



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud
Departamento de Medicina y Cirugía Animal

**CARACTERIZACIÓN HEMATOLÓGICA E INMUNOFENOTÍPICA
DEL CABALLO PURA RAZA ESPAÑOLA**

TESIS DOCTORAL

Ángel María Hernández Guerra

Valencia, 2008

KATIUSKA SATUÉ AMBROJO, DOCTORA EN VETERINARIA Y PROFESORA COLABORADORA DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD CEU-CARDENAL HERRERA Y CARMEN LORENTE MÉNDEZ, DOCTORA EN VETERINARIA Y PROFESORA ASOCIADA DE LA UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada **“CARACTERIZACIÓN HEMATOLÓGICA E INMUNOFENOTÍPICA DEL CABALLO PURA RAZA ESPAÑOLA”** de la que es autor D. Angel Hernández Guerra, Licenciado en Veterinaria, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal en el marco del Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud, y reúne las condiciones científicas y formales para ser presentada ante el tribunal correspondiente a fin de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste, firmamos la presente en Moncada (Valencia), a 18 de Julio de 2008.

Fdo. Katiuska Satué Ambrojo

Carmen Lorente Méndez

*“Este trabajo lo dedico en especial a mi familia.
Por todos estos años hasta ver acabado un proyecto.
Espero poder devolveros todo este tiempo”*

*Una falsa ciencia hace ateos; una verdadera ciencia
posterna al hombre ante la divinidad.
Voltaire (1694-1778)*

*La verdadera ciencia enseña, por encima de todo,
a dudar y a ser ignorante.
Miguel de Unamuno (1864-1936)*

*Lo que con mucho trabajo se adquiere, más se ama.
Aristóteles (384 AC-322 AC)*

Es muy difícil agradecer en una sola página a todas las personas que me han ayudado en este tiempo. Hubiera sido imposible hacerlo sin vuestra ayuda, material y humana.

A mis dos directoras, Katy y Carmita, por su confianza en mí. Y sobre todo a Katy, se podría decir que esta tesis es más tuya que de nadie. Tuya fue la idea, el apoyo económico, los contactos, la confianza inicial y cuando parecía que las cosas no funcionaban, el soporte. Muchísimas gracias.

Por supuesto, a Maika y mis niños. Las interminables horas que han tenido que aguantar hasta que esto ha salido adelante no tienen precio. Espero recuperar algún día los incontables fines de semana sentado frente al ordenador en vez de estar disfrutando con vosotros. Esto casi nos rompe, espero que ahora nos una más.

A mi familia, por haber aguantado pacientemente todo este tiempo y darme todo el apoyo que podíais desde tan lejos.

A Isabel. Gracias por tus revisiones. Tus consejos, críticas y alabanzas me devolvieron la autoestima cuando más lo necesitaba. Te estaré siempre agradecido.

A Jose, gracias también por tus revisiones. Te digo lo mismo que a Isabel. No sabéis lo que necesitaba unas palabras de ánimo.

A Vicente y Carlos. Por vuestra paciencia con mis interminables preguntas sobre la estadística. Nunca pusisteis una mala cara para darme un consejo, una idea o una crítica. Espero ser así de paciente cuando alguien me pregunte dudas.

A Chema, Javier y Rosana por conseguirme los caballos. Sin vosotros hubiera sido imposible hacer esta tesis. Me ayudasteis de forma desinteresada poniendo de vuestra parte tiempo y dinero. Esta tesis es en parte también vuestra.

A Enrique O'Connor, Carla y Cristina, del servicio de citometría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Me enseñasteis con paciencia los entresijos e hicisteis que entendiera la citometría de flujo, de la que sois unos maestros, y aceptasteis con paciencia todos los cambios de planes que hubo.

A Helena, introducir los incontables datos en el ordenador se hizo mucho más fácil y agradable contigo. Espero que a cambio te enseñara algo.

A Carola y M^a Carmen. Por vuestra ayuda en el laboratorio. Además, aguantasteis sin quejaros que ocupara el microscopio y desordenara todo muchas veces. Lástima que no sigáis más tiempo en el CEU.

A Javi, al final te hiciste mi confidente de mis problemas en la tesis, me ayudaste a verlo todo más claro y me diste el último empujón.

A todos los que me habéis animado con la tesis, Chema, Mila, Ana, Alicia, Amparo, Carlos, Lorena, Iván, Ángel, Teresa, Carmen, Empar, Mireia, Rafa, Mónica, Nacho, Joaquín, Víctor, María, Carme, Jose, M^a Carmen. Muchas gracias por vuestro apoyo y a vuestra amistad.

1. <u>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</u>	1
1.1.-INTRODUCCIÓN	1
1.2.-OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	5
2.1.-PERFIL HEMATOLÓGICOS DEL CABALLO	5
2.1.1.-SERIE ROJA	5
2.1.1.1.- <u>Factores de variación de la serie roja en el caballo</u>	7
2.1.1.1.1.-Manejo de la muestra.....	7
2.1.1.1.2.- Precisión de las determinaciones	7
2.1.1.1.3.- Actitud y grado de excitación del animal.....	8
2.1.1.1.4.-Lugar de venipunción.....	8
2.1.1.1.5.-Alimentación.....	9
2.1.1.1.6.-Ritmos biológicos de tipo circadianos.....	9
2.1.1.1.7.-Sexo	9
2.1.1.1.8.-Estación del año.....	10
2.1.1.1.9.-Altitud	10
2.1.1.1.10.-Edad	11
2.1.1.1.11.-Raza	12
2.1.1.1.12.-Ejercicio.....	13
2.1.1.1.13.-Entrenamiento.....	15
2.1.1.1.14.-Estado fisiológico	15
2.1.1.1.15.-Tranquilizantes.....	16
2.1.1.2.- <u>Interpretación de la serie roja</u>	17
2.1.1.2.1.- Recuento de eritrocitos	17
2.1.1.2.2.- Concentración de hemoglobina y valor hematocrito.....	20
2.1.1.2.3.- Índices eritrocitarios	21
2.1.2.-SERIE BLANCA	21
2.1.2.1.- <u>Características morfológicas y fisiológicas leucocitarias en équidos</u>	22
2.1.2.1.1.-Neutrófilos	22
2.1.2.1.2.-Eosinófilos	24
2.1.2.1.3.-Basófilos.....	25
2.1.2.1.4.-Monocitos.....	26
2.1.2.1.5.-Linfocitos	28
2.1.2.1.6.-Estado fisiológico	19
2.1.2.2.- <u>Factores de variación de la serie blanca en el caballo</u>	30
2.1.2.2.1.-Raza.....	32
2.1.2.2.2.-Momento del día	33
2.1.2.2.3.-Sexo	33
2.1.2.2.4.-Edad.....	33

2.1.2.2.5.-Ejercicio.....	34
2.1.2.2.6.-Estado fisiológico	35
2.1.2.3.- <u>Interpretación del leucograma en el caballo</u>	37
2.1.2.3.1.- Interpretación de las variaciones cuantitativas en los neutrófilos.....	37
2.1.2.3.2.- Interpretación de las variaciones cuantitativas en los linfocitos	39
2.1.2.3.3.- Interpretación de las variaciones cuantitativas en los eosinófilos	40
2.1.2.3.4.- Interpretación de las variaciones cuantitativas en los monocitos.....	41
2.1.2.3.5.- Interpretación de las variaciones cuantitativas en los basófilos	41
2.1.3.- PLAQUETAS	41
2.1.3.1.- <u>Características morfológicas y fisiológicas de las plaquetas</u>	41
2.1.3.2.- <u>Factores condicionantes del plaquetograma en el caballo</u>	43
2.1.3.2.1.- Anticoagulante	43
2.1.3.2.2.- Obtención de la muestra sanguínea y tiempo de analítica.....	44
2.1.3.2.3.- Raza.....	44
2.1.3.2.4.- Edad.....	44
2.1.3.2.5.- Ejercicio y entrenamiento.....	45
2.1.3.2.6.- Estado fisiológico	45
2.1.3.3.- <u>Interpretación del plaquetograma en el caballo</u>	46
2.1.4.- ESTUDIO DEL FROTIS SANGUÍNEO EN EL CABALLO	47
2.1.4.1.- <u>Examen de los eritrocitos en el frotis sanguíneo</u>	48
2.1.4.2.- <u>Examen de los leucocitos en el frotis sanguíneo</u>	49
2.1.4.3.- <u>Examen de las plaquetas en el frotis sanguíneo</u>	50
2.1.5.- PLASMA SANGUÍNEO EN EL CABALLO.....	50
2.1.5.1.- <u>Composición proteica del plasma en el caballos</u>	50
2.1.5.2.- <u>Factores de variación de la proteinemia en el caballo</u>	52
2.1.5.2.1.- Edad y crecimiento físico	52
2.1.5.2.2.- Influencia hormonal y sexual	53
2.1.5.2.3.- Influencias de tipo nutricional.....	53
2.1.5.2.4.- Estrés y pérdida de fluidos.....	54
2.1.5.2.5.- Ejercicio y raza.....	54
2.1.5.2.6.- Estado fisiológico	55
2.1.5.3.- <u>Interpretación del proteinograma en el caballo</u>	56
2.1.5.3.1.- Interpretación de la albuminemia en el caballo	56
2.1.5.3.2.- Interpretación de la globulinemia en el caballo.....	57
2.1.5.3.3.- Interpretación de la fibrinoginemia en el caballo	58
2.2.- INMUNOLOGÍA EQUINA	59
2.2.1.- INMUNOLOGÍA INNATA Y ADQUIRIDA.....	59
2.2.2.- INTEGRANTES DEL SISTEMA INMUNE.....	61
2.2.2.1.- <u>Sistema de complemento</u>	61
2.2.2.2.- <u>Proteínas de fase aguda</u>	61

2.2.2.3.- <u>Citoquinas</u>	62
2.2.2.4.- <u>Fagocitosis</u>	62
2.2.2.5.- <u>Células inflamatorias</u>	63
2.2.2.5.1.- Granulocitos	63
2.2.2.5.1.1.- Neutrófilos	63
2.2.2.5.1.2.- Eosinófilos.....	63
2.2.2.5.1.3.- Basófilos.....	64
2.2.2.5.2.- Macrófagos	64
2.2.2.5.3.- Otras células presentadoras antígenos	64
2.2.2.5.4.- Mastocitos	65
2.2.2.5.5.- Plaquetas	65
2.2.2.5.6.- Linfocitos	65
2.2.2.5.6.1.- Linfocitos B.....	65
2.2.2.5.6.1.1.- Linfocitos B CD5	66
2.2.2.5.6.2.- Linfocitos T	67
2.2.2.5.6.2.1.- Linfocitos T reguladores.....	69
2.2.2.5.6.3. Linfocitos Natural Killer (NK)	70
2.2.2.6.- <u>Órganos y tejidos</u>	70
2.2.2.6.1.- Órganos linfoides primarios	71
2.2.2.6.1.1.- Médula ósea.....	71
2.2.2.6.1.2.- Timo	71
2.2.2.6.2.- Órganos linfoides secundarios.....	72
2.2.2.6.2.1.- Bazo	72
2.2.2.6.2.2.- Nódulos linfáticos	72
2.2.2.6.2.3.- M.A.L.T.....	73
2.3.- CITOMETRÍA DE FLUJO	73
2.3.1. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE POR INMUNOFLUORESCENCIA	75
2.3.2. COMPONENTES DEL CITÓMETRO DE FLUJO	76
2.3.2.1.- Sistema óptico.....	76
2.3.2.2.- Sistema de Iluminación	77
2.3.2.3.- Sistema hidráulico.....	77
2.3.2.4.- Sistema electrónico.....	78
2.3.2.5.- Sistema de adquisición y análisis de datos	79
2.3.3. APLICACIONES CLÍNICAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	80
2.3.3.1.- Análisis de eritrocitos	81
2.3.3.2.- Análisis de plaquetas	82
2.3.3.3.- Valoración de la función fagocítica celular.....	84
2.3.3.4.- Tipificación leucocitaria. Inmunofenotipado	85
2.3.3.5.- Desórdenes de desórdenes leucoproliferativos.....	86

2.3.3.6.- Aplicaciones de la citometría de flujo en medicina equina	87
2.4.- TIPIFICACIÓN LINFOCITARIA EN EL CABALLO	89
2.4.1.- LINFOCITOS T	90
2.4.1.1.- Linfocitos T CD2.....	90
2.4.1.2.- Linfocitos T CD3.....	90
2.4.1.3.- Linfocitos T CD5.....	91
2.4.1.4.- Linfocitos T CD4.....	91
2.4.1.5.- Linfocitos T CD8.....	91
2.4.2.- LINFOCITOS B.....	92
2.5.- EFECTOS DE LA EDAD, RAZA Y SEXO SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO	93
2.5.1.- INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.....	93
2.5.2.- INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO	98
2.5.3.- INFLUENCIA DE LA RAZA SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.....	100
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	103
3.1.- PLAN DE TRABAJO.....	103
3.2.- SELECCIÓN DE LOS ANIMALES	104
3.3.- OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	105
3.4.- ANÁLISIS LABORATORIAL.....	106
3.4.1.- HEMATOLOGÍA	106
3.4.2.- BIOQUÍMICA SANGUÍNEA.....	107
3.4.3.- CITOMETRÍA DE FLUJO	107
3.4.3.1.- Anticuerpos monoclonales	111
3.4.3.2.- Poblaciones linfocitarias e inmunofenotipo.....	113
3.4.4.- ESTUDIO ESTADÍSTICO	114
4.- RESULTADOS.....	117
4.1.- ESTABLECIMIENTO DE LOS VALORES HEMATOLÓGICOS DE REFERENCIA EN EL CABALLO PRE	118
4.1.1.- VALORES DE REFERENCIA EN EL ERITROGRAMA, NÚMERO DE PLAQUETAS Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES.	118
4.1.1.1.- Influencia del sexo sobre el eritrograma, número de plaquetas y concentración de proteínas plasmáticas totales.....	119
4.1.1.2.- Influencia de la edad sobre el eritrograma, número de plaquetas y concentración de proteínas plasmáticas totales.....	120
4.1.1.3.- Influencia del sexo y edad sobre el eritrograma, número de plaquetas y concentración de proteínas plasmáticas totales.....	125
4.1.2.- VALORES DE REFERENCIA DEL LEUCOGRAMA EN EL CABALLO PRE.....	130
4.1.2.1.- Influencia del sexo sobre el leucograma en el caballo PRE.....	131

4.1.2.2.- Influencia de la edad sobre el leucograma en el caballo PRE	133
4.1.2.3.- Influencia del sexo y la edad sobre el leucograma en el caballo PRE	140
4.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN EL CABALLO PRE.	148
4.2.1.- VALORES LINFOCITARIOS DE REFERENCIA EN EL CABALLO PRE	149
4.2.1.1.- Influencia del sexo sobre las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias	150
4.2.1.2.- Influencia de la edad sobre las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.....	152
4.2.1.3.- Influencia del sexo y la edad sobre las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias ..	162
4.2.2.- SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS (LINFOCITOS Th Y LINFOCITOS Tc) Y COCIENTE CD4/CD8	171
4.2.2.1.- Subpoblaciones linfocitarias (linfocitos Th y Linfocitos Tc).....	171
4.2.2.2.- Cociente CD4/CD8.....	173
4.3.- CORRELACIONES ENTRE LAS DIVERSAS VARIABLES HEMATOLÓGICAS Y LINFOCITARIAS EN EL CABALLO PRE	175
5.- DISCUSIÓN.....	191
5.1.- VALORES HEMATOLÓGICOS DE REFERENCIA EN EL CABALLO PRE ...	191
5.1.1.- VALORES DE REFERENCIA EN EL ERITROGRAMA, NÚMERO DE PLAQUETAS Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES	192
5.1.1.1.- Eritrocitos	192
5.1.1.2.- Concentración de hemoglobina	195
5.1.1.3.- Valor hematocrito	196
5.1.1.4.- Volumen corpuscular medio	198
5.1.1.5.- Hemoglobina corpuscular media	199
5.1.1.6.- Concentración de hemoglobina corpuscular media.....	200
5.1.1.7.- Plaquetas	201
5.1.1.8.- Proteínas plasmáticas totales	201
5.1.2.- VALORES DE REFERENCIA DEL LEUCOGRAMA EN EL CABALLO PRE: INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL SEXO	203
5.1.2.1.- Leucocitos	203
5.1.2.2.- Linfocitos	205
5.1.2.3.- Neutrófilos	206
5.1.2.4.- Cociente N/L	208
5.1.2.5.- Eosinófilos, monocitos y basófilos	209
5.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN EL CABALLO PRE.	210
5.2.1.- VALORES LINFOCITARIOS DE REFERENCIA EN EL CABALLO PRE: INFLUENCIA DEL SEXO Y LA EDAD.....	211
5.2.1.1.- <u>Linfocitos T</u>	211
5.2.1.1.1.- Subpoblaciones linfocitarias (linfocitos Th y Linfocitos Tc).....	213

5.2.1.1.2.- Cociente CD4/CD8.....	215
5.2.1.2.- <u>Linfocitos B</u>	216
5.2.1.3.- <u>Linfocitos NK</u>	218
6.-CONCLUSIONES.....	221
7.-RESUMEN.....	223
8.-SUMMARY	227
9.-ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	229
9.1.-ÍNDICE DE FIGURAS	229
9.2.-ÍNDICE DE TABLAS	232
10.-BIBLIOGRAFÍA.....	241

1.-INTRODUCCIÓN

El caballo Pura Raza Española (PRE) es la raza cuantitativamente mayoritaria y autóctona de España, existiendo numerosas yeguas distribuidas a lo largo de la geografía de nuestro país. Por otro lado, hay que considerar que los caballos PRE han constituido la base genética para la formación de numerosas razas equinas, entre las que destacan Lipiziana, Kladrub, trotón de Orloff, Frederiksberg, Holstein...

Sin embargo, a pesar de la importancia económica y socio-cultural del caballo PRE, no existen parámetros hematológicos e inmunofenotípicos concretos que puedan considerarse de referencia en esta raza. Así, la mayoría de estudios de investigación se han orientado a valorar las variaciones hematológicas que se producen en determinadas situaciones fisiológicas, como entrenamiento y ejercicio (Muñoz, 1997; Agüera y cols., 1994; Rubio y cols., 1994, a, b; 1995; Escribano y cols., 1995, a, b, c; Muñoz y cols., 2001; 2006; Gouveia, 2003), momento del ciclo reproductor (Plaschka y cols., 1996; 1997; Manso y cols., 1998; Satué, 2004) y patológicas, como laminitis (Riber y cols., 1995).

