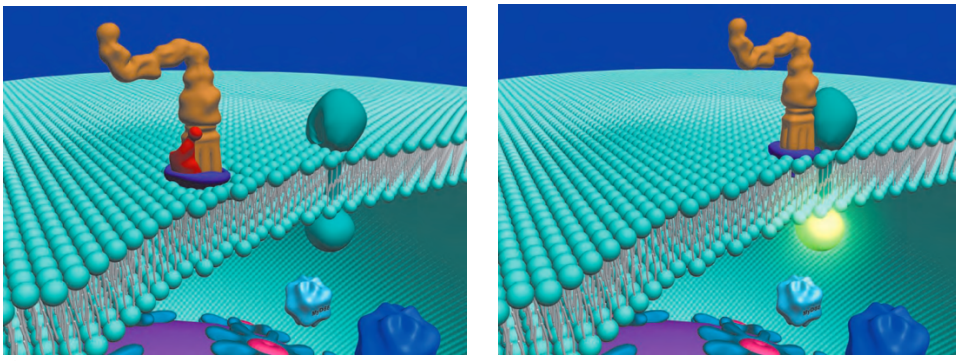
Las endotoxinas pueden ser detectadas en fluidos corporales mediante un test que se basa en la respuesta de los lisatos procedentes de las células de la hemolinfa circulante de los cangrejos de herradura, *Limulus polyphemus* (Levin y Bang 1964). Este test, a pesar de que es extremadamente sensible para la detección de endotoxinas, requiere la extracción de sangre en condiciones estériles mediante jeringas libres de pirógenos y el procesado en tubos de heparina libres de endotoxinas, para a continuación diluir y calentar el plasma para reducir los efectos de las sustancias que puedan interferir con la lectura, lo que hace su uso prácticamente inviable en situaciones de emergencia. A pesar de las diferencias en los límites de detección según el laboratorio donde se ha realizado, diferentes estudios han estimado que el 35-40% de los caballos que se reciben en los hospitales veterinarios universitarios con alteraciones gastrointestinales presentan

endotoxemia (Steverink *et al*. 1994, Moore y Morris 1992, Henry y Moore 1991, Morris 1991, Fessler *et al*. 1989, King y Gerring 1988, Meyers *et al*. 1982).

Una vez que las endotoxinas han accedido al torrente sanguíneo, pueden interactuar con proteínas circulantes, células sanguíneas o pueden ser retiradas de la circulación por los macrófagos tisulares del hígado, bazo y pulmón. La región lipídica o lípido A de las endotoxinas tiene naturaleza hidrofóbica y es por ello que las endotoxinas tienden a formar agregados en el plasma. Una vez formados, estos agregados interactúan con las lipoproteínas de alta densidad y con las proteínas de unión LBPs, y se dispersan en forma de monómeros de endotoxinas (Wurfel y Wright 1997, Tobias *et al*. 1992, Wright *et al*. 1992, Tobias *et al*. 1986). La unión entre las endotoxinas y las lipoproteínas de alta densidad prolongan su vida media en la circulación pero reducen su habilidad para interactuar con las células proinflamatorias (Baumberger *et al*. 1991, Mathison *et al.* 1991, Vosbeck *et al.* 1990, Tobias *et al.* 1985, Ulevitch *et al*. 1984, Ulevitch *et al*. 1981, Ulevitch *et al.* 1979). Sin embargo, las LBP retiran individualmente las moléculas de las endotoxinas que forman parte de los agregados y, este hecho, facilita de forma considerable la habilidad de estos monómeros de interactuar con los fagocitos mononucleares equinos (monocitos de sangre periférica, macrófagos). Estas proteínas de unión a polisacáridos, que sirven de enlace entre los agregados de endotoxinas y las células inflamatorias, se sintetizan en el hígado y, normalmente, circulan por el plasma en pequeñas cantidades. Las LBP forman parte de la respuesta inflamatoria de fase aguda, por lo que estímulos como la cirugía, procesos inflamatorios o la propia endotoxemia, pueden incrementar hasta 100 veces las concentraciones circulantes de esta proteína (Khemlani *et al*. 1994, Tobias y Ulevitch 1993, Mathison *et al*. 1992, Tobias *et al*. 1992, Wright *et al.* 1990).

Para que se produzca la unión entre la endotoxina y las células inflamatorias del hospedador, tiene que existir un receptor en la superficie de la membrana celular denominado CD14, que se expresa en las células del sistema fagocítico mononuclear (Tapping y Tobias 1997, Yang *et al*. 1996, Tobias y Ulevitch 1993, Marchant *et al.* 1992, Wright *et al.* 1990). La interacción entre endotoxina, LBP y el receptor CD14 aumenta la sensibilidad de estas células a las endotoxinas y provoca la síntesis de diferentes mediadores proinflamatorios. Además, existen evidencias de que las endotoxinas y las LBP pueden interactuar con formas solubles del receptor CD14 que es liberado por la superficie de las células fagocíticas mononucleares. A través de estas

interacciones, los complejos endotoxina-CD14 soluble interaccionan con células que no poseen el receptor CD14, como por ejemplo, las células endoteliales, iniciando los efectos inflamatorios también en estas células (Blondin *et al.* 1997, Gebhard *et al.* 1997, Martin *et al.* 1997, Tapping y Tobias 1997, Troelstra *et al.* 1997, Yang *et al.* 1996). A pesar de que el receptor CD14 juega un papel central en la respuesta de las células hospedadoras frente a las endotoxinas, este receptor no tiene la capacidad de transmitir las señales de las endotoxinas al interior de la célula. En esencia, el CD14 es un receptor superficial de las membranas celulares unido al exterior de la célula por puentes de carbohidratos, por lo que no tiene porciones atravesando la membrana y por lo tanto no puede iniciar las señales de transducción que conllevan la síntesis de mediadores proinflamatorios (Figura 14). Para que se produzcan estas señales es necesaria la presencia de los Toll receptors, que tienen porciones transmembrana y componentes intracelulares que permiten la comunicación entre el exterior y el interior celular ([a]Ulevitch 1999, [b]Ulevitch 1999, Wright 1999). Además, existen otros receptores análogos, denominados Toll-like receptors, que son los responsables de la liberación de las señales procedentes de las endotoxinas desde el receptor CD14 hasta el interior de la célula (Bihl *et al.* 2001, Visintin *et al.* 2001, Zhang y Ghosh 2001, Tapping *et al.* 2000, Hoshino *et al.* 1999). Los receptores CD14 no son selectivos para las endotoxinas y también pueden reconocer y unirse a componentes celulares de las bacterias gram-positivas, como por ejemplo los peptidoglicanos. Cuando los receptores Toll-like tipo 2 liberan las señales al interior de la célula, inician por si mismas una serie de respuesta celulares (Lorenz *et al*, 2000, Wang *et al.* 2000, Yoshimura *et al.* 1999).



A B

Figura 14: Representación gráfica del complejo endotoxina-LBP unidos al receptor de membrana CD14 (estructura de color morado) en la superficie de un fagocito mononuclear. A la derecha del complejo, aparece representado un receptor Toll-like tipo 4, con sus porciones intracelular y transmembrana. En la Figura B se representa la transmisión de la señal iniciada tras la unión de estas estructuras ([b]Moore 2001).

Basándose en los resultados de diferentes estudios en monocitos y macrófagos de diferentes especies, incluyendo el caballo, la unión de las endotoxinas a los receptores de membrana CD14 causan la transmisión de las señales al interior de la célula, movilización de los mensajeros intracelulares e interacciones en el núcleo que inducen la expresión de los genes que codifican sustancias proinflamatorias. Muchos de los efectos deletéreos de las endotoxinas están mediados por citoquinas y sustancias proinflamatorias sintetizadas y liberadas por los fagocitos mononucleares. Estas células generan muchos de los mediadores de la inflamación que han sido detectados en el sistema circulatorio de los caballos a los que previamente se les había administrado endotoxinas de forma experimental, y también en caballos con alteraciones gastrointestinales recibidos como pacientes en los hospitales (Bueno *et al.* 1999, Hammond *et al.* 1999, Allen *et al.* 1993, Robinson *et al*. 1993, MacKay 1992, MacKay y Lester 1992, Morris *et al*. 1992, Morris y Moore 1992, [a]Henry y Moore 1991, [b]Henry y Moore 1991, MacKay *et al.* 1991, Morris *et al.* 1990, Clark y Moore 1989, Moore *et al*. 1986). Dentro de los mediadores de la inflamación que se han estudiado más ampliamente, se pueden citar el TNF, las interleukinas, los eiosanoides (metabolitos del ácido aracquidónico) y el factor tisular.

El TNF es una citoquina polipeptídica de pequeño tamaño que se sintetiza por los fagocitos mononucleares expuestos a las endotoxinas y otros estímulos proinflamatorios. Su concentración en el suero aumenta al poco tiempo de la administración de endotoxinas y son las responsables de iniciar una cascada de respuestas como por ejemplo, hipotensión, hemoconcentración, acidosis metabólica y CID (Allen *et al.* 1993, MacKay *et al.* 1991, Morris 1991, Morris *et al*. 1990). El TNF provoca estos efectos por estimulación de la síntesis de otros mediadores inflamatorios (como las interleuquinas, eicosanoides y factor tisular), la respuesta de fase aguda y la fiebre (Tracey *et al.* 1986). Se ha documentado una asociación entre las concentraciones elevadas de TNF en caballos y potros y el mal pronóstico para la supervivencia (Barton y Collatos 1999, Barton *et al*. 1998, Allen *et al.* 1993, Morris y Moore 1992, MacKay *et al*. 1991, Morris 1991, Morris *et al.* 1990).

El ácido aracquidónico, que se encuentra en las membranas fosfolipídicas celulares, es liberado por la fosfolipasa A2 y se metaboliza por la ciclooxigenasa o la lipooxigenasa. Los metabolitos derivados del ciclo de la ciclooxigenasa que se han estudiado más ampliamente incluyen tromboxano A2, prostaglandina I2, prostaglandina

E2 y prostaglandina F2. El tromboxano A2 causa vasoconstricción por descenso de las concentraciones del adenosin monofosfato cíclico (cAMP) en las células del músculo liso, mientras que las prostaglandinas I2 y E2 causan vasodilatación al aumentar la concentración del mismo. Muchos de los efectos hemodinámicos de la endotoxemia están mediados por estos metabolitos derivados del ácido aracquidónico (Morris 1991, Moore 1988, Moore *et al*. 1986, Bottoms *et al.* 1985, Moore *et al*. 1981). El tromboxano A2, en concreto, está asociado con el desarrollo de hipoxemia, disnea e hipertensión pulmonar, que se producen a los pocos minutos de haber administrado endotoxinas. El aumento de las concentraciones plasmáticas de la prostaglandina I2 está asociado con la decoloración de las membranas mucosas, prolongación del tiempo de relleno capilar y el inicio de la hipotensión. El incremento en plasma de la prostaglandina F2a, también se ha asociado con los abortos inducidos por endotoxinas en yeguas en las primeras fases de la gestación (Daels *et al*. 1991, Kindahl *et al.* 1991).

El factor tisular o tromboplastina es una glicoproteína que se sintetiza en los monocitos, macrófagos y, en menor grado, en las células endoteliales, como respuesta a las endotoxinas. La mayor parte del factor tisular sintetizado por estas células permanece en la superficie y puede estar expuesto al factor VII de la coagulación. Como resultado, se puede estimular la vía extrínseca de la cascada de la coagulación, causando la estimulación de células que pueden ser el foco de la formación de microtrombos. Se ha observado un incremento significativo de la actividad del factor tisular en caballos con patologías gastrointestinales, así como en aquellos a los que se les ha administrado endotoxinas como parte de un estudio clínico (Grunig *et al.* 1991, Henry y Moore 1991, Morris 1991, Henry y Moore 1988). La magnitud del incremento de la actividad del factor tisular está inversamente correlacionada con las posibilidades de sobrevivir del animal (Henry y Moore 1991).

La mayoría de los pacientes críticos (cólicos quirúrgicos, colitis y pleuroneumonías severas) presentan endotoxinas o bacterias Gram negativas en la circulación (Moore y Barton 2003). Los monocitos circulantes, los macrófagos tisulares del M-1 y los activados por la vía clásica están diseñados para responder a las endotoxinas con la producción de citoquinas proinflamatorias y eicosanoides (Figura 15). A pesar de que los monocitos y los macrófagos son críticamente importantes en el desarrollo de la respuesta frente a las endotoxinas (células reguladoras) y en la activación de los neutrófilos (células efectoras), son también células que potencialmente pueden provocar

daño en los órganos (Brown *et al.* 2006). Este concepto se sustenta con la observación de neutrófilos activados presentes en la sangre de todos los caballos examinados que padecían enfermedades intestinales de tipo inflamatorio y en algunos con lesiones estrangulantes (Weiss y Evanson 2003). La presencia de neutrófilos activados en la sangre se correlaciona con mal pronóstico. Estos neutrófilos se marginan en respuesta a la endotoxemia, y la liberación local de citoquinas estimula a las células a sintetizar más citoquinas proinflamatorias. Después de la exposición a las endotoxinas, la migración de los neutrófilos a través del endotelio se retrasa y pueden ser secuestrados por las propias células endoteliales activadas. La liberación local de citoquinas proinflamatorias y del contenido de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos degenerados en la superficie endotelial inducen la dispersión del daño vascular, un signo de SRIS (Brown *et al.* 2006).

Como consecuencia de estos eventos, se desarrolla una hipoxia tisular global debida a un desequilibrio entre la demanda y el aporte de oxígeno. Esta hipoxia resulta de una combinación de los siguientes procesos:

- Hipovolemia: descenso del gasto cardiaco, con una concomitante disfunción del ventrículo izquierdo y una vasoconstricción arterial sistémica (Lohmann y Barton *et al.* 2009).

- Shock distributivo: pobre perfusión tisular compensada (Wood *et al.* 2008).

- Depresión miocárdica secundaria a los efectos de los mediadores inflamatorios y la apoptosis de los cardiomiocitos (Godin *et al*. 1996).

- Aumento de las demandas metabólicas (Burrows 1981).

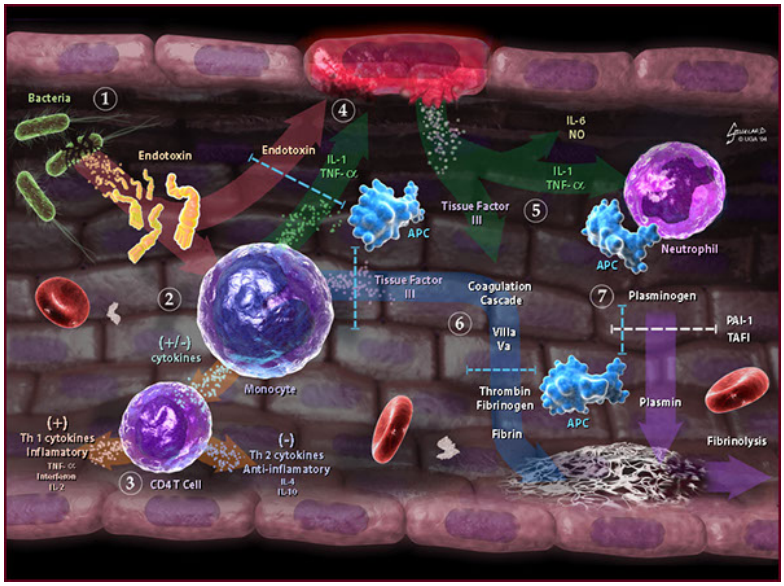


Figura 15: Esquema que muestra las diferentes fases de la endotoxemia, activación de las células efectoras y los diferentes mediadores de la inflamación implicados. (http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Endotoxemia&lang=2).

II.3. Hierro

El hierro es un nutriente esencial para los mamíferos, siendo el componente principal del grupo hemo. Tiene funciones de transporte de oxígeno y almacenaje de proteínas (hemoglobina y mioglobina). Además, forma parte del núcleo de diversas enzimas redox, incluyendo enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial y reductasas de los ribonucleótidos que participan en la síntesis de desoxiribonucleótidos (Ganz y Nemeth 2005). Por lo tanto, tiene un papel fundamental en el metabolismo energético, la proliferación celular (Le y Richardson 2002) y la reparación del ADN (Lukianova y David 2005). Sin embargo, el hierro también puede dañar los tejidos catalizando la conversión del peróxido de hidrógeno a radicales libres, que atacan las membranas celulares, las proteínas y el ADN (Andrews 1999).

La homeostasis del hierro sistémico extracelular viene determinada por la absorción del mismo por el duodeno, el reciclaje procedente de los eritrocitos degenerados previamente fagocitados por los macrófagos, el almacenamiento en los hepatocitos y la utilización por la médula ósea (Shayeghi *et al*. 2005, Andrews 1999, Bothwell y Finch 1962).

El hierro se excreta vía intestinal y por las células epiteliales (Donovan *et al.* 2005). Dos terceras partes del recuento total de hierro en el organismo forman parte del grupo

hemo, componente principal de la hemoglobina, que se encuentra en los precursores eritroides y en los eritrocitos maduros (Bothwell *et al*. 1962). La vida media de los eritrocitos es de 120 días, y se ha calculado que 20 ml de eritrocitos contienen 20 mg de hierro que es destruido diariamente. De esta manera, es necesario un aporte diario de 20 mg de hierro para producir la hemoglobina necesaria para la síntesis de nuevos eritrocitos. El hierro que se absorbe vía digestiva con la dieta sólo aporta 1-2 mg diariamente, así que el resto de las necesidades se cubren con el reciclaje procedente de los eritrocitos degenerados. Este proceso se lleva a cabo en los macrófagos del sistema reticular fagocítico, los cuales fagocitan y lisan los glóbulos rojos dañados o seniles. Una cuarta parte del total del hierro orgánico se almacena en los macrófagos y en los hepatocitos en forma de reserva fácilmente movilizable para la eritropoyesis (Ganz y Nemeth 2006).

Una vez que el hierro procedente de la dieta se ha absorbido, necesita ser transportado a través de múltiples membranas celulares. Los enterocitos son capaces de absorber de la dieta tanto el hierro procedente del grupo hemo como el no-hemo (Shayeghi *et al.* 2005).

El análisis cuantitativo de la concentración de hierro en plasma puede predecir en estadios muy tempranos procesos inflamatorios. Las citoquinas inflamatorias, incluyendo la IL-1, el TNF-α y el IFN-γ, afectan la diferenciación y proliferación de la formación de colonias progenitoras de la serie eritroide. Las citoquinas y otros mediadores de la inflamación también pueden causar secuestro del hierro en las células del sistema retículo-endotelial. Sin embargo, actualmente se ha comprobado que la heptacidina es la clave en la homeostasis del hierro. Este péptido actúa uniéndose a la ferroportina protagonizando la internalización y degradación del hierro con la consecuente pérdida del mismo exportado desde los enterocitos duodenales y las células reticulo-endoteliales. Los niveles de heptacidina aparecen elevados en los pacientes con inflamación severa cuando se compara con el grupo control. Tradicionalmente se ha considerado que el descenso del hierro plasmático era consecuencia directa de procesos anémicos (Knowles *et al.* 1980). Actualmente se sabe que el hierro participa en muchos procesos y puede actuar de marcador negativo de la inflamación, ya que el secuestro del mismo en los mácrofagos de la médula ósea impide su utilización en la eritropoyesis (Andrews 1999). En los pacientes de medicina humana se ha observado que cuando la anemia es consecuencia de la falta de hierro tienen niveles elevados de receptores para

la transferrina sérica y, sin embargo, los pacientes con anemia secundaria a un proceso inflamatorio crónico no presentan esta elevación (Ferguson *et al.* 1992). Los valores de hierro sérico establecidos por el colegio europeo de medicina interna en caballos sanos oscilan entre 72,54 µg/dL y 139,50 µg/dL.

II.4. Lactato

El ácido ℓ-láctico se produce a partir del ácido pirúvico a través de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en condiciones de anaerobiosis celular. Se produce constantemente durante el metabolismo y sobre todo durante el ejercicio, pero no aumenta su concentración hasta que el índice de producción no supere al índice de eliminación de lactato.

El índice de eliminación depende de varios factores, como por ejemplo: transportadores monocarboxilatos, concentración de LDH y capacidad oxidativa en los tejidos. La concentración de lactato en la sangre usualmente es de 1 o 2 mmol/L en reposo, pero puede aumentar hasta 20 mmol/l durante un esfuerzo intenso (Jacobs 1981, Sjödin *et al*. 1981). A pH fisiológico se encuentra sólo en su forma disociada, es decir, como lactato y no como ácido.

El aumento de la concentración de lactato ocurre generalmente cuando la demanda de energía en tejidos sobrepasa la disponibilidad de oxígeno en sangre. Bajo estas condiciones la piruvato deshidrogenasa no alcanza a convertir el piruvato a Acetil-CoA lo suficientemente rápido y el piruvato comienza a acumularse (Levraut *et al*. 1998). Esto generalmente inhibiría la glucólisis y reduciría la producción de adenosín trifosfato (ATP), si no fuera porque la lactato-deshidrogenasa reduce el piruvato a lactato:

$$\text{piruvato} + \text{NADH} + H^+ \rightarrow \text{lactato} + NAD^+$$

La función de la producción de lactato es oxidar NADH + H^+ para regenerar la nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD^+) necesario para la glucólisis y entonces para que continúe la producción de ATP.

El lactato producido sale de la célula muscular y circula mediante el torrente

sanguíneo hasta el hígado, donde se vuelve a transformar en glucosa por gluconeogénesis. Al ciclo que comprende la glicólisis en la célula muscular y su reciclaje por gluconeogénesis en el hígado se conoce como ciclo de Cori (Figura 16)**.** El hígado y el corazón tienen la facultad de oxidar el lactato de la sangre convirtiéndolo de nuevo en piruvato.

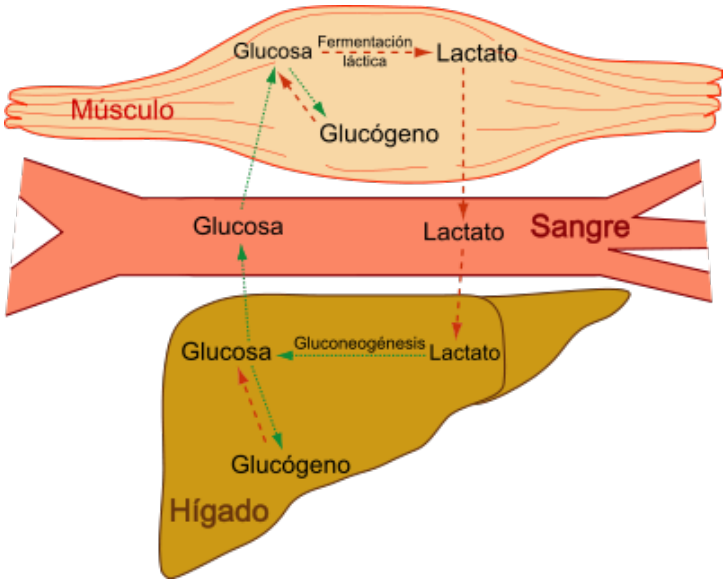


Figura 16: Esquema que representa el ciclo de Cori (https://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo_de_Cori).

El lactato plasmático se está empleando en la actualidad para valorar el grado de isquemia y la perfusión tisular en pacientes críticos, tanto en medicina humana como equina (Allen y Holm 2008, Thoefner 2000). Se ha demostrado su utilidad como marcador de pronóstico, tanto en caballos con alteraciones digestivas (Dunkel *et al.* 2013, Tennent-Brown *et al*. 2010, Delesalle *et al*. 2007) como en potros neonatos que sufren procesos sépticos (Borchers *et al.* 2012, Castagnetti *et al*. 2010). También resulta de utilidad para establecer la gravedad del proceso así como evaluar la respuesta al tratamiento en pacientes críticos (Tennent-Brown *et al.* 2007, Prittie 2006). La concentración de lactato plasmático y peritoneal es hoy en día el marcador de elección para determinar si un caballo requiere tratamiento médico o quirúrgico (Peloso y Cohen 2012, Latson *et al*. 2005).

Las células de los mamíferos producen L-lactato durante el metabolismo celular, mientras que el D-lactato es un producto del metabolismo bacteriano de la glucosa. Actualmente no existen en el mercado test de medición rápidos de este último.

Existen muchas causas del incremento en las concentraciones de L-lactato en sangre y en otros fluidos biológicos y en función de estas causas se han descrito dos tipos de acidosis láctica. La acidosis láctica tipo A es el resultado de la hipoxia tisular, secundariamente a la hipoperfusión, descenso de la concentración de oxígeno en sangre arterial o problemas tisulares en la movilización del oxígeno. La hiperlactacidemia tipo B es la consecuencia de disfunciones mitocondriales, alteraciones en el metabolismo de carbohidratos o descenso en la tasa de eliminación del lactato (Allen y Holm 2008, Prittie 2006). La causa más común e importante de hiperlactacidemia tiene su origen en alteraciones de la perfusión e hipoxia tisular. Sin embargo, el incremento de la concentración plasmática de lactato puede producirse en pacientes críticos que padecen enfermedades donde el transporte del oxígeno a los tejidos se realiza de forma normal. Cuando la producción de lactato de los tejidos hipóxicos excede la tasa de eliminación a través de los riñones y del hígado, su concentración aumenta en sangre (Prittie 2006).

La concentración plasmática de lactato también ha sido empleada como guía en pacientes que requieren transfusiones de sangre completa. El lactato plasmático es un indicador muy sensible de la pérdida de sangre en el caballo y se han observado incrementos en los animales que requieren transfusión (Hurcombe *et al*. 2007, Magdesian *et al*. 2006).

Estudios clínicos y experimentales indican que la concentración de lactato plasmático y peritoneal son herramientas muy valiosas para estimar la supervivencia de los caballos con sintomatología de cólico. En un estudio, las posibilidades de no supervivencia en caballos con cólico fue de 1,33 y 1,46 veces superior por cada 1 mmol de lactato incrementado en plasma y líquido peritoneal respectivamente (Delesalle *et al*. 2007). En este mismo trabajo se estableció un valor de corte del lactato plasmático para la no supervivencia superior a 8,6 mmol/L. Además, se ha observado un aumento significativo de su concentración en plasma en el momento de admisión de caballos no supervivientes a lesiones estrangulantes e inflamatorias de intestino grueso (Tennent-Brown *et al*. 2010). Con referencia a los caballos con vólvulo de colon, Johnston y colaboradores describen que las concentraciones plasmáticas de los caballos

supervivientes volvieron a la normalidad a las 24 horas después de la cirugía (0,96±0,60 mmol/L), mientras que en que no sobrevivieron las concentraciones plasmáticas se mantuvieron significativamente elevadas (3,24±3,08 mmol/L), confirmando el valor pronóstico de sus mediciones seriadas (Johnston *et al*. 2007). Es importante tener en cuenta que los ponis y los caballos miniatura pueden tener concentraciones plasmáticas de lactato elevadas en el momento de admisión en comparación con los caballos, lo que limita el uso de este marcador para diferenciar lesiones estrangulantes versus no estrangulantes, establecer tratamiento médico o quirúrgico así como el pronóstico de supervivencia (Dunkel *et al.* 2013).

Las determinaciones del lactato en sangre deben realizarse inmediatamente después de la extracción, ya que el L-lactato continúa aumentado como consecuencia del metabolismo de los eritrocitos (Tennent-Brown *et al*. 2007).

II.5. Troponina cardiaca I (cTnI)

Las troponinas son proteínas globulares de elevado peso molecular presentes en el tejido muscular estriado y cardíaco. La cTnI recibe esta denominación porque parece inhibir tanto la actividad de la miosina ATPasa como la unión actinomiosina. La cTnI y troponica cardiaca T (cTnT) tienen una alta sensibilidad y especificidad en la detección de necrosis celular miocárdica, incluso cuando las lesiones son pequeñas, y por lo tanto, se consideran una herramienta valiosa en el manejo de diferentes pacientes críticos (Lazzeri *et al.* 2008).

Las troponinas cardiacas pueden verse incrementadas por numerosas patologías que afectan al miocardio, incluyendo alteraciones cardíacas (trombosis de las arterias coronarias, daño miocárdico directo por trauma o inflamación y fallo cardíaco congestivo) así como alteraciones no cardíacas (shock séptico, enfermedad renal, intoxicaciones y trauma).

Actualmente, la concentración plasmática de esta proteína se considera un marcador de la función cardíaca, presentándose incrementos de la misma en casos de isquemia o hipoxia miocárdica. El incremento de la cTnI no solo ha sido descrito en casos de síndromes coronarios agudos, sino que se ha observado en diversos grupos de pacientes en la unidades de cuidados intensivos, como por ejemplo pacientes críticos con

hipotensión sistémica y condiciones tales como trauma, sepsis, embolismo pulmonar, ictus, insuficiencia renal y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Arlati *et al.* 2000, Spies *et al*. 1998). Hasta el 70% de los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos con concentraciones elevadas de cTnI no presentan enfermedades que limitan el flujo arterial coronario (Lim *et al.* 2006). El incremento de sus valores plasmáticos se considera un marcador de pronóstico en pacientes humanos (Røsjø *et al.* 2011).

En el caballo, el aumento de la concentración plasmática de cTnI ha sido asociado con alteraciones gastrointestinales agudas y puede proporcionar cierta información para establecer el diagnóstico y el pronóstico de estos pacientes (Diaz *et al*. 2014, Nath *et al.* 2012, Radcliffe *et al.* 2012). En el trabajo de Nath y colaboradores (2012), se observó que gran número de caballos con lesiones estrangulantes o inflamatorias presentaban evidencias de lesiones miocárdicas en la evaluación inicial comparado con un grupo control de caballos sanos. Además, estos hallazgos estaban directamente relacionados con la gravedad de las lesiones y con la supervivencia, siendo los animales no supervivientes los que tenían concentraciones plasmáticas más elevadas de cTnI.

En pacientes críticos con enfermedades sistémicas graves, como por ejemplo cuadros sépticos, el incremento de las troponinas cardiacas esta asociado con aumento de la mortalidad (Reynolds *et al*. 2012, John *et al*. 2010). Sin embargo, en los estudios realizados en potros sépticos, no se obtienen los mismos resultados que en pacientes humanos con septicemia. En los potros diagnosticados con septicemia no se aprecia una asociación entre daño miocárdico y supervivencia (Slack *et al*. 2005). En otros estudios en animales con inflamación sistémica, si que se ha encontrado asociación entre las concentraciones de troponina cardíaca y complicaciones o entre la cTnI y el pronóstico (Langhorn *et al.* 2013, Gilliamet *et al.* 2012, Nath *et al.* 2012). En un estudio experimental en el que se indujo endotoxemia a 8 caballos sanos se observó un incremento significativo en las concentraciones de cTnI y cuando se alcanzó el pico máximo en las concentraciones aparecieron arritmias ventriculares (Nostell *et al*. 2012). Estos hallazgos sugieren que las lesiones miocárdicas pueden aparecer antes de detectar disfunciones en la actividad eléctrica cardíaca y que la medición de las concentraciones de cTnI puede proporcionar información anticipando este tipo de lesiones y facilitando el diagnóstico y tratamiento.

El intervalo de referencia para la concentración plasmática de cTnI en caballos sanos es muy bajo, 0,0-0,06 ng/mL, usando un equipo de medición rápida (Kraus *et al*. 2010). Existe cierta controversia en referencia al valor de la concentración de este parámetro en el momento de admisión. Algunos trabajos citan que se deben interpretar estos resultados con precaución porque un aumento no siempre está relacionado con mal pronóstico o con un descenso en la supervivencia (Nath *et al.* 2012[a], Kraus *et al*. 2010). Sin embargo, otros autores sugieren que el incremento de las cTnI en la evaluación inicial debe alertar a los clínicos de que estos pacientes están predispuestos a sufrir un mayor porcentaje de complicaciones, incluyendo la muerte o la eutanasia (Nath *et al*. 2012[b], Radcliffe *et al*. 2012). Independientemente del significado de la concentración plasmática en la evaluación inicial, el incremento de la cTnI en muestras seriadas durante la hospitalización o tras la cirugía es considerada un valore fiable de la progresión de la enfermedad e indicador de pronóstico grave (Radcliffe *et al.* 2012, Reynolds *et al*. 2012). Incluso incrementos moderados (rango medio = 0,97–1,90 ng/mL) en caballos sometidos a cirugía abdominal de urgencia pueden indicar un mal pronóstico para la supervivencia de estos pacientes (Radcliffe *et al*. 2012).

II.6. Dímero D

El Dímero D es un producto resultante de la degradación de la fibrina a través del sistema fibrinolítico (Cesarini *et al*. 2014). Su aumento en plasma indica una activación de la fibrinólisis debido a la excesiva formación de fibrina en el árbol vascular (Monreal 2003). Las endotoxinas, inicialmente, inhiben el sistema fibrinolítico (Figura 17) a través del incremento de la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) y en estados más tardíos promueven la fibrinolisis a través de la activación de la plasmina (Weiss y Rashid 1998, Levi *et al*. 1997). En medicina humana, el Dímero D es considerado un marcador muy sensible de la coagulación intravascular diseminada (CID), trombosis venosa profunda (Junod 2015), tromboembolismo pulmonar (Shapiro y Bhatt 2016, Gruettner *et al*. 2015) y trombosis venosa asociada al uso de catéteres (Prudhomme *et al.* 1992). También se han empleado en medicina humana para identificar pacientes con riesgo de sufrir CID y para evaluar la respuesta al tratamiento con terapia antitrombótica (Tripodi 2011, Adam *et al*. 2009). Su concentración plasmática se considera el test más sensible para diagnosticar enfermedades

tromboembólicas y CID en humanos y ha sido demostrado que es un buen predictor de mortalidad (Toh y Hoots 2007, Toh y Downey 2005).

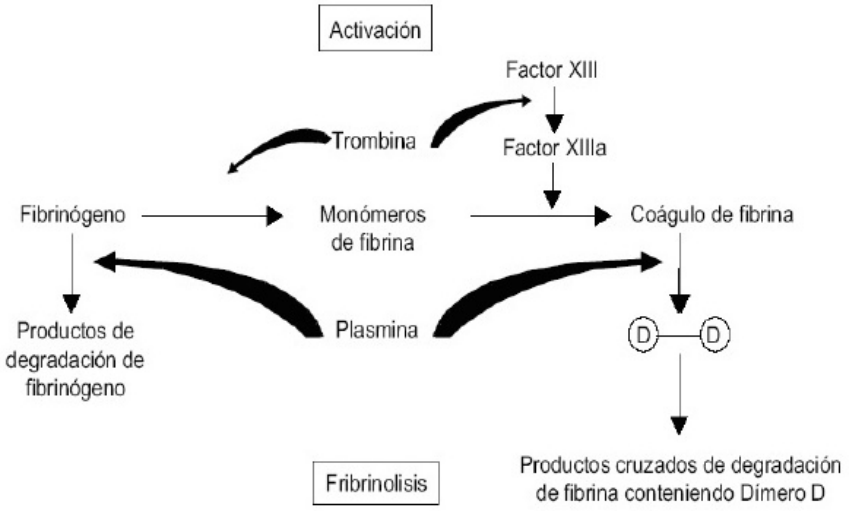


Figura 17: Esquema que representa la fibrinolisis y formación de los productos de la degradación de la fibrina (http://www.lookfordiagnosis.com).

La activación de la cascada de la coagulación es un hallazgo común en los caballos que se reciben en los hospitales con trastornos gastrointestinales (Johnstone y Crane 2010, Zbanyszek *et al*. 2004, Dolente *et al*. 2002, Monreal *et al*. 2000, Collatos *et al*. 1995, Prasse *et al.* 1993, Welch *et al*. 1992, Darien *et al*. 1991, Johnstone IB y Crane 1986) y se ha observado que hasta el 44% de los que presentan dolor abdominal grave experimentan CID (Monreal *et al*. 2000, Welch *et al.* 1992). Se ha descrito que un alto porcentaje de caballos que presentan colitis (por encima del 36%) y lesiones isquémicas (más del 70%) padecen CID (Dallap *et al*. 2003, Dolente *et al.* 2002, Monreal *et al*. 2000). Aproximadamente el 40% de los caballos con patologías gastrointestinales isquémicas o inflamatorias de pronóstico reservado, presentan depósitos masivos de fibrina en diferentes órganos, hallazgos consistentes con microtrombosis y CID (Cotovio *et al.* 2007). Se ha podido comprobar que existe un aumento en la morbilidad y mortalidad asociado con alteraciones en los sistemas de coagulación y fibrinolítico en los caballos que presentan enfermedades sistémicas (Dallap *et al.* 2003, Wada *et al.* 1995). En otros estudios, se ha comprobado que la detección rápida y el tratamiento temprano de las coagulopatías en los pacientes equinos y humanos disminuyen la morbilidad y mortalidad asociadas con el desarrollo fulminante de CID (Wada *et al.* 1999, Collatos *et al.* 1995, Orsini *et al.* 1988). En los pacientes equinos, el Dímero D ha

resultado ser una herramienta eficaz en la detección de estados de hipercoagulación tanto en caballos con cólico como en potros sépticos durante la hospitalización (Dallap *et al.* 2003, Welch *et al.* 1992, Pablo *et al.* 1983).

Las coagulopatías de consumo en el caballo pueden causar complicaciones tan graves como CID o tromboembolismo pulmonar, aunque la complicación más frecuente y menos grave de estos eventos trombóticos es la tromboflebitis (Norman *et al*. 2008, Dolente *et al.* 2005, Traub-Dargatz y Dargatz 1994, Welch *et al.* 1992, Morris 1989). La intensidad de los transtornos hemostáticos depende de la gravedad y la duración de las lesiones gastrointestinales así como del grado de activación en función de la respuesta inflamatoria del hospedador (Woodward *et al*. 2003, Wood y Feddle 1997). Los caballos con problemas inflamatorios graves y alteraciones isquémicas son los pacientes que sufren con más frecuencia coagulopatías (Cesarini *et al.* 2020, Delgado *et al.* 2009, Monreal y Cesarini 2009, Dallap 2004). Estudios previos han establecido que existe una asociación entre la gravedad de la coagulopatía en los caballos con enfermedades gastrointestinales y el descenso en la tasa de supervivencia (Cesarini *et al*. 2010, Dunkel *et al.* 2010, Dallap *et al.* 2003, Dolente *et al.* 2002, Collatos *et al,* 1995, Prasse *et al.* 1993, Johnstone y Crane 1986). Además, los caballos que presentan CID como complicación de un cólico tienen menos probabilidades de sobrevivir y la estancia en el hospital se extiende más que en aquellos caballos que no sufren coagulopatías (Cesarini *et al*. 2010).

La mayoría de las alteraciones hemostáticas aumentan durante el primer día de hospitalización (casos con tratamiento médico) o después de la intervención quirúrgica (pacientes con isquemia intestinal) y normalmente los valores retornan a los límites de referencia cuando el caballo es dado de alta (Feige *et al*. 2003, Johnstone y Crane 1986). Existen evidencias indirectas que sugieren que no sólo el proceso digestivo activa la cascada de la coagulación por sí mismo, sino que también los procedimientos quirúrgicos pueden resultar en una marcada activación del sistema de la coagulación (Feige *et al*. 2003, Collatos *et al*. 1995, Moore *et al*. 1995). En definitiva, el Dímero D plasmático es un indicador sensible y específico de la presencia de CID en caballos con cólico y los valores elevados, por encima de 4.000 ng/mL, son indicativos de un pronóstico grave y porcentajes de supervivencia bajos (Cesarini *et al.* 2010).

III. Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es profundizar en el estudio de la utilidad de diferentes parámetros laboratoriales en la evaluación de la gravedad que presentan los caballos remitidos a los Servicios de Urgencias, así como analizar su valor pronóstico.

De forma más concreta, esta Tesis Doctoral tiene los siguientes objetivos específicos:

1. Contribuir en la caracterización de parámetros analíticos indicativos de inflamación y/o isquemia en el caballo.

2. Comparar los resultados obtenidos en la concentración plasmática de hierro con otros indicadores hematológicos y bioquímicos ya descritos.

3. Determinar si la concentración plasmática de hierro permiten diferenciar procesos estrangulantes de lesiones inflamatorias.

4. Valorar el valor pronóstico de la concentración plasmática de hierro en caballos con cólico.

5. Evaluar la utilidad de un sistema POC (Point-of-Care) para la medición de Troponina cardica I (cTnI) y Dímero D en caballos críticamente enfermos.

6. Valorar si el valor de la cTnI como marcador de perfusión tisular y la concentración plasmática de Dímero D como indicador de CID pueden estar asociados con el pronóstico de los caballos críticos.

7. Establecer el valor de la eosinopenia para diferenciar patologías asociadas a la endotoxemia y/o SRIS de otras patologías no inflamatorias que causan dolor abdominal en caballos críticos en el momento de la recepción.

IV. Material y métodos

IV.1. ESTUDIO I: VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HIERRO Y DE LACTATO COMO MARCADORES DE INFLAMACIÓN E ISQUEMIA EN EL CABALLO.

IV.1.1. Animales

Este estudio fue llevado a cabo de acuerdo a las normativas relacionadas con el bienestar animal de la Unión Europea, de España y de la Comunidad Autónoma de Extremadura, con una evaluación positiva por parte del Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura (NºRegistro 152/2015).

Se han incluido 113 caballos, de edad superior a 2 años, admitidos como pacientes en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura, durante los años 2008 y 2009. Los animales se han distribuido en dos Grupos:

GRUPO A: caballos con enfermedades localizadas, 30 machos y 11 hembras, con una media de edad de 6,34 ± 4,65 años, sin signos clínicos de afectación sistémica (Tabla 1). En este Grupo se incluyen animales con trastornos ortopédicos, laceraciones, problemas genitourinarios, alteraciones de vías respiratorias altas y otros (Gráfica 1).

GRUPO B: caballos con enfermedades sistémicas (Tabla 2). Se incluyen en este Grupo los caballos que presentaban evidencias de SRIS, tal y como se encuentra definido en la actualidad, modificado de medicina humana para ser empleado en pacientes equinos (Lambert *et al.* 2016, Bone *et al.* 1992). El criterio de inclusión fue el padecimiento de dos o más de los siguientes signos clínicos:

- Fiebre (temperatura rectal superior a 38,5ºC) o hipotermia (temperatura rectal inferior a 37ºC).

- Neutrofilia (recuento de neutrófilos superior a 12,5 x 10^3cel/µL) o neutropenia (recuento de neutrófilos inferior a 5 x 10^3/µl) sin o con desviación a la izquierda.

- Taquicardia (frecuencia cardiaca superior a 50 ppm).

- Taquipnea (frecuencia respiratoria superior a 20 rpm).

- Incremento del número de formas inmaduras de granulocitos (recuentos

superiores al 10% de bastonados o neutrófilos en banda) o desviación a la izquierda.

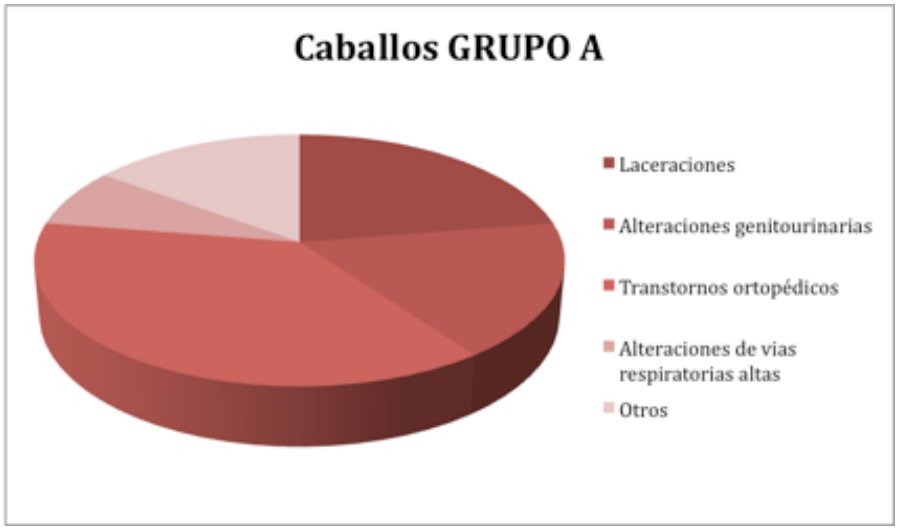
Este Grupo está ampliamente representado por animales con patologías gastrointestinales (Gráfica 2). De ellos, 23 fueron machos y 18 hembras, con una edad media de 8,77 ± 5,2 años.

Tabla 1: Grupo A. a = años; Aá = anglo-árabe; CDE= Caballo de Deporte Español; DDPB= desplazamiento dorsal del paladar blando; H= hembra; M= macho; MC= macho castrado; OCD = osteocondritis disecante; PSI= Pura Sangre Inglés; PRá= Pura Raza Árabe= PRE = Pura Raza Española; PSL= Pura Sangre Lusitano.

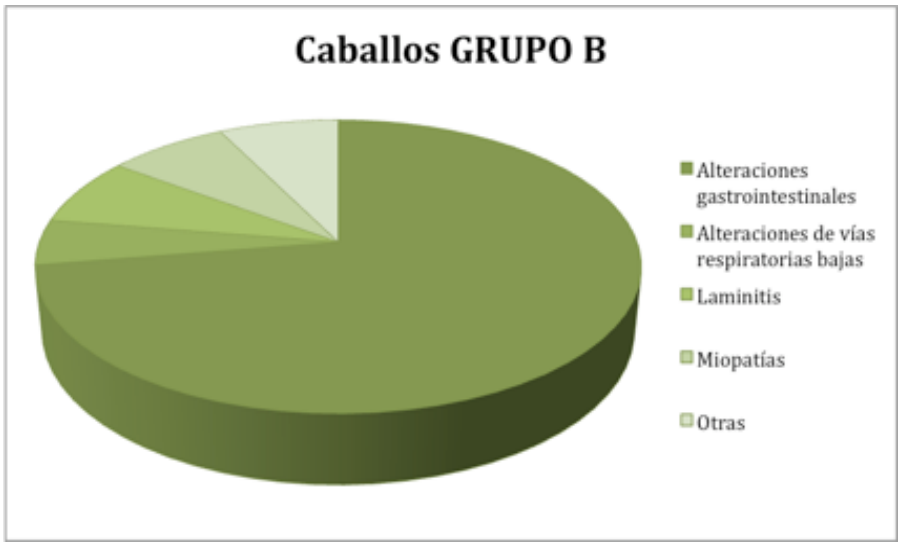
Nº	Edad	Sexo	Raza	Diagnóstico	Nº	Edad	Sexo	Raza	Diagnóstico
1	3 a	M	Cruzado	Criptórquido	22	4 a	M	PSL	Fractura sesamoideos
2	3 a	H	Cruzado	Fractura condilar	23	9 a	H	PRá	Wobbler
3	2 a	MC	Cruzado	Laceración	24	4 a	H	Cruzado	Subluxación articular
4	8 a	H	Cruzado	Hematoma etmoidal	25	3 a	M	Cruzado	Funculitis
5	18 a	M	Aá	Cistitis	26	7 a	MC	Cruzado	Fractura rudimentario
6	16 a	H	Cruzada	Laceración	27	2 a	M	PSL	OCD
7	13 a	M	PRE	Laceración	28	10 a	M	PRE	Luxación
8	2 a	MC	Cruzado	Laceración	29	3 a	M	PRE	Hematoma pene
9	20 a	MC	PSI	Laceración	30	2 a	MC	Cruzado	Artrosis
10	2 a	MC	CDE	Laceración	31	2 a	MC	Cruzado	Wobbler
11	3 a	MC	Cruzado	Laceración	32	3 a	H	PRE	Artritis séptica
12	10 a	M	PRE	Criptórquido	33	5 a	M	Cruzado	Laceración
13	7 a	H	PRá	Laceración	34	2 a	H	CDE	Tenosinovitis
14	11 a	H	Frisón	OCD menudillo	35	9 a	M	PRE	Arpeo
15	13 a	MC	Cruzado	Infección prótesis	36	2 a	M	Cruzado	Artritis séptica
16	5 a	MC	Cruzado	Criptórquido	37	9 a	M	PRE	Arpeo
17	10 a	MC	PRE	Habronemiasis	38	5 a	MC	Cruzado	Funiculitis
18	8 a	MC	CDE	Hemiplejía laringea	39	5 a	M	PRE	Perforación corneal
19	5 a	M	PSL	Higroma carpo	40	5 a	M	PRE	Criptórquido
20	4 a	H	PSL	Úlcera corneal	41	3 a	H	PRE	Fractura cerrada
21	4 a	M	Cruzado	Queloide					

Tabla 2: Grupo B. a= años; Colitis DD = Colitis Dorsal Derecha; CDE = Caballo de Deporte Español; DDD = Desplazamiento Dorsal Derecho; H = Hembra; ID = Intestino Delgado; M = macho, MC = Macho castrado; PRá = Pura Raza Árabe; PRE = Pura Raza Española; PSL = Pura Sangre Lusitano; PSI = Pura Sangre Inglés; RAO = Recurrent Airways Obstruction

Nº	Edad	Sexo	Raza	Diagnóstico	Nº	Edad	Sexo	Raza	Diagnóstico
1	3 a	H	Cruzado	Colitis	22	4 a	MC	Cruzado	Evisceración
2	8 a	M	PRE	Impactación arena	23	18 a	MC	Cruzado	Fecaloma colon menor
3	9 a	MC	Cruzado	Adelgazamiento crónico	24	2,5 a	H	PRá	Ileitis por A. Magna
4	5 a	M	PRE	Impactación colon menor	25	7 a	H	PRá	Rabdomiolisis postesfuerzo
5	30 a	M	Aá	Desplazamiento de colon	26	7 a	H	Aá	Enteritis, neumonía
6	6 a	M	PRE	Hernia inguinal	27	4 a	H	Cruzado	Laminitis aguda
7	16 a	M	PRE	Hepatitis	28	6 a	H	PRE	Torsión de colon
8	9 a	MC	Cruzado	Linfoma	29	12 a	H	PRE	Rotura de recto
9	5 a	M	PSL	Miopatía	30	7 a	H	PRE	Impactación de colon
10	6 a	M	PSL	Miopatía	31	13 a	MC	Cruzado	Enteritis, peritonitis
11	4 a	H	Cruzado	Colitis	32	7 a	H	PRE	DDD, afectación ID
12	5 a	M	CDE	Úlceras gástricas	33	11 a	MC	Cruzado	RAO
13	6 a	M	PRE	Peritonitis. Colitis DD	34	3 a	MC	Cruzado	Peritonitis
14	15 a	H	PSI	RAO	35	8 a	H	PRE	DDD, neumonía
15	13 a	MC	PRE	Enteritis	36	14 a	H	PRá	Lipoma estrangulante
16	3 a	M	PRE	Obstrucción esofágica	37	8 a	MC	PSI	Adelgazamiento crónico
17	16 a	M	Cruzado	Hernia estrangulada	38	8 a	H	PRá	Distocia
18	13 a	MC	Cruzado	Absceso	39	8 a	MC	Cruzado	Enteritis. Neumonía
19	10 a	H	PRE	Desplazamiento de colon	40	6 a	H	PRE	Impactación
20	9 a	M	PSL	DDD	41	7 a	H	PRE	Laminitis aguda
21	8 a	H	Cruzado	Laminitis					



Gráfica 1: Distribución de los caballos integrantes del Grupo A por Grupos de enfermedades.



Gráfica 2: Distribución de los caballos integrantes del Grupo B por Grupos de enfermedades.

En cada animal, y en el momento de admisión en el Hospital, se recogieron las siguientes constantes: frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y temperatura rectal. En los animales que llegaron con constantes alteradas, se volvió a repetir la medida 10 minutos después, para descartar que el incremento de frecuencia cardiaca, respiratoria y/o temperatura pudiera ser debida a estrés (transporte, animales no acostumbrados, etc.).

Con el fin de comparar los resultados obtenidos, se procedió a la extracción de sangre a un Grupo Control (Grupo 0), formado por 31 caballos sanos, 13 machos y 18 hembras, con edades comprendidas entre 3 y 17 años (6,64 ± 2,64 años). En todos ellos,

procedentes de particulares, se procedió a realizar una exploración física completa así como una analítica sanguínea consistente en hematología y bioquímica plasmática.

IV.1.2. Recogida y procesado de las muestras

La recogida de las muestras de sangre se realizó en el momento de la recepción del animal en el Hospital, y siempre previamente a la administración del tratamiento. La extracción se llevó a cabo en la vena yugular, con la ayuda de vacutainers, utilizándose tres tubos de recogida en cada caballo, conteniendo como anticoagulante, respectivamente, EDTA-K o tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid (para la hematología), heparina de litio (para la bioquímica sanguínea) y citrato sódico (para la determinación de la concentración plasmática de fibrinógeno). Se excluyeron del estudio aquellos animales que habían recibido tratamiento previo, exceptuando sedación/analgesia para el transporte con fármacos de rápida eliminación.

En las muestras recogidas se realizaron las siguientes pruebas:

Hematología: consistente en recuento de glóbulos rojos, valor hematocrito, concentración de hemoglobina, volumen corpuscular medio (MCV), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), hemoglobina corpuscular media (MCH), recuento total y diferencial de leucocitos y concentración plasmática de fibrinógeno. Se utilizó un analizador automático de sangre de impedancia (Sysmex F-800®), excepto para el valor hematocrito, que se realizó mediante ultracentrifugación (Jouan Hema-C®), el recuento diferencial de leucocitos, que se realizó de forma manual (se contaron y diferenciaron 100 leucocitos en extensiones de sangre teñidas con Diff-Quick, Química Clínica Aplicada S.A.), y para la concentración plasmática de fibrinógeno, que se determinó mediante coagulometría (Hemofibrin-kit®, Laboratorio Gernon S.A.).

Bioquímica plasmática: se determinó la concentración plasmática de hierro (Test fotométrico colorimétrico para hierro con LCF, Lipid Clearing Factor, Human diagnostics wordlwide Iron Liquicolor®, RAL S.A. Spain. EL), urea, creatinina, glucosa, bilirrubina total, directa e indirecta, AST, GGT, calcio, fósforo, proteínas totales, albúmina y lactato (kits comerciales de Laboratorios Spinreact para analizador automático Saturno 100 Vet, Crony ® Instruments), sodio, potasio y cloro (Easy

Electrolytes medica®).

IV.1.3. Estudio estadístico

Para el análisis descriptivo de las variables se ha utilizado la plataforma de distribución ("Distribution platform") de JMP6. Se ha realizado un análisis descriptivo de las variables en los diferentes Grupos de pacientes estudiados. Las variables cuantitativas se han expresado según la media y la desviación estándar (DE).

El análisis de la distribución de una variable continua y entre distintos Grupos de población definidos por una variable categórica X se realizó mediante la plataforma "Oneway" de JMP6, que calcula el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si hay diferencias entre las medias. El análisis de la independencia se realizó con un test paramétrico (Tukey-Kramer-HSD y T de Student). Se consideró que las diferencias entre variables de diferentes Grupos eran estadísticamente significativas con un nivel de significación inferior o igual a 0,05. Además se realizó un análisis de correlación y la correspondiente recta de regresión con la plataforma "Bivariate" de JMP6 para las variables hierro y lactato.

IV.2. ESTUDIO II: CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HIERRO EN CABALLOS CON ALTERACIONES GASTROINTESTINALES DE ORIGEN INFLAMATORIO, OBSTRUCTIVO Y ESTRANGULANTE

IV.2.1. Animales

Se incluyen en este estudio 117 caballos mayores de 1 año de edad que fueron remitidos al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura con sintomatología de cólico, en el espacio comprendido desde Enero de 2010 hasta Enero de 2014. Como criterios de exclusión se incluyeron: potros neonatos o caballos jóvenes de menos de 1 año de edad, caballos remitidos al Servicio de Urgencias por otras razones no relacionadas con alteraciones gastrointestinales y caballos que fueron sacrificados por motivos económicos.

Además, se estudió un Grupo Control formado por 39 caballos procedentes de particulares, y que fueron considerados sanos en base a su historia clínica, examen físico y ausencia de alteraciones en los análisis de sangre realizados (hematología y bioquímica).

Los caballos enfermos se agruparon, en función del tipo lesión, de la siguiente forma:

- IL: lesiones inflamatorias del intestino grueso (12 caballos).
- OL: lesiones obstructivas de intestino grueso (43 caballos).
- SL: lesiones estrangulantes de intestino grueso (7 caballos).
- IS: lesiones inflamatorias de intestino delgado (15 caballos).
- SS: lesiones estrangulantes de intestino delgado (37 caballos).
- OS: lesiones obstructivas de intestino delgado (3 caballos).

Estos animales fueron también agrupados en función del pronóstico en supervivientes (S), constituidos por 70 caballos, y no-supervivientes (NS), constituido por 47 caballos, que murieron o fueron eutanasiados como consecuencia de la enfermedad.

Los caballos enfermos eran PRE (49 caballos), PSL (13 caballos), centroeuropeos (11 caballos), PRá (5 caballos), PSI (1 caballo), Frisones (1 caballo), Hispano Bretones (1

caballo) y cruzados (36 caballos). En el Grupo Control se incluyeron 25 caballos PRE, 11 caballos cruzados, 1 PSI, 1 caballo PSL y 1 caballo PRá.

La media de edad en los caballos del Grupo Control fue de 9,03 ± 5,78 años. La correspondiente a los animales problema fue de 8,94 ± 5,24 años. Según los Grupos estudiados, en los caballos del Grupo con lesiones inflamatorias de intestino grueso (IL) fue de 7,91 ± 5,37 años, en los caballos con lesiones inflamatorias de intestino delgado (IS) 9,93 ± 5,23 años, en los caballos con lesiones obstructivas de intestino grueso (OL) 8,39 ± 4,41 años, en los caballos con lesiones obstructivas de intestino delgado (OS) 6,67 ± 3,21 años, en los caballos con lesiones estrangulantes de intestino grueso (SL) 16,57 ± 7,21 años y en los caballos con lesiones estrangulantes de intestino delgado (SS) 8,16 ± 4,31 años.

En el Grupo SS se incluyeron 37 caballos, de los cuales 24 tuvieron un diagnóstico de hernia inguinal (24/37), 9 caballos presentaban vólvulo de intestino delgado (9/37), 2 caballos lipoma estrangulante (2/37) y 1 caballo presentaba una lesión estrangulante de intestino delgado como consecuencia de un divertículo de Meckel (1/37). En el Grupo SL se incluyeron caballos con los siguientes procesos: 6 caballos con torsión de colon mayor (6/7) y 1 caballo con un lipoma estrangulando el colon menor (1/7). El Grupo OL estuvo compuesto por 13 caballos con desplazamiento dorsal derecho (13/43), 26 caballos con impactaciones de colon mayor (26/43), 2 caballos con impactación de ciego (2/43), 1 caballo con desplazamiento dorsal izquierdo (1/43) y 1 caballo con un fecolito (1/43). En el Grupo OS se incluyeron 2 caballos con impactación primaria de íleon (2/3) y un caballo con ileitis causada por *Anaplocephala magna* (1/3). Los procesos diagnosticados en el Grupo IL fueron los siguientes: 11 caballos con diagnóstico de colitis (11/12) y 1 caballo con colitis dorsal derecha (1/12). Todos los caballos incluidos en el Grupo IS tuvieron un diagnóstico de enteritis (15/15).

III.2.2. Muestras de sangre

Las muestras de sangre, que se obtuvieron en el momento de ingreso al Hospital mediante vacutainer, fueron extraídas de la vena yugular y procesadas en tubos de EDTA-K (tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA K3, BD Vacutainer, Becton Dickinson), citrato sódico (BD Vacutainer, Becton Dickinson) y heparina sódica

(BD Vacutainer, Becton Dickinson). Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Clínico Veterinario de la UEx. La hematología (muestras con EDTA-K) fue realizada inmediatamente. Las muestras de sangre heparinizada y citratada fueron centrifugadas a 2000 g durante 10 minutos para la obtención del plasma.

El examen clínico y laboratorial inicial en todos los pacientes del estudio incluyó: ecografía abdominal, palpación rectal, sondaje nasogástrico, abdominocentesis, hematología y bioquímica sanguínea.

El análisis hematológico se realizó en un analizador automático para hematología (Mindray BC-5300 Vet Spinreact®), exceptuando el valor hematocrito, que se obtuvo mediante ultracentrifugación (ultracentrifugadora Jouan Hema-C). El fibrinógeno plasmático se determinó mediante desnaturalización por calentamiento a 56ºC en sangre con EDTA-K como anticoagulante. Se utilizó la técnica de Millar, que aplica una fórmula en la que se incluye la medida de la longitud del precipitado en el tubo del hematocrito tratado con calor (Millar *et a.l* 1971, Blaisdell and Dodds 1977, Campbell *et al*. 1981).

Los parámetros bioquímicos analizados de proteínas plasmáticas, creatinina y lactato, fueron determinados en analizador automático para bioquímica sanguínea (Kits comerciales para analizadores automáticos de Laboratories Spinreact S.L.®; Saturno 100 VetCrony ®). La concentración plasmática de hierro fue determinada mediante test fotométrico colorimétrico para hierro sanguíneo con LCF (Lipid Clearing Factor) (Human diagnostics wordlwide Iron Liquicolor®, RAL S.A. Spain. EL).

IV.2.3.Método estadístico

Se realizó test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. En los datos que no se distribuyeron de forma normal, se aplicaron pruebas no parámetricas de Kruskal-Wallis (parámetros relativos a la clasificación) y test de Mann-Whitney (valores referentes al pronóstico). Los resultados fueron expresados como media y desviación estándar. Aquellos valores con un nivel de significación de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El análisis estadístico fue realizado empleando la versión 19.0 del programa SPSS para Macintosh.

IV.3. ESTUDIO III: CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE TROPONINA CARDIACA I (cTnI) Y DÍMERO D COMO MARCADORES DE PRONÓSTICO EN CABALLOS CRÍTICOS

IV.3.1. Animales

Se han estudiado 21 caballos con signos de SRIS y/o endotoxemia, remitidos al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura con diferentes patologías digestivas. En todos los caballos se realizaron pruebas diagnósticas iniciales que incluyeron: hematología completa, bioquímica sanguínea, ecografía abdominal, examen rectal, sondaje nasogástrico y abdominocentesis. Se consideraron caballos endotóxicos aquellos que presentaban, al menos, dos de los siguientes signos clínicos: taquicardia (igual o superior a 60 ppm), esclerótica inyectada, aumento del tiempo de relleno capilar (superior a 2 segundos), y presencia de halo endotóxico. Se consideraron caballos con SRIS cuando presentaban dos o más de las siguientes alteraciones: fiebre o hipotermia (temperatura rectal superior a 38,5ºC o inferior a 37ºC), taquicardia (frecuencia cardíaca superior a 50 ppm), taquipnea (frecuencia respiratoria superior a 20 respiraciones/minuto), leucocitosis o leucopenia (recuentos de glóbulos blancos superiores a 12.500 o inferiores a 5.000 células/μL), o incremento del número de formas inmaduras de granulocitos o desviación a la izquierda (recuentos superiores al 10% de bastonados o neutrófilos en banda).

En el Grupo Control se incluyeron 10 caballos sanos que pertenecían a propietarios particulares y que se consideraron sanos en base a la historia clínica, examen físico y ausencia de alteraciones en el recuento sanguíneo y en el perfil bioquímico.

Los caballos enfermos se clasificaron, en función de su pronóstico, en dos Subgrupos: supervivientes (Subgrupo A) y no supervivientes (subgrupo B). Se definen como supervivientes aquellos caballos que tras el tratamiento fueron dados de alta hospitalaria sin complicaciones potenciales para su vida. Los caballos eutanasiados por motivos económicos no fueron incluidos en este estudio.

En cuanto a la enfermedad diagnosticada, los caballos se dividieron en 3 Grupos:

- Enfermedades inflamatorias (I): 7 animales (4 caballos con enteritis y 3 caballos con colitis).
- Enfermedades obstructivas (0): 5 animales (3 caballos con desplazamiento

dorsal derecho, 1 caballo con impactación de intestino delgado y 1 caballo con un fecaloma en colon menor).

- Lesiones estrangulantes (S): 9 animales (4 caballos con hernias inguinales, 2 caballos con vólvulo de intestino delgado y 1 caballo con atrapamiento del intestino delgado en el foramen epiploico).

Todos los caballos incluidos en estos tres Grupos, cumplían la definición de SRIS y/o endotoxemia.

IV.3.2. Muestras de sangre

Las muestras de sangre, que se obtuvieron en el momento de ingreso al Hospital mediante vacutainer, fueron extraídas de la vena yugular y procesadas en tubos de EDTA-K (tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA K3, BD Vacutainer, Becton Dickinson), citrato sódico (BD Vacutainer, Becton Dickinson), heparina sódica (BD Vacutainer, Becton Dickinson) y tubos sin anticoagulante para la obtención de suero. Las muestras fueron remitidas al Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Clínico Veterinario de la UEx. La hematología fue realizada inmediatamente, igual que la bioquímica sanguínea básica.

En el estudio se incluyeron el valor hematocrito, recuento total de leucocitos, concentración plasmática del fibrinógeno, y concentración en plasma de proteínas totales y creatinina. Parámetros clínicos como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura rectal también fueron analizados, ya que han sido tradicionalmente usados como marcadores de la inflamación y como factor pronóstico.

Los parámetros bioquímicos fueron valorados mediante un analizador automático (Kits comerciales para analizadores automáticos de Laboratories Spinreact S.L.®; Saturno 100 VetCrony ®).

Para el recuento de células sanguíneas se empleó un analizador electrónico automático (Mindray BC-5300 Vet Spinreact®), exceptuando el valor hematocrito, que se obtuvo mediante ultracentrifugación (Jouan Hema-C®).

El fibrinógeno plasmático fue recogido y procesado en tubos de vacutainer con EDTA-K y analizado mediante desnaturalización por calentamiento a 56ºC. Para

establecer las concentraciones en forma numérica se aplicó la técnica de Millar, que aplica una fórmula en la que se incluye la medición de la longitud del precipitado en el tubo del hematocrito tratado con calor.

El plasma sobrante (obtenido mediante centrifugación a 2000 g durante 10 minutos) y el suero (obtenido mediante centrifugación a 200 g durante 10 minutos) se recogieron en tubos de eppendorf y se congelaron a -20ºC para la determinación de cTnI y Dímero D.

Se procedió a estudiar dos muestras de sangre en cada animal, la obtenida en el momento de ingreso en el Hospital (Muestra 1) y la última recogida en el momento del alta hospitalaria o previa a la muerte/eutanasia (Muestra 2).

IV.3.3. Dímero D y cTnI

El Dímero D y cTnI fueron analizados mediante el analizador automático AQT90 FLEX, tras validación analítica previa (estudios de precisión, linealidad y límites de detección).

El coeficiente intraensayo de variación (CVs) fué calculado tras el análisis de las 3 muestras con mayor concentración de cTnI (procedentes de caballos con endotoxemia) repetido 5 veces. El mismo protocolo fue empleado para el Dímero D.

La linealidad fue evaluada mediante la dilución de dos muestras de plasma de caballos con endotoxemia con concentraciones altas de cTnI, y dos muestras con concentraciones elevadas de Dímero D.

Los límites de detección fueron calculados para cada determinación basándose en datos de 12 determinaciones replicadas del cero estándar (muestras tampones diluidas) como valor medio y dos desviaciones estándar.

V.3.5. Análisis estadístico

Las medias aritméticas, desviaciones estándar y el Coeficiente de Variación (CV) intra ensayo, fueron calculados mediante procedimientos estadísticos descriptivos

rutinarios. Se empleó el test de Kolmogorov–Smirnov para la evaluación de normalidad y el test de Kruskal-Wallis para comparar las medias del Grupo Control y los caballos críticamente enfermos, así como para evaluar las diferencias entre los supervivientes y los no-supervivientes. Para el estudio comparativo de medias entre la muestra 1 (en el momento de admisión) y la muestra 2 (antes del alta o de la muerte) entre supervivientes y no supervivientes, se empleo el test de Mann-Whitney. El nivel de significación usado en cada caso fue de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando los programas de Microsoft Excel 2000 y el SPSS 11.5 para Macintosh (SPSS Inc.)

IV.4. ESTUDIO IV: EVALUACIÓN DE LA EOSINOPENIA COMO MARCADOR DE ENDOTOXEMIA EN CABALLOS CRÍTICOS

IV.4.1. Animales

Se realizó un estudio prospectivo con 100 caballos. De ellos, 69 caballos fueron pacientes remitidos al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura con diversas enfermedades sistémicas y 31 eran caballos sanos, procedentes de particulares, utilizados como animales control. Los caballos menores de 2 años fueron excluidos del estudio.