Asimismo, las aplicaciones del inmunofenotipado se han centrado por un lado, en caracterizar las poblaciones de linfocitos B y T en determinadas patologías que cursan con desequilibrios del sistema inmunitario (Deeg y cols., 2001; Flaminio y cols., 2002; Castillo-Olivares y cols., 2003; Pellegrini-Massini y cols. 2005; Thomas y cols. 2005; Kleiber y cols., 2005; Gardner y cols., 2006; De Brujin y cols., 2007; Lewis y cols., 2007; Rendle y cols., 2007) y evaluar el grado de susceptibilidad individual a padecer determinadas patologías de origen bacteriano, vírico y fúngico (Flaminio y cols., 1999; Russell y cols., 1998; Fraser y cols., 2002; Chaffin y cols., 2004). Además, esta técnica ha permitido definir las variaciones normales que se producen en las células inmunitarias durante el crecimiento y desarrollo en potros, así como para valorar la respuesta linfocitaria tras la exposición a determinados antígenos ambientales (Flaminio y cols., 1998; 1999; 2000). En todos estos casos, los resultados de dichas investigaciones se compararon con grupos control de animales sanos con un amplio rango de edad, sin especificar el sexo concreto de cada uno de ellos.

Debido a la inexistencia de referencias bibliográficas en poblaciones equinas sanas, y particularmente en el caballo PRE, el conocimiento de los parámetros hematológicos e inmunofenotípicos basales y las variaciones en función de la edad y el sexo justificaría la creación de rangos de referencia más estrechos ajustados a dichas condiciones fisiológicas. De esta forma, los datos obtenidos darán consistencia

a los resultados de la investigación y servirán como parámetros comparativos a otros estudios que utilicen la misma metodología.

El presente estudio, debido al número de animales empleados, así como el rango de edad considerado es el primer examen laboratorial de estas características realizado en el caballo, y suponemos que precursor de futuras investigaciones en la especie equina. Este trabajo de investigación permitirá por un lado establecer valores de referencia concretos y ajustados para équidos machos y hembras de diferentes edades y presumimos que serán imprescindibles para el diagnóstico de patologías de origen hematológico o del sistema inmunitario, servirán para analizar las repercusiones e implicaciones sistémicas de dichos procesos patológicos, el establecimiento del pronóstico así como valorar la respuesta al tratamiento.

2.-OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

En base a lo expuesto anteriormente y debido al interés creciente suscitado por el caballo Pura Raza Española, el presente estudio fue diseñado, en colaboración con el Equipo Veterinario de las yeguas, para conocer en profundidad el hemograma y el inmunofenotipo de los équidos PRE, así como sus variaciones con respecto al sexo y la edad. Este objetivo genérico se subdivide en varios objetivos parciales, que se detallan seguidamente.

PRIMERO: Establecer valores hematológicos de referencia para équidos PRE con edades comprendidas entre 1 y 7 años, que puedan ser de utilidad clínica al veterinario que basa su actividad profesional en esta raza. Se sabe que el hemograma se encuentra sometido a la influencia de factores variados, como raza, sexo, edad, etc.

SEGUNDO: Valorar las modificaciones hemáticas asociadas a la edad en el caballo PRE, estableciendo para ello cuatro grupos de edad. De esta manera, se pueden conocer las necesidades especiales que los animales de edad más avanzada requieren para mantener su actividad física y reproductiva al más alto nivel posible, supliendo de este modo, la demanda creciente de ejemplares por parte de los propietarios de caballos PRE e incrementando el efectivo disponible de esta raza.

TERCERO. Valorar las modificaciones hematológicas asociadas al sexo en caballos PRE. Quizá el patrón endocrinológico presente en machos y hembras pudiera ser en principio, el responsable de las diferencias hemáticas basales en este grupo de animales.

CUARTO: Establecer valores de referencia de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias de los équidos PRE. Al tratarse de la primera investigación de estas características, la implicación diagnóstica podría no circunscribirse únicamente al caballo español sino podría tener implicaciones clínicas en otras razas equinas.

QUINTO: Valorar las modificaciones asociadas a la edad sobre las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias. De esta manera se podría evaluar los cambios numéricos que acontecen en las poblaciones de linfocitos T, linfocitos B y NK con la edad, y por tanto, valorar la susceptibilidad de los individuos a padecer determinadas patologías de origen vírico, bacteriano, fúngico, etc. así como la respuesta vacunal.

SEXTO: Valorar la influencia del sexo sobre la composición de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.

2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.-PERFIL HEMATOLÓGICO EN EL CABALLO

2.1.1.-SERIE ROJA

El término serie roja hace referencia a los precursores eritrocitarios, los tejidos en los que tiene lugar su producción y a los propios eritrocitos maduros. La unidad funcional de la misma es el hematíe, el cual se evalúa a partir de muestras de sangre periférica, mediante el cálculo del número circulante de glóbulos rojos, de la concentración de hemoglobina, del valor hematócrito, de los índices eritrocitarios y del examen morfológico a nivel microscópico del eritrocito (Messer, 1995).

Para la interpretación de los datos hematológicos en los équidos, se deben considerar algunas características propias de esta especie, que les diferencia de otros animales domésticos (Morris y Large, 1990, a). Se destacan las siguientes:

Valor hematócrito inestable: El valor hematócrito en el caballo es muy variable, debido a la importante inervación del bazo y a su actuación como reservorio hemático, albergando en su interior más de la tercera parte del total de células rojas. De esta forma, cualquier estimulación adrenérgica, como ocurre durante el ejercicio, en respuesta a la excitación, a la pérdida de sangre..., provoca una esplencontracción, liberando una gran cantidad de eritrocitos hacia la circulación periférica. Por esta razón, el valor hematócrito del caballo en reposo debe evaluarse cuidadosamente bajo diferentes niveles de excitación (Persson, 1967; Schalm y Carlson, 1982; Kunugiyama y cols., 1997).

Formación de pilas globulares: Se trata de un mecanismo de agregación natural, característico de los équidos, que conlleva una rápida separación de los elementos formes del plasma, propiciando una velocidad de sedimentación globular alta (Schalm y Carlson, 1982; Jain, 1993; Oguz y cols., 1997; Baumler y cols., 2001; Plasenzotti y cols., 2004).

Inexistencia de signos periféricos de regeneración: Los eritrocitos equinos permanecen en la médula ósea durante todo su proceso de formación, de modo que se vierten hacia el torrente circulatorio una vez que la maduración se ha completado. Por este motivo, las características morfológicas ligadas a regeneración, descritas en otras especies, como la policromasia o reticulocitosis, la macrocitosis u otros signos periféricos

de regeneración, son poco frecuentes en las extensiones sanguíneas del caballo (Schalm y Carlson, 1982; Cooper y cols., 2005).

Cuerpos de Howell-Jolly: Son inclusiones eritrocitarias basófilas excéntricas, remanentes de ADN, que se pueden encontrar ocasionalmente en la sangre equina. A diferencia de lo que ocurre en otras especies animales, su presencia no indica respuesta regenerativa frente a situaciones de anemia, a no ser que aparezcan en un número elevado (Schalm y Carlson, 1982).

Tamaño eritrocitario: El eritrocito equino es relativamente pequeño en comparación con el de otras especies animales, con un diámetro medio de 5 a 6 μm y un volumen corpuscular medio (VCM) de, aproximadamente, 40 a 52 fl (Barman y cols., 1993; Lassen y Swardson, 1995; Kramer, 2000). Además, el tamaño de los hematíes difiere según la raza equina. Los caballos dedicados a la práctica deportiva, como el Pura Sangre Inglés (PSI) o los trotones Standardbred, presentan un VCM inferior a las otras razas. Como consecuencia, la hemoglobina se reparte en un número mayor de células, incrementando la superficie de la masa eritrocitaria. La mayor facilidad para el intercambio gaseoso podría justificar, parcialmente, la mejor adaptación al deporte de determinadas razas de équidos (Allen y Powell, 1983; Verheyen y cols., 2006).

2.1.1.1.-FACTORES DE VARIACIÓN DE LA SERIE ROJA EN EL CABALLO

Dentro de la interpretación del análisis hematológico en relación a la serie roja se deben considerar varios factores de variación, entre los que se citan los siguientes: manejo de la muestra, precisión de las determinaciones, actitud y grado de excitación,, lugar de venipunción, alimentación, ritmos biológicos de tipo circadiano, sexo, estación del año, altitud, edad, raza, ejercicio y entrenamiento y efecto de la administración de tranquilizantes (Schalm, 1964; Archer y Jeffcott, 1977; Snow y cols., 1983; Jain, 1993; Rose y Hodgson, 1994; Car, 2000):

2.1.1.1.1.-Manejo de la muestra

Existen diversos estudios en los que se pone de manifiesto que la utilización de tubos de vacío para la colección de la sangre puede provocar daños en las células (Archer, 1977). No obstante, el empleo de agujas de calibre superior a 21 G permite la obtención de resultados satisfactorios (Jeffcott, 1977; Messer, 1995; Cole y Whitney, 1997).

Una vez realizada la extracción sanguínea, otro parámetro a considerar es el tiempo transcurrido hasta la realización del frotis sanguíneo. Éste debe llevarse a cabo lo antes posible, preferentemente dentro de las 6 horas posteriores a la obtención de la muestra. De este modo, se evitan las alteraciones causadas por el almacenamiento. Uno de los cambios que aparecen con más frecuencia debido al almacenamiento es el aumento del tamaño de los hematíes, circunstancia que se refleja en el incremento de VCM y del valor hematócrito (Winter, 1968; Guyton, 1992).

Por otro lado, la exposición de la muestra a elevadas temperaturas ambientales o a la luz solar puede provocar hemólisis, obteniéndose valores alterados en el recuento eritrocitario (Rose y Hodgson, 1994).

2.1.1.1.2.-Precisión de las determinaciones

La precisión de las determinaciones deriva de las características del equipamiento para el análisis. Por este motivo, se debe conocer el error al que se encuentran sometidos los estudios hematológicos efectuados, siendo recomendable la realización de mediciones repetidas, lo que permite una interpretación más fiable de los resultados (Persson, 1975; Rose y Hodgson, 1994). De hecho, Persson (1975) describe una variación de hasta un 30% en los valores basales de hemoglobina en tres caballos trotones Standardbred, en los que se obtuvo sangre durante 7 días consecutivos.

2.1.1.1.3.-Actitud y grado de excitación del animal

Otro aspecto que puede influenciar los resultados de la analítica sanguínea es la actitud y el grado de excitación que presenta el animal antes y durante la extracción de la muestra (Rose y Hodgson, 1994).

Algunos estudios indican que la excitación del animal conlleva una elevación del número de glóbulos rojos circulantes, de la concentración de hemoglobina y del valor hematócrito. Este hecho es una consecuencia de la contracción esplénica, producida por la acción de la adrenalina y de la noradrenalina (Gohary y Bickhardt, 1979; Kurosawa y cols., 1998; Nagata y cols., 1999). El principal factor limitante es el tiempo necesario para recoger la muestra de sangre. Una venipunción de duración superior a 30 seg altera significativamente el hemograma, ya que supone un cierto grado de movilización

esplénica, derivado de la actuación de los ejes simpático-adrenal e hipotalámico-hipofisario (Persson, 1967; Nagata y cols., 1999).

Como causas de estrés en el caballo se citan la fatiga, la pérdida de peso y deshidratación que acompañan al transporte, entre otras (Stull, 1999; Stull y Rodiek, 2000; Racklyeft y cols., 2000; Friend, 2001).

2.1.1.1.4.-Lugar de venipunción

El lugar para la toma de la muestra sanguínea parece tener un efecto considerable sobre el resultado del eritrograma, existiendo diferencias entre las muestras obtenidas a partir de distintas venas corporales: auricular, yugular, pectoral... (Sakurai y cols., 1967; Lindner y Birks, 1994).

2.1.1.1.5.-Alimentación

Otro factor a considerar es la alimentación recibida por el caballo. En este sentido, existen varios trabajos en los que se constata un incremento significativo del valor hematócrito y de las proteínas plasmáticas totales en animales alimentados a base de heno. Este hecho se asocia a las pérdidas de líquidos a través de la salivación (Kerr y Snow, 1982; Sufit y cols., 1985). De igual modo, se observan variaciones en los parámetros eritrocitarios en caballos con diferentes regímenes nutricionales (Clarke y cols., 1988; Gatta y cols., 1992; Greppi y cols., 1996). También, se han mostrado variaciones en los parámetros de la serie roja en animales sometidos a diversas dietas alimenticias en los que se adicionan micotoxinas del género *Fusarium* (Raymond y cols., 2003).

2.1.1.1.6.-Ritmos biológicos de tipo circadiano

Se sabe que los ritmos circadianos afectan a los diferentes parámetros hematológicos (Kottmann, 1973; Allen y Powell, 1983; Bubna y Jaksch, 1986; Gill y Rastawicka, 1986; Gatta y cols., 1992; Gill y cols., 1994; Yashiki y cols., 1995; Lubas y cols., 1996; Piccione y cols., 2004).

Gill y Rastawicka (1986) describen que los periodos de oscuridad, o sea, los momentos nocturnos, se asocian a elevaciones en el valor hematócrito y en la

concentración de hemoglobina. Hauss (1994) asocia esta variación a la influencia sobre la eritropoyesis ejercida por la alternancia entre los periodos de luminosidad y de oscuridad. Años más tarde, Greppi y cols. (1996) confirman estos resultados, encontrando, además, que la concentración plasmática de proteínas totales también aumenta durante las horas con menor luminosidad.

2.1.1.1.7.-Sexo

Las diferencias hematológicas ligadas al sexo en los équidos parecen tener una importancia limitada. No obstante, existe una cierta controversia al respecto. Schalm (1964) observó que la cantidad de hemoglobina en los hematíes del macho es más elevada que en las hembras, dando lugar a valores superiores de hemoglobina corpuscular media (HCM) y de concentración hemoglobínica corpuscular media (CHCM). En principio, estas diferencias entre géneros se han asociado a la actuación de los andrógenos sobre la eritropoyesis (Persson y Ullberg, 1974).

Por el contrario, Schalm y cols. (1975), Ponce y cols. (1979) y Gill y Rastawicka (1986) mostraron en caballos PSI y Cuartos de Milla que el recuento de glóbulos rojos, la concentración de hemoglobina y el valor hematócrito eran superiores en hembras que en machos. Según Ponce y cols. (1979) este incremento eritrocitario en las hembras podría deberse a la mayor capacidad de almacenamiento de eritrocitos por parte del bazo.

2.1.1.1.8.-Estación del año

Se sabe que la estación del año influye de forma notable sobre la hematología (Gill y Wanska, 1978; Gill y Kownacka, 1979; Komosa y cols., 1990). De esta forma, se ha determinado que la concentración de hemoglobina y el valor hematócrito son superiores en verano y en otoño en relación al resto de estaciones del año. Esta variación se relaciona con una ingestión mayor de proteínas y con la actividad física más intensa que los animales realizan durante estas épocas del año (Rowlands y cols., 1979; Singh y Rattan, 1981). Además, se constata que el frío intenso disminuye el número de glóbulos rojos, debido a la reducción de su vida media (Horton, 1978).

2.1.1.1.9.-Altitud

La altura sobre el nivel del mar también condiciona variaciones en el hemograma. De hecho, caballos sometidos a mayor altitud poseen un aumento significativo de la concentración de hemoglobina, del valor hematócrito y del recuento eritrocitario, respecto a animales que habitan en alturas inferiores. Se trata de un mecanismo compensatorio del menor contenido en oxígeno en el aire atmosférico, el cual se reduce de forma proporcional a la altitud (Wickler y Anderson, 2000; Wickler y cols., 2005).

2.1.1.1.10.-Edad

La influencia de la edad sobre los parámetros hematológicos ha sido evaluada en diversas razas equinas (Ralston y cols., 1988; McFarlane y cols., 1998; 2001; Cebulj-Kadunc y cols., 2002; 2003). Sin embargo, la mayor parte de los estudios que relacionan la edad con hematología se han focalizado en potros desde el nacimiento a los cuatro años de edad (Stewart y cols., 1970; Harvey y cols., 1984; Jain, 1993), aunque recientemente los caballos geriátricos han recibido mayor atención, probablemente debido al incremento de estos mismos en la población (McFarlane y cols., 1998; Paradis, 2002).

Los potros recién nacidos poseen eritrocitos de origen fetal de gran tamaño,, presentando niveles elevados de glóbulos rojos, de concentración de hemoglobina y de valor hematócrito. Dichos parámetros se reducen progresivamente durante el primer mes de vida. El declive experimentado por los parámetros eritrocitarios durante los primeros estadios de la vida del animal está supeditado a la expansión rápida del volumen plasmático, debida a la ingestión del calostro, al incremento de la destrucción de los hematíes fetales y a la inadecuada suplementación del hierro necesaria para la síntesis de hemoglobina. A partir del segundo mes de vida, se inicia un aumento gradual de estos parámetros, que culmina al año de edad. En este momento, el animal muestra valores sanguíneos similares a los del adulto (Jain, 1993).

Stewart y cols. (1970) estimaron que el valor hematócrito y la concentración de hemoglobina disminuyen en potros menores de 2 años de edad, incrementándose a continuación, hacia los 2 años. Entre los 3 y los 4 años, existe un incremento gradual del VCM y de la HCM y, dado que la concentración de hemoglobina y el valor hematócrito permanecen constantes durante este periodo, el incremento en el tamaño celular se acompaña de una ligera reducción del número de hematíes. Otros autores encuentran estos mismos resultados en caballos de raza Lipiziana y en caballos salvajes (Ralston y cols., 1988; McFarlane y cols., 1998; Cebulj-Kadunc y cols., 2002).

En la yegua gestante Pura Raza Española de Estirpe Cartujana, Satué (2004) mostró una reducción del número de glóbulos rojos con un aumento compensatorio del VCM y de la HCM. Esta reducción en los valores de glóbulos rojos previamente había sido mostrada en Standardbred (Stewart y cols., 1970; Jain, 1986; Ralston y cols., 1988), Lipiziano (Cebulj-Kadunc y cols., 2002) y équidos salvajes (Plotka y cols., 1988). A pesar de ello, McFarlane y cols. (1998) encontraron una tendencia decreciente en animales geriátricos, posiblemente relacionada con la disminución de la capacidad regenerativa de la médula ósea.

El incremento en el tamaño eritrocitario parece ser un hallazgo frecuente asociado a la edad en el caballo (Ralston y cols., 1988; McFarlane y cols., 1998; Satué, 2004). El aumento del VCM aparece en caballos adultos en respuesta a anemia severa asociada a respuesta regenerativa intensa de la médula ósea (Easley, 1985; Radin y cols., 1986) o bien a cambios en la dinámica de maduración de los glóbulos rojos (McFarlane y cols., 1998).

Estos mismos cambios en el VCM con la edad también han sido mostrados en pacientes humanos adultos, y se han asociado a la disminución de vitamina B₁₂ o folatos en la dieta (Matthews y cols., 1988). De hecho, la suplementación con vitamina B₁₂ y ácido fólico provoca un aumento del VCM. En équidos, Stillions y cols. (1971) mostraron la carencia de deficiencias vitamínicas, principalmente debida a la síntesis endógena mediante fermentación microbiana a nivel del intestino mayor. Sin embargo, existen situaciones que podrían causar deficiencias vitamínicas en el caballo, más concretamente en casos de entrenamiento excesivo, ejercicio o confinamiento (Roberts, 1983). La reducción del número de glóbulos rojos en la yegua preñada de Pura Raza Española, podría estar relacionado con el descenso de la capacidad digestiva en animales de mayor edad (Satué, 2004). Este aumento del tamaño eritrocitario podría haber condicionado el incremento de la HCM (McFarlane y cols., 1998; Satué, 2004).

2.1.1.1.11.-Raza

La raza en équidos parece ejercer un efecto considerable sobre el eritrograma. Los caballos de las razas consideradas de sangre caliente (*hot-blooded*), como PSI, Árabe, Appaloosa, Cuarto de Milla y Standardbred, presentan valores hematológicos basales ligeramente superiores a los de razas pesadas, de sangre fría (*cold-blooded*), como Percherón, Clydesdale y ponies (McLeod y Ponder, 1946; Knill y cols., 1969; Jain, 1993; Parry y Brobst, 1997; Kramer, 2000).

Las diferencias hematológicas entre los dos grupos de razas pueden derivar de la actuación de los siguientes factores: temperamento, necesidad de oxígeno y dificultades termorreguladoras. En relación al temperamento del animal, se acepta que los animales de razas pesadas suelen ser menos excitables que los de razas ligeras. Por ello, la esplenotomía derivada de la liberación de hormonas simpáticas tras la excitación debe ser de menor magnitud en el primer grupo de caballos (Hanson y cols., 1995). Menor necesidad de oxígeno en los tejidos metabólicamente activos en razas de sangre fría.

Se describe que las razas pesadas tienen un cociente masa corporal/superficie menos favorable para la termorregulación, en comparación con las razas ligeras. Por ello, una masa hemática circulante mayor sería un inconveniente durante el ejercicio, al alcanzarse una hiperviscosidad sanguínea más intensa, con los efectos negativos asociados a ella (Kline y Foreman, 1991; Golland y cols., 2003; McKeever, 2003).

2.1.1.1.12.-Ejercicio

La relación existente entre la serie roja y el rendimiento deportivo en diversas disciplinas ecuestres ha sido objeto de estudio para muchos investigadores, dando lugar a resultados conflictivos. No obstante, la mayoría de los autores aceptan que los caballos más aptos físicamente presentan valores basales de recuento de células rojas, hemoglobina y valor hematocrito dentro de unos límites concretos (Brenon, 1956; Irvine, 1958; Steel y Whitlock, 1960; Stewart y cols., 1970; Stewart y Steel, 1974; Marbach, 1978). Dentro de este contexto destacan los trabajos de Steel y Whitlock (1960) y de Marbach (1978).

Steel y Whitlock (1960) analizaron un total de 274 muestras sanguíneas basales y según los datos obtenidos, consideraron cuatro grupos de caballos: hipervolémico (número de glóbulos rojos $>11 \times 10^6/\text{mm}^3$; concentración de hemoglobina $>16 \text{ g/dl}$; valor hematocrito $>45\%$), normovolémico (número de glóbulos rojos: $9-11 \times 10^6/\text{mm}^3$; concentración de hemoglobina: $14-16 \text{ g/dl}$; valor hematocrito: $40-45\%$), ligeramente anémico (número de glóbulos rojos: $8-9 \times 10^6/\text{mm}^3$; concentración de hemoglobina: $12-14 \text{ g/dl}$; valor hematocrito: $35-40\%$) y anémico (número de glóbulos rojos $<8 \times 10^6/\text{mm}^3$; concentración de hemoglobina $<12 \text{ g/dl}$; valor hematocrito $<35\%$). Estos autores encontraron que el grupo de mayor rendimiento fue el normovolémico.

Posteriormente, Marbach (1978), sobre un conjunto de 3794 muestras de sangre, concluyeron que los caballos de carreras con un estado de forma física correcta tenían

unos datos hematológicos basales comprendidos dentro de unos límites estrechos: 9-11,5 x 10⁶/mm³ de glóbulos rojos, 14,8-15,8 g/dl de hemoglobina y 35-40 % de valor hematócrito. Los cambios hematológicos durante el ejercicio se producen conjuntamente con las adaptaciones cardiovasculares, con la finalidad de transportar el oxígeno a los tejidos metabólicamente activos. Por este motivo, las características sanguíneas pueden ser uno de los factores limitantes de la capacidad aerobia (Persson, 1967).

El bazo de los équidos constituye un reservorio de hematíes, capaz de almacenar hasta 1/3 del volumen total de glóbulos rojos del sistema circulatorio (Torten y Schalm, 1964; Persson, 1967; 1968; 1997; Martínez y cols., 1988; Hanson y cols., 1995; Rubio y cols., 1995). La esplencontracción producida como consecuencia de la liberación de catecolaminas y/o de cortisol al inicio del ejercicio, puede incrementar el valor hematócrito hasta un 50% (Persson, 1967; Revington, 1983).

El grado de movilización esplénica está supeditado a la duración y a la intensidad del esfuerzo y, por tanto, a la necesidad de oxígeno en los tejidos metabólicamente activos (Persson, 1983). De este modo, las actividades físicas máximas, como las carreras de velocidad, inducen una esplencontracción marcada, lográndose valores hematócritos superiores al 60% (Rose y cols., 1983; Snow y cols., 1983; McKeever y cols., 1993). Las actividades físicas submáximas, por el contrario, no requieren un consumo de oxígeno tan elevado. En este caso, el incremento de los valores hemáticos es menor y depende, fundamentalmente, del estado hídrico, produciéndose pérdidas de agua y electrolitos debido a la intervención de los mecanismos termorreguladores (Judson y cols., 1983, a, b; Rubio y cols., 1994, a, b; 1995).

Por otro lado, Hanzawa y cols. (1995) pusieron de manifiesto que los eritrocitos liberados por el bazo durante el esfuerzo físico, también denominados equinocitos por algunos autores, presentan un tamaño y una cantidad de hemoglobina inferiores que los eritrocitos circulantes normales. De ahí que los índices celulares VCM y HCM decrezcan significativamente durante el desarrollo de una actividad física (Boucher, y cols., 1985; Weiss y cols., 1992; 1994). No obstante, hay que matizar que no todas las investigaciones coinciden en este aspecto. Smith y cols. (1989) describieron macrocitosis e hipercromía tras actividades físicas de intensidad máxima.

2.1.1.1.13.-Entrenamiento

Muchos investigadores han evaluado el efecto del entrenamiento físico sobre el hemograma. Se describe un incremento de los valores eritrocitarios en reposo (Steel y Witlock, 1960; Persson, 1967; Clarkson, 1968; Snow y McKenzie, 1977; Mullen y cols., 1979; Snow y cols., 1982; Rose y cols., 1983; Allen y Powell, 1983; Rose y Hodgson, 1983; Escribano y cols., 1995, c; Tyler-McGowan y cols., 1999).

También se comprueba que en el síndrome de sobreentrenamiento, relacionado, en parte, con insuficiencia o agotamiento adrenal, se puede estimular intensamente la eritropoyesis, condicionando un incremento del volumen sanguíneo total. Esta respuesta representa una consecuencia de la policitemia secundaria fisiológica derivada de la hipoxia tisular (Persson, 1967; 1968; 1983; Bruin y cols., 1994; Golland y cols., 2003; McKeever, 2003).

2.1.1.1.14.-Estado fisiológico

Las investigaciones que evalúan los cambios hematológicos derivados de la gestación en yeguas son escasas y controvertidas. En estudios llevados a cabo con yeguas gestantes PSI y Árabes, se observó un incremento significativo en el número de eritrocitos (Hansen y Tood, 1951; Mason y Kwok, 1977; Berlink y cols., 2000) y del hematócrito durante el periodo gestacional (Berlink y cols., 2000; Domingo, 2008). Estos resultados podrían estar asociados a la intensidad de los requerimientos metabólicos del feto durante el segundo periodo de gestación y la influencia de la lactación durante el primer periodo.

Por el contrario, diversas investigaciones realizadas en varias especies mamíferas confirmaron una reducción de los valores eritrocitarios durante la gestación. Esta disminución es una consecuencia de la hemodilución por el incremento en el volumen plasmático (Botella y Clavero, 1974). Tras el parto, aumentan ligeramente, una vez que se restablece el volumen normal al liberarse los anejos y líquidos fetales (Jain, 1993). Dicha idea es defendida por diversos autores, como Satué (2004) y Orozco y cols. (2007) en yeguas, Allard y cols. (1989) en perras y Ratnasooriya y cols. (1993) en elefantes hembra. Sin embargo, otros autores no mostraron variaciones en los parámetros eritrocitarios durante este periodo en la yegua (Plaschka y cols., 1996).

En momentos cercanos al parto, el análisis de la eritrocitemia en la yegua no ha revelado variaciones significativas (Plaschka y cols., 1997; Taylor-Macallister y cols., 1997; Manso y cols., 1998).

La lactación cursa con una reducción en el número circulante de hematíes, en la concentración de hemoglobina y en el valor hematócrito en la yegua, según Hansen y cols. (1950, b). Con posterioridad, Harvey y cols. (1994; 2005), en yeguas PSI y Cuarto de Milla, describieron esta misma circunstancia. Estos últimos autores reseñaron que, aunque no se trata de una anemia propiamente dicha, en hembras con un periodo de lactación superior a los 4 meses de duración, se evidencia un descenso del valor hematócrito.

La tendencia hacia la disminución de los valores del eritrograma también se ha descrito en animales de otras especies, como vacuno de leche (Steinhardt y cols., 1994), ovino (Ramos y cols., 1992) y caprino (Mbassa y Poulsen, 1991; Montoro, 1995).

2.1.1.1.15.-Tranquilizantes

La administración de compuestos tranquilizantes, como los derivados fenotiazínicos (acepromazina, clorpromazina,...) y los α_2 -adrenérgicos (xilazina, romifidina, detomidina,...) modifica sustancialmente el hemograma basal. Su acción se basa en la relajación de la musculatura lisa de la cápsula esplénica, propiciando el almacenamiento de células rojas en el bazo (Jeffcott, 1977; Muir y Hubbell, 1991). Del mismo modo, estas sustancias generan un efecto hipotensivo prolongado, tras una primera fase corta de hipertensión. La hipotensión conduce a un incremento del volumen plasmático. La hemodilución resultante, asimismo, da lugar a una reducción de los valores hemáticos en reposo (Dalton, 1972; Jeffcott, 1974; Snow y MacKenzie, 1977).

2.1.1.2.-INTERPRETACIÓN DE LA SERIE ROJA

2.1.1.2.1.-Recuento de eritrocitos

De forma general, las modificaciones patológicas que pueden afectar a la serie roja son la policitemia o eritrocitosis y la anemia.

La policitemia se define como el incremento absoluto o relativo de la cantidad de glóbulos rojos. En el hemograma, viene representada por el aumento del valor hematócrito, de la concentración de hemoglobina y del recuento de eritrocitos (Lassen y Swardson, 1995).

Las policitemias se clasifican en dos grandes grupos, relativas o absolutas. En las policitemias relativas, no existe un incremento en la creación de células rojas. Sus

orígenes son la deshidratación y la contracción esplénica (Lassen y Swardson, 1995). La deshidratación conduce a una disminución del volumen plasmático en relación al componente celular. Se trata, por tanto, de una hemoconcentración, que se acompaña de un aumento de la concentración de proteínas plasmáticas totales (Lassen y Swardson, 1995). Por otro lado, la contracción esplénica puede elevar sustancialmente el valor hematócrito, la concentración de hemoglobina y el recuento celular. En ambos casos, el número total de eritrocitos no se modifica (Morris y Large, 1990, a; Watson, 2000).

La policitemia absoluta representa la adición de células de nueva formación hacia la circulación periférica. Dentro de este grupo, se distinguen la policitemia absoluta primaria y la policitemia absoluta secundaria.

En la primaria, la eritrocitosis indica una respuesta exagerada de la médula ósea, sin ningún estímulo que la provoque, ya que las concentraciones periféricas de eritropoyetina no varían. Este tipo de policitemia se produce en algunas neoplasias o alteraciones funcionales medulares (Morris, 1998; Watson, 2000).

En la secundaria, por el contrario, la policitemia se debe a la actuación de la eritropoyetina sobre la médula ósea, ya que los niveles de dicha hormona se elevan significativamente. Según algunos autores, cabe distinguir entre una policitemia secundaria fisiológicamente correcta y una policitemia secundaria fisiológicamente incorrecta. La primera se describe en casos de hipoxia crónica sistémica, como ocurre en pacientes con patologías cardiovasculares y pulmonares de curso prolongado o en caballos que viven en zonas de altitud elevada, donde el contenido en oxígeno del aire es bajo. La segunda se relaciona con neoplasias que exacerban la producción de eritropoyetina, bien de forma directa, como ocurre en los tumores renales (carcinoma renal) o bien de forma indirecta, formando parte del síndrome paraneoplásico, como ocurre en el carcinoma hepatocelular (Morris, 1998; Watson, 2000).

A continuación, en la tabla 1 se expone un resumen de los diversos tipos de policitemia (Morris, 1998):

CLASIFICACIÓN	ETIOLOGÍA
Eritrocitosis relativa	Deshidratación Esplenocontracción
Eritrocitosis absoluta	
Eritrocitosis absoluta primaria	Disfunciones medulares
Eritrocitosis absoluta secundaria	Respuesta a un incremento en los niveles periféricos de eritropoyetina
Eritrocitosis absoluta fisiológicamente correcta	Respuesta a hipoxia crónica o altitud elevada
Eritrocitosis absoluta fisiológicamente incorrecta	Síndrome paraneoplásico, neoplasias de origen renal

Tabla 1.- Representación esquemática de los diversos tipos de policitemia descritos para équidos (Morris, 1998)

La anemia se define como una disminución absoluta o relativa del valor hematócrito, de la concentración de hemoglobina y del recuento de eritrocitos (Messer, 1995). En las anemias relativas, no existe una reducción del número total de células rojas. No obstante, la hemodilución o el secuestro de eritrocitos hace que las tres variables citadas descendan (Mahaffey y Moore, 1986; Tvedten y Weiss, 2000).

Las anemias con relevancia clínica son las absolutas, en las que existe un descenso en el número total de células rojas. De forma genérica, se diferencia entre anemias regenerativas y no regenerativas. Dentro del primer grupo, se encuentran las anemias derivadas de la pérdida de sangre, bien de forma aguda, bien de forma crónica, y las anemias hemolíticas. A continuación, se presentan los diversos tipos de anemias absolutas descritas en équidos (Lassen y Swardson, 1995; Morris, 1998).

A. Anemias regenerativas

A.1. Anemias regenerativas por pérdida de sangre

A.1.1. Anemias regenerativas por pérdida aguda de sangre

Coagulación intravascular diseminada

Traumas y cirugías

Diátesis hemorrágicas angiopáticas, trombopáticas y plasmopáticas
Intoxicación por rodenticidas
Micosis de bolsas guturales
Púrpura hemorrágica equina
Hematoma etmoidal progresivo

A.1.2. Anemias regenerativas por pérdida crónica de sangre

Pérdidas por el sistema digestivo: neoplasias digestivas, úlceras gástricas,....
Pérdidas por el sistema respiratorio: tumores, hemorragias pulmonares,....
Pérdidas por el sistema genitourinario: cistitis, neoplasias vesicales,...

A.2. Anemias regenerativas hemolíticas

A.2.1. Anemias regenerativas hemolíticas de origen no infeccioso

Isoeritrolisis neonatal equina
Anemia hemolítica alimentaria (trébol dulce, cebolla)
Transfusión incompatible de sangre
Toxicosis por fenotiacinas
Administración de penicilinas
Intoxicación por ionóforos (monensina)
Anemia hemolítica inmunomediada
Anemia hemolítica secundaria a neoplasias (linfoma)
Anemia secundaria al tratamiento sistémico con organofosforados
Deficiencia en glucosa-6-P deshidrogenasa

A.2.2. Anemias regenerativas hemolíticas de origen infeccioso

Anemia infecciosa equina
Theileria equi* o *Babesia caballi
Clostridiosis

B. Anemias no regenerativas o hipoproliferativas

- B.1. Anemia de la enfermedad crónica
- B.2. Insuficiencia renal crónica
- B.3. Anemia aplásica idiopática
- B.4. Hipoplasia familiar del caballo Standardbred
- B.5. Neoplasias medulares

2.1.1.2.2.-Concentración de hemoglobina y valor hematócrito

La concentración de hemoglobina es un parámetro que considerado aisladamente, no tiene significado clínico, por lo que debe evaluarse de forma conjunta con el valor

hematócrito (Messer, 1995). El conocimiento del valor hematócrito en el caballo es especialmente útil, puesto que junto con la concentración de proteínas plasmáticas totales, permite la valoración del estado hídrico del paciente (Pastor y cols., 1995; Kramer, 2000).

De forma general, ambos parámetros, es decir, valor hematócrito y concentración de proteínas plasmáticas totales, suelen evolucionar de forma paralela. Sin embargo, existen múltiples situaciones clínicas en las que existe disparidad entre ambos parámetros. Entre dichas situaciones cabe considerar las siguientes (Morris, 1998; Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999; Kramer, 2000):

- Aumento del valor hematócrito en caso de esplenotomía, no acompañado de elevaciones simultáneas de proteínas plasmáticas totales.

- Procesos que cursan con pérdida de proteínas (enteritis, tiflocolitis, procesos renales con proteinuria, insuficiencias hepáticas). En este caso, puede hallarse una hipoproteinemia con un valor hematócrito normal, o bien, una proteinemia normal con elevación del valor hematócrito debido a las pérdidas hídricas que suelen acompañar a algunas de las patologías anteriores.

- Anemias hemolíticas intravasculares, con un descenso del valor hematócrito y, en función de la causa, proteinemia normal, hipoproteinemia o hiperproteinemia.

- Disminución de la concentración de proteínas plasmáticas totales y del valor hematócrito en procesos hemorrágicos.

2.1.1.2.3.-Índices eritrocitarios

Los índices eritrocitarios, VCM, HCM y CHCM, resultan especialmente útiles para evaluar y categorizar los procesos anémicos. Clínicamente, los más utilizados son el VCM y la CHCM, que informan sobre el tamaño medio de los hematíes y sobre la cantidad de hemoglobina que poseen, respectivamente (Messer, 1995; Morris, 1998; Sloet Von Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999; Kramer, 2000).

En relación al VCM, los eritrocitos pueden ser de tamaño normal (normocíticos), más pequeños de lo normal (microcíticos) o de tamaño superior al normal (macrocíticos). Según la CHCM, los eritrocitos se clasifican como normocromicos, si poseen una cantidad normal de hemoglobina, o hipocromicos, si la cantidad de hemoglobina es inferior a la normal (Pastor y cols., 1995).

Finalmente, hay que tener en cuenta que, para una correcta interpretación del eritrograma, se debe conocer la concentración de proteínas plasmáticas totales y/o de albúmina. La evaluación conjunta de ambos parámetros permite la diferenciación entre variaciones hemáticas absolutas o relativas (Messer, 1995; Kramer, 2000).

2.1.2.-SERIE BLANCA

La serie blanca hace referencia al conjunto de datos aportados por el recuento total de leucocitos, el recuento diferencial de los mismos y el análisis de la morfología leucocitaria, pudiendo considerarse como una valoración puntual de un proceso dinámico (Kidd, 1991; Welles, 2000).