Los caballos que presentaban enfermedades sistémicas se distribuyeron en:

- Grupo A: 27 caballos que cumplían dos o más requisitos de la definición de SIRS. Ningún caballo de este Grupo tenía signos clínicos de endotoxemia (criterios para definir el estado de endotoxemia descritos en el Estudio I).
- Grupo B: 42 caballos con endotoxemia (criterios para definir el estado de endotoxemia descritos en el Estudio I).
- Grupo control: 31 caballos sanos sin signos clínicos de enfermedad y con analíticas sanguíneas dentro de los rangos fisiológicos.

En el momento del ingreso en el Hospital, cada caballo fue evaluado clínicamente recogiéndose los datos referentes a las constantes vitales (temperatura corporal, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria). En la historia clínica se incluyeron datos relativos a la edad, sexo y raza. Antes de la administración de medicamentos o fluidoterapia se obtuvo una muestra de sangre procedente de la vena yugular para el estudio hematológico y bioquímico. Los parámetros sanguíneos analizados fueron los siguientes: valor hematocrito, recuento total y diferencial de leucocitos, concentración plasmática de fibrinógeno, lactato, creatinina, urea, proteínas totales, albúmina y bilirrubina total.

Los pacientes fueron clasificados como sanos, con signos clínicos o laboratoriales de SRIS pero sin signos de endotoxemia y con signos evidentes de endotoxemia y SRIS en el momento de admisión.

Las enfermedades predominantes fueron enteritis (9/69), desplazamientos de intestino

grueso (8/69) y hernias inguinales (8/69). De los 69 caballos incluidos que presentaban dolor cólico, en 25 se diagnosticaron lesiones inflamatorias, en 18 lesiones estrangulantes, en 18 lesiones obstructivas y 8 caballos presentaban otras patologías.

IV.4.2. Muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos con anticoagulante (EDTA-K: tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA K3, BD Vacutainer, Becton Dickinson). El recuento total de leucocitos fue realizado mediante contador electrónico semiautomático de células sanguíneas (Sysmex F-800). El recuento de eosinófilos fue realizado manualmente en extensiones en porta de sangre teñidas con Diff-quick (Química Clínica Aplicada S.A.), e identificando 200 leucocitos sobre la extensión. El porcentaje de eosinófilos fue multiplicado por el número total de leucocitos, con el fin de obtener el valor absoluto de este tipo de células (expresado en número de eosinófilos/µl). Este recuento diferencial manual se realiza de forma rutinaria en todos los pacientes que llegan al Hospital, para poder detectar alteraciones celulares morfológicas que los equipos automáticos no son capaces de diferenciar. Se consideraron eosinopenia los recuentos de eosinófilos de 0 células/µl.

Para determinar las concentración plasmáticas de lactato, las muestras de sangre se recogieron en tubos de vacutainer con heparina sódica como anticoagulante y fueron analizadas mediante immunoturbidimetria empleando un analizador automático (Kit comercial de Laboratories Spinreact S.L.®; Saturno 100 VetCrony ®). Los límites de detección mediante esta técnica dados por el fabricante son de 0,1 mmol/L.

Para la medición de la concentración plasmática de fibrinógeno, se emplearon tubos de vacutainer con citrato sódico como anticoagulante. Previa centrifugación de la sangre a 2.000 g durante 10 minutos, se utilizó el plasma obtenido. La concentración de fibrinógeno se determinó en coagulómetro (CLOT-1 de Laboratorios RAL) mediante la técnica de coagulación de la trombina (Hemofibrin-kit®, Laboratorio Gernon S.A.).

IV.4.3. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media ± desviación estándar para las variables que se

distribuyen de forma normal (T test). Para la comparación de medias entre Grupos y entre supervivientes y no supervivientes se empleo el test de Kruskal-Wallis con un nivel de significación $p<0,05$.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando los programas de Microsoft Excel 2000 y el SPSS 11.5 para Macintosh (SPSS Inc.)

V. Resultados

V.1. ESTUDIO I: VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HIERRO Y DE LACTATO COMO MARCADORES DE INFLAMACIÓN E ISQUEMIA EN EL CABALLO.

V.1.1. Exploración física

Los resultados medios obtenidos para los diferentes parámetros evaluados en el examen clínico, realizado en todos los animales a su llegada al Hospital, se reflejan en la Tabla 3.

Tabla 3: Valor medio y desviación estándar para los parámetros clínicos evaluados en la exploración física.

PARÁMETROS	GRUPO 0	GRUPO A	GRUPO B
FRECUENCIA CARDÍACA (ppp)	38,45 ± 4,46	46,62 ± 9,04	55,80 ± 16,05
FRECUENCIA RESPIRATORIA (rpm)	14,32 ± 3,69	17,77 ± 4,91	24,97 ± 12,80
TEMPERATURA RECTAL (ºC)	37,42 ± 0,32	37,92 ± 0,40	37,88 ± 0,81

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los tres Grupos estudiados para la frecuencia cardíaca, siendo la más evidente la observada para el Grupo de animales con enfermedades sistémicas (Grupo B) respecto al Grupo Control (Grupo 0) (Tabla 4).

Tabla 4: Test de Tukey- Kramer HSD para la frecuencia cardíaca en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

GRUPOS	B	A	O
B	-6,025	2,898	10,860
A	2,898	-6,521	1,449
O	10,860	1,449	-6,929

La frecuencia respiratoria también fue significativamente más elevada en los caballos del Grupo con afectación sistémica (Grupo B) (Tablas 3 y 5) respecto a la observada en los Grupos A y 0.

Tabla 5: Test de Tukey-Kramer HSD para la frecuencia respiratoria en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

GRUPOS	B	A	0
B	-4,5457	2,4677	5,7545
A	2,4677	-4,9199	-1,6273
O	5,7545	-1,6273	-5,2277

La temperatura rectal también fue significativamente más elevada en los caballos enfermos (Grupos A y B) respecto a los sanos (Grupo 0) (Tablas 3 y 6).

Tabla 6: Test de Tukey-Kramer HSD para la temperatura rectal en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

GRUPOS	B	A	0
B	-4,5457	2,4677	5,7545
A	2,4677	-4,9199	-1,6273
O	5,7545	-1,6273	-5,2277

V.1.2. Valor hematocrito

A continuación se muestran los resultados obtenidos para el hematocrito en los diferentes Grupos. Este parámetro se ha utilizado tradicionalmente como marcador del grado de deshidratación en animales con alteraciones gastrointestinales.

Tabla 7: Valor medio y desviación estándar para el valor hematocrito y la concentración de fibrinógeno plasmático.

PARÁMETROS	GRUPO 0	GRUPO A	GRUPO B
HEMATOCRITO (%)	34,61 ± 5,52	32,19 ± 7,41	35,39 ± 10,74
FIBRINÓGENO (mg/dL)	475,42±283,32	506,06±313,10	729,84±764,59

No se encontraron diferencias significativas entre los Grupos estudiados (Tablas 7 y 8).

Tabla 8: Test de Tukey-Kramer HSD para el valor del hematocrito en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

GRUPOS	B	0	A
B	-4,4202	-3,9797	-1,3371
0	-3,9797	-5,0833	-2,4555
A	-1,3371	-2,4555	-4,6530

V.1.3. Fibrinógeno

No existen diferencias significativas en la concentración plasmática de fibrinógeno entre los tres Grupos (Tabla 9), siendo las medias obtenidas de 475,42 ± 283,32 mg/dL para el Grupo control, 506,06 ± 313,10 mg/dL para el Grupo A y 729,84 ± 764,59 para el Grupo B o caballos con patologías sistémicas (Tabla 7).

Tabla 9: Test de Tukey-Kramer HSD para el valor del fibrinógeno plasmático en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupos

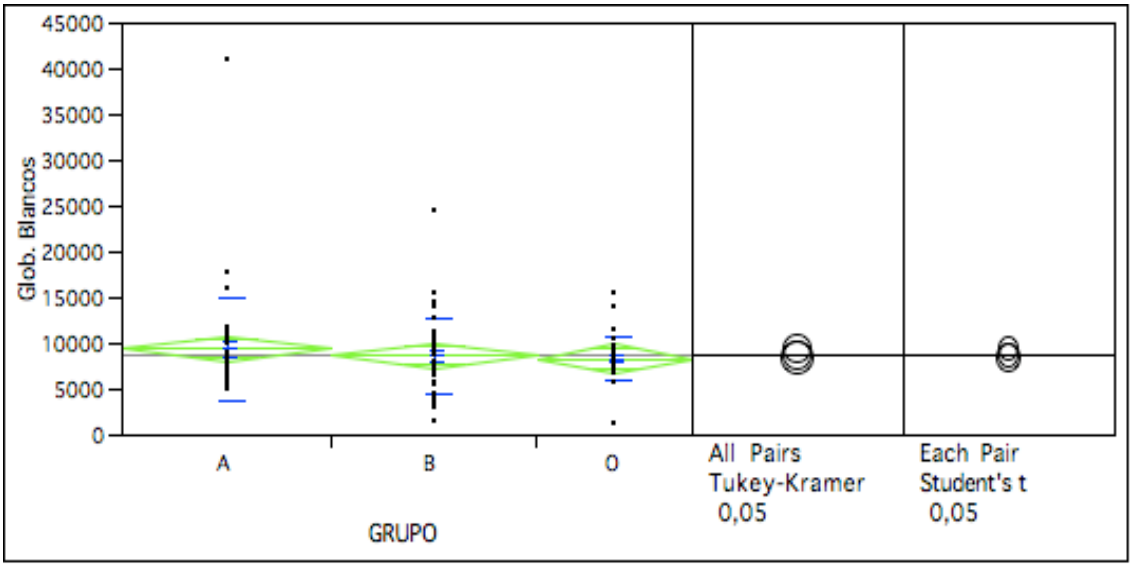
GRUPOS	B	A	0
B	-271,91	-46,50	-38,60
A	-46,50	-268,65	-260,88
0	-38,60	-260,88	-312,71

V.1.4. Recuento leucocitario

Tabla 10: Valor medio y desviación estándar correspondiente al recuento total y diferencial de leucocitos. N. = neutrófilos.

PARÁMETROS	GRUPO 0	GRUPO A	GRUPO B
LEUCOCITOS Cel/µL	8.314,84 ± 2.409,10	9.445,24 ± 5.678,21	8.670,73 ± 4.151,54
N. BASTONADOS Cel/µL	161,14 ± 115,56	270,63 ± 373,97	337,267 ± 298,88
N.SEGMENTADOS Cel/µL	2.211,37 ± 131,90	6.302,86 ± 4.370,56	6.055,39 ± 4.140,47
EOSINÓFILOS Cel/µL	351,47 ± 408,23	281,47 ± 455,14	227,53 ± 293,08
LINFOCITOS Cel/µL	2.809,06 ± 1.270,37	2.526,55 ± 1.936,21	1.933,24 ± 1.208,07
MONOCITOS Cel/µL	798,78 ± 1.422,03	429,30 ± 374,28	305,46 ± 281,46

El recuento total de leucocitos (Gráficas 3 y 4) no mostró diferencias estadísticas significativas entre los tres Grupos (Tablas 10 y 11). Además, muchos de estos pacientes mostraban cambios tóxicos en los neutrófilos (neutrófilos espumosos y con cuerpos de Dhöle), pertenecientes al Grupo de caballos con afectaciones sistémicas (Grupo B). Así mismo, hubo un porcentaje de animales con leucocitosis que se corresponde con caballos jóvenes y con los que padecían procesos crónicos o excitación.



Gráfica 3: Recuento total de leucocitos en los Grupos estudiados En las columnas de la derecha se representan los resultados obtenidos con el test de Tukey-Kramer y la comparación con el test de T de Student.

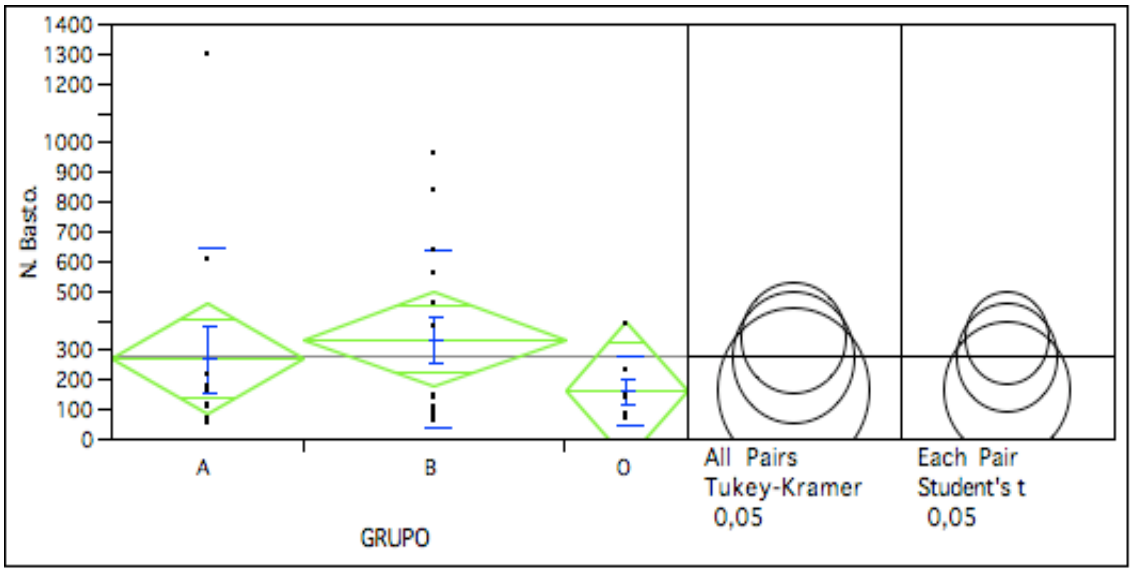
Tabla 11: Test de Tukey-Kramer HSD para el recuento de leucocitos en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupo.

GRUPOS	A	B	O
A	-2300,2	-1539,7	-1365,5
B	-1539,7	-2328,1	-2152,9
O	-1365,5	-2152,9	-2677,4

Al estudiar el recuento leucocitario diferencial, se observa que tampoco aparecen diferencias estadísticamente significativas para el recuento de neutrófilos, tanto segmentados como bastonados (Tablas 12 y 13) (Gráficas 4 y 5).

Tabla 12: Test de Tukey-Kramer HSD para el recuento de neutrófilos bastonados en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupo

GRUPOS	B	A	O
B	-271,53	-228,55	-164,25
A	-228,55	-317,08	-250,04
O	-164,25	-250,04	-397,47

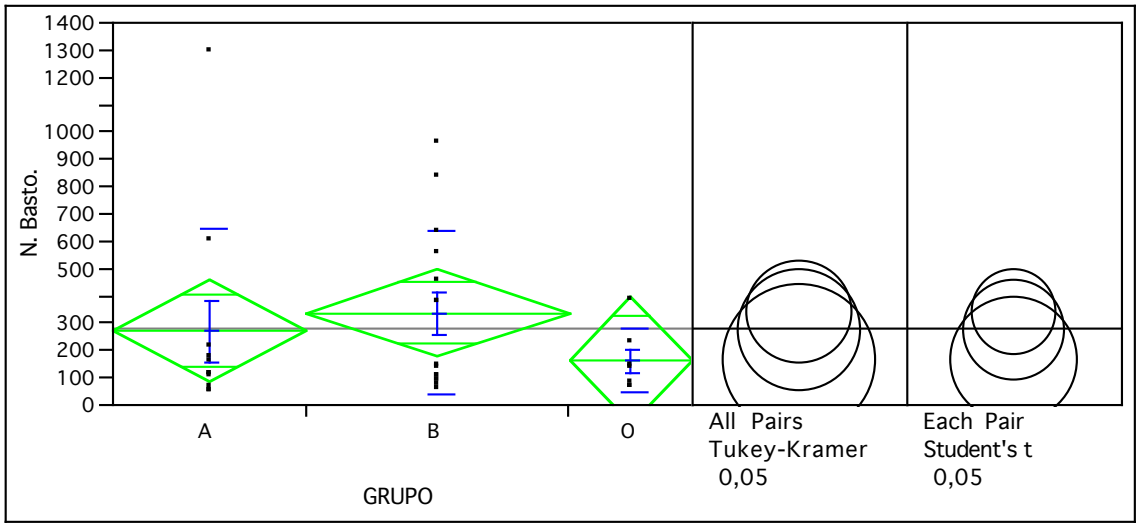


Gráfica 4: Gráfica que representa el recuento de neutrófilos bastonados de los tres Grupos estudiados. En las columnas de la derecha se representan los resultados obtenidos con el test de Tukey-Kramer y la comparación con el test de T de Student.

Como se ha comentado anteriormente, el Grupo B está compuesto por animales con patologías muy diferentes (Tabla 2; Figuras 14 y 15), algunas de las cuales provocan endotoxemia (p. ej. enteritis y colitis) con la consecuente neutropenia, y otros neutrofilia (p. ej. infecciones crónicas y abscesos). Además, muchos animales presentaban formas agudas de la enfermedad y aún no se había alterado el recuento leucocitario.

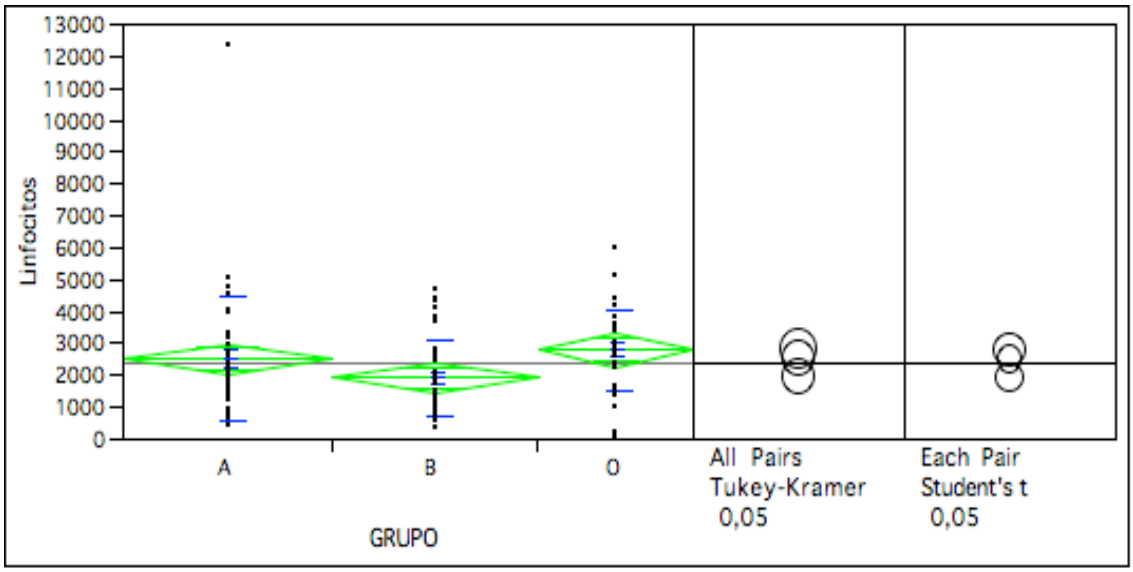
Tabla 13: Test de Tukey-Kramer HSD para el recuento de neutrófilos segmentados en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupo.

GRUPOS	A	B	O
A	-1977,7	-1742,3	-975,1
B	-1742,3	-2001,7	-1233,6
O	-975,1	-1233,6	-2302,0



Gráfica 5: Gráfica que representa el recuento de neutrófilos segmentados de los tres Grupos estudiados. En las columnas de la derecha se representan los resultados obtenidos con el test de Tukey-Kramer y la comparación con el test de T de Student. (p<0,05).

Sí se observaron diferencias estadísticas para el recuento de linfocitos (Gráfica 6) entre el Grupo 0 y el Grupo B (Tabla 14), que presentó un valor medio más bajo.



Gráfica 6: Gráfica que representa el recuento de linfocitos de los tres Grupos estudiados. En las columnas de la derecha se representan los resultados obtenidos con el test de Tukey-Kramer y la comparación con el test de T de Student.

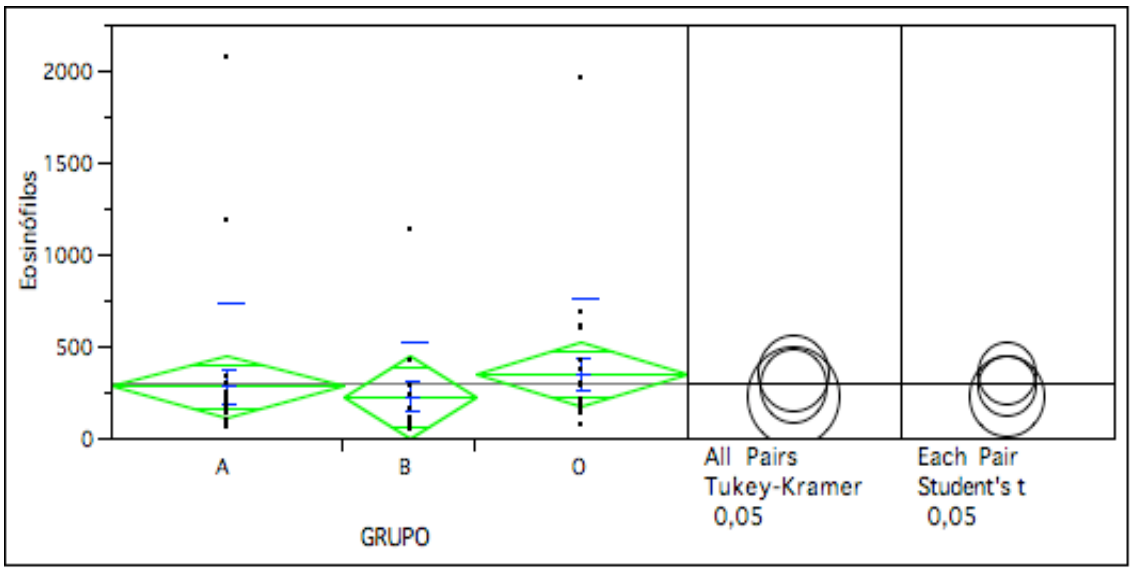
Tabla 14: Test de Tukey-Kramer HSD para el recuento de linfocitos en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupos

GRUPOS	O	A	B
O	-924,37	-579,21	9,65
A	-579,21	-794,15	-205,67
B	9,65	-205,67	-803,78

También se ha detectado una diferencia estadísticamente significativa entre Grupos para el recuento de eosinófilos (Gráfica 7, Tabla 15), siendo la media del Grupo con enfermedades sistémicas (Grupo B) menor que en el control (Grupo 0) y en el de caballos con lesiones localizadas (Grupo A).

Tabla 15: Test de Tukey-Kramer HSD para el recuento de eosinófilos en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

GRUPOS	O	A	B
O	-924,37	-579,21	9,65
A	-579,21	-794,15	-205,67
B	9,65	-205,67	-803,78

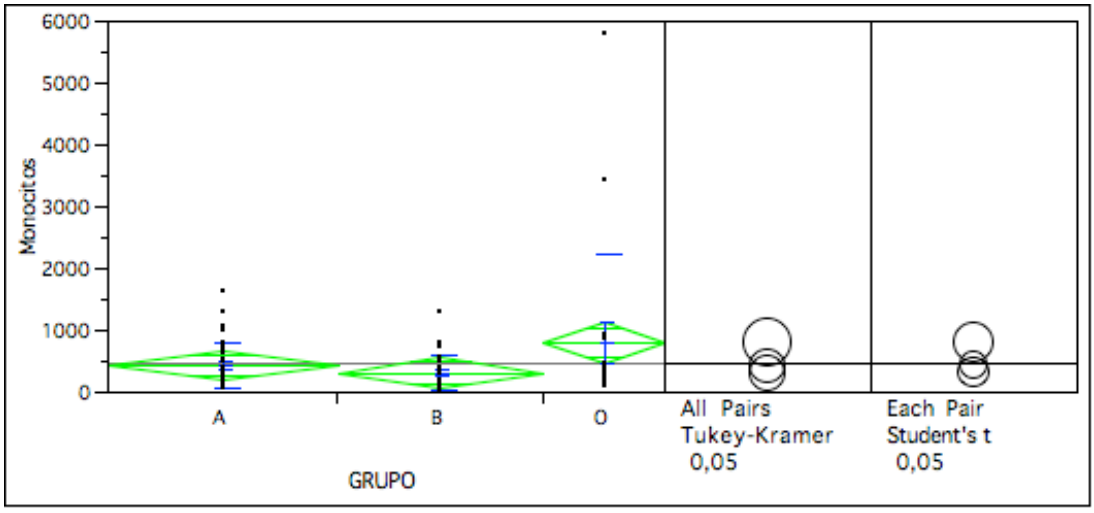


Gráfica 7: Gráfica que representa el recuento de eosinófilos de los tres Grupos estudiados. En las columnas de la derecha se representan los resultados obtenidos con el test de Tukey-Kramer y la comparación con el test de T de Student.

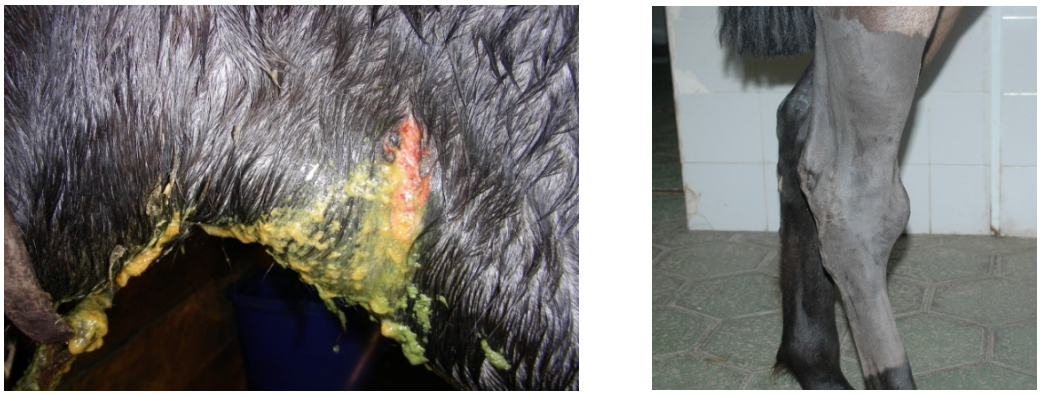
En cuanto a los monocitos, por último, no se encontraron diferencias significativas entre Grupos (Gráfica 8, Tabla 16). Los individuos que presentaban valores más elevados tenían abscesos (Figura 16) o padecían procesos crónicos de tipo tenosinovitis o artritis sépticas (Figura 17), celulitis séptica o adelgazamiento crónico.

Tabla 16: Test de Tukey-Kramer HSD para el recuento de monocitos en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

GRUPOS	O	A	B
O	-558,72	-118,84	-5,44
A	-118,84	-405,90	-294,56
B	-5,44	-294,56	-430,52



Gráfica 8: Gráfica que representa el recuento de monocitos de los tres Grupos. En las columnas de la derecha se representan los resultados obtenidos con el test de Tukey-Kramer y la comparación con el test de T de Student ($p<0,05$).



Figuras 16 y 17: La Figura 16 se corresponde con un caballo que fue referido al Hospital debido a un absceso localizado en el cuello (caballo Nº 18; Grupo B). En la Figura 17 se observa gran distensión sinovial en un caballo con artritis séptica en la región del tarso (caballo Nº 32; Grupo A.

V.1.5. Bioquímica sanguínea

Tabla 17: Valor medio y desviación estándar para la concentración en sangre de proteínas totales, albúmina, creatinina y urea.

PARÁMETROS	GRUPO 0	GRUPO A	GRUPO B
PROTEÍNAS TOTALES (g/dL)	7,23 ± 0,76	6,84 ± 0,79	6,82 ± 1,23
ALBÚMINA (g/dL)	4,13 ± 0,45	3,86 ± 0,25	3,67 ± 0,39
CREATININA (mg/dL)	1,28 ± 0,51	1,41 ± 0,38	1,70 ± 0,80
UREA (mg/dL)	40,08 ± 8,78	31,81 ± 8,36	46,07 ± 25,11

No se han observado diferencias estadísticamente significativas para la concentración de proteínas totales entre los Grupos (Tablas 17 y 18), debido a la alta variabilidad en los resultados obtenidos.

En el Grupo A, el valor máximo fue de 7,9 g/dL, en un caso de funiculitis (caballo Nº 38; Tabla 1), y el mínimo de 5,6 g/dL, correspondiente a una yegua con laceración en la región frontal (caballo Nº 6; Tabla 1). En el Grupo B el valor máximo fue de 9,8 g/dL, correspondiente a un paciente con peritonitis crónica que presentó hiperglobulinemia manifiesta (caballo Nº 34; Tabla 2). El valor mínimo fue de 5 g/dL, observado en un caso de enfermedad hepática y lesiones del intestino delgado secundarias a un desplazamiento de intestino delgado en el que parte del yeyuno estaba atrapado entre el hígado y la pared abdominal (caballo Nº 7; Tabla 2) y en otro animal con peritonitis y colitis dorsal derecha (caballo Nº 13; Tabla 2).

Tabla 18: Test de Tukey-Kramer HSD para la concentración plasmática de proteínas totales en los Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias significativas entre Grupos.

GRUPO	0	A	B
0	-0,58960	-0,17347	-0,15069
A	-0,17347	-0,53968	-0,51642
B	-0,15069	-0,51642	-0,51905

Se observó una diferencia estadísticamente significativa para la concentración en plasma de albúmina (Tabla 19) en el Grupo B respecto al Grupo 0.

Tabla 19: Test de Tukey-Kramer HSD para la albúmina en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

GRUPOS	0	A	B
0	-0,41490	-0,14590	0,10360
A	-0,14590	-0,41490	-0,16540
B	0,10360	-0,16540	-0,28631

En cuanto a los valores sanguíneos de urea y creatinina, se ha observado un incremento significativo (Tablas 17, 20 y 21) para los caballos con enfermedades sistémicas respecto a los controles. La mayoría de estos pacientes presentaban cuadros de cólico acompañados de deshidratación e hipovolemia.

Tabla 20: Test de Tukey-Kramer HSD para la creatinina en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupo.

GRUPOS	B	A	0
B	-0,32394	-0,05226	0,07010
A	-0,05226	-0,34146	-0,21869
0	0,07010	-0,21869	-0,37405

Tabla 21: Test de Tukey-Kramer HSD para la urea en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupo.

GRUPOS	B	0	A
B	-8,967	-3,688	5,054
0	-3,688	-10,354	-1,644
A	5,054	-1,644	-9,452

V.1.6. Concentración plasmática de hierro y lactato

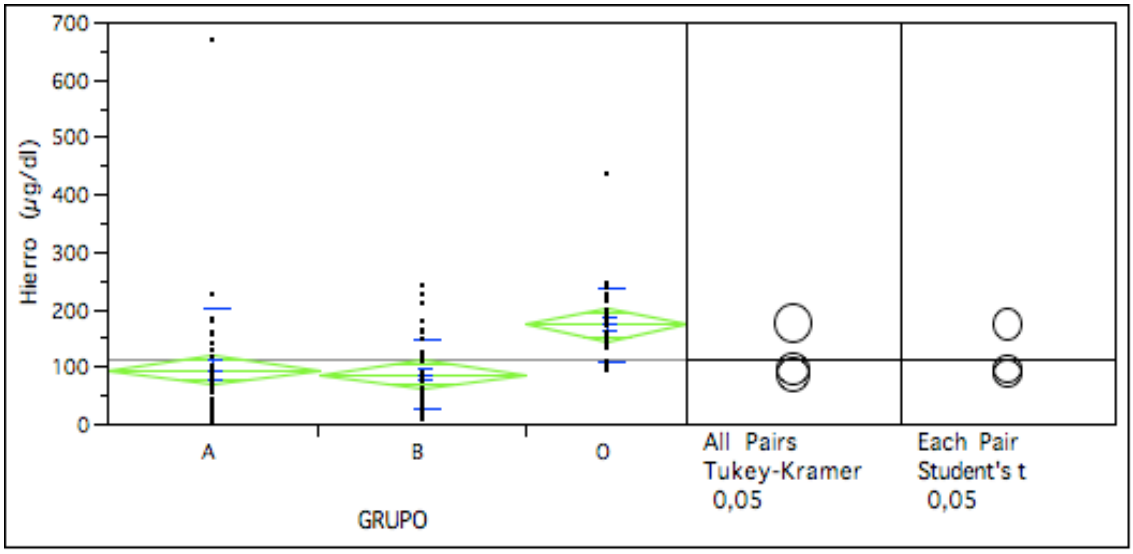
La Tabla 22 refleja la media y la desviación estándar para la concentración plasmática de hierro y lactato en los diferentes Grupos:

Tabla 22: Valor medio y desviación estándar correspondiente a la concentración plasmáticas de hierro y de lactato

GRUPOS	GRUPO 0	GRUPO A	GRUPO B
HIERRO (µg/dL)	173,58 ± 63,21	95,22 ± 107,92	86,37 ± 60,31
LACTATO (mmol/L)	1,3 ± 0,53	1,22 ± 0,51	3,36 ± 0,47

Los valores del hierro plasmático obtenidos para los caballos enfermos (Grupos A y B) fueron significativamente menores que los obtenidos en los animales del Grupo Control (Tablas 22 y 23).

No existen diferencias significativas (Gráfica 19) entre los valores obtenidos en los caballos del Grupo con enfermedades sistémicas (Grupo A) y los del Grupo con lesiones localizadas (Grupo B).

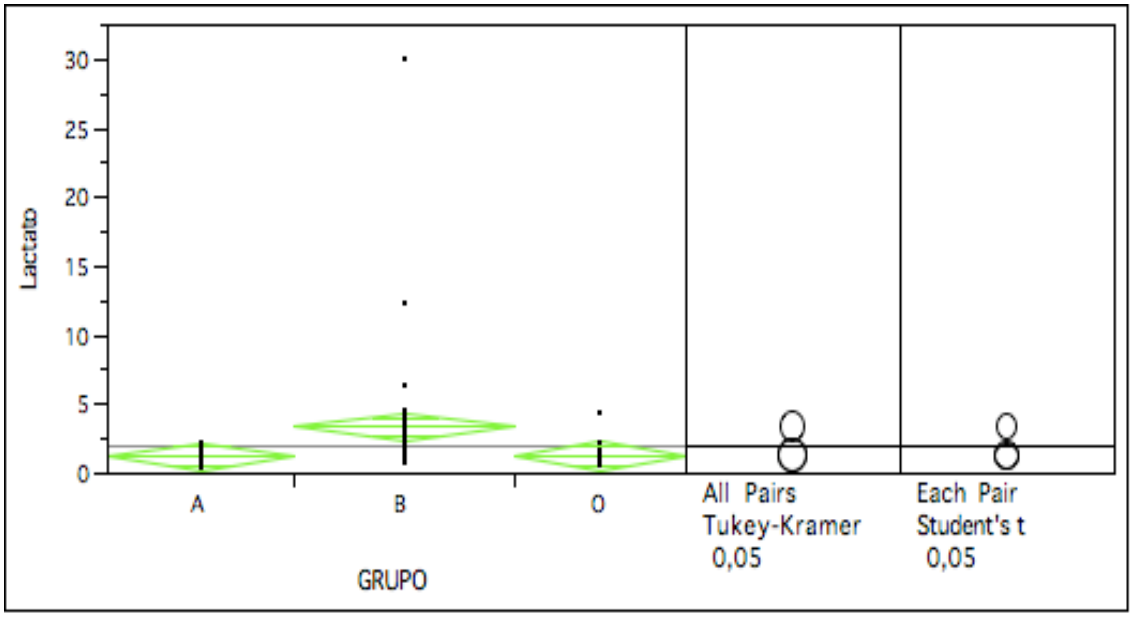


Gráfica 19: Gráfica que representa el porcentaje de hierro de los tres Grupos estudiados. En las columnas de la derecha se representan los resultados obtenidos con el test de Tukey-Kramer y la comparación con el test de T de Student ($p<0,05$).

Tabla 23: Test de Tukey-Kramer HSD para la concentración plasmática de hierro en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias significativas entre Grupos.

GRUPOS	O	A	B
O	-49,315	32,151	40,747
A	32,151	-42,881	-34,304
B	40,747	-34,304	-43,414

En cuanto a la concentración plasmática de lactato, existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres Grupos (Gráfica 20, Tablas 22 y 24), correspondiendo el valor medio más elevado a los caballos con afectaciones sistémicas (Grupo B).

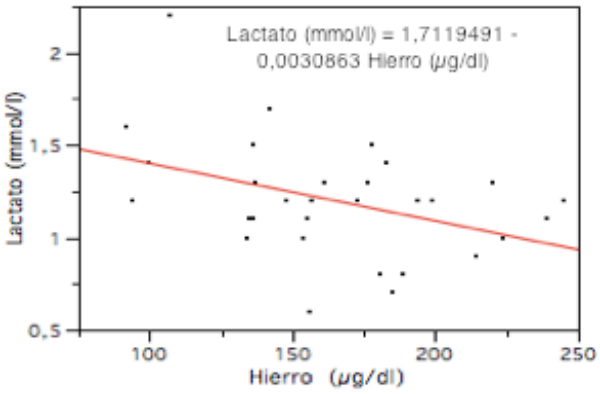


Gráfica 20: Gráfica que representa el porcentaje de lactato de los tres Grupos estudiados. En las columnas de la derecha se representan los resultados obtenidos con el test de Tukey-Kramer y la comparación con el test de T de Student ($p<0,05$).

En este estudio, los caballos que presentaban las concentraciones de lactato más elevadas se correspondieron con los que presentaban las patologías más graves (torsión de colon, peritonitis, enteritis y colitis) y exceptuando el caballo número 28 del Grupo B (Tabla 2), cuya concentración de hierro era casi fisiológica (90 µg/dL), el resto de los animales presentaban una relación inversamente proporcional entre los valores de hierro y lactato (Gráfica 25).

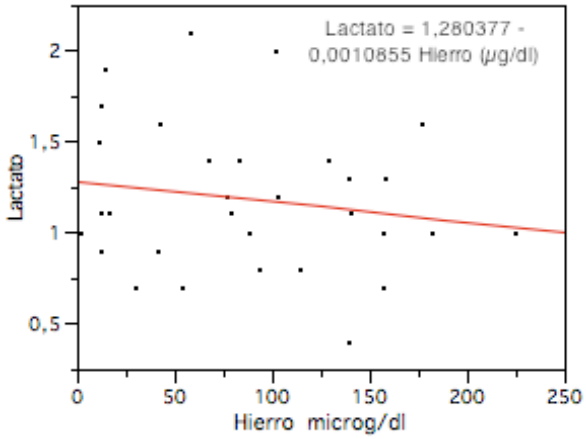
Tabla 24: Test de Tukey-Kramer HSD para la concentración plasmática de lactato en los tres Grupos estudiados. Los resultados positivos indican diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

GRUPOS	B	O	A
B	-1,5928	0,3516	0,4742
O	0,3516	-1,8093	-1,6892
A	0,4742	-1,6892	-1,7276



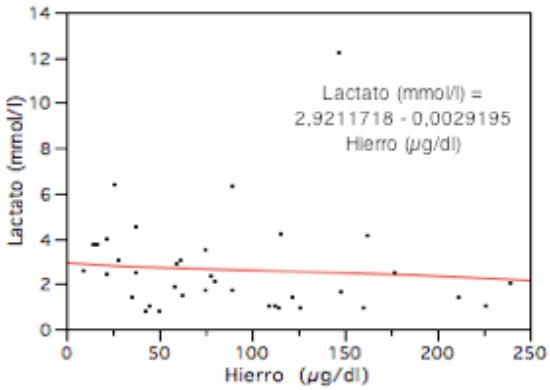
Gráfica 25: Comparación de los valores de lactato e hierro para el Grupo control mediante análisis de correlación y recta de regresión.

Cuando se comparan los valores de hierro y lactato en sangre en cada animal de forma conjunta, se observa que en los caballos sanos existe una tendencia a que, cuando desciende la concentración de hierro, aumenta la de lactato. En la Gráfica 25 se puede apreciar que los caballos que presentaban los valores más elevados de lactato también presentaban los valores de hierro en sangre más bajos.



Gráfica 26: Comparación de los valores de lactato e hierro para el Grupo A mediante análisis de correlación y recta de regresión.

En el Grupo de animales con patologías localizadas (Grupo A), la tendencia no es tan evidente como en el Grupo Control. La media de la concentración de hierro era estadísticamente menor que la de los animales del Grupo Control (Gráfica 26); sin embargo, no existieron diferencias estadísticamente significativas en los valores del lactato.



Gráfica 27: Comparación de los valores de lactato e hierro para el Grupo B mediante análisis de correlación y recta de regresión.

En el Grupo de animales con patologías sistémicas (Grupo B), tampoco existe una tendencia evidente a la disminución del hierro con el incremento del lactato. En este Grupo se encuentran animales con valores muy elevados de lactato (un animal presentó más de 12 mmol/L a su llegada al Hospital), y sin embargo el hierro estaba dentro de los límites fisiológicos. En la nube de puntos se observa que en la mayoría de los animales que presentaban valores altos de lactato, el hierro estaba por debajo de los límites establecidos como fisiológicos (Gráfica 27).

V.2. ESTUDIO II: CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HIERRO EN CABALLOS CON ALTERACIONES GASTROINTESTINALES DE ORIGEN INFLAMATORIO, OBSTRUCTIVO Y ESTRANGULANTE

No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los Grupos con alteraciones intestinales, aunque sí la presentaron respecto al Control (Tabla 25).

Tabla 25: Valor medio con su correspondiente desviación estándar de los parámetros laboratoriales evaluados obtenidos en la admisión de los pacientes. WBC: recuento de leucocitos; C: Grupo control; IL: procesos inflamatorios de intestino grueso; OL: procesos obstructivos de intestino grueso; SL: procesos estrangulantes de intestino grueso; IS: procesos inflamatorios de intestino delgado; SS: procesos estrangulantes de intestino delgado; OS: procesos obstructivos de intestino delgado.[a,b]: Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

GRUPO	WBC (Cel/µL)	FIBRINÓGENO (mmol/L)	HIERRO (µg/dL)	LACTATO (mmoL/L)
CONTROL	8.324,87 ± 2.062,43	217,95 ± 102,27[a]	156,89 ± 47,51[a]	1,25 ± 0,58[a]
IL	4.410,00 ± 3.631,94	564,54 ± 394,49[b]	65,55 ± 43,08[b]	3,15 ± 1,52
IS	8.208,67 ± 3.360,60	453,33 ± 324,84[b]	84,93 ± 61,25[b]	4,30 ± 2,63[b]
OL	8.128,41 ± 2.722,85	477,27 ± 299,50[b]	99,98 ± 77,27[b]	2,21 ± 1,78
OS	9.166,67 ± 901,85	733,33 ± 208,16[b]	100,67 ± 71,59[b]	3,20 ± 1,47
SL	9.192,86 ± 3.947,60	614,28 ± 302,37[b]	73,00 ± 64,59[b]	4,73 ± 2,84[b]
SS	7.957,03 ± 4.988,44	510,81 ± 321,98[b]	61,51 ± 46,74[b]	4,76 ± 2,46[b]

La concentración plasmática de hierro (Tabla 25) fue menor en los caballos del Grupo SS (61,51 ± 46,74 µg/dL), seguido de los caballos del Grupo IL (65,55 ± 43,08 µg/dL) y del Grupo SL (73,00 ± 64,59 µg/dL) cuando se compara con los caballos incluidos en el Grupo IS (84,93 ± 61,25 µg/dL), OL (OL: 99,98 ± 77,27 µg/dL) y OS (OS: 100,67 ± 71,59 µg/dL). Todos los caballos incluidos en los Grupos con patologías clínicas mostraron concentraciones plasmáticas de hierro inferiores al Grupo Control (156,89 ± 47,51 µg/dL). Además, los caballos no supervivientes mostraron concentraciones plasmáticas de hierro significativamente menores que los supervivientes (NS: 52,64 ± 42,05 µg/dL; S: 100,09 ± 69,34 µg/dL) (Tabla 26).

Tabla 26: Valor medio con su correspondiente desviación estándar de los parámetros laboratoriales evaluados obtenidos en función de la evolución de la enfermedad. WBC: recuento de leucocitos; NS: "no supervivientes"; S: "supervivientes", C: "Grupo Control". [a,b,c]: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

EVOLUCIÓN	HIERRO (µg/dL)	LACTATO (mmol/L)	FIBRINÓGENO (mmol/L)	WBC (Cel/µL)
NS	52,64 ± 47,51[a]	4,72 ± 2,36[a]	559,79 ± 378,33	6.934,68 ± 2.062,44
S	100,09 ± 69,34[b]	2,79 ± 2,16[b]	472,86 ± 304,99	8.423,14 ± 3.019,47
C	156,89 ± 47,51[c]	1,25 ± 0,58[c]	217,95 ± 102,26	8.324,87 ± 2.062,43

Se observaron concentraciones elevadas de lactato en todos los Grupos clínicos, observándose las mayores concentraciones en los caballos incluidos en el Grupo SS (4,76 ± 2,56 mmol/L) y SL (4,73 ± 2,83 mmol/L), seguidos por los incluidos en el Grupo IS (4,30 ± 2,62 mmol/L) (Tabla 25).

Los caballos que no sobrevivieron mostraron concentraciones plasmáticas de lactato significativamente superiores comparados con los supervivientes (NS: 4,72 ± 2,36 mmol/L; S: 2,79 ± 2,16 mmol/L) (Tabla 26).

La concentración de fibrinógeno fue inferior en el Grupo IS (453,33 ± 324,84 mmol/L), mientras que las concentraciones más elevadas se observaron en los Grupos OS (733,33 ± 208,16 mmol/L), SL (614,28 ± 302,37 mmol/L) y IL (564,54 ± 394,49 mmol/L); sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 25).

Considerando la evolución, las concentraciones de fibrinógeno no fueron significativamente diferentes entre supervivientes y no supervivientes (S: 472,86 ± 304,99 mmol/L; NS: 559,79 ± 378,33 mmol/L) (Tabla 26).

Con respecto al recuento de leucocitos (WBC), no se aprecian diferencias significativas entre los Grupos (Tabla 25), a pesar de que el Grupo IL mostró los recuentos más bajos (4.410,00 ± 3.631,94 cel/µL). Además, tampoco se observaron diferencias significativas en los recuentos cuando se compararon los resultados en función de la evolución (Tabla 26).

Además, se apreciaron diferencias significativas para el valor hematocrito siendo la media más elevada en el Grupo IS (50,99 ± 9,49%) y la inferior en el Grupo OL (36,83 ± 5,29%).

En cuanto a los resultados del resto de los parámetros estudiados en función de la patología que presentaban en el momento de ingreso en el Hospital, existieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de proteínas totales, observándose las más elevadas en el Grupo OS (7,80 ± 1,38 g/dL) e IS (7,45 ± 1,23 g/dL), y la más baja en el Grupo IL (5,99 ± 1,02 g/dL). También se observaron diferencias estadísticamente significativas para la frecuencia cardiaca, donde se observaron los valores más elevados en el Grupo SL (76,00 ± 26,93 ppm) e IL (73,45 ± 26,30 ppm), y los más bajos en el Grupo OL (57,73 ± 14,41 ppm). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los parámetros analizados (Tabla 27).

Tabla 27: Valor medio con su correspondiente desviación estándar obtenido en el momento de admisión de los diferentes parámetros analizados en función de la clasificación de las patologías diagnosticadas. IL: procesos inflamatorios de intestino grueso, OL: procesos obstructivos de intestino grueso, SL: procesos estrangulantes de intestino grueso, IS: procesos inflamatorios de intestino delgado, SS: procesos estrangulantes de intestino delgado, y OS: procesos obstructivos de intestino delgado. FC: Frecuencia Cardiaca; FR: Frecuencia Respiratoria; Tª: Temperatura; Hto: hematocrito; PT: proteínas Totales. Las unidades para cada parámetro analizado fueron las siguientes: [a]: diferencias estadísticamente significativas. ($p < 0.05$).

GRUPO	FC (ppm)	FR (rpm)	Tª (ºC)	HTO (%)	PT (g/dL)
IL	73,45 ± 26,31[a]	25,82 ± 11,36	38,30 ± 0,60	47,88 ± 10,57	5,99 ± 1,02[a]
IS	68,93 ± 17,55	27,20 ± 13,02	38,35 ± 0,72	50,99 ± 9,49[a]	7,45 ± 1,23[a]
OL	57,73 ± 14,41	24,27 ± 10,89	37,95 ± 0,66	36,83 ± 5,29	6,79 ± 0,79
OS	64,00 ± 35,55	29,33 ± 26,63	37,99 ± 0,18	39,07 ± 7,18	7,80 ± 1,38[a]
SL	76,00 ± 26,93[a]	30,86 ± 17,85	37,73 ± 0,30	41,27 ± 6,07	6,20 ± 1,14
SS	65,84 ± 16,73	31,35 ± 16,63	37,86 ± 1,15	47,72 ± 9,81	6,71 ± 1,60

En función de la evolución clínica, se observaron diferencias significativas entre Grupos para la frecuencia cardíaca (S: 58,14 ± 14,49 ppm; NS: 73,87 ± 20,78 ppm), frecuencia respiratoria (S: 24,09 ± 12,21 rpm; NS: 32,72 ± 15,31 rpm) y valor

hematocrito (S: 39,96 ± 8,15%; NS: 48,70 ± 9,78%) en el momento de admisión (Tabla 28).

Tabla 28: Valor medio con su correspondiente desviación estándar obtenido en función de la evolución. NS: no supervivientes, S: supervivientes. Hto: hematocrito; PT: proteínas totales; FC: Frecuencia Cardiaca; FR: Frecuencia Respiratoria; T[a]: Temperatura rectal. [a,b]: diferencias estadísticamente significativas. ($p < 0,05$).

PRONÓSTICO	HTO (%)	PT (g/dL)	FC (ppm)	FR (rpm)	T (ºC)
NS	48,70 ± 9,78[a]	6,66 ± 1,40	73,87 ± 20,78[a]	32,72 ± 15,31[a]	38,11 ± 1,04
S	39,96 ± 8,15[b]	6,82 ± 1,15	58,14 ± 14,49[b]	24,09 ± 12,21[b]	37,92 ± 1,04

V.3. ESTUDIO III: CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE TROPONINA CARDIACA I (cTnI) Y DÍMERO D COMO MARCADORES DE PRONÓSTICO EN CABALLOS CRÍTICOS

El método evaluado mostró una buena linealidad y coeficiente de variación intra-análisis. Los límites de detección fueron suficientemente bajos para cuantificar concentraciones de cTnI y Dímero D en caballos sanos y enfermos. Los resultados obtenidos del estudio de la precisión se muestran en la Tabla 29. Para los valores de las cTnI, la variación intra-análisis mostró un coeficiente de variación (CV) de 1,7% para muestras con altas concentraciones. Respecto al Dímero D, el CV intra-análisis obtenido fue de 6,5% para muestras con altas concentraciones. El rango de mediciones para el análisis del Dímero D fue de 80 – 15.100 ng/mL y el límite de detección de 80 ng/mL. El rango de medidas para los análisis de cTnI fue de 0,010 –1,2 µg/mL y el límite de detección de 0,010 µg/mL. Los resultados obtenidos procedentes de las diluciones de las muestras de plasma con concentraciones más elevadas de cTnI y Dímero D mostraron para ambos parámetros ecuaciones de regresión lineal con un coeficiente de correlación en torno al 0,99 (Tabla 30; Figuras 18 y 19).

Tabla 29: Valores intra-ensayo obtenidos para los Dímero D y cTnI en muestras de plasma con altas concentraciones para ambos parámetros.

Parámetro	Pool n=5	Intra ensayo		
		X	SD	CV%
Dímero D	3.460	3.460	65,57	6,5%
cTnI	0,39	0,36	0,017	1,7%

Tabla 30: Valores medios obtenidos para las muestras de cTnI y Dímero D en diferentes diluciones (1:2–1:112 para cTnI y 1:2-1:56 para Dímero D).

	DILUCIONES	1:2	1:4	1:8	1:16	1:24	1:48	1:56	1:112
cTnI		0,31	0,14	0,074	0,029	0,021	0,012	0,014	<0,010
Dímero D		4.090	2.210	1.110	579	298	147	<80	

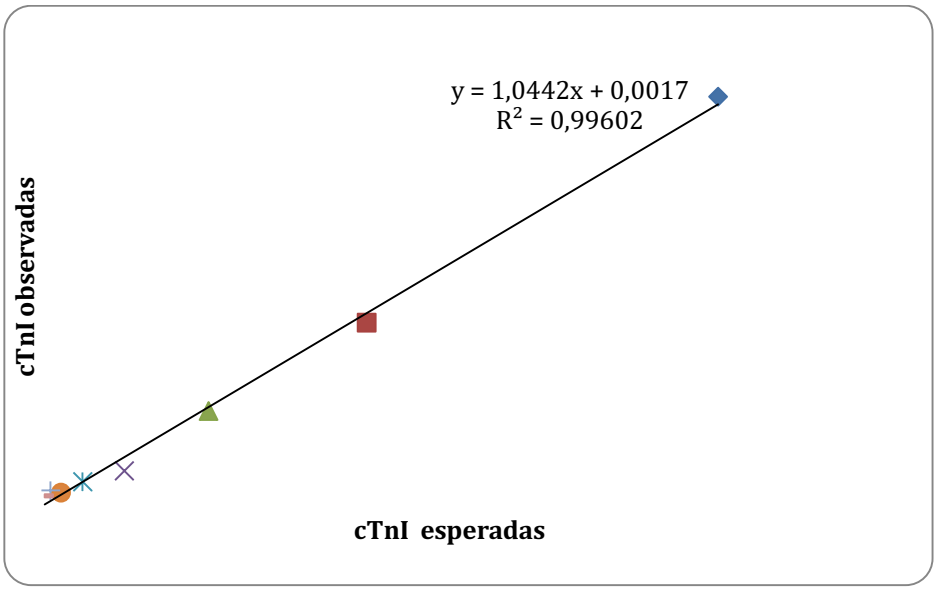


Fig. 18: Estudio de linealidad mediante diluciones de dos muestras de plasma que contenían altas concentraciones de cTnI .

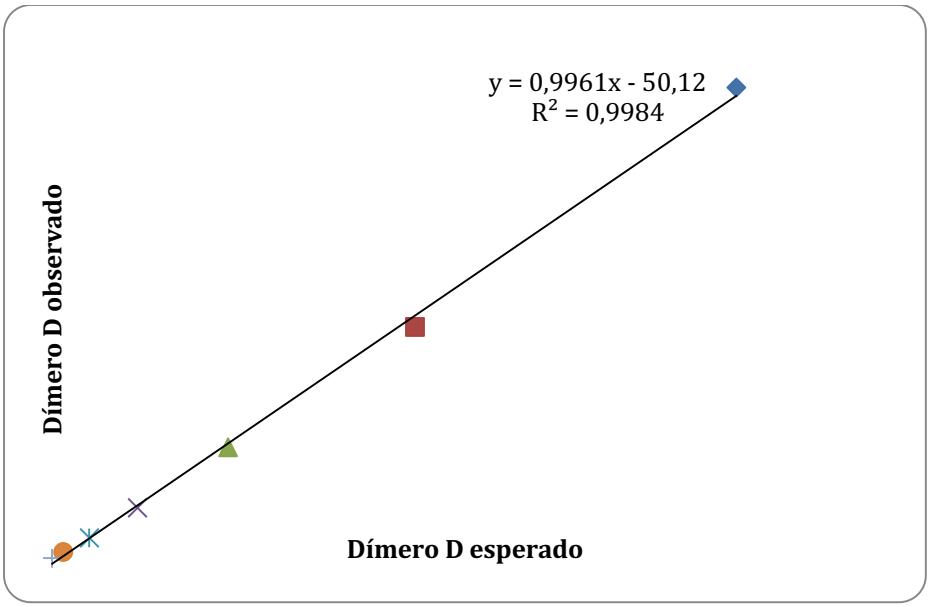


Fig. 19: Estudio de linealidad mediante diluciones de dos muestras de plasma que contenían altas concentraciones del Dímero D.

Tabla 31: Relación de parámetros clínicos y laboratoriales en el momento de admisión. SIS: lesión estrangulante de intestino delgado; SIO: lesión obstructiva de intestino delgado; RDD: desplazamiento dorsal derecho con afectación de intestino delgado; CT: Torsión de colon mayor.

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	EVOLUCIÓN	cTnI (µg/mL)	DÍMERO D (ng/mL)	LACTATO (mmol/L)	FIBRINOGENO (mg/dL)	HTO (%)	WBC (cel/µL)	HR (ppm)
1	Colitis	Superviviente	0,99	1.090	3,2	215	44%	5.000	64
2	Enteritis	Superviviente	0,62	793	7,2	1.200	46%	11.300	72
3	SIS	Superviviente	0,01	412	8,6	850	46%	10.600	60
4	RDD	Superviviente	0,014	2.340	3,1	900	43%	11.200	76
5	SIO	Superviviente	0,01	107	2,1	901	38%	8.300	36
6	RDD	Superviviente	0,01	979	6,2	130	38%	9.400	96
7	Enteritis	Superviviente	0,064	1.090	1,8	122	45%	8.600	80
8	Fecolito	Superviviente	0,031	3.930	1	630	33%	4.500	64
9	RDD	Superviviente	0,12	214	5,8	203,1	35%	7.800	60
10	Enteritis	No superviente	0,83	1.270	5,9	211,4	47%	6.500	88
11	SIS	No superviente	0,022	296	8,2	109,5	46%	4.600	64
12	Colitis	No superviente	0,11	323	2	1.086,2	50%	1.800	80
13	SIS	No superviente	0,021	1.710	8,5	192,2	47%	3.100	92
14	SIS	No superviente	0,61	1.740	2,1	910	35%	7.300	80
15	SIS	No superviente	0,013	5.210	10,3	1.354	44%	7.200	60
16	SIS	No superviente	1	2.230	5,1	327	50%	18.300	71
17	Colitis	No superviente	0,3	2.660	4,5	1.400	51%	8.800	80
18	SIS	No superviente	0,01	234	6	843,8	28%	11.300	60
19	Enteritis	No superviente	4,3	2.300	1,6	193,3	28%	12.700	64
20	SIS	No superviente	0,014	261	5,1		44%	19.400	80
21	SIS	No superviente	0,01	1.130	2,8	630	37%	12.100	60
22		Control	0,053	103	0,8	201	34%	7.400	36
23		Control	0,01	95	1,2	273	37%	7.500	40
24		Control	0,01	<80	1	165	32%	6.000	36
25		Control	0,01	164	1,1	170	24%	7.200	36
26		Control	0,01	<80	2,2	171,5	38%	8.600	44
27		Control	0,01	<80	1,4	160	30%	8.400	36
28		Control	0,011	140	1,1	156,4	34%	15.500	44
29		Control	0,01	137	0,8	210	38%	11.400	36
30		Control	0,01	<80	1,2	155	36%	10.500	40
31		Control	0,01	92	1,7	163,6	34%	7.600	36

La concentración media de cTnI en plasma fue significativamente más elevada en el Grupo de animales enfermos en comparación con los sanos (Grupo de caballos enfermos: 0,51 ± 0,97 µg/mL; Grupo Control: 0,01 ± 0,97 µg/mL; Tablas 31 y 32). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre

supervivientes y no supervivientes en el momento de admisión (Supervivientes: 0,27 ± 0,37 µg/mL; No supervivientes: 0,60 ± 1,21 µg/mL; Grupo Control: 0,014 ± 0,01 µg/mL; Figura 20).

Tabla 32: Concentración de cTnI y Dímero D en el momento de la admisión. D: Grupo de caballos con enfermedad; C: Grupo Control. [a,b]: diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05).

	GRUPOS	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR
cTnI (µg/mL)	D	20	0,51370[a]	0,970260
	C	10	0,01440[b]	0,013566
Dímero D (ng/mL)	D	20	1.299,55[a]	1.318,065
	C	10	105,10[b]	30,737

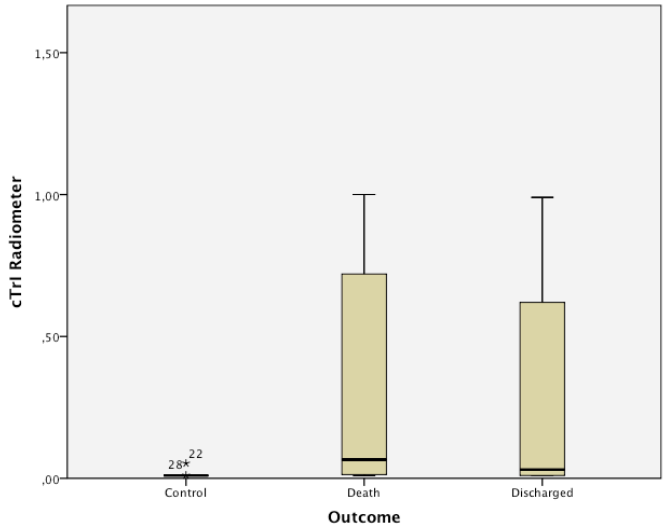


Fig 20: Concentración de cTnI (µg/ml) en caballos sanos (n = 10) y en caballos con signos clínicos de SRIS (n = 21), divididos en supervivientes y no supervivientes en el momento de admisión. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con un asterisco (p < 0,05).

Tampoco se observaron diferencias significativas entre los Grupos en función de la naturaleza de la enfermedad (procesos inflamatorios, obstructivos o estrangulantes (Figura 21). Tras la hospitalización, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre Grupos (I: 0,56 ± 1,48 µg/mL, S: 0,34 ± 0,77 µg/mL, O: 0,02 ± 0,01 µg/mL).

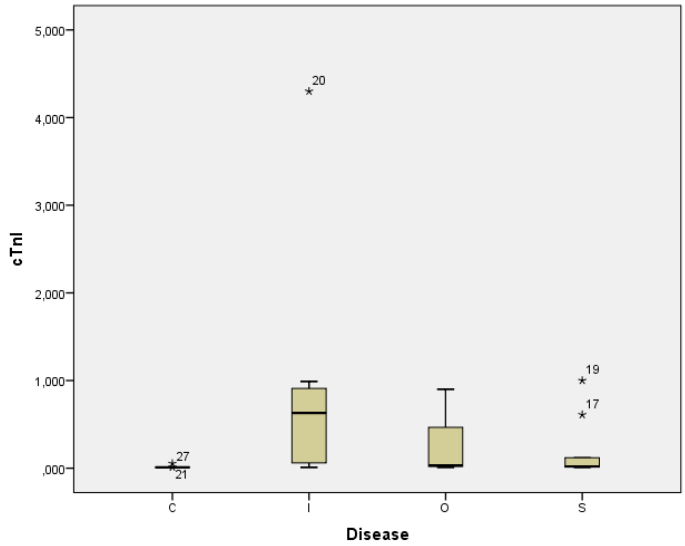


Fig 21: Concentración de cTnI (µg/ml) en función de la naturaleza de la enfermedad. C: Grupo Control, I: enfermedades inflamatorias; O: enfermedades obstructivas; S: enfermedades estrangulantes. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con un asterisco ($p < 0.05$).

La concentración media de Dímero D fue significativamente superior en los caballos enfermos en comparación con el Grupo Control (Grupo con enfermedades: 1.299,55 ± 1.318,065 ng/mL; Grupo Control: 105,10 ± 30,74 ng/mL; Tabla 32) pero no existieron diferencias estadísticamente significativas entre supervivientes y no supervivientes en el momento de la admisión (Supervivientes: 1.217,22 ± 1.213,28 ng/mL; No supervivientes: 1.613,67 ± 1.426,75 ng/mL; Grupo Control: 104,90 ± 30,82 ng/mL; Figura 22).

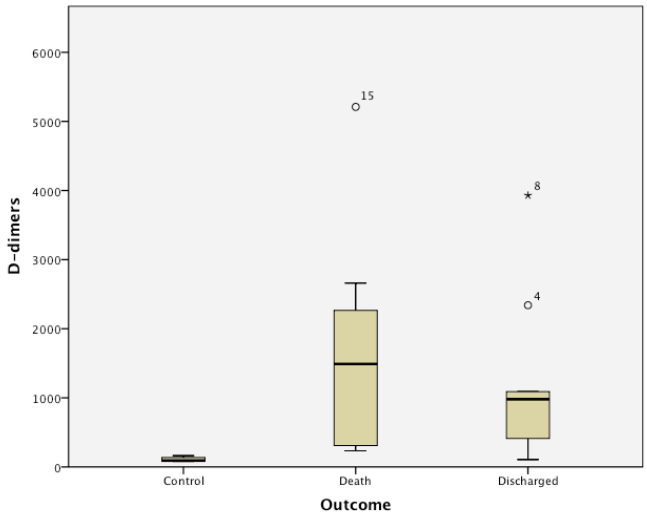


Fig 22: Concentración de Dímero D (ng/mL) en caballos sanos (n = 10) y en caballos con signos clínicos de SRIS (n = 21) divididos en supervivientes y no supervivientes en el momento de admisión. La línea en

el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con un asterisco ($p < 0.05$).

El valor medio correspondiente a la concentración de cTnI en el Grupo de supervivientes (0,04 ± 0,06 µg/mL) en comparación con los no supervivientes (0,70 ± 1,47 µg/mL) no fue estadísticamente diferente en la última muestra analizada (Figura 23, tablas 33, 34, 35 y 36). La media observada de la concentración de Dímero en los caballos supervivientes (958,80 ± 686,65 ng/mL) tampoco fue significativamente diferente a la de los no supervivientes (1.875,30 ± 801,83 ng/mL) en la última muestra analizada (Figura 24, Tablas 33, 34 y 35).

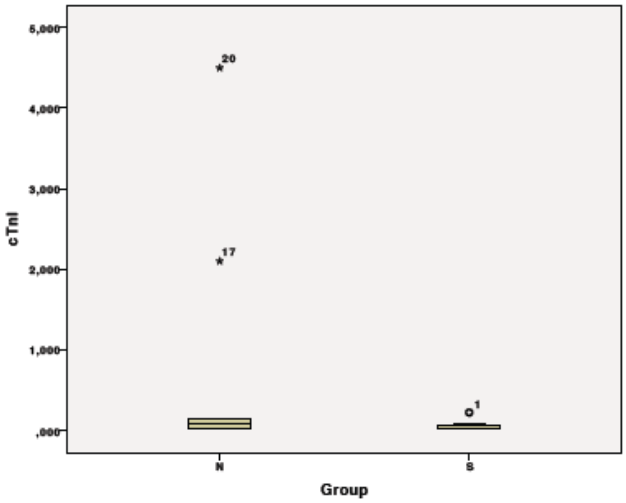


Fig 23: Concentración de cTnI (µg/mL) en caballos con signos clínicos de SRIS (n = 21) divididos entre supervivientes y no supervivientes en la última muestra obtenida. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con un asterico ($p < 0,05$).

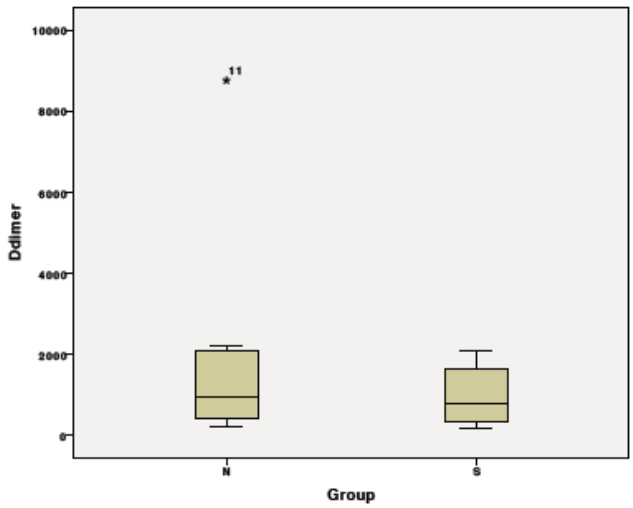


Fig 24: Concentración de Dímero D (ng/mL) en caballos con signos clínicos de SRIS (n = 21) divididos entre supervivientes y no supervivientes en la última muestra recogida. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con un asterico ($p < 0,05$).

Tabla 33: Concentración de cTnI y Dímero D en el Grupo de no supervivientes.

	EN ADMISIÓN	ÚLTIMA MUESTRA
cTnI (µg/mL)	0,60 ± 1,21	0,70 ± 1,47
Dímero D (ng/mL)	1.613,67 ± 1.426,75	1.875,30 ± 801,83

Tabla 34: Concentración de cTnI y Dímero D en el Grupo de supervivientes.