Los valores celulares sanguíneos representan el resultado final de la dinámica de producción celular por parte de la médula ósea, la liberación de las células formadas a la sangre periférica y la utilización de éstas por los diversos órganos y sistemas corporales, pudiendo coexistir células en diferentes estadios de maduración (Kidd, 1991). De este modo, se pueden hallar células completamente maduras (neutrófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos y basófilos) y leucocitos inmaduros (neutrófilos en banda, metamielocitos, mielocitos y progranulocitos) (Messer, 1995; Welles, 2000).

2.1.2.1.-CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS LEUCOCITARIAS EN ÉQUIDOS

2.1.2.1.1.-Neutrófilos

La liberación de los neutrófilos desde la médula ósea hacia la circulación sistémica se encuentra regulada por las necesidades tisulares y por la actuación de diversos factores de origen humoral. Tras su paso hacia la sangre, los neutrófilos pueden situarse en el *pool* circulante o bien en el *pool* marginal, almacenados en el endotelio vascular de diferentes órganos, como pulmón o intestino. De hecho, Lassen y Swardson (1995) describen tres localizaciones generales para los neutrófilos:

-Médula ósea: En este compartimento existe una población proliferante de neutrófilos, que incluye promielocitos, mielocitos, metamielocitos y neutrófilos maduros, preparados para su liberación hacia sangre periférica (Lassen y Swardson, 1995; Roi y cols., 1997; Smith, 2000).

-Sangre: En el compartimento sanguíneo se encuentran los neutrófilos circulantes, valorables mediante el hemograma. Estas células periféricas aparecen con forma redondeada y con un tamaño de 10 a 15 μm de diámetro. Su citoplasma es claro, con gránulos de tinción neutra o rosa pálido y su núcleo es polimórfico y segmentado, con cromatina dispuesta en forma de nudos (Lassen y Swardson, 1995; Roi y cols., 1997; Welles, 2000).

-Tejidos: En los procesos infecciosos e inflamatorios se produce una liberación de sustancias quimiotácticas que favorecen la migración neutrofílica desde el lecho vascular hacia los tejidos afectados. Los granulocitos del *pool* marginal se adhieren al endotelio vascular, especialmente al de los vasos de pequeño calibre. Esta circunstancia facilita la migración hacia los tejidos, al mismo tiempo que sirve de reserva para el *pool* circulante, de modo que existe un intercambio continuo entre los sectores marginal y circulante (Lassen y Swardson, 1995; Roi y cols., 1997; Smith, 2000).

En sangre periférica, los neutrófilos pueden aparecer como neutrófilos segmentados, una vez alcanzada su madurez, o bien como neutrófilos en banda, cuando aún son formas inmaduras (Kramer, 2000; Smith, 2000).

En condiciones fisiológicas, la cantidad circulante de neutrófilos en banda en sangre periférica es escasa. En casos de infección bacteriana, estos neutrófilos jóvenes pueden suponer entre un 1 y un 10% del recuento diferencial leucocitario total. Morfológicamente, presentan un núcleo polimórfico, sin constricciones, con un patrón de cromatina menos condensada que los neutrófilos segmentados. Su citoplasma es similar al del neutrófilo maduro (Jain, 1993; Welles, 2000).

El neutrófilo maduro o segmentado muestra un núcleo con lobulaciones unidas mediante finos estrechamientos y un patrón de cromatina densa. El citoplasma se tiñe de forma pálida y contiene una gran cantidad de gránulos pequeños azurófilos rosados, repartidos de forma uniforme (Lassen y Swardson, 1995; Smith, 2000).

Los neutrófilos circulantes tienen una vida media de 10,5 horas, renovándose aproximadamente 1,5 veces al día (Lassen y Swardson, 1995; Welles, 2000). A continuación, abandonan el torrente circulatorio y emigran hacia los tejidos. Se trata de un movimiento unidireccional, ya que estas células no regresan hacia la circulación periférica. En los tejidos, los neutrófilos son funcionales durante 1 ó 2 días y, posteriormente son fagocitados por las células del sistema monocito-macrófago, o bien

se eliminan por las superficies mucosas (Morris y Large, 1990, b; Morris, 1998; Welles, 2000).

La función principal de los neutrófilos es defensiva y se lleva a cabo mediante mecanismos de fagocitosis. Para ello, los neutrófilos utilizan enzimas hidrolíticas y compuestos reactivos de oxígeno, que destruyen a los microorganismos. Sin embargo, estas enzimas también se liberan hacia los propios tejidos del paciente, ocasionando daños tisulares importantes. Además, los neutrófilos producen leucotrienos y otros mediadores de la inflamación que contribuyen al inicio del proceso inflamatorio (Roi y cols., 1997; Smith, 2000; Welles, 2000).

En situaciones de infección bacteriana puede producirse una desviación a la izquierda, caracterizada por un incremento en el porcentaje de neutrófilos inmaduros presente en sangre periférica. Esta desviación aparece como consecuencia de la demanda exacerbada de neutrófilos por parte del organismo, sobrepasando la capacidad de respuesta de la médula ósea para proveer suficiente cantidad de células maduras (Schalm y Carlson, 1982; Welles, 2000). Por este motivo, en sangre periférica se pueden encontrar diversos tipos de células inmaduras, tales como metamielocitos, mielocitos, promielocitos y mieloblastos (Latimer y Rakich, 1992). Otro hallazgo característico de las infecciones bacterianas es la aparición de modificaciones morfológicas citoplasmáticas, que serán descritas con posterioridad y que se conocen como cambios tóxicos neutrofílicos (Lassen y Swardson, 1995; Kramer, 2000; Welles, 2000).

2.1.2.1.2.-Eosinófilos

Los eosinófilos son células de tamaño ligeramente superior al de los neutrófilos. Su citoplasma, de color azul pálido, muestra numerosos gránulos con una tinción eosinófila intensa. Su núcleo puede aparecer segmentado o lobulado y, a veces, se encuentra cubierto casi completamente por los gránulos citoplasmáticos (Kramer, 2000; Smith, 2000). No obstante, hay que tener en cuenta que existen situaciones, poco frecuentes, en las que se produce una degranulación eosinofílica, presentándose como estructuras celulares vacuolizadas (Latimer, 1999).

La cantidad de eosinófilos presentes en sangre periférica es escasa, debido a que la mayor parte de estas células migra hacia los tejidos, como son la mucosa bronquial, tracto gastrointestinal,... (Young, 2000). La vida media de los eosinófilos circulantes es de unas 2 a 12 horas en seres humanos, situación extrapolable a los équidos. Se confirma que estas células poseen receptores para las hormonas estrogénicas, de modo que se

puede producir un flujo incrementado de eosinófilos hacia el tracto genitourinario en momentos determinados del ciclo reproductivo, no asociado a la exposición a un elemento antigénico. A continuación, los eosinófilos permanecen a nivel tisular durante varios días, ejerciendo diversas funciones, hasta su eliminación por el sistema monocito–macrófago o mediante migración por las superficies epiteliales (Latimer, 1999; Welles, 2000; Young, 2000).

La función principal de los eosinófilos es la destrucción de agentes de naturaleza parasitaria y la modulación de las reacciones de hipersensibilidad, estando ambas acciones relacionadas. La exposición a antígenos de naturaleza parasitaria, fundamentalmente a helmintos, induce la producción de IgE por las células plasmáticas. Este anticuerpo citofílico se fija, con posterioridad, a los receptores de membrana de las células cebadas o mastocitos. La nueva exposición al mismo compuesto antigénico induce una alteración en las células cebadas, con degranulación y liberación de factores quimiotácticos de eosinófilos. Dichos factores promueven la salida de los eosinófilos circulantes hacia los tejidos, procediendo a la destrucción parasitaria o a la regulación de la reacción inmune originada (Roi y cols., 1997; Latimer, 1999; Welles, 2000; Young, 2000).

La destrucción parasitaria por los eosinófilos se ve facilitada por la opsonización previa del organismo con anticuerpos, generalmente con IgG o con complemento. Tras la fijación de los eosinófilos a los parásitos opsonizados, se produce la degranulación celular, con la liberación de proteínas básicas y peroxidasas, que originan lesiones en las proteínas de superficie del agente parasitario y la producción de compuestos reactivos de oxígeno (Morris, 1998; Latimer, 1999; Welles, 2000).

Por otro lado, diversos estudios in vitro han mostrado que los eosinófilos actúan como moduladores de las reacciones inmunes. Este grupo de leucocitos puede fagocitar gránulos desprendidos o liberados de las células cebadas, inactivar las sustancias de reacción lenta de la anafilaxis (leucotrienos C₄, D₄ y E₄) con artilsulfatasa B, degradar la histamina con histaminasa, inactivar el factor activador de plaquetas con fosfolipasa D y neutralizar la heparina con la liberación de diversas proteínas (Weller y Goetzl, 1980; Butterworth y Davis, 1981). Sin embargo, la degranulación de los eosinófilos no se halla libre de consecuencias secundarias, debido a la producción de lesiones tisulares indiscriminadas. La agresión tisular puede ser localizada, como ocurre en las neumonías alérgicas o en las patologías obstructivas recurrentes de las vías respiratorias inferiores, o generalizada, como se produce en los casos de hipereosinofilia idiopática o en las

infiltraciones eosinofílicas sistémicas. Este último grupo de síndromes no siempre se acompaña de eosinofilia periférica (Latimer, 1999; Welles, 2000).

2.1.2.1.3.-Basófilos

Los basófilos son células de tamaño ligeramente superior al de los neutrófilos. Presentan un núcleo lobulado, si bien en menor grado que el de los neutrófilos, y un citoplasma de color azul grisáceo sobre el que se dispone una gran cantidad de gránulos repartidos de forma irregular, con una tinción intensa de color púrpura, llegando incluso a ocultar el núcleo (Jain, 1993; Kramer, 2000). Las células cebadas raramente se aprecian en sangre periférica, pero cuando aparecen muestran un núcleo redondo u ovalado (Jain, 1986; 1993; Scott y Stockham, 2000).

Los basófilos no suelen aparecer en condiciones fisiológicas en sangre periférica, si bien tienden a incrementarse en situaciones de eosinofilia (Scott y Stockham, 2000). No obstante, desempeñan funciones biológicas importantes, participando en las reacciones inflamatorias inmunomediadas, como anafilaxis e hipersensibilidad cutánea, previniendo y/o favoreciendo los procesos hemostáticos a través de la liberación de heparina o mediante su actividad basofílica similar a la calicreína, incrementando la lipólisis plasmática mediante la liberación de heparina y la estimulación de la lipoproteína lipasa, y propiciando la destrucción parasitaria, sobre todo de garrapatas. Asimismo, se ha sugerido la intervención de los basófilos en la citotoxicidad tumoral. Algunas de estas funciones parecen estar reguladas por los linfocitos T, sobre todo la actuación basofílica en las reacciones de hipersensibilidad (Newball y cols., 1980; Goetzl y cols., 1984; Roi y cols., 1997; Welles, 2000).

2.1.2.1.4.-Monocitos

Los monocitos son los leucocitos maduros de mayor tamaño que aparecen en la circulación periférica. Como características más destacables, cabe citar su núcleo, con aspecto oval, lobulado o en forma de herradura o riñón, y su citoplasma, con numerosos gránulos azurófilos repartidos difusamente. El patrón de cromatina nuclear es menos condensado que el de los neutrófilos y, ocasionalmente, puede apreciarse una vacuola nuclear (Jain, 1993). El citoplasma muestra una coloración azul grisácea y contiene numerosas vacuolas de tamaño variable, localizadas preferentemente, en la periferia celular, lo cual confiere a los monocitos un aspecto espumoso (Bienzle, 2000).

Tras su producción en la médula ósea, los monocitos pasan a sangre y se dirigen a los tejidos. Allí maduran hacia macrófagos tisulares. Mediante la transformación de monocito a macrófago, la célula incrementa su tamaño y genera una cantidad mayor de gránulos citoplasmáticos (Bienzle, 2000).

Si bien su cinética no ha sido analizada en detalle en los équidos, se supone que es equiparable a la descrita en seres humanos y en otras especies de mamíferos. Su estancia a nivel medular es breve, con una media de 1 a 2,5 días, antes de su liberación hacia el torrente circulatorio. Se cree que no existe un almacenamiento medular cuantitativamente importante. No obstante, en estados sanitarios correctos, la capacidad proliferativa medular de los monocitos no se utiliza completamente, de modo que puede experimentar una expansión importante cuando las necesidades tisulares se exacerban en estados patológicos (Meuret y cols., 1974; Welles, 2000).

En el torrente sanguíneo, la cantidad total de monocitos se distribuye entre los *pools* circulante y marginal, con un cociente de 1/3,5. Al contrario de lo que ocurre con los neutrófilos, este cociente permanece constante en diversos estados fisiológicos y en respuesta a patologías. La vida circulante media del monocito es de unas 8,4 horas, abandonando la circulación, independientemente de la edad celular, y no existe un intercambio a nivel tisular y sanguíneo (Meuret y Hoffman, 1973). En los tejidos, los monocitos maduran hacia macrófagos, transformación que se acompaña de modificaciones en su ultraestructura, aparición de receptores celulares o cambios metabólicos. La vida media de los macrófagos oscila entre varios días y meses (Lasser, 1983; Welles, 2000).

Los monocitos y los macrófagos son los leucocitos con mayor actividad fagocítica. Desempeñan un papel muy importante en la defensa del organismo frente a numerosos agentes infecciosos (hongos, virus, protozoos y ciertas bacterias), actúan en la presentación de antígenos a los linfocitos, eliminan células senescentes, neoplásicas o dañadas y remodelan la reparación tisular durante el crecimiento y cicatrización. También intervienen en los procesos inflamatorios liberando sustancias biológicamente activas, tales como enzimas proteolíticas, interferón, interleukinas, factores de necrosis tumoral, componentes del complemento, prostaglandinas y proteínas de transporte (Roi y cols., 1997). Por otro lado, regulan las funciones hemostáticas y fibrinolíticas. La secreción de algunas proteínas, como las interleukinas, es vital para la producción de fiebre (interleukina 1), la estimulación del crecimiento de los linfocitos T (interleukina 2 o factor de crecimiento de los linfocitos T) y el aumento de la granulopoyesis (interleukina 3 o

factor estimulador de la formación de colonias granulocito-macrofágicas) (Latimer, 1999; Welles, 2000).

2.1.2.1.5.-Linfocitos

Los linfocitos constituyen la segunda población circulante más numerosa de leucocitos en caballos sanos, siendo el componente principal del sistema inmune. La célula madura tiene un diámetro de 7 a 12 μm , un núcleo algo excéntrico y redondeado con una muesca, en numerosas ocasiones, y un patrón de cromatina dispuesto en agregados densos. En general, los linfocitos T y B son células pequeñas, (Tizard, 2007), aunque existe una población bien definida de mayor tamaño con gránulos citoplasmáticos que corresponde a los linfocitos *Natural killer* (células NK). El citoplasma de todas células es bastante estrecho, generalmente de tonalidad azul pálida (Latimer y Rackich, 1992; Day, 2000; Regueiro y cols., 2004).

Los linfocitos estimulados antigénicamente, también conocidos como linfocitos atípicos, células plasmocitoides o inmunocitos, pueden aparecer en cantidades ínfimas en caballos sanos, incrementándose de forma limitada en respuesta a la activación antigénica mediante inmunización, natural o adquirida. Dichas células son de igual tamaño e incluso superior al de los neutrófilos, poseen un margen nuclear irregular, con cromatina moderadamente agregada y una banda citoplasmática que ocasionalmente se tiñe de color azul pálido, representando la zona de Golgi (Latimer, 1999; Day, 2000). Los inmunocitos se incluyen dentro de los linfocitos en el recuento diferencial leucocitario.

La vida media de los linfocitos varía entre 20 y 200 días (Schalm y Carlson, 1982), siendo la duración media de su tránsito por sangre de aproximadamente, unas 30 horas (Duncan y Prasse, 1986). Es interesante mencionar que los linfocitos sanguíneos tienen la capacidad de recircular en la sangre, así como la de experimentar procesos de mitosis. La recirculación facilita la exposición de los linfocitos a los antígenos localizados y redistribuye los linfocitos sensibilizados a través del tejido linfoide del organismo. La proliferación linfocitaria tras una exposición antigénica resulta en una amplificación general y logarítmica de la respuesta inmune (Craddock, 1971 a, b; Jain, 1986; Welles, 2000).

La mayor parte de los linfocitos sanguíneos se origina en los tejidos linfoides periféricos, de modo que tan sólo un porcentaje reducido deriva de los tejidos linfoides centrales, es decir, de la médula ósea y del timo (Parks y Chisari, 1983). Generalmente, los linfocitos circulantes son linfocitos T, de tamaño pequeño, con una vida media

prolongada y con memoria inmunológica. En los équidos, la distribución de la población de linfocitos es aproximadamente de 29 a 51% (media 38%) de linfocitos T y del 23 al 35% (media 27%) de linfocitos B (Banks y Henson, 1973; Tarr y cols., 1977; Kramer, 2000).

En relación a su cinética, cabe resaltar su circulación continua entre sangre, canales linfáticos y tejidos periféricos linfoides (Latimer, 1999). Esta circulación se lleva a cabo de una forma concreta, ya que se demuestra que los linfocitos regresan preferentemente a los lugares de origen. Esta respuesta posiblemente deriva de la existencia de receptores en las células endoteliales, así como en los propios linfocitos, que propician la adhesión celular y la extravasación posterior (Hopkins y McConnell, 1984; Welles, 2000).

El tiempo de circulación está supeditado al subtipo linfocítico y al tejido de origen. De forma genérica, los linfocitos T circulan con más rapidez que los B y la migración a través del parénquima esplénico es más rápida que a través de los ganglios linfáticos. Se citan valores medios de 5 a 6 horas en el bazo y de 15 a 20 horas en los linfonodos (Hopkins y McConnell, 1984). En estados sanitarios correctos, los linfocitos circulan preferentemente por las vénulas hacia los tejidos linfoides periféricos, por los eferentes linfáticos hacia el conducto torácico y, de ahí, hacia la circulación general (Craddock, 1971, a, b). Se evidencia, además, el acceso directo hacia la sangre, pero esta ruta es más importante en procesos patológicos, con una entrada importante de linfocitos de los aferentes linfáticos. Por tanto, las patologías modifican o alteran los patrones normales de circulación linfocitaria (Hopkins y McConnell, 1984; Day, 2000).

La función de los linfocitos T es la de intervenir en la inmunidad celular y la de los linfocitos B la de producir anticuerpos después de su transformación en células plasmáticas (Roi y cols., 1997). Los linfocitos T experimentan un proceso de maduración y adquieren plena competencia inmunológica en el timo. Entre ellos, se diferencian diversos tipos, como supresores, colaboradores, citotóxicos, de hipersensibilidad retardada y de cultivo mixto linfocitario (Lassen y Swardson, 1995; Day, 2000; Welles, 2000).

Estos linfocitos viajan vía sanguínea a los diferentes órganos linfoides periféricos, como ganglios linfáticos, timo, placas de Peyer intestinales,... para regresar de nuevo a la circulación general. Esta recirculación se mantiene de forma continua durante meses e incluso durante años (Lassen y Swardson, 1995; Day, 2000).