	EN ADMISIÓN	ÚLTIMA MUESTRA
cTnI (µg/mL)	0,27 ± 0,37	0,04 ± 0,06
Dímero D (ng/mL)	1.217,22 ± 1.213,28	958,80 ± 686,65

Tabla 35: Concentración de cTnI y Dímero D en función de la evolución en el momento de admisión

	CONTROL	SUPERVIVIENTES	NO SUPERVIVIENTES
cTnI (µg/mL)	0,014 ± 0,01	0,27 ± 0,37	0,60 ± 1,21
Dímero D (ng/mL)	104,90 ± 30,82	1.217,22 ± 1.213,28	1.613,67 ± 1.426,75

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de Dímero D entre Grupos dependiendo del proceso diagnosticado (Figura 25, Tabla 36), aunque se observó una diferencia estadísticamente significativa con el Grupo Control en el momento del ingreso (Grupo Control: 104,90 ± 30,82 ng/mL, I: 909,78 ± 651,39 ng/mL, S: 1.483,00 ± 1.762,68 ng/mL, O: 1.855,50 ± 1.646,46 ng/mL). No existieron diferencias estadísticas entre Grupos tras la hospitalización (I: 1.565,11 ± 2.733,88 ng/mL, S: 1.288,14 ± 8.19,24 ng/mL, O: 1.309,50 ± 842,10 ng/mL)

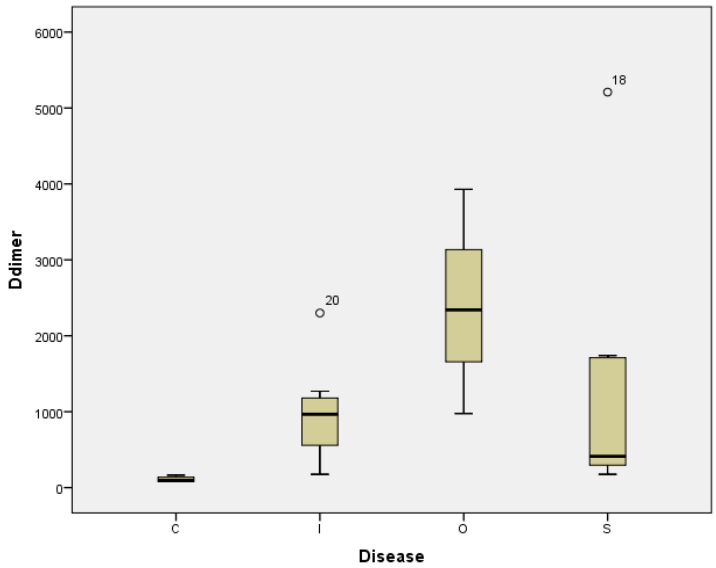


Fig 25: Concentración de Dímero D (ng/mL) en función de la naturaleza de la enfermedad. C: Grupo Control, I: enfermedades inflamatorias; O: enfermedades obstructivas; S: enfermedades estrangulantes. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con un asterisco. ($p < 0.05$). La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con un círculo ($p < 0,05$).

Tabla 36: Concentración de cTnI y Dímero D en el momento de admisión en relación con la enfermedad diagnosticada. S: lesión estrangulante; O: lesión obstructiva e I: lesión inflamatoria.

	GRUPO S	**GRUPO I**	**GRUPO 0**
cTnI (µg/mL)	0,26 ± 0,39	0,83 ± 1,35	0,24 ± 1,44
Dímero D (ng/mL)	1.483,00 ± 1.762,68	909,78 ± 651,39	1.855,50 ± 1.646,46

V.4. ESTUDIO IV: EVALUACIÓN DE LA EOSINOPENIA COMO MARCADOR DE ENDOTOXEMIA EN CABALLOS CRÍTICOS

De los 25 caballos con lesiones inflamatorias, 9 fueron eutanasiados y 16 sobrevivieron. De los 18 caballos con lesiones estrangulantes, 8 sobrevivieron y 10 fueron eutanasiados. De los 18 caballos con lesiones obstructivas 16 sobrevivieron y 2 fueron eutanasiados. Finalmente, en el Grupo de caballos con lesiones no estrangulantes ni inflamatorias, como por ejemplo, úlceras de estómago y otras patologías similares, los 8 caballos sobrevivieron.

El porcentaje de supervivientes en el Grupo A (caballos con SRIS) fue de 81,48% (22 supervivientes y 5 no supervivientes) y de 61,9% en el Grupo B, o caballos con signos clínicos de endotoxemia (26 supervivientes y 16 no supervivientes). La tasa de mortalidad en el Grupo A fue del 18,52 %, y del 38,1% en el Grupo B.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los caballos con SRIS (Grupo A) y con endotoxemia (Grupo B) en el recuento de eosinófilos (Tabla 38, Figuras 28 y 30). No existieron diferencias significativas entre Grupos en el recuento total de glóbulos blancos ($P < 0.05$) siendo la media 8.228,46 ± 422,55 cel/μL en el Grupo A y de 7.562,86 ± 771,510 cel/μL en el Grupo B (Tabla 38).

Los caballos incluidos en el Grupo B tuvieron un recuento de eosinófilos significativamente inferior que los incluidos en el Grupo A (Grupo A: 116,77 ± 48,09 cel/μL; Grupo B: 3,03 ± 3,027 cel/μL). Así mismo, también se observó una diferencia estadística significativa para el recuento de eosinófilos entre supervivientes y no supervivientes, obteniéndose valores inferiores en el Grupo de no supervivientes (Figura 26). No se observaron diferencias entre ambos Grupos para el recuento total de leucocitos (Tabla 39).

La concentración plasmática de lactato fue significativamente diferente entre los caballos del Grupo A, es decir, aquellos con SRIS y los caballos del Grupo B o con signos clínicos de endotoxemia (Grupo A: 2,78 ± 0,31 mmol/L ; Grupo B: 5,4 ± 0,9 mmol/L) (Figuras 29 y 31). Respecto a la superviviencia, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre supervivientes y no supervivientes (Figura 27), siendo más elevadas en el Grupo de no supervivientes (Grupo control: 1,59 ± 1,1 mmol/L; Supervivientes: 2,24 ± 2,02 mmol/L; No supervivientes: 4,38 ± 3,4 mmol/L).

Tabla 38: Resultados obtenidos para los diferentes parámetros dependiendo del Grupo en el que fueron incluidos. Grupo A: caballos con SRIS, Grupo B: caballos con endotoxemia. Los resultados se expresan como media y desviación estándar.

GRUPOS	RECUENTO DE EOSINÓFILOS (cel/µl)	LACTATO (mmol/L)	WBC (cel/µL)
A	116,77 ± 48,09	2,78 ± 0,31	8.228,46 ± 422,55
B	3,03 ± 3,027	5,4 ± 0,9	7.562,86 ± 771,510

Tabla 39: Resultados obtenidos para los diferentes parámetros en función de la supervivencia. Los resultados se expresan como media y desviación estándar.

GRUPO	RECUENTO DE EOSINÓFILOS (Células/ µL)	LACTATO (mmol/L)	WBC (Cel/ µL)
CONTROL	238,10 ± 372,82	1,59±1,03	8.314,84±2.409,09
SUPERVIVIENTES	70,35 ± 188,88	2,24±2,02	9.110,42±5.663,82
NO SUPERVIVIENTES	21,05 ± 66,14	4,38±3,43	7.125,00±5.752,61

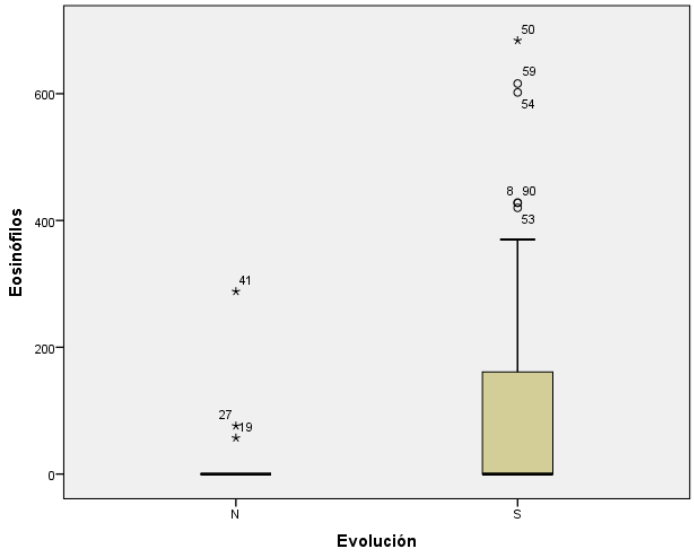


Fig 26. Recuento de eosinófilos en función de la evolución. N: no supervivientes: S: Supervivientes. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con asterisco y círculos. ($p < 0,05$).

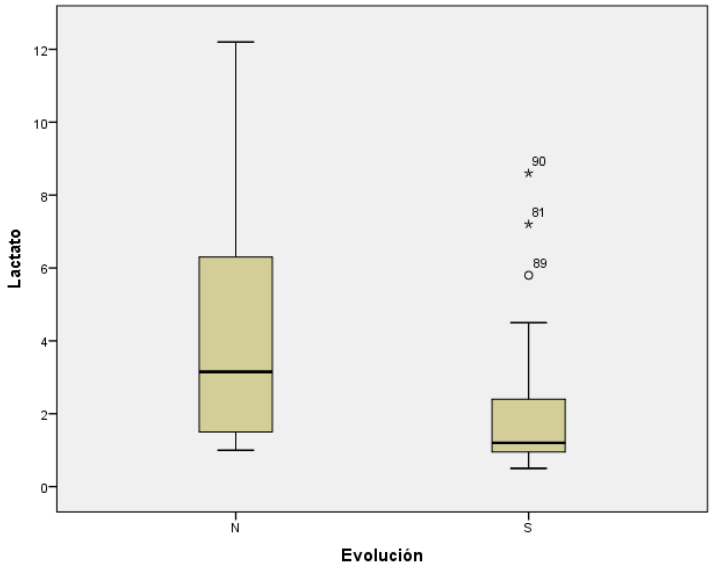


Fig 27. Concentración plasmática de lactato en función de la evolución. N: no supervivientes; S: supervivientes. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con asterisco y círculos ($p < 0,05$).

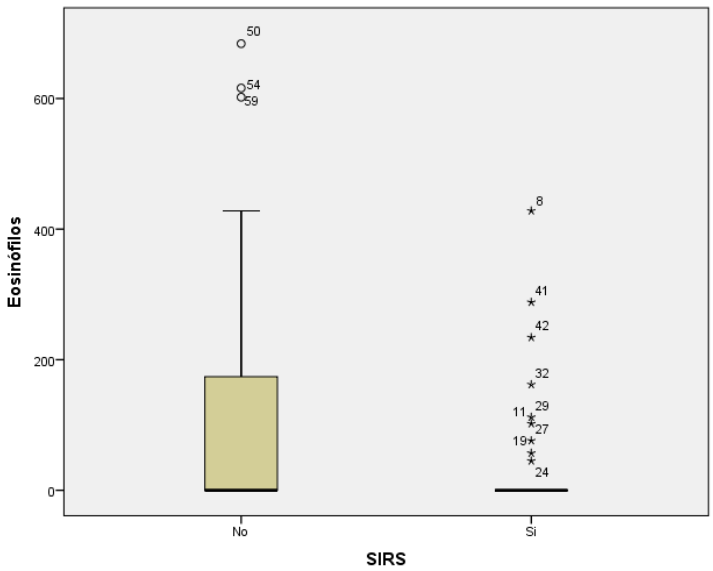


Fig. 28. Recuento de eosinófilos en función de la presencia de SRIS. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con asteriscos y círculos ($p < 0,05$).

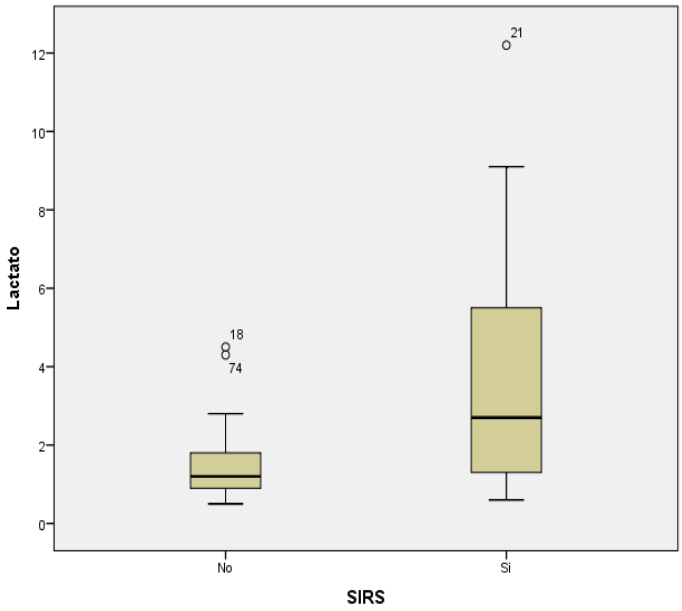


Fig. 29. Concentración plasmática de lactato en función de la presencia de SRIS. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con asteriscos y círculos ($p < 0,05$).

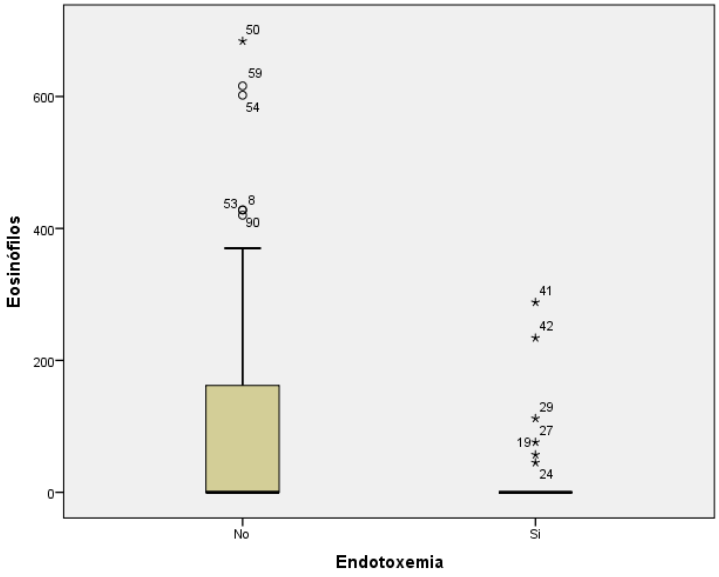


Fig. 30. Recuento de eosinófilos en función de la presencia de endotoxemia. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con asteriscos y círculos ($p < 0,05$).

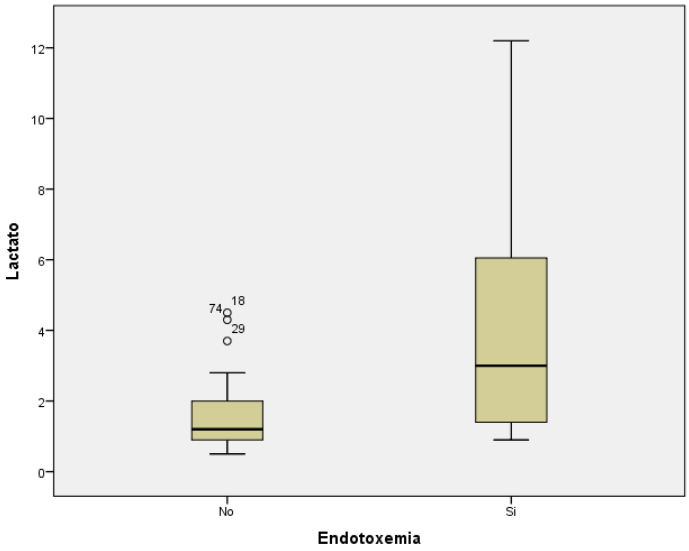


Fig. 31. Concentración plasmática de lactato en función de la presencia de endotoxemia. La línea en el interior del recuadro muestra la media, los percentiles 25th y 75th se reflejan en la caja y los percentiles 5th y 95th con los bigotes. Los individuos fuera de rango se expresan con asteriscos y círculos ($p < 0,05$).

VI. Discusión

VI.1. ESTUDIO I: VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HIERRO Y DE LACTATO COMO MARCADORES DE INFLAMACIÓN E ISQUEMIA EN EL CABALLO.

VI.1.1. Valoración de los parámetros clínicos

Los caballos con enfermedades sistémicas presentaban frecuencias cardíacas más elevadas que el Grupo con patologías localizadas (Grupo B: 55,80 ± 16,05 ppm; Grupo A: 46,62 ± 9,04 ppm; (Tabla 3), y las diferencias fueron más evidentes al comparar estos resultados con el Grupo Control (38,45 ± 4,46). Las diferencias entre los valores obtenidos para la frecuencia cardíaca se puede explicar por la liberación de catecolaminas por el dolor (Tousignant-Laflamme *et al.* 2005, Terkelsen *et al.* 2005), la endotoxemia (Godin *et al.* 1996, Lee *et al.* 1988) y/o la hipovolemia (Convertino y Baumgartner 1997, Triedman *et al*. 1993) que presentaban muchos de los pacientes incluidos en este Grupo.

La frecuencia respiratoria también fue significativamente más elevada en los caballos del Grupo con afectación sistémica (Grupo B: 24,97 ± 12,80 rpm) respecto a la observada en los Grupos A y 0 (Grupo A: 17,77 ± 4,91 rpm y Grupo 0: 14,32 ± 3,69 rpm). La presencia de problemas respiratorios primarios como RAO y neumonía, incrementan la frecuencia respiratoria de manera significativa. Otras causas de taquipnea en los caballos incluidos en este Grupo fueron: hipertermia (secundaria a fiebre, ejercicio y transporte), dolor (secundario a crisis abdominales, laminitis y miopatías), acidosis metabólica (en enterocolitis), shock (hipovolémico, cardiaco y endotóxico), anemia, dilatación gástrica y distensión abdominal. Estos resultados coinciden con los aportados por Wilson y Lofstedt, en 2009.

La temperatura rectal también fue significativamente más elevada en los caballos enfermos (Grupos A y B) respecto a los sanos (Grupo 0). Este resultado puede atribuirse al transporte (Carlson 1985), ya que los caballos de los Grupos A y B necesitaron ser transportados antes de la toma de muestras. Los caballos del Grupo Control (Grupo 0) no necesitaron transportarse antes de tomar las muestras y las constantes físicas; sin embargo, los animales de los Grupos A y B fueron examinados tras viajar desde sus respectivos lugares de origen y quizás el tiempo esperado para la toma de constantes no fue suficiente para que la temperatura volviera a la normalidad. Además, no se ha tenido

en cuenta la época del año en la que se tomaron las muestras, ya que en primavera (temporada reproductiva) y en verano el porcentaje de animales que presentan incremento de la temperatura rectal es mayor (Roth *et al.* 2006). Otra explicación es que muchos de los animales del Grupo B presentaban enfermedades sistémicas que cursan con fiebre (su presencia fue uno de los criterios de inclusión en este Grupo). Así mismo, algunos de los animales del Grupo A, presentaban patologías que pueden producir hipertermia o fiebre como por ejemplo artritis sépticas, algunas laceraciones y cistitis. La temperatura rectal también fue significativamente más elevada en los caballos enfermos (Grupos A y B) respecto a los sanos (Grupo 0).

VI.1.2. Valoración del hematocrito

El valor hematocrito se ha utilizado tradicionalmente como marcador del grado de deshidratación en animales con alteraciones gastrointestinales (Reeves *et al.* 1989). No se encontraron diferencias significativas entre los Grupos estudiados. Este hallazgo contradice lo aportado por Ihler *et al.* en 2004, que afirman que el hematocrito es uno de los parámetros a tener en cuenta como valor pronóstico en los animales cuando llegan al Hospital. A pesar de que el hematocrito representa el estatus cardiovascular del paciente (de gran importancia, sobretodo en animales con cólico) es un parámetro muy variable en el caballo, y depende de la raza, grado de estrés y nivel de entrenamiento.

Probablemente, los valores obtenidos para el hematocrito en nuestra población (predominantemente representada por caballos PRE y PSL) sean significativamente menos elevados que en otras regiones, donde los pacientes atendidos son predominantemente PSI, con valores normales más elevados (Muñoz *et al.* 2002, Andrews *et al*. 1995, Rose *et al.* 1983, Engelhardt 1977).

El hecho de que la extracción de las muestras se realizara en el momento de la llegada del animal al Hospital puede contribuir a justificar que los animales del Grupo A tuvieran valores similares como consecuencia del estrés y la consecuente contracción esplénica. Aunque los animales del Grupo Control no fueron transportados, pudieron padecer estrés en el momento de la recogida de muestras como consecuencia de la manipulación.

La desviación estándar de los Grupos A y B es manifiestamente más amplia que la del Grupo 0, de hasta 10,74 % en el Grupo B, lo que indica una variabilidad considerable para este parámetro en los animales enfermos. A título de ejemplo, en el Grupo Control

el valor máximo obtenido fue de 48,3% en un semental cruzado sano. En el Grupo A, fue del 46,7%, correspondiente al caballo número 37, un caballo entero, PRE, remitido al Hospital para someterse a una cirugía electiva como consecuencia de arpeo bilateral. En el Grupo B el valor máximo lo presenta el caballo número 31 (enteritis proximal y peritonitis), con un hematocrito del 64,55%.

VI.1.3. Valoración del fibrinógeno

No existen diferencias significativas en la concentración de fibrinógeno entre los tres Grupos. Estos datos coinciden parcialmente con los obtenidos por Borges *et al.* (2007), ya que estos autores tampoco encontraron diferencias entre caballos con lesiones localizadas y caballos sanos. Sin embargo concluyeron que el incremento de la concentración de fibrinógeno en caballos con enfermedades inflamatorias sistémicas está asociado a un mal pronóstico y que la concentración plasmática de hierro refleja mejor inflamatorios agudos. En un trabajo más reciente, se ha demostrado que el entrenamiento puede aumentar las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno y de haptoglobina, aunque no modifica el recuento de leucocitos (Fazio *et al.* 2010).

Durante las últimas décadas el fibrinógeno ha sido utilizado para diagnosticar y monitorizar diversas condiciones inflamatorias en el caballo (Newquist y Baxter 2009). Sin embargo, y como se describe y se discute más adelante, con los resultados obtenidos parece que el descenso de la concentración plasmática de hierro refleja de manera más precisa procesos inflamatorios agudos, subagudos y crónicos. En un estudio realizado por Hobo *et al.* en 2007, se evaluaron las concentraciones de amiloide A sérico y fibrinógeno en caballos sanos y posteriormente se infectaron de manera experimental con Streptococcus zooepidemicus para monitorizar la progresión de la neumonía. Los resultados indican que el amiloide A sérico responde más rápidamente que el fibrinógeno a los cambios en los signos clínicos de la neumonía. También se han comparado las concentraciones plasmáticas de hierro, fibrinógeno, amiloide A sérico y recuento leucocitario en animales que fueron sometidos a una cirugía menor (castración). Las muestras se tomaron antes del procedimiento y los días 3 y 8 después de la cirugía. Los resultados muestran que el amiloide A sérico y el hierro reflejan mejor el desarrollo de la inflamación y sus valores se correlacionan con la gravedad de la inflamación desde el punto de vista clínico. Sin embargo, el resto de los marcadores de inflamación e infección tradicionalmente empleados en clínica equina (por ejemplo el

recuento leucocitario o la fiebre) no fueron útiles para monitorizar la recuperación de estos animales (Jacobsen *et al.* 2005). En otro trabajo, se compara la respuesta de diversas proteínas de fase aguda (incluyendo el fibrinógeno, el amiloide A sérico y la haptoglobina) entre caballos clínicamente normales y dos Grupos de animales, uno de ellos sometidos a cirugías electivas y otro sometido a cirugías no electivas. Las concentración séricas de fibrinógeno se incrementó más lentamente después de la cirugía que las de amiloide A sérico. Además, las concentración de fibrinógeno no comenzó a descender hasta pasadas las 72 horas post-cirugía (Pollock *et al*. 2005). Estos estudios sugieren que, aunque la determinación de la concentración de fibrinógeno en plasma se ha utilizado tradicionalmente para detectar enfermedades inflamatorias en el caballo, es una proteína de fase aguda relativamente lenta, y es cuestionable su valor en procesos subagudos. No obstante, y aunque no existan diferencias estadísticamente significativas, existe una evidente tendencia en el Grupo B a presentar valores más altos.

VI.1.4. Valoración del recuento leucocitario

El recuento total de leucocitos no mostró diferencias significativas entre los tres Grupos estudiados. La interpretación del resultado obtenido se explica en el tiempo de reacción frente a la inflamación por parte de los glóbulos blancos. Varios animales llegaron al Hospital con cuadros agudos, de pocas horas de duración, lo que explica su escasa respuesta leucocitaria (Delano *et al*. 2011, Vestweber 2007, Athens *et al.* 1961). En los casos de alteraciones crónicas (peritonitis, neumonías, adelgazamiento crónico progresivo) el recuento total no estaba afectado, ya que el recuento de neutrófilos (células blancas predominantes) no se observó alterado en la mayoría de estos animales. Algunos caballos del Grupo B mostraron leucopenia como consecuencia de endotoxemia. Además, muchos de estos pacientes mostraban cambios tóxicos en los neutrófilos (neutrófilos en banda, espumosos y cuerpos de Dhöle), lo que coincide con lo aportado por otros autores (Ward *et al.* 1987, Carakostas *et al*. 1981). Así mismo, hubo un porcentaje del 46,34% de animales jóvenes (caballos con edades inferiores a los 5 ños de edad) con leucocitosis (McFarlane *et al*. 2001, McFarlane *et al*. 1998) y un porcentaje del 39,02% que padecían procesos crónicos o excitación (Baković *et al.* 2005, Steward y McKenzie 2002) lo cual justifica los valores elevados en recuento de leucocitos. En un estudio realizado por Jacobsen *et al.* en 2009, se compararon las

concentraciones en sangre de proteína amiloide A, fibrinógeno, hierro y recuento leucocitario en caballos sometidos a diferentes procesos quirúrgicos, y se observó que el recuento leucocitario no se modificaba entre los Grupos, pero que existían diferencias significativas en los diferentes marcadores de la inflamación dependiendo de la intensidad del trauma quirúrgico.

Al estudiar el recuento leucocitario diferencial, se observa que tampoco aparecen diferencias estadísticamente significativas para el recuento de neutrófilos, tanto segmentados como bastonados.

Como se ha comentado anteriormente, el Grupo B está compuesto por animales con patologías muy diferentes, algunas de las cuales provocan endotoxemia (p. ej. enteritis y colitis) con la consecuente neutropenia, y otros neutrofilia (p. ej. infecciones crónicas y abscesos). Además, varios animales presentaban formas agudas de la enfermedad, en las que aún no se había alterado el recuento leucocitario. Estos resultados ponen de manifiesto la limitada utilidad diagnóstica del recuento de neutrófilos en determinadas ~~algunas~~ ocasiones para establecer un estado de SRIS, y en la necesidad de incluir otros parámetros para ello.

Se observaron diferencias estadísticas para el recuento de linfocitos entre el Grupo 0 y el Grupo B, que presentó un valor medio más bajo. Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores, que asocian la linfopenia con la administración de glucocorticoides, estrés, infecciones virales e inmunodeficiencia combinada de los potros árabes (Lunn y Horohov 2009, Cowell *et al*. 2002). En el presente trabajo se puede atribuir al estrés combinado con el dolor, ya que se excluyeron los potros menores de 2 años del estudio, los animales con posibles infecciones víricas y aquéllos que habían recibido previamente algún tratamiento. El estrés en los caballos que padecen alteraciones gastrointestinales parece ser un marcador de valor pronóstico. En un estudio realizado en 2005 por Hindchcliff *et al.,* determinaron que el riesgo de muerte en caballos afectados de cólico era mayor en aquellos con concentraciones elevadas de epinefrina y cortisol. Por lo tanto, la presencia de un leucograma de estrés en animales críticos podría emplearse como marcador de pronóstico en estos casos. Otra posibilidad que se debe tener en cuenta es que los animales que padecían lesiones estrangulantes o inflamatorias del tracto gastrointestinal tuvieran cierto grado de linfangiectasia, lo que provocaría la salida a la cavidad abdominal de proteínas y

linfocitos (los caballos con lesiones estrangulantes y colitis/enteritis mostraron hipoproteinemia después de corregir la deshidratación). En medicina humana se describe la linfopenia en trastornos agudos gastrointestinales como apendicitis (Cunha *et al*. 2010), colitis necrotizante (Snyder *et al*. 2010) y otras alteraciones gastrointestinales (Charlett *et al.* 2009). Otros autores han observado linfopenia en un caso de úlceras gastroduodenales en un potro (Coleman 2008), en un caballo árabe con una lesión estrangulante de intestino delgado (Pratt *et al.* 2008), en un caballo con enteritis (Wolf 1983), en caballos con perforaciones de intestino por ingerir alambres metálicos (Saulez *et al.* 2009) y en infecciones por Salmonella (Cullinane *et al*. 2006, Goetz y Coffman 1984).

También se ha detectado diferencia estadísticamente significativa entre Grupos para el recuento de eosinófilos, siendo la media del Grupo con enfermedades sistémicas (Grupo B) menor que en el control (Grupo 0) y en el de caballos con lesiones localizadas (Grupo A). Esto coincide con los resultados obtenidos en Unidades de Cuidados Intensivos de medicina humana, donde se está utilizando la eosinopenia como marcador de pronóstico en pacientes críticos (López de Toro *et al.* 2010, Shaaban *et al*. 2010; Smithson *et al.* 2009). De manera individual se observaron recuentos elevados de eosinófilos en el caballo número 17 del Grupo A, que sufría habronemiasis localizada en las extremidades, y en el caballo número 7 del Grupo B, en el que se observaron diversos trayectos parasitarios en el hígado mediante laparoscopia. Aunque es difícil valorar los resultados, dado que los recuentos de eosinófilos en el caballo suelen ser muy bajos, en este caso las diferencias entre Grupos pudieron radicar bien en la elevación de la media por los individuos con recuentos más altos (animales del Grupo A) o bien por la disminución del recuento en el Grupo de animales con enfermedades sistémicas (Grupo B).

En cuanto a los monocitos, por último, no se encontraron diferencias significativas entre Grupos.

VI.1.5. Valoración de la bioquímica sanguínea

No se han observado diferencias estadísticamente significativas para la concentración de proteínas totales entre los Grupos, debido a la alta variabilidad en los resultados obtenidos. Su interpretación, además, resulta complicada en algunos casos. Así, se han encontrado valores elevados debidos a deshidratación en varios animales del Grupo B

secundaria a diversas patologías digestivas (Boscan y Steffey 2007, Ashworth y Jester 1944). En otros casos, sin embargo, debido a las pérdidas de proteínas vía intestinal, la concentración plasmática se compensa y pueden mantenerse dentro de límites fisiológicos, a pesar de padecer hipoproteinemia. De hecho, tras recibir fluidoterapia, estos animales mostraron valores bajos para este parámetro. También se observaron hiperproteinemias individuales en animales con infecciones crónicas.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa para la concentración en plasma de albúmina en el Grupo B respecto al Grupo 0, lo que puede atribuirse a que algunos de estos animales presentaban endotoxemia, la cual cursa con disminución plasmática de albúmina, bien por aumento en las pérdidas (colitis, enteritis y lesiones necrotizantes de intestino) o por falta de su producción (alteraciones hepáticas). La albúmina proporciona información sobre la presión oncótica del paciente (Canaan-Kuhl *et al.* 1993) y debe tenerse en cuenta antes de decidir la fluidoterapia que se va a administrar. Además, el descenso en los valores plasmáticos de albúmina se ha asociado a procesos sépticos (Wildi et al, 2011), enfermedades inflamatorias (Don y Kaysen 2004) y a mal pronóstico (Leite *et al.* 2016, Qian y Liu. 2012).

En cuanto a los valores sanguíneos de urea y de creatinina, se ha observado un incremento significativo para los caballos con enfermedades sistémicas respecto a los controles. La mayoría de estos pacientes presentaban cuadros de cólico acompañados de deshidratación e hipovolemia (Braun y Lefebvre 2008, Arosalo *et al*. 2007, Divers *et al*. 1987, Narayanan y Appleton 1980). Además, la alimentación y los procesos digestivos alterados de los animales que presentaban cólico también pueden modificar los valores plasmáticos de la urea (Khol-Parisini *et al*. 2007; Fonnesbeck y Symons, 1969).

VI.1.6. Valoración del hierro y lactato

Los valores del hierro plasmático obtenidos para los caballos enfermos (Grupos A y B) fueron significativamente menores que los obtenidos en los animales del Grupo Control. Este hallazgo contrasta con lo aportado por Borges *et al*. en 2007, que no obtuvieron valores de hierro plasmático por debajo de los límites establecidos como normales en animales con alteraciones localizadas. Los resultados obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto la sensibilidad del hierro como marcador de la inflamación en fases agudas, capaz de reaccionar aunque el trauma sea de poca magnitud y no tenga repercusiones sistémicas.

Algunos de los animales que presentaban alteraciones sistémicas padecían procesos infecciosos graves, que justificaría los niveles bajos de hierro plasmático por la utilización de los microorganismos implicados para su propio metabolismo (Caballos 18, 26, 31 y 39 del Grupo B). Sin embargo, la mayoría presentaban procesos inflamatorios de diversa índole, de carácter agudo o subagudo, siendo la concentración plasmática de hierro marcadamente inferior en aquellos animales que presentaban los signos clínicos más graves de endotoxemia (Caballos 6, 11, 13, 15, 17, 22, 26, 28, 29, 35, 36 y 39 del Grupo B).

El hierro es requerido por diversas bacterias para su crecimiento y supervivencia (Ratledge y Dover 2005, Jordan *et al*. 2003). Las nuevas tendencias en medicina humana para combatir la resistencia a los antibióticos, se encaminan a bloquear la captación del hierro almacenado en las fuentes del hospedador (transferrina, ferritina y estructuras con grupo hemo) por las bacterias (Ratledge 2007, Ratledge y Dover 2005). Algunos de los animales que presentaban alteraciones sistémicas padecían procesos infecciosos graves, que justificaría los niveles bajos de hierro plasmático por la utilización de los microorganismos implicados para su propio metabolismo. Sin embargo, la mayoría presentaban procesos inflamatorios de diversa índole, de carácter agudo o subagudo. Como marcador de la inflamación, el hierro es un marcador negativo, ya que su biodisponibilidad se reduce tanto en el compartimento extracelular como en el intracelular y es secuestrado por las células del sistema reticuloendotelial en procesos inflamatorios. Esto justificaría los valores obtenidos en los animales con alteraciones sistémicas atribuibles a procesos inflamatorios, siendo la concentración plasmática de hierro marcadamente inferior en aquellos animales que presentaban los signos clínicos más graves de endotoxemia.