Los linfocitos B, en general, tienen una longevidad inferior a la de los linfocitos T y su recirculación es de menor importancia. Su ubicación en los órganos linfoides periféricos se establece principalmente en los folículos linfoides de los ganglios linfáticos, en los folículos de la pulpa blanca del bazo y dispersos en la pulpa roja de este órgano, así como en los folículos linfoides del tejido linfático bucofaríngeo e intestinal. Morfológicamente no se distinguen de los linfocitos T, si bien estos últimos suelen mostrar gránulos citoplasmáticos y su tamaño es ligeramente superior (Lassen y Swardson, 1995; Day, 2000).

Cuando un linfocito B recibe un estímulo antigénico adecuado, se produce un proceso de transformación morfológica en el interior del folículo linfoide ganglionar. Esta transformación modifica al linfocito B y le otorga memoria inmunológica. Dicho cambio pasa por una serie de etapas, que van desde la aparición de una profunda hendidura en el núcleo con un aumento progresivo en su tamaño, hasta su conversión en una célula con signos evidentes de inmadurez morfológica. Esta última célula, ya fuera del folículo linfoide, se transforma en inmunoblasto, caracterizado, como se ha descrito con anterioridad, por su gran tamaño, unos 20 a 30 μm de diámetro, por su núcleo redondeado con patrón de cromatina densa y varios nucleolos de localización periférica, y por su citoplasma con coloración basófila intensa (Lassen y Swardson, 1995; Day, 2000; Welles, 2000).

A partir de este estadio evolutivo, el inmunoblasto puede regresar a la fase de linfocito B pequeño, quiescente, o bien, convertirse en una célula plasmática secretora de inmunoglobulinas. Las células plasmáticas se localizan en los cordones medulares de los ganglios linfáticos, así como en el bazo, el timo, la médula ósea o en el tejido conectivo de diversos órganos, como la dermis y el intestino. Su morfología es peculiar, con un núcleo excéntrico de cromatina densa, en rueda de carro, con un citoplasma intensamente basófilo y una zona yuxtannuclear más clara, donde se sitúa el aparato de Golgi, hipertrofiado en estas células (Lassen y Swardson, 1995; Day, 2000; Welles, 2000).

2.1.2.2.-FACTORES DE VARIACIÓN DE LA SERIE BLANCA EN EL CABALLO

Se describen numerosos factores capaces de suscitar una respuesta leucocitaria en el organismo, modificando la cantidad de leucocitos presentes en sangre periférica. De hecho, existen diversos tipos de respuesta leucocitaria observados comúnmente en el caballo. Según Lassen y Swardson (1995) cabe citar los siguientes:

-Leucocitosis fisiológica: Hace referencia a los cambios en el número de leucocitos circulantes derivados de la actuación de diferentes factores neuroendocrinos, fundamentalmente de los ejes hipotalámico–hipofisario y simpático-adrenal (Welles, 2000; McKeever, 2002).

-Leucocitosis patológica: Su aparición indica la actuación defensiva frente a los agentes infecciosos o la participación leucocitaria en un proceso inflamatorio (Welles, 2000).

La leucocitosis fisiológica asociada a la intervención del eje simpático-adrenal resulta de una contracción esplénica en casos de miedo, excitación o actividad física de intensidad máxima y de corta duración. Se produce una movilización del *pool* marginal de neutrófilos y/o de linfocitos hacia la circulación general. Además, se favorece el intercambio entre los *pools* marginal y periférico debido a la reducción en la capacidad de adherencia neutrofílica y al incremento del flujo sanguíneo a través de la microvasculatura (Latimer y Mejer, 1989). Cursa, por tanto, con una leucocitosis con neutrofilia, fundamentalmente por aumento de las formas maduras y/o linfocitosis. En algunos casos, estos cambios pueden acompañarse de eosinofilia y de monocitosis. No se produce desviación hacia la izquierda, ya que en estados sanitarios apropiados, no se liberan neutrófilos inmaduros desde la médula ósea. Por tanto, la intensidad de la liberación medular, la vida media de las células circulantes y el tamaño del *pool* total neutrofílico no se modifica (Bogg, 1967). La leucocitosis derivada de la liberación de las hormonas simpáticas adrenalina y noradrenalina es la modificación leucocitaria de mayor magnitud cuantitativa en los équidos (Snow y cols., 1983; Welles, 2000).

Generalmente, tales modificaciones leucocitarias suelen ser transitorias, desapareciendo con rapidez tras su instauración. De este modo, el *pool* marginal de neutrófilos se restablece de nuevo en los 20 a 30 minutos siguientes al inicio de la respuesta y el recuento de linfocitos retorna a sus valores basales al cabo de 1 hora (Rossdale y cols., 1982).

Por otro lado, existe una respuesta leucocitaria asociada a la liberación de cortisol, también conocida como leucocitosis por estrés. Aunque en ciertos casos puede considerarse esta leucocitosis como fisiológica, hay que tener en cuenta que también puede aparecer en estados patológicos (Welles, 2000; McKeever, 2002).

Bajo determinadas situaciones estresantes, los animales responden con una liberación importante de cortisol. Esta hormona conlleva la aparición de leucocitosis con

neutrofilia, sin desviación a la izquierda, que coexiste con linfopenia y eosinopenia (Welles, 2000; McKeever, 2002).

La aparición de neutrofilia proviene de la movilización de estas células desde su *pool* marginal de almacenamiento, de la reducción en la capacidad de migración desde la sangre hacia los tejidos periféricos y del aumento en la movilización de la población de reserva de la médula ósea (Caracostas y cols., 1981). La linfopenia es el resultado del secuestro linfocítico por parte de los tejidos linfoides (Duncan y Prasse, 1986). La eosinopenia deriva de la marginación de los eosinófilos en los vasos sanguíneos, así como de la menor liberación de estas células desde la médula ósea (Duncan y Prasse, 1986; Welles, 2000).

La respuesta leucocitaria vinculada al cortisol se produce entre 2 y 4 horas después de la elevación de los niveles circulantes de corticoides endógenos (Rossdale y cols., 1982) o tras la administración exógena de este grupo de sustancias (Rossdale y cols., 1982; Burguez y cols., 1983). Los valores normales se recuperan en unas 24 horas. Como se ha comentado con anterioridad, aunque esta respuesta puede ser fisiológica, asociada a la realización de actividad física (pruebas de resistencia), también se describe en una amplia variedad de procesos patológicos (Morris y Large, 1990, b; Welles, 2000).

Al igual que se ha descrito para la serie roja, la serie blanca también se ve afectada por numerosos factores, tales como la raza, el momento del día, sexo del animal, edad del animal y ejercicio físico.

2.1.2.2.1.-Raza

La raza es un hecho a tener en cuenta a la hora de interpretar un leucograma, como queda patente en los trabajos de Schalm (1964), Coles (1974) y Escribano y cols. (2005). Estos autores encontraron una mayor cantidad de leucocitos en caballos PSI, en comparación con las razas de tiro. Además, los dos citados investigadores describen un cociente neutrófilos/linfocitos (N/L) de, aproximadamente, 1/1 en caballos PSI, mientras que este cociente fue de 5/3 en animales de razas pesadas. Resultados similares han sido descritos por Harvey y cols. (1984).

2.1.2.2.2.-Momento del día

Otro factor a considerar es el momento del día en el que se efectúa la extracción sanguínea. Allen y Powell (1983), en caballos PSI de carreras, observaron que el recuento de linfocitos aumenta significativamente por las tardes y se reduce por las mañanas. Otros autores atribuyeron estos cambios a las variaciones circadianas experimentadas por los corticoides (McKeever, 2002). Se sabe que la concentración máxima circulante de cortisol se produce en las primeras horas del día, tras el amanecer (McKeever, 2002; Piccione y cols., 2004). Anteriormente, Plotsky y cols. (1989) mostraron la actuación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal en el control de los disturbios producidos en la homeostasis.

2.1.2.2.3.-Sexo

En caballos de raza Angloárabe, Muñoz y cols. (2001) revelaron que el número total y absoluto de granulocitos era superior en hembras que en sementales. Sin embargo, en esta misma raza Escribano y cols. (2008) mostraron mayores porcentajes de neutrófilos en machos que en hembras.

2.1.2.2.4.-Edad

El número de leucocitos presente en el feto aumenta considerablemente a lo largo del periodo de gestación, llegando a alcanzar después del nacimiento valores incluso superiores a los del adulto. Por otro lado, cabe citar que durante el proceso de crecimiento físico se produce un descenso en la tasa de neutrófilos. Al mismo tiempo, el número de linfocitos y eosinófilos aumenta, alcanzándose una meseta a los 4-6 meses de edad (Harvey y cols., 1984; Jain, 1986). De este modo, la relación N/L, elevada en el momento del nacimiento, experimenta un descenso progresivo, con cifras de 1/1 a los 51 días de edad. Estos valores se mantienen hasta los 2 años de vida. Posteriormente, el cociente N/L se incrementa en el caballo adulto, describiéndose valores de 2/1 en caballos geriátricos (Harvey y cols., 1984; Zinkl y cols., 1990; Jain, 1993; Lassen y Swardson, 1995).

En diversas razas equinas se ha descrito una reducción del número de glóbulos blancos y linfocitos de forma concomitante al aumento del número de neutrófilos y eosinófilos con el avance de la edad (Schalm y cols., 1975; Lassen y Swardson, 1995; McFarlane y cols., 2001; Cebulj-Kadunc y cols., 2003; Satué, 2004). Esta inversión del

cociente neutrófilos/linfocitos con la edad se asocia a la reducción de la capacidad de las células para regenerarse (Fermaglich y Horohov, 2002).

A lo largo de los últimos años, este proceso ha recibido una considerable atención en medicina geriátrica humana (Negoro, 1992; Globerson, 1995; Pawelec y cols., 1997). En pacientes adultos se ha mostrado una tendencia progresiva hacia la linfopenia, como consecuencia de la reducción en el número de células B, linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, debido a la disminución de la funcionalidad del timo, reduciéndose de esta forma la respuesta inmune contra antígenos (Negoro, 1992). Estos mismos acontecimientos en el caballo reflejan la senescencia del sistema inmunológico (Horohov y cols., 2002; Smith y cols., 2002).

En relación al número de eosinófilos, en asnos y diversas razas de équidos se describe un aumento con la edad (Harvey y cols., 1984; Zinkl y cols., 1990; Jain, 1993; Lassen y Swardson, 1995; Satué, 2004). Este incremento se asocia a una exposición prolongada a alérgenos a lo largo de la vida (Jain, 1993). De forma contraria, McFarlane y cols. (1998) y Cebulj-Kadunc y cols. (2003) no detectaron diferencias en los recuentos de este parámetros entre animales jóvenes y adultos.

Los monocitos, por el contrario, no parecen mostrar ninguna variación asociada al envejecimiento (Jain, 1993; Lassen y Swardson, 1995; Cebulj-Kadunc y cols., 2003; Satué, 2004).

2.1.2.2.5.-Ejercicio

La respuesta leucocitaria está directamente relacionada con el tipo de ejercicio llevado a cabo. De este modo, la proporción de leucocitos puede incrementarse entre un 10 y un 30%, dependiendo de factores como el grado de intensidad y la duración del esfuerzo, así como del nivel de excitación al que se ve sometido el animal antes y durante la realización del mismo (Rose y Hodgson, 1994; Evans y cols., 1995).

En ejercicios de intensidad máxima y corta duración (carreras de velocidad) se produce una marcada leucocitosis con neutrofilia y linfocitosis, debido a la movilización de células sanguíneas por la estimulación simpático-adrenal (Rose y cols., 1983). También puede apreciarse cierto grado de eosinopenia, ya que en situaciones de excitación, los eosinófilos tienden a retirarse a sus lugares de reserva, como mucosa gástrica, pulmones, tejido linfoide,... (Roi y cols., 1997).

En ejercicios de intensidad submáxima y larga duración (pruebas de resistencia), aparece una leucocitosis debida, exclusivamente, a neutrofilia. Dicha neutrofilia,

acompañada a veces de linfopenia, se atribuye a la liberación de cortisol desencadenada por este tipo de actividad física (Jensen-Waern y cols., 1999). La intensidad de los cambios leucocitarios en ejercicios submáximos depende parcialmente de la velocidad, de modo que los caballos más rápidos presentan un cociente N/L mayor que los animales menos veloces (Rose y Hodgson, 1994; Escribano y cols., 1995, a).

La realización de ejercicios de intensidad máxima conlleva una disminución en la relación N/L, como consecuencia de la mayor proporción de linfocitos liberados a la circulación. Sin embargo, ante ejercicios de resistencia, el cociente N/L se incrementa, debido al descenso en la tasa de linfocitos circulantes (Rossdale y cols., 1982; Snow y cols., 1983).

Al igual que ocurre en ejercicios de resistencia, el estrés sufrido en el transporte en équidos afecta de forma directa al cociente neutrófilos/linfocitos. Esta elevación se debe a la duración del efecto estresante sobre la liberación de cortisol (Stull y Rodiek, 2000).

2.1.2.2.6.-Estado fisiológico

Las investigaciones llevadas a cabo en hembras de diversas especies de mamíferos domésticos concluyen que la gestación condiciona una leucocitosis (Kolb, 1976; Schalm y Carlson, 1982; Jain, 1986; Ratnasooriya y cols., 1993). Este hecho posiblemente represente el efecto de la liberación de estrógenos (Kolb, 1976; Alonso y cols., 1987).

Dicha leucocitosis se debe fundamentalmente a la neutrofilia, como se ha descrito en mujeres (West, 1990; Branch, 1992; Balloch y Cauchi, 1993; Gilles y Monif, 2002; Luppi, 2003), vacas (Díez y cols., 1982; Gonzalo y cols., 1986; Pereira y cols., 1987) y ovejas (Alonso y cols., 1987; Ramos y cols., 1992). Del igual modo, esta circunstancia se aprecia en yeguas PSI (Hansen y cols., 1950, b). No obstante, hay que matizar que otros autores observan neutropenia y linfocitosis a lo largo de la gestación en ovejas (Chiboka y Thomas, 1985; Jain, 1986; Ramos y cols., 1992). Por otra parte, según Gilles y Monif (2002) y Luppi y cols. (2002), en mujeres, la gestación condiciona linfopenia y monocitosis.

Al contrario de los autores anteriores, Gill y cols. (1994) confirmaron que en yeguas PSI gestantes aparece leucopenia durante los primeros 4 meses de gestación, con una tendencia hacia el aumento a partir de la mitad de la preñez, incremento que se mantiene hasta el momento del parto.

Finalmente, otras investigaciones no han mostrado variaciones en el leucograma durante la gestación (Hansen, 1950, a; Hansen y Todd, 1951; Mason y Kwok, 1977; Plaschka y cols., 1996; Berlink y cols., 2000; Satué, 2004).

El parto parece condicionar una leucocitosis caracterizada por neutrofilia, linfopenia y eosinopenia, posiblemente asociada a la actuación del eje hipotálamo–hipofisario–adrenal, con la consiguiente liberación de glucocorticoides, como corresponde a una respuesta de estrés (Schalm y cols., 1975; Silver y cols., 1984; Blanchard y cols., 1986; Harvey y cols., 1994).

Al contrario de lo expuesto en el párrafo anterior, Plaschka y cols. (1996) y Taylor-Macallister y cols. (1997) presentaron, en yeguas durante el parto, una leucopenia con neutropenia y eosinopenia.

Según los resultados expuestos por Hansen y cols. (1950, a) y por Trum (1951) la lactación desencadena leucopenia, de intensidad proporcional al grado de estrés de los animales a lo largo del periodo de producción máxima de leche.

2.1.2.3.-INTERPRETACIÓN DEL LEUCOGRAMA EN EL CABALLO

2.1.2.3.1.-Interpretación de las variaciones cuantitativas en los neutrófilos

La neutrofilia o incremento del número de neutrófilos circulantes, como se ha expuesto en los párrafos anteriores, puede presentarse tanto en procesos fisiológicos (respuesta de estrés, esplenotomía) como patológicos (inflamaciones, infecciones, neoplasias). De forma genérica, se considera neutrofilia cuando el número de neutrófilos supera los $6000/\text{mm}^3$ de sangre. La desviación hacia la izquierda denota un valor de formas inmaduras superior a $300/\text{mm}^3$ (Latimer, 1999; Welles, 2000).

La neutrofilia clínica se produce cuando la salida de los neutrófilos formados a nivel medular excede la migración hacia los tejidos. En esta circunstancia, el *pool* neutrofílico total experimenta una expansión y la vida media de la población circulante es normal o aumenta ligeramente. La magnitud de la neutrofilia es superior en procesos infecciosos localizados, generalmente con creación de abscesos, que en desórdenes inflamatorios generalizados (Jain, 1986; 1993; Welles, 2000).

La presencia y la magnitud de la desviación hacia la izquierda depende de tres factores: número de neutrófilos en el *pool* medular, liberación desde la médula y rapidez del paso de neutrófilos desde el compartimento mitótico medular hacia el compartimento

no mitótico, de maduración o de almacenamiento. Por tanto, la severidad de la patología se refleja en la intensidad de la desviación a la izquierda y en la presencia de cambios tóxicos en los neutrófilos (Latimer, 1999).

En algunos pacientes equinos puede observarse neutrofilia, si bien el diagnóstico del tejido afectado puede ser complicado. Bajo esta situación clínica, se debe excluir la afectación generalizada de los tejidos dérmicos, sistemas gastrointestinal y genitourinario, articulaciones, planos tisulares o abscesos ocultos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los procesos hemorrágicos y las anemias hemolíticas cursan con neutrofilia (George y cols., 1982).

La convalecencia de un estado patológico se manifiesta con una disminución en la intensidad de la desviación hacia la izquierda, ya que la producción medular de neutrófilos rellena el *pool* no mitótico. Por otro lado, la reducción en las demandas tisulares promueve la regresión hacia los valores basales. La persistencia de la leucocitosis neutrofílica con una desviación hacia la izquierda mínima refleja la existencia de una enfermedad supurativa crónica, generalmente asociada a anemia no regenerativa de enfermedad crónica e hiperfibrinogenemia (Welles, 2000).

La neutropenia o reducción del número de neutrófilos en sangre periférica por debajo de $3000/\text{mm}^3$ es una consecuencia de ciertos procesos patológicos. Puede derivar de la actuación individual o simultánea de uno de estos tres mecanismos: producción defectuosa en la médula ósea, intercambios entre los *pools* marginal y periférico y migración rápida hacia los tejidos, con una velocidad superior a la capacidad medular de reemplazamiento de dichas células. Siempre hay que tener en cuenta que la neutropenia es un problema clínico serio y que puede resultar de un proceso bacteriano grave (Latimer, 1999; Welles, 2000).

La producción neutrofílica reducida en la médula ósea se ha documentado en ponies y en caballos. La exposición a radiaciones ionizantes y a quimioterapia resultan en una neutropenia severa. En estos casos, no obstante, la neutropenia es una manifestación de la pancitopenia, cuya causa suele ser difícil de diagnosticar, a pesar de la valoración exhaustiva de la historia clínica, del examen físico, del diagnóstico laboratorial e incluso del estudio anatomopatológico (Berggren, 1981). Por otro lado, la neutropenia secundaria a una reducción de la masa medular es poco frecuente, pero se observa en mieloptosis (Latimer, 1999; Welles, 2000).

La neutropenia asociada a necrosis medular se describe en personas tras procesos sépticos severos, sobre todo por infecciones por *Staphylococcus*, *Pneumococcus* y *Klebsiella* spp. (Murdoch y Smith, 1972). Aunque en vacuno se observa

destrucción medular y pancitopenia tras mastitis y metritis, esta circunstancia no se ha visto en équidos (Weiss y Miller, 1985). No obstante, la neutropenia derivada de la destrucción medular debe considerarse en cualquier paciente equino, tras descartar otras causas de neutropenia, sobre todo si existe una sepsis concomitante de intensidad severa (Latimer, 1999; Welles, 2000).

La obliteración del espacio medular aparece secundariamente a reacciones del estroma o a enfermedades infiltrativas, si bien la neutropenia se acompaña de pancitopenia. Las reacciones del estroma incluyen la mielofibrosis o producción de tejido conectivo fibroso y la osteopetrosis o deposición de tejido osteoide. Las enfermedades infiltrativas más comunes son las inflamaciones granulomatosas diseminadas y las neoplasias (Latimer y Mejer, 1989). En el caballo, la mayoría de las mieloptisis con neutropenia secundaria se atribuyen a patologías de origen neoplásico, fundamentalmente linfoma y leucemia (Latimer, 1999).

El intercambio temporal entre el *pool* circulante y el marginal se refleja en el leucograma mediante neutropenia, si bien la cantidad total de neutrófilos sanguíneos puede permanecer invariable. Este mecanismo, junto con el incremento en la demanda tisular, son las consideraciones primarias en el diagnóstico diferencial de la neutropenia en équidos. Se produce, fundamentalmente en casos de endotoxemia y patologías gastrointestinales variadas, como el síndrome de colitis dorsal derecha o las tiflocolitis por salmonelosis (Smith, 1981; Owen y cols., 1983; Ziemer y cols., 1987; Schott y cols., 2001). En estos casos, la presencia de neutropenia sugiere la reducción de la vida media neutrofílica y la migración masiva desde los vasos sanguíneos hacia los tejidos severamente dañados. Se aprecia, además, destrucción intravascular o intrasinusoidal o secuestro de estas células (Latimer, 1999). La neutropenia asociada a infecciones bacterianas suele manifestarse, asimismo, con desviación a la izquierda, degeneración celular y cambios tóxicos leucocitarios (Jain, 1993).

2.1.2.3.2.-Interpretación de las variaciones cuantitativas en los linfocitos

La linfocitosis, incremento del número circulante de linfocitos, supone una elevación sobre $5000/\text{mm}^3$ y se atribuye a estados fisiológicos, estimulación antigénica crónica o neoplasias linfoides.

Como se ha citado en párrafos anteriores, la linfocitosis fisiológica proviene de la liberación incrementada de hormonas simpáticas, fundamentalmente adrenalina, induciendo valores de linfocitos circulantes de hasta $14000/\text{mm}^3$.

Por otro lado, las infecciones crónicas y las lesiones inflamatorias cursan con linfocitosis. Ejemplos típicos de estas circunstancias son las infecciones bacterianas y las alteraciones postvacunales (Jeffcott, 1977; Rumbaugh y cols., 1978). Este incremento en el número de linfocitos se vincula a la presencia de inmunocitos en los frotis sanguíneos. Las neoplasias linfoides no son una etiología frecuente de linfocitosis en équidos (Schalm, 1981; Madewell y cols., 1982). No obstante, se aprecia en linfomas en fase leucémica y en leucemias linfocíticas (Madewell y cols., 1982; Welles, 2000).

La linfopenia o reducción del número de linfocitos por debajo de $1500/\text{mm}^3$, es un hallazgo frecuente en el hiperadrenocorticismo, en la administración de corticoides exógenos y en infecciones agudas de etiología diversa (Latimer, 1999). De este modo, la linfopenia es un hallazgo común en los primeros días de las infecciones víricas, como es el caso de herpesvirus tipo I (Mason y cols., 1989; 1990). Otras causas a considerar en el diagnóstico diferencial de la linfopenia son las inmunodeficiencias, como el síndrome de inmunodeficiencia combinada del potro Árabe (Morris, 1998; Latimer, 1999; Welles, 2000).

2.1.2.3.3.-Interpretación de las variaciones cuantitativas en los eosinófilos

La eosinofilia, incremento del número de eosinófilos por encima de $800/\text{mm}^3$, sugiere una interacción antígeno–anticuerpo en los tejidos en los que existe una gran cantidad de mastocitos, como piel y pulmón, o bien un problema parasitario, que produzca sensibilización. Los potros carecen de eosinófilos circulantes, experimentando una elevación sustancial al alcanzar los 3 meses de edad. Se supone que esta circunstancia deriva de la exposición a parásitos u otros antígenos (Jeffcott, 1977; Harvey y cols., 1984; Jain, 1986). La eosinofilia es más probable y su intensidad más marcada en las nematodosis, debido a la necesidad de migración tisular para completar su ciclo vital (Latimer, 1999; Welles, 2000). Determinados casos de leucemia linfocítica o linfosarcoma en équidos se presentan acompañados de eosinofilia. Estas patologías son similares al síndrome paraneoplásico humano, en los que la producción de IL-5 por los linfocitos T neoplásicos causan la diferenciación y activación de los eosinófilos (Welles, 2000).

Por otro lado, las lesiones inflamatorias en la piel, en el tejido gastrointestinal y en el tracto genitourinario pueden originar una eosinofilia secundaria a la degranulación de las células cebadas (Tavassoli, 1981; Gibson y Alders, 1987; Welles, 2000). No obstante, resulta paradójico que muchas de estas patologías conlleven una infiltración severa eosinofílica tisular, sin presencia concomitante de eosinofilia periférica (Pass y Bolton, 1982). La presencia incrementada de estos elementos celulares en los tejidos dañados se

asocia a la degranulación de los basófilos o células cebadas, a la producción de factores quimiotácticos derivados del complemento, a la síntesis de aminas vasoactivas y de linfocinas y a la deposición de inmunocomplejos dentro de los tejidos (Tavassoli, 1981).

La eosinopenia, reducción del número circulante de eosinófilos, es difícil de evaluar en el caballo, ya que los leucogramas de los animales clínicamente normales contienen cantidades pequeñas de eosinófilos. No obstante, se describe eosinopenia asociada a procesos infecciosos o inflamatorios activos, así como en respuesta al incremento de corticoides, endógenos o exógenos (Roi y cols., 1997; Welles, 2000).

2.1.2.3.4.-Interpretación de las variaciones cuantitativas en los monocitos

La monocitosis o incremento en la concentración periférica de monocitos, aparece en situaciones con intensa fagocitosis tisular, tales como procesos de necrosis, hemólisis intravascular o enfermedades supurativas crónicas. La monocitopenia o descenso en el número circulante de monocitos, carece de significado clínico (Roi y cols., 1997; Welles, 2000).

2.1.2.3.5.-Interpretación de las variaciones cuantitativas en los basófilos

La basofilia o incremento del número de basófilos en sangre periférica, es difícil de evaluar, ya que estas células se encuentran pocas veces en el torrente circulatorio (Welles, 2000). No obstante, como causas más comunes de basofilia cabe citar la hiperlipemia, la dermatitis alérgica y las reacciones de hipersensibilidad. Del mismo modo, también se describen circunstancias que inducen basopenia, tales como las situaciones de excitación y de estrés, posiblemente asociados a la liberación exagerada de corticoides (Roi y cols., 1997).

2.1.3.-PLAQUETAS

2.1.3.1.-CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE LAS PLAQUETAS

Las plaquetas o trombocitos son fragmentos citoplasmáticos de los megacariocitos. Generalmente aparecen como estructuras ovales o alargadas, de 2,5 μm de diámetro y de 3,5 μm de longitud, con citoplasma de color azul pálido en el que pueden aparecer gránulos azurófilos y rodeadas por una fina membrana (Kramer, 2000).

El tiempo de supervivencia de las plaquetas en sangre circulante es de 4 a 7 días en équidos (Schalm y cols., 1975; Jain, 1993).

Estas células desempeñan un papel esencial en los procesos hemostáticos y modulan las reacciones inflamatorias e inmunológicas. La formación del coágulo primario depende de la interacción entre las plaquetas y el endotelio vascular, adhesión que se produce por la fijación de la glucoproteína de la membrana plaquetaria al colágeno del endotelio vascular mediante un puente del factor de Von Willebrand (fvW). A continuación, las plaquetas experimentan procesos de activación, agregación y liberación de diversas sustancias (Siess, 1989; Gentry, 2000; Segura y cols., 2006).

Debido a la actuación de ciertos agonistas plaquetarios, que conducen a la síntesis y liberación de tromboxano A₂ (TXA₂) y de ácido araquidónico, las plaquetas pierden su morfología oval, pasando a ser redondeadas, con seudópodos, modificación necesaria para la agregación. La agregación primaria es reversible y está supeditada a la liberación de adenosín difosfato (ADP) desde la plaqueta durante la fase de activación, así como a la exposición de los receptores de fibrinógeno, a los que se une esta proteína en presencia de calcio. Por el contrario, la agregación secundaria es irreversible, se produce tras la liberación de TXA₂ y por la secreción de los gránulos plaquetarios, que contienen adenosín trifosfato (ATP), ADP, Ca⁺⁺, fibrinógeno, fvW, trombomodulina, factor V, factor plaquetario 4 e hidrolasas lisosomiales (Jain, 1993). Finalmente, el efecto sinérgico del TXA₂ y del ADP induce la contracción plaquetar y la secreción de gránulos, con liberación del factor plaquetar 3, que proporciona los fosfolípidos para las interacciones siguientes con las proteínas de coagulación, acelerando la formación de trombina (Jain, 1993; Gentry, 2000).

Por otro lado, las plaquetas intervienen en la respuesta inflamatoria, al liberar sustancias vasoactivas, tales como prostaglandinas, proteínas catiónicas, colagenasas, elastasas, histamina, serotonina y quimiotactinógeno, que desencadenan o mantienen la respuesta inflamatoria e influyen en la reparación tisular tras una lesión (De Gaetano y cols., 1989; Gentry y Nyarko, 2000). Esta función plaquetaria viene determinada por la liberación del factor activador de plaquetas, producido por diversas células inflamatorias, especialmente neutrófilos y macrófagos.

En personas, se observa que las plaquetas muestran capacidad fagocítica de microorganismos y partículas de látex. Asimismo, pueden intervenir en la endotoxemia, con una actividad detoxificante de polisacáridos bacterianos en el torrente circulatorio. Por estos motivos, se sugiere que los pacientes trombocitopénicos deben recibir una

transfusión de plasma o de concentrados de plaquetas, en un intento de incrementar sus mecanismos de defensa frente a infecciones bacterianas (Jain, 1993; Weiss, 2000).

Finalmente, se describe que las plaquetas podrían actuar en la implantación de metástasis tumorales. Según Weiss (2000), los agregados de plaquetas favorecen la diseminación de células tumorales en la sangre, al propiciar la adherencia a la superficie endotelial y al permitir la formación extravascular de cúmulos celulares neoplásicos.

2.1.3.2.-FACTORES CONDICIONANTES DEL PLAQUETOGRAMA EN EL CABALLO

Aunque existen diversas investigaciones que analizan la influencia de diferentes factores sobre la concentración plaquetar circulante en équidos, son escasos los trabajos concluyentes.

2.1.3.2.1.-Anticoagulante

La utilización de EDTA como anticoagulante, aunque puede producir agregación plaquetaria en situaciones normales, es más frecuente en pacientes con patologías gastrointestinales severas, debido a la activación plaquetaria por las endotoxinas circulantes y a la formación de agregados de plaquetas y leucocitos (Hinchcliff y cols., 1993; Schrezenmeier y cols., 1995; Jarvis y Evans, 1996; Yoneyama y cols., 2003; Saigo y cols., 2005).

2.1.3.2.2.-Obtención de la muestra sanguínea y tiempo de analítica

Las venipunciones reiteradas, las alteraciones en el flujo sanguíneo o el retraso en la realización de la analítica modifican significativamente el recuento de plaquetas (Weiss y cols., 1998; Mani y cols., 2004). Es recomendable llevar a cabo el análisis dentro de las 2 h siguientes a la extracción, ya que el volumen plaquetar medio (VPM) se altera si la muestra con EDTA se mantiene en refrigeración. Por otro lado, resulta interesante el uso del citrato sódico como anticoagulante cuando se desea evaluar el tamaño de las plaquetas (Sellon, 1998; Weiss y cols., 1998; May y Heptinstall, 2004; Seghatchian y cols., 2006).

2.1.3.2.3.-Raza

Jeffcott (1977), en caballos Cuartos de Milla, encontraron que la cantidad de plaquetas en esta raza es superior a la de otras razas equinas. Sin embargo, esta mayor concentración plaquetar parecía no depender exclusivamente del factor racial, ya que también podría estar relacionada con el grado de actividad física que cada raza realiza.

2.1.3.2.4.-Edad

La edad del animal parece influenciar significativamente el plaquetocrito. Raltson y cols. (1988), Jain (1993) y Satué (2004) mostraron una disminución progresiva del recuento plaquetario conforme avanza la edad del caballo. Zinkl y cols. (1990) y Kubota y cols. (1991), en asnos y en seres humanos, de forma respectiva, presentaron resultados similares a los anteriores. Por el contrario, en équidos (McFarlane y cols., 1998) y humanos (Takubo y Tatsumi, 2000) no evidenciaron modificaciones en el número de plaquetas en sangre periférica en personas de diferentes edades.

2.1.3.2.5.-Ejercicio y entrenamiento

La evolución de las plaquetas durante una actividad física es variable y depende de los autores. Según Archer (1959) y Bayly y cols. (1983), el entrenamiento en caballos PSI y la realización de ejercicios de intensidad máxima, conducen a una trombocitosis. Por el contrario, Lopherd (1977) y Kociba y cols. (1984) no consiguieron poner de manifiesto la existencia de cambios en la concentración sanguínea de plaquetas en caballos sometidos a diferentes pautas de ejercicio. Por otro lado, también existen investigaciones que presentan una trombocitopenia durante esfuerzos de intensidad máxima, circunstancia que se asocia a un incremento en la capacidad de agregación plaquetaria (Kingston y cols., 2002; Norris y cols., 2006).

2.1.3.2.6.-Estado fisiológico

En seres humanos y en animales de laboratorio se aprecia una marcada activación de la megacariopoyesis al final del periodo gestacional, persistente durante las semanas iniciales tras el parto, posiblemente asociada a la elevación de las concentraciones de estrógenos, progesterona y otras hormonas esteroideas (Botella y Clavero, 1974; Fay y cols., 1983; Matsumura y cols., 1984; Sill y cols., 1985; Suárez y

cols., 1988; Jackson y cols., 1992). Igualmente, se encuentra una trombocitosis derivada de la gestación en otras especies de mamíferos, como por ejemplo, el elefante hembra (Ratnasooriya y cols., 1993).

Por otro lado, algunos investigadores han hallado una trombocitopenia gestacional debida al efecto dilucional en humanos y primates (Fay y cols., 1983; Matthews y cols., 1990; Verdy y cols., 1997; Harewood y cols., 2000).

En cuanto a la especie equina, la mayoría de los estudios indican que la gestación no parece tener un efecto significativo sobre la población plaquetaria circulante (Harvey y cols., 1994; Plaschka y cols., 1996; Berlink y cols., 2000). Sin embargo, Satué (2004) en la yegua Pura Raza Española de Estirpe Cartujana mostró modificaciones significativas en el número de plaquetas en sangre periférica durante la gestación. La dinámica hormonal durante la gestación (Lovell y cols., 1975; Ginther, 1979; Daels y cols., 1991) unida a los niveles incrementados de tromboxano B2, producido por la placenta, corion y amnios podrían justificar esta respuesta.

Jackson y cols. (1992) observaron una trombocitosis previa al parto en la rata, atribuida al efecto conjunto del estrés de la hembra durante este momento del ciclo reproductor y de la liberación incrementada de estrógenos, progesterona y otras hormonas esteroideas. Esta misma idea había sido defendida varios años antes por Matsumura y cols. (1984) en ratas y por Suárez y cols. (1988) en la mujer. Por el contrario, la información existente en la literatura sobre el efecto del parto en el plaquetograma de la yegua ha revelado la ausencia de modificaciones significativas (Harvey y cols., 1994; Plaschka y cols., 1997; Manso y cols., 1998)

De acuerdo con la bibliografía consultada, la lactación no parece ejercer ningún efecto evidenciable sobre la población circulante de plaquetas en yeguas (Harvey y cols., 1994; Manso y cols., 1998; Satué, 2004).

2.1.3.3.-INTEPRETACIÓN DEL PLAQUETOGRAMA EN EL CABALLO

Las principales alteraciones que se producen en el plaquetograma son la trombocitosis o incremento del número de plaquetas y la trombocitopenia o disminución del número de plaquetas (Messer, 1995; Morris, 1998; Weiss, 2000).

Los procesos de trombocitosis pueden aparecer de forma fisiológica o patológica. La trombocitosis fisiológica se produce por la movilización de las plaquetas desde el bazo

y otros compartimentos no esplénicos, como el pulmón o la médula ósea (Messer, 1995; Morris, 1998). La trombocitosis patológica puede ser primaria, cuando deriva de enfermedades medulares, o secundaria a fracturas, cirugías, patologías infecciosas e inflamatorias,... (Messer, 1995; Morris, 1998; Weiss, 2000).

La trombocitopenia puede deberse a diversos mecanismos, como reducción de la trombopoyesis, incremento de la destrucción periférica de las plaquetas, aumento en su consumo y pérdida plaquetar, secuestro en el bazo y origen idiopático (Sellon, 1998). Seguidamente se exponen las causas de trombocitopenia en el caballo, según Lassen y Swardson (1995), Sellon y cols. (1996), Sellon (1998), Russell y Grindem (2000):

A. Reducción de la trombopoyesis: Cualquier patología y/o medicación que afecte la funcionalidad de la médula ósea, origina trombocitopenia, en algunos casos acompañada de anemia y leucopenia. Las patologías medulares que pueden cursar con trombocitopenia en équidos son la mieloptosis, la mielofibrosis, la mielodisplasia y las aplasias medulares idiopáticas con pancitopenia.

B. Incremento de la destrucción periférica de las plaquetas: Se produce en las trombocitopenias inmunomediadas, primarias o secundarias.

- En la trombocitopenia inmunomediada primaria, se producen anticuerpos frente a los antígenos de la membrana plaquetar, de modo que la plaqueta es eliminada por la acción del sistema fagocítico mononuclear en hígado, bazo y médula ósea.

- La trombocitopenia inmunomediada secundaria se debe a la unión no específica de inmunocomplejos circulantes a los receptores de la superficie plaquetar. En el caballo, se describe asociada a infecciones víricas (herpesvirus, influenza, peste equina, anemia infecciosa equina, arteritis viral equina), bacterianas (septicemia neonatal, *Ehrlichia equi*) y neoplasias.