En medicina humana se ha observado descenso del hierro plasmático y de la hepcidina en enfermedades crónicas, alteraciones renales y procesos inflamatorios agudos (Cheng *et al*. 2010, Andrews 1999). Además, existen evidencias clínicas que sugieren que inflamaciones crónicas de poca intensidad y el propio metabolismo del hierro pueden estar involucrados en la patogénesis de enfermedades de tipo insulino-resistente (Insenser et al. 2010). Se ha observado descenso de hierro plasmático en pacientes con alteraciones localizadas de tipo inflamatorio, como la artritis (Aalto *et al*. 2011; Masson 2011; Grom y Mellins 2010). Estos datos justificarían los valores de hierro disminuidos en los animales del Grupo con lesiones localizadas.

No existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en los caballos del Grupo con patologías sistémicas (Grupo A) y los obtenidos en los caballos del Grupo con lesiones localizadas (Grupo B), por lo que se puede presuponer que el hierro no es un buen marcador de la gravedad del proceso.

En cuanto a la concentración plasmática de lactato, existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres Grupos siendo el valor medio más elevado el correspondiente al Grupo de caballos con afectaciones sistémicas (Grupo B). Esta determinación ha sido empleada en medicina deportiva equina para evaluar el entrenamiento y la intensidad del ejercicio (Beneke *et al.* 2010, Lindner 2010, Escribano *et al.* 2008), como marcador de gravedad en personas hospitalizadas en unidades de cuidados intensivos (Guinat *et al.* 2010), en potros neonatos con septicemia (Castagnetti *et al.* 2010, Saulez *et al*. 2007), en líquido peritoneal como indicador de isquemia y pronóstico (Latson *et al.* 2005), como parámetro de gravedad (Johnston *et al.* 2007), para monitorizar caballos hospitalizados (Tennent-Brown *et al.* 2010, Wotman *et al.* 2009, Tennent-Brown *et al.* 2007) y como parámetro de evolución de pacientes críticos (Jansen *et al.* 2009).

El aumento del lactato en plasma indica hipoxia tisular, muchas veces relacionada con hipovolemia (por ejemplo, en casos de shock hipovolémico como consecuencia de hemorragias intensas). En los caballos es frecuente encontrar valores elevados en patologías digestivas ya que a menudo presentan cuadros de deshidratación. Es importante comparar los valores de lactato con el hematocrito, proteínas totales y parámetros renales, para diferenciar si su elevación es secundaria al grado de deshidratación o a la acidosis metabólica. En este estudio, los caballos que presentaban las concentraciones de lactato más elevadas se correspondieron con los que presentaban las patologías más graves (torsión de colon, peritonitis, enteritis y colitis) y exceptuando el caballo número 28 del Grupo B, cuya concentración de hierro era casi fisiológica (90 ⌈g/dl), el resto de los animales presentaban una relación inversamente proporcional entre los valores de hierro y lactato.

A pesar de que las concentraciones de lactato aumentan con la hipovolemia, se considera un buen marcador de hipoxia tisular, que permite monitorizar a pacientes críticos. En potros sépticos, en los cuales existen alteraciones en la perfusión, permite conocer la gravedad del proceso. Se considera que un potro tiene posibilidades de

sobrevivir si las concentración de lactato disminuye en las primeras 24-48 horas tras el ingreso (Wotman *et al.* 2009, Corley *et al.* 2005). El lactato también se ha empleado en el caballo como marcador de isquemia, siendo de especial interés el valor de la concentración en líquido peritoneal en caballos con lesiones estrangulantes (Latson *et al*. 2005).

Las concentraciones elevadas de lactato que presentaban los caballos del Grupo B (con afectación sistémica) se justifican por el elevado porcentaje de caballos con patologías gastrointestinales que llegaron al Hospital con signos de endotoxemia.

Cuando se comparan los valores de hierro y lactato en sangre en cada animal de forma conjunta, se observa que en los caballos sanos existe una tendencia a que, cuando desciende la concentración de hierro, aumenta la de lactato. Se puede apreciar que los caballos que presentaban los valores más elevados de lactato, eran los mismos que tenían los valores mínimos de hierro sérico. Estos datos pueden explicarse por el grado de entrenamiento que recibían estos animales, ya que los caballos con los valores más dispares se corresponden con sementales sometidos a un ejercicio de moderado a intenso. En medicina humana se ha observado que los valores hemáticos, incluyendo la concentración de hierro y ferritina sérica, disminuyen con el entrenamiento (Ricci *et al.* 1988).

En el Grupo de animales con patologías localizadas (Grupo A), la tendencia no es tan evidente como en Grupo Control. Estos resultados son los esperados, ya que la media de la concentración de hierro era estadísticamente menor que la de los animales del Grupo Control; sin embargo, no existieron diferencias estadísticamente significativas en los valores del lactato.

En el Grupo de animales con patologías sistémicas (Grupo B), tampoco existe una tendencia evidente a la disminución del hierro con el incremento del lactato. En este Grupo se encuentran animales con valores muy elevados de lactato (un animal presentó más de 12 mmol/L a su llegada al Hospital y se pudo confirmar este valor en analíticas posteriores), y sin embargo el hierro estaba dentro de los límites fisiológicos.

El hecho de que existan variaciones entre Grupos en las concentraciones plasmáticas del lactato, hierro y de los parámetros renales, pero no en el hematocrito y proteínas totales (marcadores tradicionales del grado de deshidratación) indican la necesidad de

emplear nuevos marcadores que permitan establecer la gravedad y el pronóstico de estos pacientes. Además, en las regiones en las que la piroplasmosis es una enfermedad endémica, el hematocrito puede parecer normal, a pesar de que el animal padezca una deshidratación grave (Knowles *et al.* 1980). Incluir el lactato y el hierro sérico en los análisis rutinarios permite conocer la presencia de alteración sistémica en animales que no tienen signos clínicos de SRIS (hierro) y la gravedad de los pacientes (lactato) así como la necesidad de cuidados intensivos.

VI.2. ESTUDIO II: CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HIERRO EN CABALLOS CON ALTERACIONES GASTROINTESTINALES DE ORIGEN INFLAMATORIO, OBSTRUCTIVO Y ESTRANGULANTE

VI.2.1. Valoración de los parámetros clínicos

La frecuencia cardiaca fue más elevada en los caballos con lesiones estrangulantes e inflamatorias de intestino grueso, y estos resultados pueden ser explicados por el grado de dolor, hipovolemia y/o distensión abdominal en caballos con colitis o torsión de colon, como se ha demostrado en estudios previos (Bertin *et al*. 2013, Gómez *et al.* 2013, Moore *et al.* 1994). Los caballos con lesiones obstructivas de intestino grueso fueron los que presentaron frecuencias cardíacas más bajas, lo cual coincide con los resultados obtenidos para otras variables como la frecuencia respiratoria y el valor hematocrito. Estos resultados indican que los caballos con lesiones obstructivas de colon suelen llegar al Hospital en mejores condiciones cardiovasculares y hemodinámicas, lo cual también explica porqué los caballos con este tipo de patologías tienen mejor pronóstico (Jennings *et al*. 2014).

En cuanto a la supervivencia, se observó que los caballos que no sobrevivieron presentaron frecuencias respiratorias y valores de hematocritos más elevados. El incremento de la frecuencia respiratoria en los caballos que no sobrevivieron puede explicarse por el grado de distensión abdominal (el aumento de la timpanización incrementa la frecuencia cardíaca y empeora el pronóstico), el grado de dolor, la presencia de fiebre o hipertermia y/o la presencia de anormalidades electrolíticas (Hassel *et al*. 2009).

VI.2.2. Valoración del hematocrito

Los caballos con lesiones estrangulantes e inflamatorias de intestino delgado y aquéllos con lesiones inflamatorias de intestino grueso exhibieron valores de hematocritos mas elevados, posiblemente debido a la endotoxemia, a pesar de que estos resultados no se vieron reflejados en el recuento de glóbulos blancos. Sería interesante evaluar los cambios en el recuento de leucocitos durante el periodo de hospitalización y valorar si existe relación entre los valores en admisión de otros parámetros, ya que en este trabajo solo se tuvieron en cuenta los valores en el momento del ingreso.

Los parámetros que proporcionan datos referentes a la supervivencia incluyen la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y valor hematocrito. La frecuencia cardíaca y el valor hematocrito están íntimamente relacionados y cuando aumentan significativamente pueden indicar deshidratación y mal pronóstico, como se ha visto en otros estudios (Hassel *et al.* 2009).

VI.2.3. Valoración del fibrinógeno

Los caballos con lesiones obstructivas fueron los que presentaron concentraciones más elevadas de fibrinógeno, atribuido a que los veterinarios referentes remitieron los caballos al Hospital después de tratarlos durante varios días en condiciones ambulantes, aunque las diferencias no fueron significativas. El fibrinógeno es una proteína de fase aguda que se produce en el hígado y sus niveles plasmáticos se elevan durante los procesos de inflamación sistémica (Canseco *et al.* 2006, Andrews *et al.* 1994,). Específicamente, las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno comienzan a elevarse a las 24 o 72 horas tras la iniciación de la respuesta inflamatoria, y pueden mantenerse elevadas hasta 7 días después de haber superado el evento inflamatorio (Crisman *et al*. 2008). Así podemos considerar que en nuestra población, el fibrinógeno no parece ser de utilidad para determinar el pronóstico

VI.2.4. Valoración del recuento leucocitario

El recuento de leucocitos tampoco resultó ser un parámetro de utilidad para diferenciar a los caballos sanos de aquéllos con diferentes patologías gastrointestinales. Adicionalmente, el recuento de glóbulos blancos tampoco mostró variaciones en función de la supervivencia. El recuento total de leucocitos disminuye en caballos con endotoxemia y la leucopenia (específicamente, la neutropenia) ha sido asociada con mal pronóstico en caballos con patologías gastrointestinales (Southwood *et al.* 2009). La falta de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de este trabajo en relación con el recuento de leucocitos puede deberse a que sólo se tuvieron en cuenta las muestras en el momento de ingreso y no durante la hospitalización. Algunos caballos desarrollan leucopenia tras ser sometidos a procedimientos quirúrgicos en los que se manipulan porciones afectadas del intestino, que causa la movilización de las

endotoxinas y como consecuencia activación de la inflamación sistémica (Salciccia *et al*. 2013, Cook *et al*. 2008).

VI.2.5. Valoración de las proteínas totales

La concentración de proteínas totales se mostró más elevada en caballos con lesiones obstructivas y estrangulantes de intestino delgado, posiblemente debido al grado de deshidratación o como consecuencia del aumento de los componentes de las proteínas totales como las proteínas de fase aguda o las inmunoglobulinas. Sin embargo, no existieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas en función de la evolución.

VI.2.6. Valoración del hierro y lactato

Los caballos con enfermedades intestinales mostraron concentraciones de hierro plasmático inferiores en el momento de admisión que las de los caballos incluidos en el Grupo Control. Además, la concentración plasmática de hierro en el momento del ingreso fue significativamente superior en los caballos que sobrevivieron comparado con los no supervivientes. Corradini *et al.*, en 2014, demostraron que esta concentración en caballos con respuesta inflamatoria sistémica era inferior que en caballos con lesiones inflamatorias localizadas, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Borges *et al*. en 2007. El descenso del hierro en el momento del ingreso en los caballos no supervivientes puede reflejar la gravedad de la enfermedad, como también se ha demostrado en los caballos con grados elevados de SRIS y, como consecuencia, es indicativo de peor pronóstico (Corradini *et al*. 2014). Así pues, podría ser interesante evaluar la concentración de hierro conjuntamente con otros marcadores de gravedad y de pronóstico, como por ejemplo el cortisol (Mair *et al.* 2014), para determinar si existe correlación entre el grado de inflamación y la cantidad de hierro secuestrado. En estudios previos se ha demostrado una significativa correlación entre los cambios en las concentraciones plasmáticas de hierro durante la hospitalización entre los supervivientes y los no supervivientes (Corradini *et al*. 2014). En el presente trabajo se han encontrado hallazgos similares, a pesar de que sólo se incluyeron los valores en el momento del ingreso.

Respecto a los resultados obtenidos en función del tipo de patología diagnosticada, la concentración plasmática de hierro no parece variar en función de la naturaleza de las lesiones (obstructivas, inflamatorias y estrangulantes), a pesar de que los caballos con lesiones estrangulantes de intestino delgado mostraron concentraciones plasmáticas inferiores que los que padecían otras alteraciones inflamatorias. Todos los caballos con trastornos digestivos mostraron una concentración inferior al Grupo Control, siendo los caballos con lesiones obstructivas los que presentaban los valores más altos.

Al comparar los resultados obtenidos para la concentración plasmática de lactato se observa que los caballos con lesiones estrangulantes mostraron concentraciones superiores que aquellos con lesiones obstructivas. Como se ha explicado anteriormente, el lactato es producido por las células sometidas a condiciones anaerobias, y la hiperlactacidemia que aparece en los caballos que padecen trastornos gastrointestinales puede ser el resultado de la hipoperfusión tisular y de la hipoxia asociada al shock, anemia grave, distrés respiratorio y estatus hipermetabólicos. El lactato ha sido extensamente investigado en potros neonatos en estado crítico (Borchers *et al*. 2012, Wotman *et al* 2009) y en caballos adultos se ha demostrado que es de gran utilidad para determinar la gravedad de la enfermedad y monitorizar la respuesta al tratamiento (Tennent-Brown *et al*. 2010, Tennent-Brown *et al.* 2007). En concordancia con otros trabajos (Tennent-Brown 2012, Tennent-Brown *et al*. 2010), los niveles de lactato en el presente estudio fueron de utilidad para diferenciar caballos con lesiones estrangulantes frente a aquellos que padecían otras patologías, como por ejemplo, lesiones obstructivas. Por ello, el lactato se muestra más fiable como marcador de diagnóstico que el hierro plásmático, ya que este último no permite diferenciar entre procesos estrangulantes y obstructivos. Todos los caballos enfermos mostraron concentraciones plasmáticas de lactato superiores a los caballos incluidos en el Grupo Control, y aquéllos que no sobrevivieron presentaron concentraciones superiores en el momento de admisión que los supervivientes, resultados similares a los obtenidos para la concentración de hierro plasmático.

En la población estudiada, la concentración plasmática~~s~~ de hierro resultó ser un marcador de pronóstico útil, aunque no fue lo suficientemente sensible~~s~~ como para diferenciar los diferentes tipos de lesiones, posiblemente porque se trata de un marcador muy sensible de procesos inflamatorios y porque todos los casos incluidos en este trabajo presentaban cierto grado de inflamación sistémica, entendiendo como respuesta

inflamatoria la presencia de dos o más de los siguientes síntomas: fiebre (temperatura rectal > 38,9°C), neutrofilia o neutropenia (recuentos de neutrófilos > 6.600 o < 2.700 cel/µL, respectivamente), incremento del número de granulocitos inmaduros (> 10% de bastonados), y cambios tóxicos en los neutrófilos (Borges *et al*. 2007). En contraste, los niveles de lactato fueron de gran utilidad para distinguir lesiones obstructivas de lesiones inflamatorias o estrangulantes, y resultó de utilidad como marcador de pronóstico.

En general, los caballos con alteraciones inflamatorias de intestino grueso y delgado y lesiones estrangulantes de intestino delgado, fueron los que presentaron alteraciones bioquímicas y hematológicas más pronunciadas. En particular, los caballos con lesiones estrangulantes de intestino grueso mostraron una frecuencia cardíaca más elevada, posiblemente debido a la gravedad del dolor abdominal y la distensión. Sin embargo, dada la naturaleza hiperaguda de las torsiones de colon, estos caballos no tuvieron suficiente tiempo para desarrollar alteraciones en los parámetros laboratoriales. Un hallazgo común fue que los caballos con lesiones estrangulantes de intestino delgado presentaron concentraciones de hierro inferiores y concentraciones de lactato más elevadas que los caballos con lesiones inflamatorias de intestino delgado. Aunque este dato debe interpretarse con precaución, puede servir de guía en el diagnóstico de enfermedades de intestino delgado.

Una limitación de este estudio es el escaso número de pacientes con lesiones obstructivas de intestino delgado y con lesiones estrangulantes de intestino grueso, lo cual puede haber sesgado los resultados. Otra limitación es que no se ha incluido el tiempo transcurrido desde que los caballos mostraron signos de dolor abdominal y hasta que fueron recibidos en el Hospital. Este periodo de tiempo puede haber influido en que algunos caballos con lesiones graves, pero que fueron remitidos rápidamente, mostraran menos variación en los parámetros sanguíneos que caballos con lesiones menos graves pero que fueron enviados tras un periodo de tiempo más prolongado.

VI.3. ESTUDIO III: CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE TROPONINA CARDIACA I (cTnI) Y DÍMERO D COMO MARCADORES DE PRONÓSTICO EN CABALLOS CRÍTICOS

VI.3.1. Evaluación de la utilidad del sistema POC para la medición de cTnI y Dímero D en caballos críticos.

La validación del método analítico es un paso esencial antes de establecer nuevos protocolos en el laboratorio o en diferentes especies animales. Los estudios de validación deben asegurar que los métodos analíticos sean capaces de detectar los correspondientes análisis proporcionando resultados repetibles y certeros, y que sean de utilidad para diferenciar entre animales sanos y con patologías. En este trabajo, se evalúa el equipo AQT90 FLEX que integra un sistema point-of-care (POC) comercialmente disponible para las determinaciones de cTnI y Dímero D en suero de caballos. El método mostró una buena linealidad y coeficiente de variación intraensayo. Las concentraciones medias de cTnI y Dímero D en las muestras de plasma de los caballos sanos fueron superiores a los límites de detección del método validado (Límite de detección inferior para la cTnI: <0,010 μg/ml; Límite de detección inferior para el Dímero D: <80 ng/mL) y ningún caballo del Grupo de los enfermos tuvo concentraciones en el límite inferior. Los resultados obtenidos para la validación del AQT90 FLEX fueron lo suficientemente adecuados para garantizar su uso rutinario en la clínica equina.

VI.3.2. Determinación de la utilidad de estos parámetros en la identificación de pacientes críticos.

Las cTnI han sido empleadas previamente como marcadores de respuesta inflamatoria sistémica en caballos críticos ([b]Nath *et al.* 2012) y como marcadores de pronóstico después de cirugías abdominales de emergencia (Radcliffe *et al.* 2012). El descenso de la función miocárdica ha sido ampliamente descrito en pacientes humanos con sepsis (Landesburg *et al.* 2012, Maeder *et al.* 2006). La disfunción del ventrículo izquierdo en personas con sepsis, determinada mediante ecocardiografía, se correlaciona con elevadas concentraciones de cTnI (Røsjø *et al.* 2011).

En el presente estudio existieron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones plasmáticas de cTnI y Dímero D en el momento de admisión entre los caballos enfermos y el Grupo Control. Todos los caballos incluidos en el Grupo con enfermedades mostraron signos clínicos de endotoxemia y/o SRIS, por lo que parece claro que pueda existir cierto grado de hipoperfusión miocárdica en estos pacientes. De esta forma, parece que la combinación de estos dos parámetros en el momento del ingreso puede ser de utilidad para identificar caballos críticos.

VI.3.3. Determinación de la utilidad de estos parámetros como marcadores de pronóstico en caballos con patologías gastrointestinales.

Los caballos con lesiones intestinales estrangulantes o inflamatorias mostraron una concentración en sangre elevada de cTnI, comparado con el Grupo Control, aunque dicho valor no estuvo asociado a mortalidad o al grado de gravedad de la enfermedad. La concentración media de Dímero D fue significativamente superior en los caballos enfermos en comparación con el Grupo Control pero estos valores tampoco estuvieron asociados a la supervivencia. Además no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de Dímero D entre Grupos dependiendo del proceso diagnosticado

Después del tratamiento y de la hospitalización, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los Grupos con SRIS/endotoxemia para las concentraciones de cTnI o Dímero D. Estos resultados pueden ser explicados, por un lado, por la sensibilidad de estos parámetros, que pueden haber sido corregidos con el tratamiento y, por otro lado, por la gran variabilidad de los valores obtenidos dentro del mismo Grupo. Podría ser interesante realizar futuros trabajos englobando los caballos críticos en Grupos más homogéneos para valorar la variabilidad de estos parámetros durante la hospitalización. Este resultado puede ser también explicado por el hecho de que solo se incluyeron caballos críticos, y que la concentración plasmática de estos parámetros va disminuyendo lentamente. La concentración plasmática de cTnI y Dímero D no parecen ser de utilidad para evaluar la respuesta al tratamiento en caballos admitidos en condiciones críticas.

VI.3.4. Concentración plasmática de cTnI y Dímero D después del tratamiento como marcadores de gravedad.

Las concentraciones elevadas de cTnI pueden reflejar necrosis celular por isquemia miocárdica (Mehta *et al.* 2004) debido a la hipoperfusión sistémica, trombosis microvascular, o ambas. En este estudio no aparecieron diferencias significativas en las concentraciones de cTnI entre los Grupos en función de la naturaleza de sus lesiones, pero los caballos con lesiones inflamatorias, como colitis o enteritis, fueron los que presentaron concentraciones más altas. Aquellos con lesiones estrangulantes de intestino delgado tuvieron concentraciones inferiores de cTnI. La alta proporción de sementales con hernias inguinales pueden explicar estos resultados. Los caballos Pura Raza Españoles presentan predisposición genética a padecer hernias inguinales (Muñoz *et al*. 2008) y la porción de intestino delgado sin perfusión queda aislada del resto del cuerpo en la bolsa escrotal. La raza más representada en este trabajo fue precisamente los Pura Raza Española (PRE) y las hernias inguinales la patología estrangulante de intestino delgado más común. Una posible explicación para esta falta de aumento en los caballos no supervivientes puede ser que llegaran al Hospital con síntomas de pocas horas de duración. Además, en el caso de las hernias inguinales, la endotoxemia se desarrolla durante la hospitalización, y no siempre llegan al Hospital con signos clínicos o laboratoriales de endotoxemia. Esta es una de las razones por las que las cTnI no parecen ser un buen marcador de pronóstico en el momento de admisión en el caso de caballos con hernias inguinales, porque el secuestro del asa estrangulada en una cavidad, como es en este caso la bolsa escrotal, previene la liberación de endotoxinas del intestino dañado al torrente circulatorio, aunque la liberación de estas endotoxinas puede ocurrir durante la reducción de la hernia (Mair y Edwards 2003).

Normalmente, las coagulopatías en caballos con patologías gastrointestinales son estados de hipercoagulabilidad que pueden progresar a coagulopatías de consumo (CID). Además, la gravedad de las coagulopatías en trastornos gastrointestinales está asociada a mal pronóstico (Dolente *et al.* 2002, Prasse *et al.* 1993, Johnstone y Crane 1986). En estudios previos, se ha observado que los caballos con enteritis y peritonitis son diagnosticados con mayor prevalencia de formas subclínicas de CID en el momento de admisión, y junto con las lesiones isquémicas (especialmente aquéllas que requieren resección), son los pacientes que presentan con más frecuencia activación de la cascada de la coagulación (Cesarini *et al*. 2010, Stokol *et al.* 2005, Monreal *et al.* 2000). La

ausencia de correlación entre las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno y Dímero D en el momento de admisión puede ser explicada porque el fibriógeno tarda en aumentar en sangre en los pacientes críticos de 24 a 48 horas (Kamath y Lip 2003). En concordancia con investigaciones previas (Dunkel *et al.* 2010), se ha observado que las concentraciones plasmáticas de Dímero D en caballos con SRIS en el momento del ingreso fueron superiores a las del grupo control. Además, los caballos con concentraciones superiores a 4.000 ng/mL tienen peor pronóstico (Cesarini *et al.* 2010). En este trabajo no se han alcanzado diferencias significativas entre los dos Grupos de caballos con SRIS en términos de supervivencia. A pesar de que las concentraciones plasmáticas de Dímero D en la última muestra analizada fueron superiores en los caballos que no sobrevivieron en comparación con los supervivientes, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Respecto a las concentraciones plasmáticas de Dímero D y fibrinógeno en función de la patología, no existieron diferencias significativas entre Grupos, siendo el Grupo con lesiones obstructivas el que mostró concentraciones más altas en ambos parámetros en el momento de admisión. Muchos de los caballos con lesiones obstructivas se presentaron en el Hospital, tras ser atendidos en el campo durante varios días por el veterinario referente, y a pesar de que este dato no está reflejado en el estudio, esto puede explicar el ligero aumento de estos valores. Después de la hospitalización, tampoco existieron diferencias significativas en estos parámetros en función de la patología diagnosticada.

Los parámetros que variaron durante el periodo de hospitalización significativamente fueron la concentración de lactato plasmático, el valor hematocrito y los parámetros clínicos temperatura rectal y frecuencia cardíaca. Sin embargo, en el Grupo de los caballos no supervivientes, el único parámetro que se modificó durante la hospitalización fue la concentración de proteínas totales, las cuales estaban más elevadas en el momento del ingreso. Además, se puede considerar que los caballos que responden al tratamiento son aquéllos cuyos parámetros laboratoriales y clínicos mejoran durante la hospitalización y son por tanto los que tienen un mejor pronóstico, como ya se ha demostrado en otros estudios (Tennet-Brown 2012, Southwood *et al.* 2009, Magdesian 2004).

A pesar de que no existieron diferencias significativas en las concentraciones de cTnI entre los Grupos de supervivientes y no supervivientes, los valores más altos fueron observados en el Grupo de no supervivientes. Hay que tener en cuenta que todos los

caballos se mantuvieron hospitalizados por diferentes periodos de tiempo y tuvieron diferentes grados de endotoxemia que fue variando durante la hospitalización. Por ejemplo, los caballos con hernias inguinales tuvieron signos clínicos más graves después de la movilización del segmento intestinal afectado y mostraron marcada leucopenia pasadas las 24 horas de la cirugía. Algunos de estos caballos con hernias inguinales presentaron mejor condición clínica en el momento de la admisión que los que fueron remitidos con patologías inflamatorias, los cuales se estabilizaron en las primeras 24 horas de hospitalización. Sería interesante valorar las variaciones plasmáticas de estos parámetros durante la hospitalización porque la administración de fluidos y vasopresores pueden influir en los resultados. Los resultados obtenidos muestran que este parámetro puede resultar de utilidad para identificar caballos críticos, pero se deben realizar más estudios en los que se incluyan mayor número de animales para evaluar su utilidad como marcador de pronóstico. En este trabajo, no se observaron diferencias significativas en la tasa de supervivencia en función de las concentraciones de Dímero D porque solo se incluyeron caballos críticos y en estudios previos donde se obtuvieron diferencias se habían incluido caballos con patologías menos graves (Cesarini *et al.* 2010).

Las limitaciones de este trabajo incluyen el escaso número de animales incluidos, resultando en intervalos de confianza amplios. A pesar de que los resultados obtenidos muestran que las cTnI y el Dímero D pueden ser empleados como marcadores de estados inflamatorios sistémicos, el uso de estos parámetros como indicadores de pronóstico en caballos con patologías digestivas, debe interpretarse con cuidado. Otra limitación del trabajo es que no se pudo realizar examen post-morten en todos los caballos eutanasiados o muertos por decisión del propietario, por lo que resulta imposible confirmar las causas del deterioro sistémico y el grado de daño miocárdico mediante histopatología en estos pacientes.

El equipo AQT90 FLEX es suficientemente preciso y fiable para ser empleado en Unidades de Cuidados Intensivos equinas.

VI.4. ESTUDIO IV: EVALUACIÓN DE LA EOSINOPENIA COMO MARCADOR DE ENDOTOXEMIA EN CABALLOS CRÍTICOS

En esta parte del trabajo, se valora la capacidad de la eosinopenia para diferenciar caballos críticos con patologías gastrointestinales de otros con patologías digestivas que no causan SRIS o endotoxemia. La eosinopenia forma parte del leucograma de estrés, y los efectos deletéreos de la endotoxemia causan en el hospedador una respuesta de los mediadores inflamatorios endógenos, incluyendo citoquinas, eicosanoides, la activación del complemento y hormonas de estrés (Bone 1991). Otros indicadores de estrés como el cortisol, la "heat shock protein 72" (HSP72) y las beta-endorfinas han sido usados como marcadores de pronóstico pero, a día de hoy, el lactato sigue siendo el parámetro más útil como marcador usado en solitario en caballos con patologías abdominales (Niinistö *et al.* 2010). El riesgo de muerte parece ser también mayor en los caballos afectados de lesiones gastrointestinales con altas concentraciones circulantes de epinefrina y cortisol, indicando el grado de activación del sistema simpático en los caballos con cólico (Hinchcliff *et al.* 2005).

La eosinopenia ha sido empleada en medicina humana como marcador de sepsis (Terradas *et al.* 2012, Wibrow *et al.* 2011, Abidi *et al.* 2008) para predecir la mortalidad (Yip y Ho 2013, Kim *et al.* 2013) en pacientes con dolor abdominal ([a]Deibener-Kaminsky *et al.* 2011), y como marcador de pronóstico ([b]Deibener-Kaminsky *et al*. 2011, Shaaban *et al*. 2010). Los mecanismos de control de la eosinopenia en estados de inflamación aguda, también considerado como estrés agudo, incluyen la mediación adrenal de los glucocorticoides y de la epinefrina (Bass *et al*. 1980). Adicionalmente, la respuesta eosinopénica inicial frente a las infecciones agudas puede interpretarse como el resultado del secuestro periférico de los eosinófilos circulantes. Las sustancias quimiotácticas liberadas durante la inflamación aguda pueden colaborar en la migración y secuestro de los eosinófilos junto con la respuesta inflamatoria por sí misma, presumiblemente (Hubert 2006, Benafara *et al*. 2002). Las principales sustancias quimiotácticas incluyen el C5a y fragmentos de fibrina que han sido detectados en la circulación durante los estados de inflamación aguda (Bass *et al*. 1980). Si tenemos en cuenta el hipotético mecanismo de eosinopenia de la migración de los eosinófilos al foco de inflamación, se pueden explicar las diferencias en los recuentos entre los diferentes Grupos obtenidos en este trabajo.

Es fácilmente explicable que los animales con mayor grado de estrés y, por consiguiente, con concentraciones más elevadas de catecolaminas, presenten los recuentos de eosinófilos más bajos. Como ya se ha demostrado en estudios previos (Hinchcliff *et al.* 2005), el cortisol es un buen marcador de pronóstico, siendo sus concentraciones más elevadas en los caballos no supervivientes o con las patologías más graves. La medición del cortisol en la clínica equina no se emplea de forma rutinaria, dada su complejidad y su coste económico, y sólo se ha empleado en estudios experimentales. Por lo tanto, el recuento de eosinófilos (que se realiza de forma rutinaria en la clínica equina, tanto manual como automáticamente), puede ser una buena alternativa, ya que parece que existe una relación entre el recuento de éstos y el nivel de cortisol circulante.

Las limitaciones de este estudio son el escaso número de animales incluidos y la heterogeneidad de las patologías incluidas. Se requieren más estudios para evaluar la progresión de la eosinopenia en los pacientes críticos hospitalizados y para establecer un valor de corte para este marcador. Hay que tener cierta precaución al interpretar estos resultados, ya que en condiciones normales, el recuento de eosinófilos es bastante bajo, por lo que se deben interpretar los valores obtenidos junto con otros parámetros más estudiados como el lactato. Además, gracias a su morfología característica, los eosinófilos de los caballos son muy fáciles de distinguir, lo que hace de este método una alternativa eficaz para este tipo de recuentos. Los resultados obtenidos muestran que la eosinopenia puede ser usada como marcador en el diagnóstico de endotoxemia o SRIS en el momento de admisión y puede ser de utilidad para aproximar la evolución.

VII. Conclusiones

VII. Conclusiones

1. La disminución de la concentración de hierro plasmático en el caballo es útil en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias, si bien no discrimina entre enfermedades localizadas y sistémicas.

2. De los marcadores tradicionales estudiados, recuento total de leucocitos, hematocrito, concentración plasmática de proteínas totales, concentración plasmática de albúmina y concentración plasmática de lactato, este último es el más fiable como indicador de gravedad, permitiendo identificar caballos críticos.

3. El equipo AQT90 FLEX es suficientemente preciso y fiable para ser empleado en la medición en plasma de cTnI y Dímero D en Unidades de Cuidados Intensivos equinas.

4. La medida de la concentración plasmática de cTnI y de Dímero D resulta de utilidad en la identificación de pacientes críticos en el momento del ingreso, aunque se requieren más estudios para valorar su utilidad en la monitorización durante la hospitalización.

5. El recuento de eosinófilos tiene valor discriminativo para identificar caballos con SRIS y endotoxemia. La eosinopenia puede considerarse como indicador de mal pronóstico en caballos críticos.

6. La concentración plasmática de hierro y de lactato, en combinación con otros métodos complementarios (por ejemplo, ecografía abdominal y examen rectal), contribuyen a determinar la naturaleza de la lesión intestinal. Estos biomarcadores, junto con la concentración plasmática de cTnI, Dímero D y el recuento de eosinófilos, contribuyen a establecer un pronóstico.

VII. Conclusions

1. The decrease in plasma iron concentration in the horse is useful in the diagnosis of inflammatory diseases, although it does not discriminate between localized and systemic disorders.

2. Of the traditional markers studied, WBC, hematocrit, total proteins, albumin and lactate, the latter is the most reliable as an indicator of severity, allowing the identification of critical horses.

3. The AQT90 FLEX equipment is sufficiently precise and reliable to be used in the plasma measurement of cTnI and D-dimers in equine Intensive Care Units.

4. Measurement of plasma concentration of cTnI and D-Dimers is useful in the identification of critically ill patients on admission, although more studies are needed to assess the usefulness of monitorization.

5. The eosinophil count has discriminative value to identify horses with SIRS and endotoxemia. Eosinopenia can be considered an indicator of poor prognosis in critical horses.

6. The plasma concentration of iron and lactate, in combination with other complementary methods (eg, abdominal ultrasound and rectal examination), help to determine the nature of the intestinal lesion. These biomarkers, together with the plasma concentration of cTnI, D-dimer and eosinophil count, help to establish a prognosis.

VIII. Resumen

En medicina veterinaria se están extrapolando diversos marcadores de inflamación para su uso clínico. En el caballo, dada su alta susceptibilidad a las endotoxinas, es de vital importancia encontrar marcadores que permitan su tratamiento antes de que desarrollen signos clínicos irreversibles en muchas ocasiones. Con el fin de contribuir al desarrollo de estos marcadores, se han realizado cuatro estudios clínicos.