C. Aumento del consumo y pérdida de plaquetas: Se asocia a hemorragia, a coagulación intravascular diseminada y a la activación localizada de procesos coagulativos y fibrinolíticos, como ocurre en las vasculitis (púrpura hemorrágica equina), en las neoplasias vasculares (hemangiosarcoma diseminado) y en las patologías renales (síndrome hemolítico-urémico).

D. Secuestro en el bazo: Debido a la capacidad de almacenamiento de las plaquetas en el bazo y a la producción de anticuerpos antimegacariocitos, en

medicina humana y en pequeños animales las patologías esplénicas se asocian a trombocitopenia, circunstancia mucho menos importante en los équidos.

2.1.4.-ESTUDIO DEL FROTIS SANGUÍNEO EN EL CABALLO

El estudio del frotis o extensión sanguínea permite llevar a cabo un examen exhaustivo de las diversas poblaciones celulares de la sangre, poniendo de manifiesto cualquier alteración en su tamaño, morfología, características tintoriales,... (Messer, 1995; Kramer, 2000).

2.1.4.1.-EXAMEN DE LOS ERITROCITOS EN EL FROTIS SANGUÍNEO

Los hallazgos indicativos de alteración que se observan con mayor frecuencia en el examen eritrocitario en el caballo se describen a continuación (Stockham y cols., 1994; Lassen y Swardson, 1995; Tvedten y Weiss, 2000):

- Cuerpos de Howell-Jolly: Son remanentes de ADN, de tinción basófila intensa. Pueden aparecer en números incrementados en casos de anemias severas y en procesos de supresión esplénica.
- Excentrocitos o hemifantasmas: Estas células representan eritrocitos con un contenido escaso en hemoglobina.
- Esquistocitos: Son fragmentos eritrocitarios, irregulares, brillantes e indicativos de trastornos sistémicos, como cambios en la microcirculación, coagulación intravascular diseminada, neoplasias, procesos inflamatorios de órganos muy vascularizados, como hígado, pulmón, bazo, médula ósea o placenta.
- Estomatocitos: Son células de contorno irregular, cuya presencia puede sugerir la existencia de una hemólisis inmunomediada.
- Esfercitos: Se trata de eritrocitos de tamaño pequeño, carentes de palidez central. Derivan de alteraciones a nivel de la membrana celular, causadas por el sistema monocito–macrófago, manteniéndose el volumen citoplasmático inalterado.

- Equinocitos: Se trata de hematíes espiculados, con proyecciones romas o puntiagudas en la membrana celular, generalmente numerosas y distribuidas a lo largo de toda la superficie del eritrocito. Las espículas son uniformes en tamaño, lo cual permite la diferenciación entre equinocitos y acantocitos. En estos últimos, las proyecciones muestran tamaño variable y su distribución en la célula es irregular. Se han descrito tres causas de formación de los equinocitos, como son: artefactos, administración de fármacos y depleción electrolítica, sobre todo hipocalcemia y deshidratación hemática (Weiss y cols., 1994).

Por otro lado, durante el examen de los hematíes en el frotis sanguíneo, se pueden hallar modificaciones en el tamaño y en la coloración de los mismos (Lassen y Swardson, 1995; Tvedten y Weiss, 2000):

- Hipocromía: Se identifica como una menor intensidad en la coloración de los eritrocitos en la extensión sanguínea. Esta alteración se corresponde en el eritrograma con una reducción del índice CHCM.

- Microcitosis: Revela la existencia de eritrocitos de tamaño pequeño y se manifiesta con un valor de VCM bajo.

- Macrocitosis: Hace referencia a la presencia de eritrocitos de tamaño mayor y se presenta con un valor de VCM elevado.

2.1.4.2.-EXAMEN DE LOS LEUCOCITOS EN EL FROTIS SANGUÍNEO

El estudio de la morfología de los glóbulos blancos en el frotis sanguíneo es esencial para el diagnóstico de diversas patologías. Así, en infecciones bacterianas por agentes Gram negativos, es frecuente la observación de alteraciones citoplasmáticas y nucleares conocidas como cambios tóxicos (Smith, 2000).

Los cambios tóxicos son las alteraciones más comunes inducidas por procesos patológicos. Estos cambios usualmente están asociados a infecciones bacterianas severas o septicemia, aunque también pueden ponerse de manifiesto en procesos inflamatorios estériles o por toxicidad de determinados medicamentos del tipo de la fenilbutazona (MacKay y cols., 1983). Se identifican varios tipos de cambios tóxicos que incluyen la existencia de vacuolización citoplasmática, cuerpos de Döhle, basofilia citoplasmática y granulación tóxica (Latimer, 1999; Smith, 2000).

La basofilia y la vacuolización son los cambios tóxicos citoplasmáticos más comunes de los neutrófilos equinos. La basofilia citoplasmática procede de remanentes de ARN y ribosomas tras la maduración. El origen de las vacuolas permanece aún sin discernir, aunque se asocia a fenómenos de autodigestión. Los neutrófilos afectados tienen un citoplasma espumoso y azulado (Latimer, 1999; Smith, 2000).

Los cuerpos de Döhle son unas partículas de 0,5 a 2,0 μm , azul grisáceas depositadas en la periferia del citoplasma, denotan infección severa (Latimer, 1999; Smith, 2000).

La granulación tóxica se produce por un incremento de la permeabilidad de la membrana de los gránulos citoplasmáticos a los colorantes. Los neutrófilos afectados contienen gránulos de coloración rosa púrpura. No son frecuentes en el caballo, aunque se han identificado en animales afectados de lipidosis hepática (Latimer, 1999; Smith, 2000).

El núcleo en condiciones de toxicidad medular también puede verse afectado. En tales condiciones, entre los signos marcadores de toxicidad se citan poliploidia, hiposegmentación y neutrófilos gigantes, entre otros (Smith, 2000).

2.1.4.3.-EXAMEN DE LAS PLAQUETAS EN EL FROTIS SANGUÍNEO

Las principales alteraciones cualitativas que se pueden encontrar en las plaquetas de una preparación sanguínea en el caballo son las siguientes (Pastor y cols., 1995; Smith, 2000):

- Macroplaquetas. Se trata de plaquetas de gran tamaño, con signos marcados de inmadurez, incremento del ratio núcleo/citoplasma, anisocariosis o núcleo disperso.
- Plaquetas de forma oval o de cigarro. Suelen ser indicativas de hemorragia oculta.

2.1.5.-PLASMA SANGUÍNEO EN EL CABALLO

2.1.5.1.-COMPOSICIÓN PROTEICA DEL PLASMA EN EL CABALLO

El plasma sanguíneo constituye el componente líquido de la sangre, sobre el que se disponen los diferentes elementos formes. A partir de él, las células obtienen sus nutrientes y depositan sus productos de desecho (Webb y Weaver, 1979).

Los componentes mayoritarios del plasma son las proteínas, que representan aproximadamente 6-8 g/dl de sangre, mientras que el componente no proteico supone sólo 1 g/dl de plasma. El componente proteico del plasma, sobre todo la albúmina, es el principal determinante de la presión osmótica coloidal (Kaneko, 1997; Thomas, 2000).

A continuación, en la tabla 2, se relacionan los principales constituyentes proteicos del suero sanguíneo en el caballo (Kaneko, 1997). La diferencia entre el plasma y el suero radica en que en este último no se encuentran presentes ni el fibrinógeno ni las proteínas de la coagulación (Kaneko, 1997).

NOMBRE	TIPO Y TRANSPORTE	ORIGEN
ALBÚMINA	Regulación osmótica	Hígado
α1-GLOBULINA	Bilirrubina	Hígado
	Lipoproteína	
	Transporte de esteroides	
α2-GLOBULINA	Mucoproteína	Hígado
	Haptoglobulina	
β1-GLOBULINA	Lipoproteína	Hígado
	Esteroide	
	Caroteno	
	Protrombina	
β2-GLOBULINA		Sistema retículo-endotelial
δ-GLOBULINA		Sistema retículo-endotelial

Tabla 2.- Componentes proteicos del suero en équidos (Kaneko, 1997)

En el caballo, la relación entre la concentración de albúmina y de globulinas plasmáticas oscila entre 0,8 y 1,0 y constituye un parámetro importante a considerar en el análisis de las proteínas plasmáticas (Thomas, 2000).

2.1.5.2.-FACTORES DE VARIACIÓN DE LA PROTEINEMIA EN EL CABALLO

En condiciones fisiológicas, la concentración de proteínas plasmáticas permanece relativamente constante a lo largo del tiempo. Sin embargo, existen numerosos factores que pueden afectar sus valores basales (Kaneko, 1997; Thomas, 2000). Entre dichos factores cabe nombrar los siguientes: edad y crecimiento físico, influencia hormonal y sexual, influencias de tipo nutricional, estrés y pérdida de fluidos, ejercicio.

2.1.5.2.1.-Edad y crecimiento físico

La edad es un factor importante a considerar en la interpretación de los cambios que se producen en las proteínas plasmáticas. En el feto, tanto la concentración de proteínas plasmáticas totales como la fracción de la albúmina se incrementan progresivamente con la edad. Antes del nacimiento existe una ausencia completa de inmunoglobulinas (Kaneko, 1997; Thomas, 2000).

Tras el nacimiento, mediante la ingestión del calostro materno, se produce la transferencia pasiva de inmunoglobulinas desde la madre hacia el potro, alcanzándose una concentración máxima de proteínas plasmáticas totales dentro de las 24 horas primeras de vida (Kaneko, 1997; Thomas, 2000).

Transcurrido el primer día de vida, y una vez concluida la transferencia pasiva de inmunidad, la concentración de proteínas plasmáticas totales desciende progresivamente, hasta que el potro adquiere capacidad para elaborar sus propias proteínas (Thomas, 2000). Finalizado el periodo de lactancia del potro, la concentración de proteínas plasmáticas totales experimenta un ligero incremento conforme aumenta la edad del animal. Al mismo tiempo, se produce un descenso en el cociente albúmina/globulina (Kaneko, 1997).

En el animal adulto, la cantidad de proteínas plasmáticas permanece relativamente estable, hasta llegar a la senectud, momento en el que declinan significativamente (Tumbleson y cols., 1972; Kaneko, 1997; Thomas, 2000; Siciliano, 2002). Esta reducción se asocia a tendencias hacia la hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Estos resultados se deben al efecto anabólico de los estrógenos (Perk

y Lobi, 1960), en personas (Kubota y cols., 1991; Takubo y Tatsumi, 2000; Martin y cols., 2001), asnos (Zinkl y cols., 1990), gatos (Nakai y cols., 1992) y perros (Uchiyama y cols., 1985; Lowseth y cols., 1990). En determinados casos, esta disminución de la concentración de proteínas se ha asociado a patologías relacionadas con malabsorción o maladigestión en caballos geriátricos (Thomas, 2000).

2.1.5.2.2.-Influencia hormonal y sexual

De forma general, el efecto de los cambios hormonales sobre la concentración de proteínas plasmáticas suele ser de intensidad leve, incluso cuando las repercusiones sobre la ganancia de peso o las influencias sobre la composición corporal son marcadas (Kaneko, 1997; Thomas, 2000).

Las hormonas pueden ejercer dos tipos de acciones sobre las proteínas plasmáticas: anabólicas y catabólicas. La testosterona y los estrógenos son hormonas anabólicas en todas las especies. Existen estudios que demuestran que la administración de dietilestilbestrol a terneros machos y a gallinas incrementa la concentración de proteínas plasmáticas totales y condiciona hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (Perk y Lobi, 1960). Por otro lado, la hormona del crecimiento tiene un efecto similar (Kaneko, 1997).

La tiroxina desempeña un efecto catabólico, provocando una disminución de las proteínas totales en plasma. Los glucocorticoides, caracterizados por su acción glucogénica, también causan un descenso en los niveles de gammaglobulinas (Kaneko, 1997).

2.1.5.2.3.-Influencias de tipo nutricional

La concentración de proteínas plasmáticas se modifica por factores de tipo nutricional, si bien, en la mayoría de los casos, los cambios son de pequeña magnitud y de difícil detección e interpretación. No obstante, en investigaciones llevadas a cabo en vacuno, se observa una relación directa entre los niveles de vitamina A y de albúmina (Kaneko, 1997). Además, también se constata que la depleción dietaria de proteínas induce hipoproteinemia o hipoalbuminemia en diversas especies animales (Kaneko, 1997; Siciliano, 2002). En animales adultos, las demandas nutricionales aparecen incrementadas en determinados estados fisiológicos (gestación y lactación) así como en la fase de recuperación por daño tisular o lesión (Thomas, 2000).

2.1.5.2.4.-Estrés y pérdida de fluidos

Los animales sometidos a condiciones de estrés, así como a procesos febriles, situaciones de frío intenso, etc... muestran una capacidad adrenal incrementada, capaz de inducir una reducción de los niveles plasmáticos de proteínas totales (Cornelius y cols., 1962; Kaneko, 1997).

Por otro lado, en procesos inflamatorios y/o infecciosos, en los que se produce una movilización de líquidos y de proteínas con formación de edemas, existe hipoalbuminemia. Ello se debe al paso de las proteínas hacia el espacio extravascular por la lesión endotelial o por los cambios en la permeabilidad en el lecho vascular (Kaneko, 1997; Thomas, 2000).

En condiciones de deshidratación, con hemoconcentración por reducción del volumen plasmático, existe hiperproteinemia, siempre y cuando no haya una pérdida adicional de proteínas. Sin embargo, la pérdida de sangre entera, como ocurre en las patologías hemorrágicas, desencadena hipoproteinemia (Kaneko, 1997; Thomas, 2000).

En condiciones de estrés e inflamación aguda se produce un incremento de las fracciones α y β globulinas. La inflamación crónica o infección se asocia con una producción incrementada de γ globulinas (Thomas, 2000).

2.1.5.2.5.-Ejercicio y raza

La actividad física puede condicionar una respuesta variable en la proteinemia. Los ejercicios de intensidad máxima y corta duración, que cursan con esplenotomía intensa e incremento de la presión hidrostática, fuerzan la salida de las proteínas plasmáticas de bajo peso molecular hacia el espacio intersticial. Posteriormente, se detecta un incremento asociado con cambios intercompartmentales de fluidos y sudoración (McKeever y cols., 1993; Andrews y cols., 1995; Harris y cols., 1995; Williamson y cols., 1996; Muñoz y cols., 1999; Kedzierski y Bergero, 2006).

Los ejercicios de intensidad submáxima, tanto de corta como de larga duración, suelen inducir una hiperproteinemia, secundaria al descenso en el volumen plasmático circulante. Éste puede perderse, bien por los cambios intercompartmentales de fluidos, bien por la actuación de los mecanismos de termorregulación (Judson y cols., 1983, a, b; Snow y cols., 1983; Muñoz y cols., 2006).

La concentración de proteínas plasmáticas con el ejercicio también se ve influenciada por el tipo de raza. Así, Kedzierski y Bergero (2006) observaron que los caballos de Pura Raza Árabe mostraban una mayor concentración de proteínas plasmáticas tras la realización de un ejercicio de 1200 m a galope en comparación con los animales de raza Thoroughbres, incluso tras 30 min de recuperación.

2.1.5.2.6.-Estado fisiológico

Los niveles plasmáticos de proteínas totales experimentan variaciones intensas a lo largo de la gestación, como respuesta al estrés adicional impuesto por el desarrollo fetal. Sin embargo, la dirección de estos cambios varía, habiéndose descrito estados de hipoalbuminemia y de hiperproteinemia.

En trabajos con ovejas, se ha apreciado hipoalbuminemia con hipoglobulinemia e hipoproteinemia progresiva hacia la mitad de la gestación, la cual se recupera al término de la misma (Dunlap y Dickson, 1955). Sin embargo, en esta misma especie animal, Alonso y cols. (1997) afirmaron que la gestación se acompaña de hiperproteinemia. Con anterioridad, en vacas y ovejas, se observó que los niveles de proteínas plasmáticas totales comienzan a incrementarse 2 meses antes de la conclusión de la gestación, alcanzando su valor máximo 1 mes después del parto, para declinar durante la fase de lactación (Larson y Kendall, 1957; Alonso y cols., 1997).

No se dispone de información suficiente sobre la evolución de las proteínas plasmáticas totales en yeguas gestantes. No obstante, se sugiere que, este parámetro no se encuentra sometido a cambios sustanciales durante el periodo de gestación, a pesar de que los valores medios determinados durante esta fase del ciclo reproductor son inferiores a los obtenidos durante la lactación (Holtan y cols., 1975; Felbinger, 1987; Harvey y cols., 1994; Satué, 2004).

Al igual que la gestación, la lactación representa un estímulo importante para la movilización de las reservas proteicas del animal, debido al incremento en la tasa metabólica. A pesar de esta aseveración, los escasos trabajos realizados en la especie equina han puesto de manifiesto que la concentración de proteínas plasmáticas durante el periodo de lactación es discretamente superior a la encontrada durante la gestación. Este resultado probablemente deriva de la normalización en el volumen plasmático en la lactación (Holtan y cols., 1975; Felbinger, 1987; Harvey y cols., 1994).

2.1.5.3.-INTERPRETACIÓN DEL PROTEINOGRAMA EN EL CABALLO

Aunque, en un sentido estricto, la concentración plasmática de proteínas no se considera parte integrante del hemograma, su valoración resulta de gran interés para la correcta interpretación del número de eritrocitos, de la concentración de hemoglobina y del valor hematócrito (Kaneko, 1997). A continuación, se presentan las variaciones más importantes en la proteinemia.

2.1.5.3.1.-Interpretación de la albuminemia en el caballo

La hiperalbuminemia no deriva de una producción excesiva de albúmina. Se trata de un proceso secundario a la deshidratación o de un error laboratorial, en casos de lipemia o de hemólisis. No obstante, este último factor está supeditado al procedimiento analítico seguido (Sloet Von Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999).

La hipoalbuminemia se relaciona con las siguientes circunstancias (Morris, y Large, 1990, c; Sloet Von Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999):

- Hipoalbuminemia secundaria a una hemodilución, tras una fluidoterapia excesiva.
- Reducción en la síntesis de esta proteína en estados crónicos de malnutrición, en patologías hepáticas o en reacciones de fase aguda. Se sabe que la liberación de citocinas en respuesta a procesos inflamatorios, infecciosos, neoplásicos, traumatismos... disminuye la síntesis de albúmina, al mismo tiempo que se produce un estado catabólico.
- Pérdida incrementada de albúmina, en glomerulopatías y en enteropatías con pérdida de proteínas, en hemorragias severas, en quemaduras,...
- Secuestro de albúmina en cavidades corporales, como ocurre en pleuroneumonías o en peritonitis.
- Incremento del catabolismo proteico, en casos de equilibrio energético negativo, como fiebre, traumatismos, cirugías y neoplasias.