En el primero se han analizado 82 caballos adultos, con enfermedades localizadas (Grupo A) y sistémicas (Grupo B). Además se incluyó un Grupo Control (Grupo 0) compuesto por 31 animales sanos. Los parámetros evaluados fueron: parámetros clínicos (frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y temperatura rectal), parámetros bioquímicos (albúmina, creatinina, urea, proteínas totales, hierro y lactato plasmáticos) y hematología (hematocrito y recuento leucocitario total y diferencial). Los resultados obtenidos muestran que la concentración plasmática de hierro refleja de manera más sensible el estado de inflamación que el recuento total de leucocitos. La concentración plasmática de lactato permite identificar caballos críticos que requieren hospitalización.

El segundo estudio se orienta en la búsqueda de marcadores que permitan diferenciar lesiones intestinales estrangulantes, obstructivas e inflamatorias con el objetivo de identificar parámetros que permitan diferenciar pacientes que necesitan cirugía. Se incluyeron 117 caballos mayores de 1 año de edad, con signos de dolor abdominal en el momento del ingreso, y 39 caballos sanos como Grupo Control. Los caballos enfermos se dividieron en función de la naturaleza de la lesión y también se clasificaron en función de la evolución. Se evaluó la concentración plasmática de hierro, lactato, fibrinógeno, recuento de leucocitos y varios parámetros clínicos. Los resultados obtenidos fueron: en el momento de admisión, los caballos con lesiones estrangulantes (61,51 ± 46,74 μg/dL) e inflamatorias (65,55 ± 43,08 μg/dL) mostraron la concentración plasmática de hierro más baja. Todos los enfermos mostraron concentraciones significativamente inferiores de hierro plasmático que los sanos (156,89 ± 47,51 μg/dL). Los no supervivientes presentaron una concentración de hierro inferior (52,64 ± 42,05 μg/dL) a los supervivientes (100,09 ± 69,34 μg/dL). La concentración plasmática de hierro no es útil para determinar la naturaleza del dolor abdominal, aunque puede ser empleada como marcador pronóstico.

Los objetivos del tercer estudio fueron, por un lado, validar un sistema POC en la medida de cTnI y Dímero D en plasma de caballos y, por otro, determinar si las concentraciones de estos parámetros pueden ser de utilidad para distinguir animales sanos de enfermos, como marcadores de pronóstico o para monitorizar el tratamiento de caballos hospitalizados. Se obtuvieron aumentos significativos ($P < 0,05$) para ambos parámetros en caballos enfermos en el momento de admisión, a pesar que las diferencias no fueron estadísticamente significativas en función de la evolución (cTnI: control: 0,014 ± 0,01 μg/mL, supervivientes: 0,27 ± 0,37 μg/mL, no-supervivientes: 0,60 ± 1,21 μg/mL; Dímero D: control: 104,90 ± 30,82 ng/mL, supervivientes: 1.217,22 ± 1.213,28 ng/mL, no-supervivientes: 1.613,67 ± 1.426,75 ng/mL). Después del tratamiento hospitalario no existieron diferencias significativas en las concentraciones de cTnI y Dímero D entre supervivientes (cTnI: 0,04 ± 0,06 μg/mL; Dímero D: 958,80 ± 686,65 ng/mL) y no-supervivientes (cTnI: 0,70 ± 1,47 μg/mL; Dímero D: 1.875,30 ± 801,83 ng/mL). Teniendo en cuenta la naturaleza de las lesiones (inflamatoria, obstructiva o estrangulante) no existieron diferencias significativas para los dos parámetros en el momento de la admisión (cTnI: I: 0,83 ± 1,35 μg/mL, S: 0,26 ± 0,39 μg/mL, O: 0,24 ± 0,44 μg/mL; Dímero D: I: 909,78 ± 651,39 ng/mL, S: 1.483,00 ± 1.762,68 ng/mL, O: 1.855,50 ± 1.646,46 ng/mL) ni tras la hospitalización (cTnI: I: 0,56 ± 1,48 μg/mL, S: 0,34 ± 0,77 μg/mL, O: 0,02 ± 0,01 μg/mL; Dímero D: I: 1.565,11 ± 2.733,88 ng/mL, S: 1.288,14 ± 819,24 ng/mL, O: 1.309,50 ± 842,10 ng/mL). El sistema POC para la medición de cTnI y Dímero D puede ser de utilidad en la clínica equina, ya que es una herramienta práctica, simple y mínimamente invasiva para evaluar caballos críticos en el momento del ingreso.

El cuarto trabajo consistió en evaluar el recuento de eosinófilos como marcador de SRIS en caballos críticos. Para ello se incluyeron 63 caballos adultos con dolor abdominal divididos en dos Grupos, en función de la presencia o ausencia de respuesta inflamatoria sistémica. El recuento de eosinófilos se realizó en el momento del ingreso. Los resultados del recuento de eosinófilos y de la~~s~~ concentración plasmática de lactato difieren entre los dos Grupos, siendo el recuento de eosinófilos significativamente menor en el Grupo de los caballos con SRIS. El recuento de eosinófilos tuvo el mismo valor discriminativo que el lactato y también puede usarse como marcador de pronóstico El valor predictivo negativo de la eosinopenia puede resultar de utilidad como marcador de pronóstico.

IX. Summary

In veterinary medicine, several markers of inflammation are being extrapolated for clinical use. In the horse, given its high susceptibility to endotoxins, it is vital to find markers that allow its treatment before they develop irreversible clinical signs. In order to contribute to the development of these markers, four clinical studies have been performed.

In the first one, 82 adult horses with localized diseases (Group A) and systemic diseases (Group B) were analyzed. In addition, a control group (Group 0) was composed of 31 healthy animals. The parameters evaluated were: clinical parameters (heart rate, respiratory rate and rectal temperature), biochemical parameters (albumin, creatinine, urea, total proteins, plasma iron and lactate) and hematology (hematocrit and total and differential leukocyte counts). The results show that the plasma concentration of iron reflects in a more sensitive way the state of inflammation than the total white blood cell count. The plasma concentration of lactate allows to identify critical horses that require hospitalization.

The second study is focused on the search for markers that allow the differentiation of intestinal, strangulating, obstructive and inflammatory lesions in order to identify parameters that allow differentiating patients who need surgery. We included 117 horses older than 1 year of age, with signs of abdominal pain on admission and 39 healthy horses as a control group. Sick horses were divided according to the nature of the injury and were also classified according to the outcome. Plasma concentrations of iron, lactate, fibrinogen, leukocyte count and various clinical parameters were evaluated. The results obtained were: at the time of admission, horses with strangulating lesions (61.51 ± 46.74 μg / dL) and inflammatory (65.55 ± 43.08 μg / dL) showed the lowest plasma iron concentration. All patients showed significantly lower concentrations of plasma iron than healthy ones (156.89 ± 47.51 μg / dL). Non-survivors presented a lower iron concentration (52.64 ± 42.05 μg / dL) to the survivors (100.09 ± 69.34 μg / dL). Plasma iron concentration is not useful in determining the nature of abdominal pain, although it may be used as a prognostic marker.

The objectives of the third study were, on the one hand, to validate a POC system in the measure of cTnI and D-dimer in horses' plasma and, on the other, to determine

if the concentrations of these parameters can be useful to distinguish healthy animals from diseased, as prognostic markers or to monitor the treatment of hospitalized horses. Significant increases ($P < 0.05$) were obtained for both parameters in sick horses on admission, although the differences were not statistically significant for the outcome (cTnI: control: 0.014 ± 0.01 µg / mL, Survivors: 0.27 ± 0.37 µg / mL, non-survivors: 0.60 ± 1.21 µg / mL, D-dimer: control: 104.90 ± 30.82 ng / mL, survivors: 1,217.22 ± 1213.28 ng / mL, non-survivors: 1613.67 ± 1426.75 ng / mL). After the treatment there were no significant differences in cTnI and D-dimer concentrations between survivors (cTnI: 0.04 ± 0.06 µg / mL; D-dimer: 958.80 ± 686.65 ng / mL) and non-survivors (CTnI: 0.70 ± 1.47 µg / mL; D-dimer: 1,875.30 ± 801.83 ng / mL). Considering the nature of the lesions (inflammatory, obstructive or strangulating), there were no significant differences for the two parameters at the time of admission (cTnI: I: 0.83 ± 1.35 µg / mL, S: 0.26 ± 0.39 µg / mL, O: 0.24 ± 0.44 µg / mL D-dimer: I: 909.78 ± 651.39 ng / mL, S: 1,483.00 ± 1,762.68 ng / mL, (CTnI: I: 0.56 ± 1.48 µg / mL, S: 0.34 ± 0.77 µg / mL, OR: 0.855 ± 1.646.46 ng / mL) D: D: I: 1565.11 ± 2,733.88 ng / mL, S: 1.288,14 ± 819.24 ng / mL, O: 1.309.50 ± 842.10 ng /mL). The POC system for the measurement of cTnI and D-dimer can be useful in the equine clinic, since it is a practical, simple and minimally invasive tool to evaluate critical horses at the time of entry.

The fourth research consisted in evaluating the eosinophil count as a marker of SIRS in critical horses. For this, 63 adult horses with abdominal pain were divided into two groups, depending on the presence or absence of systemic inflammatory response. The eosinophil count was performed at the time of admission. The results of the eosinophil count and the lactate plasma concentration differ between the two groups, with eosinophil counts being significantly lower in the SIRS horses group. The eosinophil count had the same discriminative value as lactate.

X. Bibliografía

- Aalto K, Honkanen V, Lahdenne P. Iron status during anti-TNF therapy in children with juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rheumatol*, 2011; 70: 1605-1612.

- Abidi K, Khoudri I, Belayachi J, Madani N, Zekraoui A, Zeggwagh AA, Abouqal R: Eosinopenia is a reliable marker of sepsis on admission to medical intensive care units. *Crit Care*, 2008; 12: R59.

- Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. Blood, 2009; 113: 2878-2887.

- Allen SE, Holm JL. Lactate: physiology and clinical utility. *J Vet Emerg Crit Care*, 2008; 18:123-132.

- Allen GK, Green EM, Robinson JA, Garner HE, Loch WE, Walsh DM. Serum tumor necrosis factor alpha concentrations and clinical abnormalities in colostrum-fed and colostrum-deprived neonatal foals given endotoxin. *Am J Vet Res*, 1993; 54: 1404-1410.

- Andersen SA, Petersen HH, Ersbøll AK, Falk-Rønne J, Jacobsen S. Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses. *Vet J*. 2012; 191: 199-202.

- Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, 1999; 341: 1986-1995.

- Andrews FM, Geiser DR, White SL, Williamson LH, Maykuth PL, Green EM. Haematological and biochemical changes in horses competing in a 3 Star horse trial and 3 -day-event. *Equine Vet J Suppl*, 1995; 20: 57-63.

- Andrews DA, Reagan WJ, DeNicola DB. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. *Compend Cont Educ Pract Vet*, 1994; 16: 1349-1354.

- Arlati S, Brenna S, Prencipe L, et al. Myocardial necrosis in ICU patients with acute non-cardiac disease: a prospective study. *Intensive Care Med*. 2000; 26: 31-37.

- Armengou L, Monreal L, Tarancón I, Navarro M, Ríos J, Segura D. Plasma

D-dimer concentration in sick newborn foals. *J Vet Intern Med*, 2008; 22: 411-417.

- Arosalo BM, Raekallio M, Rajamäki M, Holopainen E, Kastevaara T, Salonen H, Sankari S. Detecting early kidney damage in horses with colic by measuring matrix metalloproteinase -9 and -2, other enzymes, urinary glucose and total proteins. *Acta Vet Scand*, 2007; 49: 4.

- Ashworth CT, Jester AW. Local loss of fluid and protein in experimental shock: relation to decrease of plasma volumen and total circulating protein. *Am J Physiol*, 1944; 141: 571-574.

- Athens J, Haab O, Raab S, Boggs DR, Ashenbrucker H, Cartwright GR, Wintrobe MM. Leukokinetic Studies. IV. The total blood, circulating, and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest*, 1961; 40: 989-995.

- Baković D, Eterović D, Saratlija-Novaković Z, Palada I, Valic Z, Bilopavlović N, Dujić Z. Effect of human splenic contraction on variation in circulating blood cell counts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005; 32: 944-951.

- Barrera R, Martín M, Ruiz P, Vieitez V, Beristain DM, Duque J, Ezquerra LJ. Plasma fibrinogen and iron concentrations versus leukocyte response as indicators in systemic inflammatory diseases in horses, 2009; 11th ESVCP-ECVCP meeting, Tesalónica, Grecia.

- Barton MH, Collatos C. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *J Vet Intern Med*, 1999; 13: 457-464.

- Barton MH, Morris DD, Norton N, Prasse KW. Hemostatic and fibrinolytic indices in neonatal foals with presumed septicemia. *J Vet Intern Med*, 1998; 12: 26-35.

- Bass DA, Gonwa TA, Szejda P, Cousart MS, DeChatelet LR, McCall CE. Eosinopenia of acute infection: production of eosinopenia by chemotactic factors of acute inflammation. *J Clin Invest,* 1980, 65: 1265-1271.

- Baumberger C, Ulevitch RJ, Dayer JM. Modulation of endotoxic activity of lipopolysaccharide by high-density lipoprotein. Pathobiology, 1991; 59: 378-383.

- Benarafa C, Collins ME, Hamblin AS, Cunningham FM. Role of the chemokine eotaxin in the pathogenesis of equine sweet itch. *Vet Rec*, 2002; 151: 691-693.

- Beneke R, Wittekind A, Mühling M, Bleif I, Leithäuser RM. Lactate response to short term exercise with elevated starting levels. *Eur J Appl Physiol*, 2010; 1: 215-218.

- Bertin FR, Reising A, Slovis NM, Constable PD, Taylor SD. Clinical and clinicopathological factors associated with survival in 44 horses with equine neorickettsiosis (Potomac horse fever). *J Vet Intern Med*, 2013; 27: 1528-1534.

- Bihl F, Lariviere L, Qureshi ST, Flaherty L, Malo D. LPS-hyporesponsiveness of mnd mice is associated with a mutation in Tolllike receptor 4. *Genes Immun*, 2001; 2: 56-59.

- Blaisdell FS, Dodds WJ. Evaluation of two microhematocrit methods for quantitating plasma fibrinogen. *J Am Vet Med Assoc*, 1977; 171: 340-342.

- Blondin C, Le Dur A, Cholley B, Caroff M, Haeffner-Cavaillon N. Lipopolysaccharide complexed with soluble CD14 binds to normal human monocytes. *Eur J Immunol*, 1997; 27: 3303-3309.

- Blood DC, Radostits OM. Veterinary Medicine, 7ª ed. Filadelfia, Bailliere Tindall, 1989.

- Bone, R.C. The pathogenesis of sepsis. *Ann Inter Med*, 1991; 115: 457-469.

- Borchers A, Wilkins PA, Marsh PM, Axon JE, Read J, Castagnetti C, Pantaleon L, Clark C, Qura'n L, Belgrave R, Schwarzwald C, Levy M, Bedenice D, Saulez MN, Boston RC. Association of admission L-lactate concentration in hospitalised equine neonates with presenting complaint, periparturient events, clinical diagnosis and outcome: a

prospectivemulticenter study. *Equine Vet J Suppl*, 2012; 41: 57-63.

- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest, 1992; 101: 1644-1655.

- Borges AS, Divers TJ, Sokol T, Mohammed OH. Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *J Vet Intern Med*, 2007; 21: 489-494.

- Boscan P, Steffey EP. Plasma colloid osmotic pressure and total protein in horses during colic surgery. Veterinary Anaesthesia and Analgesia, 2007; 34: 408-415.

- Bothwell TH, Finch CA. Iron metabolism, Little, Brown. Boston, 1962.

- Bottoms GD, Johnson MA, Lamar CH, Fessler JF, Turek JJ. Endotoxin-induced eicosanoid production by equine vascular endothelial cells and neutrophils. *Circ Shock*, 1985; 15: 155-162.

- Braun JP, Lefebvre HP: Kidney function. En Kaneko JJ, editor: Clinical Biochesmitry of Domestic Animals, 5ª ed., New York, Academic Press.2008. p: 485–528.

- Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure. Lancet, 2006; 368: 157-169.

- Bueno AC, Seahorn TL, Cornick-Seahorn J, Horohov DW, Moore RM. Plasma and urine nitric oxide concentrations in horses given below a low dose of endotoxin. *Am J Vet Res*, 1999; 60: 969-976.

- Burguez PN, Ousey J, Cash RS, Rossdale PD. Changes in Blood neutrophil and lymphocyte counts following administration of cortisol to horses and foals. *Equine Vet J*, 1983; 15: 58-60.

- Burmester GR, Pezzutto A, Monocytes and Dendriditc Cells. En: Burmester GR, Pezzutto A. Color Atlas of Immunology. 1º ed. Germany: Georg Thieme

Verlag; 2003. p:43.

- Burrows GE. Endotoxaemia in the horse. *Equine Vet J*, 1981; 13: 89-94.

- Busk P, Jacobsen S, Martinussen T. Administration of perioperative penicillin reduces postoperative serum amyloid A response in horses being castrated standing. *Vet Surg*, 2010; 39: 638-643.

- Campbell MD, Bellamy JE, Searcy GP. Determination of plasma fibrinogen concentration in the horse. *Am J Vet Res*, 1981; 42: 100-104.

- Canaan-Kuhl S, Venkatraman ES, Ernst SI, Olshen RA, Myers BD. Relationships among protein and albumin concentrations and oncotic pressure in nephrotic plasma. *Am J Physiol Renal Physiol*, 1993; 264: 1052-1059.

- Canseco LM, Jerjes C, Ortiz R, Rojas A, Guzmán D. Fibrinógeno. ¿Factor o indicador de riesgo cardiovascular?. *Arch Cardiol Mex*, 2006; 76: 158-172.

- Carakostas MC, Moore WE, Smith JE. Intravascular neutrophilic granulocyte kinetics in horses. *Am J Vet Res*, 1981, 42: 623-625.

- Carrick JB, Begg AP. In Peripheral Blood Leukocytes. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2008; 24: 239-259.

- Carlson, GP. Medical problems associated with protracted heat and work stress in horses. En: Proc. Fifth Ann. Association of Equine Sports Medicine. Lawrenceville, N.J. : Veterinary Learning Systems Co.Reno, NV. 1985, 84-99.

- Castagnetti C, Pirrone A, Mariella J, Mari G. Venous blood lactate evaluation in equine neonatal intensive care. Theriogenology, 2010; 3: 343-357.

- Cavaillon JM, Minou AC. Monocites/macrophages and sepsis. *Crit Care Med*, 2005; 33: 506-509.

- Cesarini C, Monreal L, Armengou L, Delgado MÁ, Ríos J, Jose-Cunilleras E. Association of admission plasma D-dimer concentration with diagnosis and outcome in horses with colic. *J Vet Intern Med*, 2010; 24: 1490-1497.

- Cesarini C1, Monreal L, Armengou L, Delgado MÁ, Ríos J, Jose-Cunilleras E. Progression of plasma D-dimer concentration and coagulopathies during hospitalization in horses with colic. *J Vet Emerg Crit Care*, 2014; 24: 672-680.

- Charlett A, Dobbs RJ, Dobbs SM, Weller C, Ibrahim MAA, Dew T, Sherwood R, Oxlade NL, Plant JM, Bowthorpe J, Lawson AJ, Curry A, Peterson DW, Bjarnason IT. Blood profile holds clues to role of infection in a premonitory state for idiopathic parkinsonism and of gastrointestinal infection in established disease. *Gut Pathog*, 2009; 1: 20.

- Cheng PP, Jiao XY, Wang XH, Lin JH, Cai YM. Hepcidin expression in anemia of chronic disease and concomitant iron-deficiency anemia. *Clin Exp Med*, 201; 11: 33-42.

- Clark ES, Moore JN. The effects of slow infusion of a low dosage of endotoxin in healthy horses. *Equine Vet J Suppl,* 1989; 7: 33-37.

- Coleman M. Clinical Snapshot Compendium equine, 2008; Nov/Dec: 476-478.

- Cohen, N.D., Parson, E.M., Seahorn, T.L. and Carter, G.K. Prevalence and factors associated with development of laminitis in horses with duodenitis/proximal jejunitis: 33 cases (1985-1991*). J Am Vet Med Ass*, 1994; 204: 250-254.

- Collatos C, Barton M, Prasse K, Moore JN. Intravascular and peritoneal coagulation and fibrinolysis in horses with acute gastrointestinal tract diseases. *J Am Vet Med Assoc,* 1995; 207: 465-470.

- Collobert-Laugier C, Hoste H, Sevin C, Chartier C, Dorchies P. Mast cell eosinophil mucosal responses in the large intestine of horse naturally infected with cyathostomes. *Vet Parasitol*, 2002; 107: 251-264.

- Convertino VA, Baumgartner N. Effects of hypovolemia on aortic baroreflex control of heart rate in humans. *Aviat Space Environ Med*, 1997; 68: 838-843.

- Cook VL, Jones Shults J, McDowell M, Campbell NB, Davis JL, Blikslager

AT. Attenuation of ischaemic injury in the equine jejunum by administration of systemic lidocaine. *Equine Vet J*, 2008; 40: 353-357.

- Corley KT, Donaldson LL, Furr MO. Arterial lactate concentration, hospital survival, sepsis and SIRS in critically ill neonatal foals. *Equine Vet J*, 2005; 37: 53-59.

- Corradini I, Armengou L, Viu J, Rodríguez-Pozo ML, Cesarini C, Jose-Cunilleras E. Parallel testing of plasma iron and fibrinogen concentrations to detect systemic inflammation in hospitalized horses. *J Vet Emerg Crit Care*, 2014; 24: 414-420.

- Costa LRR. Granulomatous Diseases. En: Felippe MJB. Equine Clinical Immunology. 1º ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2016. p:104.

- Cotovio M, Monreal L, Navarro M, Segura D, Prada J, Alves A. Detection of fibrin deposits in tissues from horses with severe gastrointestinal disorders. *J Vet Intern Med*, 2007; 21: 308-313.

- Cowell Rl, Tyler RD. Cytology and Hematology of the Horse. Galeta CA, Ed American Veterinary Publications, Inc., 2002.

- Crisman MV, Scarratt WK and Zimmerman KL. En Blood Proteins and Inflammation in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2008; 24: 285-297.

- Cullinane AA, Barr B, Bernard W, Duncan JL, Malcahy G, Smith IM, Timoney JF. Infectious diseases. In: Higgins A, Snyder JR. The equine manual. 2ª ed., UK, Elsevier Health Sciences, 2006, p: 53-54.

- Cunha BA, Pherez FM, Durie N. Swine influenza (H1N1) and acute appendicitis Heart Lung, 2010; 39: 544-546.

- Daels PF, Stabenfeldt GH, Hughes JP, Odensvik K, Kindahl H. Effects of flunixin meglumine on endotoxin-induced prostaglandin F2 alpha secretion during early pregnancy in mares. *Am J Vet Res*, 1991; 52: 276-281.

- Dallap BL. Coagulopathy in the equine critical care patient. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2004; 20: 231-251.

- Dallap BL, Dolente B, Boston R. Coagulation profiles in 27 horses with large colon volvulus. *J Vet Emerg Crit Care*, 2003; 13: 215-225.

- Darien B, Potempa J, Moore J, Travis J. Antithrombin III activity in horses with colic: an analysis of 46 cases. *Equine Vet J*, 1991; 23: 211-214.

- [a]Deibener-Kaminsky J, Lesesve JF, Kaminsky P. Leukocyte differential for acute abdominal pain in adults. *Lab Hematol*, 2011; 17: 1-5.

- [b]Deibener-Kaminsky J, Lesesve JF, Grosset S, Pruna L, Schmall-Laurain MC, Benetos A, Kaminsky P: Clinical relevance of leukocyte differential in patients with marked leukocytosis in the emergency room. *Rev Med Interne*, 2011; 32: 406-410.

- Delano MJ, Thayer T, Gabrilovich S, Kelly-Scumpia KM, Winfield RD, Scumpia PO, Cuenca AG, Warner E, Wallet SM, Wallet MA, O'Malley KA, Ramphal R, Clare-Salzer M, Efron PA, Mathews CE, Moldawer LL. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J Immunol*, 2011; 1: 195-202.

- Delesalle C, Dewulf J, Lefebvre RA, Schuurkes JA, Proot J, Lefere L, Deprez P. Determination of lactate concentrations in blood plasma and peritoneal fluid in horses with colic by an Accusport analyzer. *J Vet Intern Med*, 2007; 21: 293-301.

- Delgado M, Monreal L, Armengou L, Ríos J, Segura D.. Peritoneal D-dimer concentration for assessing peritoneal fibrinolytic activity in horses with colic. *J Vet Intern Med*, 2009; 23: 882-889.

- Diaz OM, Durando MM, Birks EK, Reef VB. Cardiac troponin I concentrations in horses with colic. *J Am Vet Med Assoc*, 2014; 245: 118-125

- Divers TJ, Whitlock RH, Byars TD, Leith M, Crowell WA. Acute renal failure in six horses resulting from haemodynamic causes. *Equine Vet J*, 1987; 3: 178-184.

- Dolente BA, Beech J, Lindborg S, Smith G.. Evaluation of risk factors for development of catheter-associated jugular thrombophlebitis in horses: 50

Cases (1993–1998). *J Am Vet Med Assoc*, 2005; 227: 1134-1141.

- Dolente BA, Wilkins PA, Boston RC. Clinicopathologic evidence of disseminated intravascular coagulation in horses with acute colitis. *J Am Vet Med Assoc*, 2002; 220: 1034-1038.

- Don BR, Kaysen G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. *Semin Dial*, 2004;17: 432-437.

- Dondi F, Lukacs RM, Gentilini F, Rinnovati R, Spadari A, Romagnoli N. Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: Association with common clinicopathological variables and short-term outcome. *Vet J*, 2015; 205: 50-55.

- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*, 2005; 3: 191-200.

- Duckett WM, Matthews HK. Hypereosinophilia in a horse with intestinal lymphosarcoma. *Can Vet J*, 1997; 38: 719-720.

- Dunkel B, Chan DL, Boston R, Monreal L. Association between hypercoagulability and decreased survival in horses with ischemic or inflammatory gastrointestinal disease**.** *J Vet Intern Med*, 2010; 24: 1467-1474.

- Dunkel B, Kapff JE, Naylor RJ, Boston R. Blood lactate concentrations in ponies and miniature horses with gastrointestinal disease. *Equine Vet J*, 2013; 45: 666-670.

- Engelhardt WV. Cardiovascular Effects of Exercise and Training in Horses. *Adv Vet. Sci. & Comp Med*, 1977; 21: 173-205.

- Escribano BM, Castejón FM, Santisteban R, Agüera EI, Tovar P, Vivo R, Rubio MD. Gender differences in non-specific immune response to exercise in the lactate threshold: a study in equine athletes. *Res Vet Sci*, 2008; 2: 250-256.

- Fazio F, Assenza A, Tosto F, Casella S, Piccione G, Caola G. Modifications of some acute phase proteins and the white blood cell count in thoroughbreds

during training. *Vet Rec*, 2010; 167: 370-373.

- Feige K, Kästner S, Dempfle C, Balestra E. Changes in coagulation and markers of fibrinolysis in horses undergoing colic surgery. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 2003; 50: 30-36.

- Felippe MJB. The Immune System. En: Felippe MJB. Equine Clinical Immunology. 1º ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2016. p: 6.

- Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, Baynes RD, Cook JD. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med*, 1992; 119: 385-390.

- Fernex M. Eosinopenia and predisposition to thromboembolic diseases. *Helv Med Acta*, 1964; 31: 400-406.

- Fessler JF, Bottoms GD, Coppoc GL, Gimarc S, Latshaw HS, Noble JK.. Plasma endotoxin concentrations in experimental and clinical equine subjects. *Equine Vet J Suppl*, 1989; 7: 24-28.

- Fonnesbeck PV, Symons LD. Effect of diet on concentration of protein, urea nitrogen, sugar and cholesterol of blood plasma of horses, *J Anim Sci*, 1969; 28: 216-219.

- Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta*, 2006; 1763: 690-699.

- Gebhard F, Rösch M, Helm M, Strecker W, Buttenschön K, Kinzl L, Bock KH, Brückner UB. Is the activity of soluble CD14 enhanced following major trauma? *Arch Surg*, 1997; 132: 1116-1120.

- Gilliam LL, Holbrook TC, Ownby CL, McFarlane D, Sleeper MM, Martin S, Levis K, Payton ME. Cardiotoxicity, inflammation, and immune response after rattlesnake envenomation in the horse. *J Vet Intern Med*, 2012; 26: 1457-1463.

- Godin PJ, Fleisher LA, Eidsath A, Vandivier RW, Preas HL, Banks SM, Buchman TG, Suffredini AF. Experimental human endotoxemia increases cardiac regularity: results from a prospective, randomized, crossover trial.

Crit Care Med, 1996; 24: 1117-1124.

- Godlowski ZZ. Eosinopenia caused by adrenaline infusion and by insulin hypoglycaemia. *Br Med J*, 1948; 1: 46-48.

- Goetz TE, Coffman JR. Ulcerative colitis and protein losing enteropathy associated with intestinal salmonellosis and histoplasmosis in a horse. *Equine Vet J*, 1984; 16: 439-441.

- Gomez DE, Arroyo LG, Stämpfli HR, Cruz LE, Oliver OJ. Physicochemical interpretation of acid-base abnormalities in 54 adult horses with acute severe colitis and diarrhea. *J Vet Intern Med*, 2013; 27: 548-553.

- Grom AA, Mellins ED. Macrophage activation syndrome: advances towards understanding pathogenesis *Curr Opin Rheumatol*, 2010; 22: 561-566.

- Gruettner J, Viergutz T, Bolte M, Henzler T, Schoenberg SO, Sudarski S, Apfaltrer P, Walter T. Importance of risk factors for the evaluation of patients with a suspected pulmonary embolism. *Exp Ther Med,* 2015; 9: 2281-2284.

- Grunig G, Hulliger C, Winder C, Hermann M, Jungi TW, von Fellenberg R. Spontaneous and lipopolysaccharide-induced expression of procoagulant activity by equine lung macrophages in comparison with blood monocytes and blood neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol*, 1991; 29: 295-312.

- Guinat M, Vincent JL. Hyperlactataemia: not only useful in circulatory shock. *Rev Med Brux*, 2010; 3: 451-457.

- Hammond RA, Hannon R, Frean SP, Armstrong SJ, Flower RJ, Bryant CE. Endotoxin induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in equine alveolar macrophages. *Am J Vet Res*, 1999; 60: 426-431.

- Hassel DM, Hill AE, Rorabeck RA. Association between hyperglycemia and survival in 228 horses with acute gastrointestinal disease. *J Vet Intern Med*, 2009; 23: 1261-125.

- [a]Henry MM, Moore JN. Whole blood re-calcification time in equine colic. *Equine Vet J*, 1991; 23: 303-308.

- [b]Henry MM, Moore JN. Clinical relevance of monocyte procoagulant activity in horses with colic. *J Am Vet Med Assoc*, 1991; 198: 843-848.

- Henry MM, Moore JN. Endotoxin-induced procoagulant activity in equine peripheral blood monocytes. *Circ Shock*, 1988; 26: 297-309.

- Hinchcliff KW, Rush BR, Farris JW. Evaluation of plasma catecholamine and serum cortisol concentrations in horses with colic. *J Am Vet Med Assoc*, 2005; 227: 276-280.

- Hobo S, Niwa H, Anzai T. Evaluation of serum amyloid A and surfactant protein D in sera for identification of the clinical condition of horses with bacterial pneumonia. *J Vet Med Sci*, 2007; 69: 827-830.

- Hoffman, A.M., Staempfli, H.R. and Willan, A. Prognostic variables for survival of neonatal foals under intensive care. *J Vet Intern Med*, 1992; 6: 89-95.

- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Tolllike receptor 4 (TRL4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, 1999; 162: 3749-3752.

- Hubert J. Equine eosinophils- why do they migrate? *Vet J,* 2006; 171: 389-392.

- Hurcombe SD, Mudge MC, Hinchcliff KW. Clinical and clinicopathologic variables in adult horses receiving blood transfusions: 31 cases (1999–2005). *J Am Vet Med Assoc*, 2007; 231: 267-274.

- Ihler CF, Venger JL, Skjerve E. Evaluation of clinical and laboratory variables as pronostic indicators in hospitalised gastrointestinal colic horses. *Acta Vet Scand*, 2004; 45: 109-118.

- Insenser M, Martínez-García MA, Montes R, San-Millán JL, Escobar-Morreale HF. Proteomic analysis of plasma in the polycystic ovary syndrome identifies novel markers involved in iron metabolism, acute-phase response, and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010; 95: 3863-3870.

- Jackson ML. The Leukocytes. En: Veterinary Clinical Pathology: an intriduction. 1ª ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2007 p: 55-80.

- Jacobs I. Lactate, muscle glycogen and exercise performance in man. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1981; 495: 1-35.

- Jacobsen S, Jensen JC, Frei S, Jensen AL, Thoefner MB. Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine Vet J*, 2005; 37: 552-556.

- Jacobsen S, Nielsen JV, Kjelgaard-Hansen M, Toelboell T, Fjeldborg J, Halling-Thomsen M, Martinussen T, Thoefner MB. Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. *Vet Surg*, 2009; 38: 762-769.

- Jansen TC, van Bommel J, Bakker J. Blood lactate monitoring in critically ill patients: a systematic health technology assessment. *Crit Care Med*, 2009; 37: 2827-2839.

- Jennings K, Curtis L, Burford J, Freeman S. Prospective survey of veterinary practitioners' primary assessment of equine colic: clinical features, diagnoses, and treatment of 120 cases of large colon impaction. *BMC Vet Res*, 2014; 10: S2.

- John J, Woodward DB,Wang Y, Yan SB, Fisher D, Kinasewitz GT, Heiselman D. Troponin-I as a prognosticator of mortality in severe sepsis patients. *J Crit Care*, 2010; 25: 270-275.

- Johnston K, Holcombe SJ, Hauptman JG. Plasma lactate as a predictor of colonic viability and survival after 360 degrees volvulus of the ascending colon in horses. *Vet Surg*, 2007; 36: 563-567.

- Johnstone IB, Crane S. Haemostatic abnormalities in horses with colic - Their prognostic value. *Equine Vet J*, 2010; 18: 271-274.

- Johnstone I, Crane S. Hemostatic abnormalities in equine colic. *Am J Vet Res*, 1986; 47: 356-358.

- Jordan MC, Harrington JR, Cohen ND, Tsolis RM, Dangott LJ, Weinberg ED, Martens RJ. Effects of iron modulation on growth and viability of Rhodococcus equi and expression of virulence-associated protein A. *Am J Vet Res*, 2003; 64: 1337-1246.

- Junod A. The diagnostic scores for deep venous thrombosis. *Rev Med Suisse*, 2015; 11: 1558-1562.

- Kamath S, Lip GY. Fibrinogen: Biochemistry, Epidemiology and Determinants. *QJM*, 2003; 96: 711-729.

- Khemlani LS, Yang Z, Bochsler PN. Identification and characterization of a bovine lipopolysaccharide-binding protein. *J Leukoc Bio,l* 1994; 56: 784-791.

- Khol-Parisini A, Van den Hoven R, Leinker S, Hulan HW, Zentek J. Effects of feeding sunflower oil or seal blubber oil to horses with recurrent airway obstruction. *Can J Vet Res*, 2007; 71: 59-65.

- Kim YH, Park HB, Kim MJ, Kim HS, Lee HS, Han YK, Kim KW, Sohn MH, Kim KE. Prognostic usefulness of eosinopenia in the pediatric intensive care unit. *J Korean Med Sci*, 2013; 28: 114-119.

- Kindahl H, Daels P, Odensvik K, Daunt D , Fredricksson G , Stabenfeldt G , Hughes JP. Experimental models of endotoxaemia related to abortion in the mare. *Reprod Fertil Suppl*, 1991; 44: 509-516.

- King J, Gerring E. Detection of endotoxin in cases of equine colic. *Vet Rec*, 1988; 123: 269-271.

- Knowles RC, Hourrigan JL, Holbrook AA. Equine piroplasmosis. *Equine Pract*, 1980; 2: 10-14.

- Krakowski L, Krawczyk C, Kostro K, Stefaniak T, Novotny F, Obara J. Serum Levels of Acute Phase Proteins: SAA, Hp and Progesterone (P4) in Mares with Early Embryonic Death. *Reprod Domest Anim*, 2011; 46: 624-629.

- Kraus MS, Jesty SA, Gelzer AR, Ducharme NG, Mohammed HO, Mitchell LM, Soderholm LV, Divers TJ. Measurement of plasma cardiac troponin I

concentration by use of a point-of-care analyzer in clinically normal horses and horseswith experimentally induced cardiac disease. *Am J Vet Res*, 2010; 71: 55-59.

- Lambert JL, Fernandez NJ, Roy MF. Association of Presence of Band Cells and Toxic Neutrophils with Systemic Inflammatory Response Syndrome and Outcome in Horses with Acute Disease. *J Vet Intern Med*, 2016; 30: 1284-1292.

- Landesburg G, Gilon D, Meroz Y, Georgieva M, Levin PD, Goodman S, Avidan A, Beeri R, Weissman C, Jaffe AS, Sprung CL. Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *Eur Heart J*, 2012; 33: 895-903.

- Langhorn R, OyamaMA, King LG, Machen MC, Trafny DJ, Thawley V, Willesen JL, Tarnow I, Kjelgaard-Hansen M. Prognostic importance of myocardial injury in critically ill dogs with systemic inflammation. *J Vet Intern Med*, 2013; 27: 895-903.

- Latimer KS, Prasse KW. Leukocytes. In: Latimer KS, MahaffeyEA, Prasse KW, editors. Duncan and Prasse´s veterinary laboratory medicine clinical pathology. 4th Edition. Ames (IA): Iowa State Press; 2003; 46-79.

- Latson KM, Nieto JE, Beldomenico PM, Snyder JR. Evaluation of peritoneal fluid lactate as a marker of intestinal ischaemia in equine colic. *Equine Vet J*, 2005; 37: 342-346.

- Lazzeri C, Bonizzoli M, Cianchi G, et al. Troponin I in the intensive care unit setting: from the heart to the heart. Intern Emerg Med, 2008; 3: 9-16.

- Le NT, Richardson DR. The role of iron in cell cycle progresión and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys. Acta* 1603, 2002; 31-46.

- Lee K, Van der Zee H, Dziuban Jr SW, Luhmann K, Goldfarb RD. Left ventricular function during chronic endotoxemia in swine. *Am J Physiol Heart Circ Physio*l, 1988; 254: 324-330.

- Leite HP, Rodrigues da Silva AV, de Oliveira Iglesias SB, Koch Nogueira PC.

Serum Albumin Is an Independent Predictor of Clinical Outcomes in Critically Ill Children. *Pediatr Crit Care Med*, 2016; 17: 50-57.

- Levi M, van der Poll T, ten Cate H, van Deventer SJ.. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *Eur J Clin Invest,* 1997; 27: 3-9.

- Levin J, Bang F. A description of cellular coagulation in Limulus. *Bull Johns Hopkins H*osp, 1964; 115: 337-345.

- Levraut J, Ciebiera JP, Chave S, Rabary O, Jambou P, Carles M, Grimaud D. Mild hyperlactatemia in stable clearance rather than overproduction. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 1021-1026.

- Lim W, Cook DJ, Griffith LE, Crowther MA, Devereaux PJ. Elevated cardiac troponin levels in critically ill patients: prevalence, incidence, and outcomes. *Am J Crit Care*, 2006; 15: 280-288.

- Lindner AE. Maximal lactate steady state during exercise in blood of horses. *J Anim Sci*, 2010; 6: 2038-2044.

- Lohmann KL, Barton MH. Endotoxemia. En: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC, editors. Equine internal medicine. 2nd Edition. St Louis (MO): Saunders; 2004; 821-846.

- López de Toro I, Sánchez M, Rodríguez S, Raigal A, López P, Velasco A, Sánchez P, Cabezas H. Evaluation of eosinopenia as an infection marker in critical care patients. *Med Intensiva*, 2010; 34: 246-253.

- Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun*, 2000; 68: 6398-6401.

- Lukianova OA, David SS. A role for iron-sulfur clusters in DNA repair. *Curr Opin Chem Biol*, 2005; 9: 145-151.

- Lunn DP, Horohov DW. Equine immunology. En: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC, editors. Equine internal medicine. 2nd Edition. St Louis (MO): Saunders; 2004; 1-28.

- MacKay R. Endotoxemia. In: Robinson NE, 3ª ed. Current Therapy in Equine Medicine. Philadelphia: Saunders, 1992; 225-323.

- MacKay RJ, King RR, Dankert JR, Reis KJ, Skelley LA. Cytotoxic tumor necrosis factor activity produced by equine alveolar macrophages: preliminary characterization. *Vet Immunol Immunopathol,* 1991; 29: 15-30.

- MacKay RJ, Lester GD. Induction of the acute-phase cytokine, hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6, in the circulation of horses treated with endotoxin. *Am J Vet Res*, 1992; 53: 1285-1289.

- MacKay RJ, Merritt AM, Zertuche JM, Whittington M, Skelley LA. Tumor necrosis factor activity in the circulation of horses given endotoxin. *Am J Vet Res*, 1991; 52: 533-538.

- Maeder M, Fehr T, Rickli H, Ammann P. Sepsis-associated myocardial dysfunction: diagnostic and prognostic impact of cardiac troponins and natriuretic peptides. Chest, 2006; 129: 1349-1366.

- Magdesian KG, Fielding CL, Rhodes DM, Ruby RE. Changes in central venous pressure and blood lactate concentration in response to acute blood loss in horses. *J Am Vet Med Assoc*, 2006; 229: 1458-1462.

- Magdesian KG. Monitoring the critically ill equine patient. *Vet Clin North Am Equine Pract,* 2004; 20:11-39.

- Mair TS and Edwards GB. Strangulating obstructions of the small intestine. Equine Veterinary Education, 2003; 15: 192-199.

- Mair TS, Sherlock CE, Boden LA. Serum cortisol concentrations in horses with colic. *Vet J*, 2014; 201: 370-377.

- Mantavani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentation and activation. *Eur J Immunol*, 2007; 37: 14-16.

- Marasco WA, Sui J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Biotechnology*, 2007; 25: 1421-1434.

- Marchant A, Duchow J, Deville JP, Goldman M. Lipopolysaccharide induces

up-regulation of CD14 on monocytes in human whole blood. *Eur J Immunol*, 1992; 22: 1663-1665.

- Martin TR, Rubenfeld GD, Ruzinski JT, Goodman RB, Steinberg KP, Leturcq DJ, Moriarty AM, Raghu G, Baughman RP, Hudson LD. Relationship between soluble CD14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 155: 937-944.

- Masson C. Rheumatoid anemia. Joint Bone Spine, 2011; 78:131-137.

- Mathison J, Tobias P, Wolfson E, Ulevitch R. Regulatory mechanisms of host responsiveness to endotoxin (lipopolysaccharide). Pathobiology, 1991; 59: 185-188.

- Mathison JC, Tobias PS, Wolfson E, Ulevitch RJ. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein: a key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol,* 1992; 149: 200–206.

- McFarlane D, Sellon DC, Gaffney D, Hedgepeth, V., Papich, M., and Gibbs, S. Hematologic and serum biochemical variables and plasma corticotropin concentration in healthy aged horses. *Am J Vet Res*, 1998; 59: 1247-1251.

- McFarlane D, Sellon DC, Gibbs SA. Aged-related quantitative alterations in lymphocyte subsets and immunoglobulin isotypes in healthy horses. *Am J Vet Res*, 2001; 62: 1413-1417.

- Mehta NJ, Khan IA, Gupta V, Jani K, Gowda RM, Smith PR. Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction and adverse outcome in septic shock. *Int J Cardiol,* 2004; 95: 13-17

- Meyers K, Reed S, Keck M, Clem M, Bayly W. Circulating endotoxinlike substance(s) and altered hemostasis in horses with gastrointestinal disorders: an interim report. *Am J Vet Res*, 1982; 43: 2233-2238.

- Millar HR, Simpson JG, Stalker AL. An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. *J Clin Pathol*, 1971; 24: 827-830.

- Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol*, 2006; 176:

705-710.

- Monreal L, Cesarini C. Coagulopathies in horseswith colic. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2009; 25: 247-258.

- Monreal L. Editorial: D-dimer as a new test for the diagnosis of dic and thromboembolic disease. *J Vet Intern Med*, 2003; 17: 757-759.

- Monreal L, Anglés A, Espada Y, Monasterio J, Monreal M. Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. *Equine Vet J Suppl*, 2000; 32: 19-25.

- Moore JN, Barton MH. Treatment of endotoxemia. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2003; 19: 681-695.

- Moore JN, Hardee MM, Hardee GE. Modulation of arachidonic acid metabolism in endotoxic horses: comparison of flunixin meglumine, phenylbutazone, and a selective thromboxane synthetase inhibitor. *Am J Vet Res,* 1986; 47: 110-113.

- Moore JN, Morris DD. Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates. *J Am Vet Med Assoc*, 1992; 200: 1903-1914.

- [a]Moore JN, lecture: A Perspective on Endotoxemia, AAEP proceedings, California. 2001, Vol. 47. p. 65-66.

- [b]Moore JN, lecture: A Perspective on Endotoxemia, AAEP proceedings, California. 2001, Vol. 47. p. 67-68.

- Moore JN. Endotoxemia: definition, characterization, and host defenses. *Compend Cont Educ* 1981; 3: 355-359.

- Moore JN. Recognition and treatment of endotoxemia. *Vet Clin North Am Equine Pract,* 1988; 4: 105-113.

- Moore JN, Garner HE, Shapland JE, Schaub RG. Equine endotoxemia: an insight into cause and treatment. *J Am Vet Assoc*, 1981; 179: 473-477.

- Moore JN, Garner HE, Shapland JE, Hatfield DG. Lactic acidosis and arterial hypoxemia during sublethal endotoxemia in conscious ponies. *Am J Vet Res,*

1980; 41: 1696-1698.

- Moore R, Couto C, Muir W, Moore B, Kociba G. Systemic and colonic venous hemostatic alterations in horses during low-flow ischemia and reperfusion of the large colon. *Am J Vet Res*, 1995; 56: 664-670.

- Moore RM, Muir WW, Bertone AL, Beard WL. Characterization of the hemodynamic and metabolic alterations in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. *Am J Vet Res*, 1994; 55: 1444-1453.

- Morris DD. Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J Vet Intern Med*, 1991; 5: 167-181.

- Morris D. Thrombophlebitis in horses: the contribution of hemostatic dysfunction to pathogenesis. *Compend Contin Educ Vet*, 1989; 11: 1386-1394.

- Morris DD, Bloom JC, Roby KA, Woods K, Tablin F. Eosinophilic myeloproliferative disorder in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 1984; 185: 993-996.

- Morris DD, Crowe N, Moore JN, Moldawer LL. Endotoxin-induced production of interleukin 6 by equine peritoneal macrophages in vitro. *Am J Vet Res*, 1992; 53: 1298-1301.

- Morris DD, Crowe N, Moore JN. Correlation of clinical and laboratory data with serum tumor necrosis factor activity in horses with experimentally induced endotoxemia. *Am J Vet Res*, 1990; 51: 1935-1940.

- Morris D, Moore JN. Serum tumor necrosis factor activity in horses with gastrointestinal diseases which cause colic. *Am J Vet Res,* 1992; 52: 1565-1569.

- Morris D, Moore JN, Fischer JK. Endotoxin-induced production of tumor necrosis factor activity by equine peritoneal macrophages. *Circ Shock*, 1990; 30: 229-236.

- Muñoz A, Riber C, Santiesteban R, Lucas RG, Castejon FM. Effect of training duration and exercise on blood borne substrates, plasma lactate and

enzyme concentrations in Andalusian, Anglo -Arabian and Arabian breeds. *Equine Vet. J,* 2002; Suppl. 34:2 45-251.

- Muñoz E1, Argüelles D, Areste L, Miguel LS, Prades M. Retrospective analysis of exploratory laparotomies in 192 Andalusian horses and 276 horses of other breeds. *Vet Rec*, 2008; 162: 303-306.

- Narayanan S, Appleton HD. Creatinine: a review. *Clin Chem,* 1980; 26: 1119-1126.

- [a]Nath LC, Anderson GA, Hinchcliff KW, Savage CJ. Serum cardiac troponin I concentrations in horses with cardiac disease. *Aust Vet J*, 2012; 90: 351-357.

- [b]Nath LC, Anderson GA, Hinchcliff KW, Savage CJ. Clinicopathologic evidence of myocardial injury in horses with acute abdominal disease. *J Am Vet Med Assoc*, 2012; 241: 1202-1208.

- Newquist JM, Baxter GM. Evaluation of plasma fibrinogen concentration as an indicator of physeal or epiphyseal osteomyelitis in foals: 17 cases (2002-2007). *J Am Vet Med Assoc*, 2009; 15: 415-419.

- Niinistö KE, Korolainen RV, Raekallio MR, Mykkänen AK, Koho NM, Ruohoniemi MO, Leppäluoto J, Pösö AR. Plasma levels of heat shock protein 72 (HSP72) and beta-endorphin as indicators of stress, pain and prognosis in horses with colic. *Vet J*, 2010; 184: 100-104.

- Nimmo Wilkie JS, Yager JA, Nation PN, Clark EG, Townsend HG, Baird JD. Chronic eosinophilic dermatitis: a manifestation of a multisystemic epitheliotropic disease in 5 horses. *Vet Pathol*, 1985; 22: 297-305.

- Norman T, Chaffin M, Perris E, Edwards JF, David JB, Cohen ND, Reuss S. Massive pulmonary thromboembolism in six horses. *Equine Vet J*, 2008; 40: 514-517.

- Nostell K, Brojer J, Hoglund K, Edner A, Häggström J.. Cardiac troponin I and the occurrence of cardiac arrhythmias in horses with experimentally induced endotoxaemia. *Vet J*, 2012; 192: 171-175.

- Orsini JA, Elser AH, Galligan DT, Donawick WJ, Kronfeld DS.. Prognostic

index for acute abdominal crisis (colic) in horses. *Am J Vet Res*, 1988; 49: 1969-1971.

- Pablo LS, Purohit RC, Teer PA, Newton JC, Hammond LS.. Disseminated intravascular coagulation in experimental intestinal strangulation obstruction in ponies. *Am J Vet Res*, 1983; 44: 2115-2122.

- Peek, S.F., Semrad, S., McGuirk, S.M., Riseberg, A., Slack, J.A., Marques, F., Coombs, D., Lien, L., Keuler, N. and Darien, B.J. Prognostic value of clinicopathologic variables obtained at admission and effect of antiendotoxin plasma on survival in septic and critically ill foals. *J Vet Intern Med*, 2006; 20: 569-574.

- Peloso JG, Cohen ND. Use of serial measurements of peritoneal fluid lactate concentration to identify strangulating intestinal lesions in referred horses with signs of colic. *J Am Vet Med Assoc*, 2012; 240: 1208-1217.

- Pohlman LM. Basophils, Mast Cells, and Their Disorders. En: Weiss DJ y Wardrop KJ. Schalm´s veterinary hematology. 5ª ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 2000 p: 290-297.

- Pollock PJ, Prendergast M, Schumacher J, Bellenger CR. Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. *Vet Rec*, 2005; 156: 538-542.

- Prasse K, Topper M, Moore JN, Welles EG.. Analysis of hemostasis in horses with colic. *J Am Vet Med Assoc*, 1993; 203: 685-693.

- Pratt SM, Christian JA, Jackson LP, Hawkins JF, Sojka JE. What is your diagnosis? Peritoneal fluid from an Arabian horse after colic surgery. Veterinary Clinical Pathology, 2008; 37: 253-255.

- Prittie J. Optimal endpoints of resuscitation and early goal-directed therapy. *J Vet Emerg Crit Care*, 2006; 16: 329-339.

- Prudhomme S, Colin L, Laloux A. Thrombosis of the superior vena cava after prolonged catheterization. Treatment by progressive removal of the catheter combined with urokinase-heparin administration. *Ann Fr Anesth Reanim*,

1992; 11: 156-159.

- Qian SY, Liu J. Relationship between serum albumin level and prognosis in children with sepsis, severe sepsis or septic shock. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2012; 50: 184-187.

- Radcliffe RM, Divers TJ, Fletcher DJ, Mohammed H, Kraus MS. Evaluation of L-lactate and cardiac troponin I in horses undergoing emergency abdominal surgery. *J Vet Emerg Crit Care*, 2012; 22: 313-319.

- Ratledge C. Iron metabolism and infection. *Food Nutr Bull*, 2007; 8: S515-S523.

- Ratledge C, Dover L. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2005; 54: 881-941.

- Reeves MJ, Curtis CR, Salman MD, Hilbert BJ. Prognosis in Equine Colic Patients Using Multivariable Analysis. *Can J Vet Res*, 1989; 53: 87-94.

- Reynolds T, Cecconi M, Collinson P, Rhodes A, Grounds RM, Hamilton MA. Raised serum cardiac troponin I concentrations predict hospital mortality in intensive care unit patients. *Br J Anaesth,* 2012; 109: 219-224.

- Ricci G, Masotti M, Vitali DP, Vedovato M, Zanotti GZEffects of Exercise on Haematologic Parameters, Serum Iron, Serum Ferritin, Red Cell 2,3-Diphosphoglycerate and Creatine Contents, and Serum Erythropoietin in Long-Distance Runners during Basal Training. *Acta Haematol*, 1988; 80: 95-89.

- Robinson JA, Allen GK, Green EM, Garner HE, Loch WE, Walsh DM. Serum interleukin- 6 concentrations in endotoxin-infused neonatal foals. *Am J Vet Res*, 1993; 54: 1411-1414.

- Ronacardlo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol*, 2007; 7: 585-598.

- Rose RJ, Allen JR, Hodgson DR, Stewart JH, Chan W. Responses to submaximal treadmill exercise and training in horses: changes in hematology,

arterial blood gas and acid –base measurements, plasma biochemical values and heart rate. *Vet Rec*, 1983; 113: 612-618.

- Røsjø H, Varpula M, Hagve TA, Karlsson S, Ruokonen E, Pettilä V, Omland T. Circulating high sensitivity troponin T in severe sepsis and septic shock: distribution, associated factors, and relation to outcome. *Intensive Care Med*, 2011; 37: 77-85.

- Roth Z, Aroyo A, Yavin S, Arav A. 176 Effect of hyperthermia on developmental compentence of germinal-stage oocytes: in vivo and ex vivo Studies in mice. Reproduction, Fertility and Development, 2006; 18: 196-196.

- Salciccia A, Sandersen C, Grulke S, de la Rebière de Pouyade G, Caudron I, Serteyn D, Detilleux J. Sensitivity and specificity of blood leukocyte counts as an indicator of mortality in horses after colic surgery. *Vet Rec*, 2013;173: 267.

- Saulez MN, Burton A, Steyl JCA, Williams JH, Clift SJ. Perforation of the gastrointestinal tracts of four horses by metallic wires. *Vet Rec*, 2009; 164: 86-88.

- Saulez MN, Gummow B, Slovis NM, Byars TD, Frazer M, MacGillivray K, Bain FT. Admission clinicopathological data, length of stay, cost and mortality in an equine neonatal intensive care unit. *J S Afr Vet Assoc*, 2007; 3: 153-157.

- Scharnagl NC, Klade CS. Experimental discovery of T-cell epitopes: combining the best of classical and contemporary approaches. *Expert Rev Vaccines*, 2007; 6: 605-615.

- Sellon DC. Disorders of the hematopoietic system. En: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC editors. Equine internal medicine. 2nd Edition. St Louis (MO): Saunders; 2004; 721-768.

- Shaaban H, Daniel S, Sison R, Slim J, Perez G. Eosinopenia: Is it a good marker of sepsis in comparison to procalcitonin and C-reactive protein levels for patients admitted to a critical care unit in an urban hospital? *J Crit Care*,

2010; 25: 570-575.

- Shapiro NL, Bhatt SH. Critical Review and Update on the Treatment of Acute and Chronic Pulmonary Embolism. *J Pharm Pract*, 2016; 29: 35-45.

- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC. Identification of an intestinal heme transporter. Cell, 2005; 122: 789-801.

- Shorr AF, Trotta RF, Alkins SA, Hanzel GS, Diehl LF. D-dimer assay predicts mortality in critically ill patients without disseminated intravascular coagulation or venous thromboembolic disease. *Intensive Care Med*, 1999; 25: 207-210.

- Simson L, Foster PS. Chemokine and cytokine cooperativity: Eosinophil migration in the asthmatic response. Immunology and Cell Biology, 2000; 78: 415-422.

- Slack JA, McGuirk SM, Erb HN, Coombs D, Semrad SD, Riseberg A, Marques F, Darien B, Fallon L, Burns P, Murakami MA, Apple FS, Peek SF. Biochemical markers of cardiac injury in normal, surviving septic, or nonsurviving septic neonatal foals. *J Vet Intern Med*, 2005; 19: 577-580.

- Sihler KC, Raghavendran K, Westerman M, Ye W, Napolitano LM.J. Hepcidin in trauma: linking injury, inflammation, and anemia. Trauma, 2010; 69: 831-837.

- Sjödin B, Jacobs I. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. *Int J Sports Med*, 1981; 2: 23-26.

- Smithson A, Perelló R, Nicolas JM. Is eosinopenia a reliable marker of sepsis?. *Crit Care*, 2009; 13: 409.

- Snyder JK, Barsness K, Muñoz R. Gastrointestinal Complications: Necrotizing Enterocolitis, Malrotation, and Protein Losing Enteropathy. Critical Care of Children with heart disease, 2010; 4: 661-669.

- Southwood LL, Dolente BA, Lindborg S, Russell G, Boston R. Short-term outcome of equine emergency admissions at a university referral hospital.

Equine. Vet J, 2009; 41: 459-464.

- Spies C, Haude V, Fitzner R, et al. Serum cardiac troponin T as a prognostic marker in early sepsis. Serum cardiac troponin T as a prognostic marker in early sepsis. Chest, 1998; 113: 1055-1063.

- Steinbicker AU, Sachidanandan C, Vonner AJ, Yusuf RZ, Deng DY, Lai CS, Rauwerdink KM, Winn JC, Saez B, Cook CM, Szekely BA, Roy CN, Seehra JS, Cuny GD, Scadden DT, Peterson RT, Bloch KD, Yu PB. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. Blood, 2011; 117: 4915-4923.

- Steinvil A, Banai S, Leshem-Rubinow E, Rogowski O, Halkin A, Keren G, Finkelstein A, Chundadze T, Berliner S, Arbel Y. The development of anemia of inflammation during acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 2012; 156: 160-164.

- Steverink PJ, Salden HJ, Sturk A, Klein WR, van der Velden MA, Németh F. Laboratory and clinical evaluation of a chromogenic endotoxin assay for horses with acute intestinal disorders. *Vet Q*, 1994;16(sup2): 117-121.

- Stewart IB, McKenzie DC. The human spleen during physiological stress. *Sports Med*, 2002; 32: 361-369.

- Stobo JD. Lymphocytes: development and function. En: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. Inflamation: basic principles and clinical correlates. New York: Raven Press LTD; 1988; 303-324.

- Stockham SL, Scott MA. Leukocytes. Fundamentals of veterinary clinical pathology. 1st edition. Ames (IA): Iowa State Press, 2002; 49-83.

- Stokol T, Erb HN, De Wilde L, Tornquist SJ, Brooks M. Evaluation of latex agglutination kits for detection of fibrinogen degradation products and D-dimer in healthy horses and horses with severe colic. *Vet Clin Pathol*, 2005; 34: 375-382.

- Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS.. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and

Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol*, 2000; 165: 5780-5787.

- Tapping RI, Tobias PS. Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *J Biol Chem*, 1997; 27: 23157-23164.

- Traub-Dargatz J, Dargatz D. A retrospective study of vein thrombosis in horses treated with intravenous fluids in a veterinary teaching hospital. *J Vet Intern Med*, 1994; 8: 264-266.

- Tennent-Brown BS. Interpreting lactate measurement in critically ill horses: diagnosis, treatment, and prognosis. *Compend Contin Educ Vet*, 2012;34: E2.

- Tennent-Brown BS, Wilkins PA, Lindborg S, Russell G, Boston RC. Sequential plasma lactate concentrations as prognostic indicators in adult equine emergencies. *J Vet Intern Med*, 2010; 1: 198-205.

- Tennent-Brown BS, Wilkins PA, Lindborg S, Russell G, Boston RC. Assessment of a point-of-care lactate monitor in emergency admissions of adult horses to a referral hospital. *J Vet Intern Med*, 2007; 5: 1090-1098.

- Terkelsen AJ, Mølgaard H, Hansen J, Andersen OK, Jensen TS. Acute pain increases heart rate: differential mechanisms during rest and mental stress. *Auton Neurosci*, 2005; 31: 101-109.

- Terradas R, Grau S, Blanch J, Riu M, Saballs P, Castells X, Horcajada JP, Knobel H: Eosinophil count and neutrophil-lymphocyte count ratio as prognostic markers in patients with bacteremia: a retrospective cohort study. PLoS One, 2012; 7: e42860.

- Thoefner MB, Ersboll AK, Hesselholt M. Prognostic indicators in a Danish hospital-based population of colic horses. *Equine Vet J, Suppl* 2000; 32: 11-18.

- Tizard RI. Innate Immunity: Neutrophils and Phagocytosis. En: Veterinary Immunology. 9ª Ed. St Luis, Lousiana. Elsevier Saunders, 2013; p.30-40.

- Tizard RI. Los Linfocitos. En: Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8ª Ed. Elsevier Saunders, 2009; p. 128-138.

- Tobias PS, Mathison J, Mintz D, Lee JD, Kravchenko V, Kato K, Pugin J, Ulevitch RJ. Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992; 7: 239-245.

- Tobias PS, McAdam KP, Soldau K, Ulevitch RJ. Control of lipopolysaccharide- high-density lipoprotein interactions by an acute-phase reactant in human serum. *Infect Immun*, 1985; 50: 73-76.

- Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med,* 1986; 164: 777-793.

- Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation. *Immunobiol*, 1993; 187: 227-232.

- Toh CH, Downey C. Performance and prognostic importance of a new clinical and laboratory scoring system for identifying non-overt disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagul Fibrinol*, 2005; 16: 69-74.

- Toh CH, Hoots WK. The scoring system of the scientific and standardization committee on disseminated intravascular coagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: A 5-year overview. *J Thromb Haemost*, 2007; 5: 604-606.

- Tousignant-Laflamme Y, Rainville P, Marchand S. Establishing a link between heart rate and pain in healthy subjects: a gender effect. *J Pain*, 2005; 6: 341-347.

- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey III TJ, Zentella A, Albert JD, Shires GT, Cerami A. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science, 1986; 234: 470-474.

- Triedman JK, Cohen RJ, Saul JP. Mild hypovolemic stress alters autonomicmodulation of heart rate. Hypertension, 1993; 21: 236-247.

- Tripodi A. D-dimer testing in laboratory practice. *Clin Chem*, 2011; 57: 1256-1262.

- Troelstra A, Geipmans BN, Van Kessel KP, Lichenstein HS, Verhoef J, Van Strijp JA.. Dual effects of soluble CD14 on LPS priming of neutrophils. *J Leukoc Biol*, 1997; 61: 173-178.

- Uchida K, Iwasaki R, Nakano S, Kigoshi T, Morimoto S, Matsunou H. Non-obese Cushing's syndrome in an aged woman with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Intern Med*, 1995; 34: 1089-1092.

- [a]Ulevitch RJ. Endotoxin opens the Tollgates to innate immunity. *Nat Med*, 1999; 5: 144-145.

- [b]Ulevtich RJ. Toll gates for pathogen selection. Nature, 1999; 401: 755-756.

- Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB. New function for high density lipoproteins. Isolation and characterization of a bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complex formed in rabbit plasma. *J Clin Invest*, 1981; 67: 827-837.

- Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB. New function for high density lipoproteins. Their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest*, 1979; 64: 1516-1524.

- Ulevitch RJ, Tobias PS, Mathison JC. Regulation of the host response to bacterial lipopolysaccharides. *Fed Proc*, 1984; 43: 2755-2759

- Vestweber D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev*, 2007; 218: 178-196.

- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166: 249-255.

- Vosbeck K, Tobias P, Mueller H, Allen RA, Arfors KE, Ulevitch RJ, Sklar LA. Priming of polymorphonuclear granulocytes by lipopolysaccharides and its complexes with lipopolysaccharide binding protein and high density lipoprotein. *J Leukoc Biol*, 1990; 47 :97-104.

- Wada H, Sakuragawa N, Mori Y,Takagi M, Nakasaki T, Shimura M,

Hiyoyama K, Nisikawa M, Gabazza EC, Deguchi K, Kazama M, Shiku H. Haemostatic molecular markers before the onset of disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol*, 1999; 60: 273-278.

- Wada H, Wakita Y, Nakase T, Shimura M, Hiyoyama K, Nagaya S, Mori Y, Shiku H. Outcome of disseminated intravascular coagulation in relation to the score when treatment was begun. *Thromb Haemost*, 1995; 74: 848-852.

- Wang T, Lafuse WP, Zwilling BS. Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following *Mycobacterium avium* infection. *J Immunol*, 2000; 165: 6308-6313

- Ward DS, Fessler JF, Bottoms GD, Turek J. Equine endotoxemia: cardiovascular, eicosanoid, hematologic, blood chemical and plasma enzyme alterations. *Am J Vet Res,* 1987; 48: 1150-1156.

- Weiss DJ, Evanson OA. Evaluation of activated neutrophils in the blood of horses with colic. *Am J Vet Res*, 2003; 64: 1364-1368.

- Weiss DJ, Rashid J. The sepsis-coagulant axis: a review. *J Vet Intern Med,* 1998; 12: 317-324.

- Welch RD, Watkins JP, Taylor TS, Cohen ND, Carter GK. Disseminated intravascular coagulation associated with colic in 23 horses (1984-1989*). J Vet Intern Med*, 1992; 1: 29-35.

- Werners, A.H., Bull, S. and Fink-Gremmels, J. (2005) Endotoxaemia: a review with implications for the horse. *Equine Vet J,* 2005; 37: 371-383.

- Weston MC, Cunningham FM, Collins ME. Distribution of CCR3 mRNA expression in horse tissues. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006; 114: 238-246.

- Wibrow BA, Ho KM, Flexman JP, Keil AD, Kohrs DL**:** Eosinopenia as a diagnostic marker of bloodstream infection in hospitalized paediatric and adult patients: a case-control study. *Anaesth Intensive Care*, 2011; 39: 224-230.

- Wildi K, Tschudin-Sutter S, Dell-Kuster S, Frei R, Bucher HC, Nüesch R. Factors associated with positive blood cultures in outpatients with suspected

bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011; 30: 1615-1619.

- Wilson WD, Lofstedt J. Alterations in respiratory function. En Smith BP. Large animal internal medicine. 4ª ed. St Luis, Lousiana, Elsevier, 2009; 289-353.

- Wolf GA. Wolf, Peyton LC. Enteritis as a cause of "colic": A case report. Journal of Equine Veterinary Science, 1983; 3: 165-167.

- Wotman K, Wilkins PA, Palmer JE, Boston RC. Association of blood lactate concentration and outcome in foals. *J Vet Intern Med*, 2009; 3: 598-605.

- Wood S, Lavieri MC, Durkin T. Todo lo que usted debe saber sobre la sepsis. Nursing, 2008; 26: 22-27.

- Wood SC, Fedde MR. Effects of racing and gender on viscoelastic properties of horse blood. *Respir Physiol*, 1997; 107: 165-172.

- Woodward M, Hoffmeister A, Koenig W, Lowe GD. Comparison of plasma fibrinogen by Clauss, prothrombin time-derived, and immunonephelometric assays in a generalpopulation: implications for risk stratification by thirds of fibrinogen. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2003; 14: 197- 201.

- Wright SD. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J Exp Med*, 1999; 189: 605-609.

- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science, 1990; 249: 1431-1433.

- Wurfel MM, Wright SD. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. *J Immunol*, 1997; 158: 3925-3934.

- Yang Z, Breider MA, Carroll RC, Miller MS, Bochsler PN. Soluble CD14 and lipopolysaccharide-binding protein from bovine serum enable bacterial lipopolysaccharide-mediated cytotoxicity and activation of bovine vascular endothelial cells in vitro. *J Leukoc Biol* 1996; 59:2 41-247.

- Yip B, Ho KM. Eosinopenia as a predictor of unexpected re-admission and mortality after intensive care unit discharge. *Anaesth Intensive Care*, 2013; 41: 231-241.

- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. J Immunol. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innage immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol*, 1999; 163: 1-5.

- Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*, 2001; 107: 13-19.

- Zbanyszek M, Procajło A, Stopyra A, Sobiech P, Rajski K. The coagulation system in horses with colic. *Pol J Vet Sci*, 2004; 7: 53-58.