2.1.5.3.2.-Interpretación de la globulinemia en el caballo

Las globulinas, como se indica en la tabla 2, se dividen en tres fracciones, en función de su movilidad electroforética. Las α globulinas se subdividen en subunidades

α_1 y α_2 . Las globulinas α_1 incluyen la α_1 -antitripsina, la α_1 -antiquimotripsina, la prosomucoide (glucoproteína ácida), el amiloide sérico A y la lipoproteína α_1 (HDL). Las globulinas α_2 comprenden la macroglobulina α_2 (inhibidor de proteasa), la haptoglobina (se une a la hemoglobina libre), la proteína C (inhibidor de los factores de coagulación VIII y V activados), la ceruloplasmina (transportador de cobre) y la lipoproteína α_2 . Del mismo modo, las β globulinas se dividen en β_1 y β_2 . Dentro de las globulinas β_1 se distingue la transferrina (unión al hierro) y la hemopexina. Las globulinas β_2 incluyen el factor 3 del complemento, la proteína C reactiva, el plasminógeno, la lipoproteína β_2 (LDL), la microglobulina β_2 , parte de IgA e IgM. El fibrinógeno también migra hacia esta región. En tercer lugar, se encuentran las δ -globulinas, formadas por las inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG (Morris y Large, 1990, c).

La hipoglobulinemia se relaciona con el descenso de las δ -globulinas, ya que la reducción de las otras dos fracciones no es significativa. Se observa hipoglobulinemia en casos de hipoproteinemia. Además, la reducción de las δ -globulinas se puede deber a factores hereditarios (inmunodeficiencia primaria combinada, agammaglobulinemia del potro, déficit selectivo de IgM, hipogammaglobulinemia transitoria) o adquiridos (fallo de transferencia pasiva de inmunidad, procesos neoplásicos) (Morris y Large, 1990, c).

La hiperglobulinemia deriva del incremento de una o varias de las fracciones de las globulinas. El aumento de las α -globulinas indica una respuesta proteica de fase aguda o aparece como hallazgo laboratorial en algunos casos de síndrome nefrótico. Las β -globulinas aumentan en los siguientes casos: en procesos inflamatorios agudos y crónicos, en patologías hepáticas, en dermatopatías supurativas y en el síndrome nefrótico. Finalmente, la elevación de las δ -globulinas representa una respuesta inmune activa exagerada frente a una estimulación antigénica. Se observa en procesos neoplásicos que afectan a las células plasmáticas y a los linfocitos (gammopatía monoclonal), en inflamaciones crónicas, en hepatopatías crónicas, en abscesos hepáticos y en patologías altamente supurativas (gammopatía policlonal) (Morris y Large, 1990, c).

2.1.5.3.3.-Interpretación de la fibrinogenemia en el caballo

El fibrinógeno es una molécula de alto peso molecular producida por el hígado. Su función principal es actuar como sustrato de la trombina para constituir fibrina durante la hemostasis. Además, el fibrinógeno es una proteína de fase activa, por lo que en el caballo es un marcador de respuesta inflamatoria (Morris y Large, 1990, c; Sloet Von Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999).

La hiperfibrinogenemia se relaciona con procesos inflamatorios, si bien hay que matizar que la magnitud de la hiperfibrinogenemia no siempre tiene una correlación directa con la severidad de la patología. La hipofibrinogenemia puede deberse a dos circunstancias: reducción en su síntesis o incremento de su consumo (Morris y Large, 1990, c).

2.2.-INMUNOLOGÍA EQUINA

El sistema inmune es uno de los componentes más complejos y diversos del organismo, cuya funciones principales son proteger al mismo frente patógenos externos, eliminar las sustancias extrañas, y destruir los tejidos dañados o envejecidos y las células cancerígenas (Heaton y cols., 2002, c). Para realizar estas funciones este sistema es capaz de ajustar su respuesta a cada tipo de agresión y, al mismo tiempo, mantener la tolerancia frente al organismo invasor (Regueiro y cols. 2004). Cuando el sistema inmune falla, debido a una respuesta insuficiente, mal dirigida o aberrante se producen patologías, como enfermedades de naturaleza inmunomediada, entre otras (Zekarias y cols., 2002).

En seres humanos y ratones el sistema inmune es el mejor caracterizado y su conocimiento se ha extrapolado a las diferentes especies de mamíferos (Viveiros y Antczak, 1999; Slater y Hannant, 2000; Abbas y cols., 2001; Balasuriya y McLachlan, 2004).

Aunque todos los mecanismos inmunológicos están estrechamente relacionados, clásicamente se distinguen dos componentes del sistema inmune: la inmunidad innata, primera línea de defensa del organismo, encargada de generar una respuesta rápida aunque inespecífica, y la inmunidad adquirida, más sofisticada y tardía, que permite dar una respuesta específica a cada agresión y el desarrollo de una memoria inmunológica (Guiguère y Prescott, 2000; Slater y Hannant, 2000; Heaton y cols. 2002, c).

2.2.1.-INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA

La inmunidad innata constituye un sistema de reconocimiento inmediato ya presente de forma evolutiva en plantas e invertebrados (Guiguère y Prescott, 2000). La respuesta que ofrece la inmunidad innata es parecida en todas las agresiones, y sus mecanismos reconocen de forma constitucional como extraños patrones moleculares inespecíficos presentes en numerosos microorganismos patógenos, pero no en los tejidos propios. Estos patrones se denominan patrones moleculares asociados a patógenos

(PAMP), y un ejemplo de ellos son los lipopolisacáridos de la pared bacteriana comunes a grupos o familias de organismos patógenos (Medzhitov y Janeway, 1997; Guiguère y Prescott, 2000; Slater y Hannant, 2000; Blach-Olszewska, 2005). Existen varios tipos de receptores de reconocimiento de los PAMP, siendo los denominados tipo *tol* los más importantes (Bautista y Mosqueda, 2005; Blach-Olszewska, 2005). Los efectores de la inmunidad innata son las barreras mucosas y epiteliales, las células fagocitarias (neutrófilos y macrófagos), las células Natural Killer, los mediadores inflamatorios y el sistema del complemento.

Como las células de la inmunidad innata expresan un número limitado de receptores, no necesitan sufrir una expansión clonal, como sí ocurre en la expansión linfocitaria de la inmunidad adquirida. La activación de la inmunidad innata sólo necesita la expresión de genes altamente activos, lo que la hace capaz de producir una respuesta inmune rápida (de minutos a horas) y eficaz (Janeway y Medzhitov, 2002). La misión de la inmunidad innata es combatir la agresión desde su inicio hasta la activación de los mecanismos de la inmunidad adquirida y la consiguiente eliminación (Guiguère y Prescott, 2000; Slater y Hannant, 2000; Blach-Olszewska, 2005).

Además de actuar como primera línea de defensa, la inmunidad innata también participa activamente en el desarrollo de la inmunidad adquirida que se producirá a continuación y en el reclutamiento de los agentes que la desencadenan (Fearon y Locksley, 1996; Trinchieri, 1997; Balasuriya y McLachlan 2004)

A diferencia de la inmunidad innata, la inmunidad adquirida posee receptores especializados, con una capacidad casi ilimitada para reconocer de forma específica cada agente extraño al organismo (Blach-Olszewska, 2005). Además de esta especificidad, la inmunidad adquirida desarrolla una memoria inmunológica que hace que la respuesta frente a futuras agresiones por el mismo agente sea más rápida e intensa (Slater y Hannant, 2000; Balasuriya y McLachlan 2004).

Para el desarrollo de una respuesta inmune específica, se necesita la interacción del sistema inmune con el agente agresor. De esta forma, la respuesta inicial es el reconocimiento de dicho agente y su presentación a las células efectoras de la inmunidad adquirida, los linfocitos, a través de las células presentadoras de antígenos. Los linfocitos inician entonces la expansión clonal de linfocitos T y B antígeno-dependiente y específica para ese patógeno (Janeway, 2001; Heaton y cols., 2002, a, b; Regueiro y cols., 2004; Bautista y Mosqueda, 2005).

Estos linfocitos¹¹ son capaces de reconocer hasta 10^{11} antígenos diferentes, tantos como receptores de linfocitos T y B existen. La estructura responsable del reconocimiento

específico de antígenos potenciales por los linfocitos es el receptor de antígeno BCR en linfocitos B y TCR en linfocitos T (Janeway, 2001; Zekarias y cols., 2002; Regueiro y cols., 2004).

Dependiendo del tipo de respuesta inmunitaria, la inmunidad adquirida o específica se clasifica en inmunidad celular y humoral (Tizard, 2007).

-Inmunidad Celular: se considera cualquier respuesta frente a microorganismos o tumores en la que los anticuerpos juegan un papel subordinado o secundario. Está mediada por los linfocitos T, y controla los microorganismos intracelulares (virus).

-Inmunidad Humoral: está mediada por anticuerpos (linfocitos B) y se orienta al control de microorganismos extracelulares y toxinas.

2.2.2.-INTEGRANTES DEL SISTEMA INMUNE

2.2.2.1.-SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El sistema de complemento es un complejo bioquímico integrado por 30 proteínas séricas, aproximadamente. Este sistema se activa en respuesta a agresiones por bacterias, levaduras, virus, células neoplásicas o partículas extrañas, bien por contacto con las proteínas de la pared celular, o bien mediante la formación de complejos antígeno-anticuerpo (Regueiro y cols., 2004; Tizard, 2007).

La activación del sistema de complemento produce una serie de reacciones enzimáticas en cascada, cuyas consecuencias finales son la citólisis del agente agresor, su opsonización y el inicio del proceso inflamatorio (Guiguère y Prescott, 2000; Slater y Hannant, 2000; McKay, 2000). La citólisis consiste en la destrucción de la célula diana debido a la penetración de agua tras la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) y la opsonización corresponde al recubrimiento de inmunocomplejos en las células diana, de tal manera que puedan ser reconocidos por las células fagocitarias.

2.2.2.2.-PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

Las proteínas de fase aguda son producidas en el hígado durante la inflamación en respuesta a citoquinas secretadas por los macrófagos (Guiguère y Prescott, 2000). Estas proteínas se unen a las bacterias para inducir la respuesta del complemento o dificultar su metabolismo, con la finalidad de impedir su crecimiento y favorecer su destrucción (Regueiro y cols., 2004).

2.2.2.3.-CITOQUINAS

Las citoquinas son sustancias de naturaleza proteica de bajo peso molecular secretadas por células, que actúan en el sistema inmunitario como mediadores en la comunicación intercelular. Una vez liberadas, se unen a sus receptores específicos en la membrana de las células diana, regulando el inicio, el mantenimiento y la respuesta inmunitaria inflamatoria (Giguère y Prescott, 2000; Regueiro y cols., 2004). Las citoquinas poseen numerosas funciones, entre las que se citan (Slater y Hannant, 2000):

- Inducción y modulación de la respuesta inmune innata y adquirida (ej.: IL-12)
- Acción antivírica (ej.: IFN- α , IFN- β , IFN- γ y Factor de necrosis tumoral- α)
- Inducción de reacción general defensiva del organismo (Ej.: IL-1: pirexia).

2.2.2.4.-FAGOCITOSIS

La fagocitosis es la unión del microorganismo (o agente particulado, insoluble) a la superficie de una célula fagocítica mediante un mecanismo inespecífico de tipo ameboide. La célula fagocitaria emite pseudópodos y engloba al microorganismo para crear un fagosoma al que se unen lisosomas. Los principales agentes encargados de la fagocitosis son los macrófagos y neutrófilos (Guiguère y Prescott, 2000; Regueiro y cols. 2004).

Los neutrófilos necesitan que el patógeno esté unido a inmunoglobulinas y/o proteínas de complemento para adherirse. Por el contrario, los macrófagos reconocen a algunos patógenos sin necesidad de opsonización gracias a que además de receptores de superficie para inmunoglobulinas y proteínas del complemento, presentan receptores para varios PAMP (Guiguère y Prescott, 2000; Regueiro y cols. 2004).

La destrucción del microorganismo en los lisosomas secundarios de los fagocitos se produce por tres tipos de mecanismos, que se citan a continuación (Guiguère y Prescott, 2000; Regueiro y cols. 2004):

-Mecanismos dependientes de oxígeno:

-Intermediarios reactivos de oxígeno (ROI). Se activa una ruta metabólica (hexosa monofosfato) que consume oxígeno y produce elevadas cantidades de radicales tóxicos antimicrobianos (como el O_2^- , H_2O_2 , OH^- , O_2^1), y que además, pueden reaccionar para dar otras sustancias tóxicas, como hipocloritos y cloruros. Estas sustancias provocan una intensa halogenación que afecta a una gran diversidad de bacterias y virus.

-Mecanismos dependientes de óxido nítrico (NO). La enzima NOS (óxido nítrico-sintetasa) combina el oxígeno molecular con el nitrógeno guanidino de la L-arginina, para generar óxido nítrico (NO), que es tóxico para bacterias y células tumorales.

-Mecanismos independientes de oxígeno: Liberación de enzimas hidrolíticos: lisozima, proteínas catiónicas, proteasas, etc., con efecto bactericida o bacteriostático.

Aunque ambas células usan mecanismos fagocíticos similares, los neutrófilos son más potentes y son capaces de destruir bacterias capaces de sobrevivir dentro de los macrófagos (Guiguère y Prescott, 2000; Regueiro y cols. 2004).

2.2.2.5.-CÉLULAS INFLAMATORIAS

2.2.2.5.1.-GRANULOCITOS

En respuesta a un estímulo determinado, los granulocitos se adhieren a las paredes vasculares, deslizándose entre las células endoteliales mediante diapédesis hasta alcanzar el foco inflamatorio (Regueiro y cols., 2004; Tizard, 2007). Dentro de los granulocitos se encuentran los neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

2.2.2.5.1.1.-NEUTRÓFILOS

Representan el 90% de los granulocitos totales, son las células con mayor capacidad fagocítica y las primeras en alcanzar el foco inflamatorio, dando lugar a la fagocitosis y destrucción de diversos patógenos como bacterias, virus y hongos. También, aunque en menor medida que los macrófagos, participan en la modulación de la respuesta inflamatoria mediante la liberación de mediadores químicos (Guiguère y Prescott, 2000; Regueiro y cols., 2004).

2.2.2.5.1.2.-EOSINÓFILOS

Constituyen el 2-5% de los granulocitos y son eminentemente tisulares. Si bien tienen capacidad fagocitaria, su acción principal es el vertido del contenido de sus gránulos, de acción citotóxica y neurotóxica en respuesta a parásitos, normalmente helmintos, que no pueden ser fagocitados (Regueiro y cols., 2004; Tizard, 2007). Los gránulos tienen además acción bactericida y moduladora de la reacción inflamatoria (Brito y cols., 2003).

2.2.2.5.1.3.-BASÓFILOS

Los basófilos responden a los estímulos quimiotácticos atravesando el tejido afectado por diapedesis y liberando sustancias de carácter inflamatorio, como las histaminas, con un papel importante en la hipersensibilidad de tipo I (Horohov, 2000; Regueiro y cols., 2004; Tizard, 2007).

2.2.2.5.2.-MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células fagocitarias de origen mieloide, que se liberan al torrente circulatorio aún inmaduros y se distribuyen en los tejidos en los que se produce su diferenciación. Algunos tejidos tienen macrófagos específicos, como las células de Küpfer en el hígado o la microglia en Sistema Nervioso Central. De forma conjunta, los macrófagos del organismo conforman el Sistema Mononuclear Fagocítico (Regueiro y cols., 2004; Tizard, 2007).

Los macrófagos se estimulan muy precozmente en el curso de una agresión, participando en la activación del sistema del complemento (Slater y Hannant, 2000). Además de su función fagocítica, actúan como células presentadoras de antígeno, como agentes moduladores e inductores de la respuesta linfocitaria y en la reparación de tejidos dañados (Guiguère y Prescott, 2000; Slater y Hannant, 2000; Licastro y cols., 2005; Tizard, 2007).

2.2.2.5.3.-OTRAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS

Los macrófagos junto con las células dendríticas y los linfocitos B son las células presentadoras de antígenos. Estas células, tras procesar los antígenos del patógeno, lo presentan a través de las denominadas moléculas de histocompatibilidad a los linfocitos, para que éstos inicien la respuesta inmunitaria (Licastro y cols., 2005; Tizard, 2007).

2.2.2.5.4.-MASTOCITOS

Los mastocitos son células localizadas en los tejidos y participan activamente en los procesos inflamatorios. Poseen en su interior una gran cantidad de mediadores inflamatorios, como las histaminas, que liberan frente a un estímulo determinado, aumentando considerablemente la permeabilidad vascular. Este incremento de permeabilidad favorece la expansión del plasma sanguíneo y la migración de células

inflamatorias al foco inflamatorio para eliminar al patógeno (McKay, 2000; Swiderski, 2000).

2.2.2.5.5.-PLAQUETAS

Las plaquetas también participan activamente en los procesos inflamatorios. Una vez activadas, liberan numerosas citoquinas que atraen, activan y median en la interacción de los leucocitos con el endotelio vascular, permitiendo la migración a los tejidos subendoteliales (Wagner y Burger, 2003).

2.2.2.5.6.-LINFOCITOS

Dentro de la población linfocitaria total, los linfocitos B son los responsables de la inmunidad humoral, los linfocitos T junto con los macrófagos de la inmunidad celular y las células NK de la inmunidad innata, ya que no requieren activación previa para actuar (Regueiro y cols., 2004; Tizard, 2007).

2.2.2.5.6.1.-LINFOCITOS B

Los linfocitos B mediante la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son los responsables principales de la inmunidad humoral (Heaton y cols., 2002, b, c). Los anticuerpos son moléculas tetrapeptídicas capaces de comunicarse con el sistema del complemento y las células fagocitarias. Asimismo, reconocen y se fijan específicamente a un microorganismo de forma individual (Roitt, 1998, b).

Cada linfocito B está programado para elaborar un único tipo de anticuerpo, que sitúa en su superficie externa para que actúe como receptor. Cuando un antígeno penetra en el organismo, se unirá a dicho anticuerpo. Este receptor se convierte en célula plasmática, capaz de producir numerosos anticuerpos idénticos al que portaba en su superficie. Al mismo tiempo, los linfocitos B sufren un proceso de expansión clonal para elaborar gran cantidad de anticuerpos específicos (Roitt, 1998, b; Regueiro y cols., 2004).

En el hombre existen cinco formas de Ig, denominadas isotipos, con estructuras similares denominadas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. La mayoría de los linfocitos B que circulan en sangre expresan dos isotipos en su membrana plasmática: IgM e IgD (Regueiro y cols., 2004). En el caballo los isotipos de inmunoglobulinas son complejos e incluyen IgM, IgA, IgE y 5 subisotipos de IgG (IgGa, IgGb, IgGc, IgG (T) y IgG (B)) (McGuire y Crawford, 1973). Hasta la actualidad no se ha reconocido IgD en équidos

(Lunn y cols., 1995).

Los anticuerpos pueden inactivar antígenos extracelulares, marcar patógenos bacterianos para su posterior destrucción por las células NK y neutralizar toxinas bacterianas (Guiguère y Prescott, 2000).

2.2.2.5.6.1.1.-LINFOCITOS B CD5

Se trata de un tipo de linfocitos que expresan en su membrana el Cluster de Diferenciación CD5, como se expresará en el apartado 2.3.3.4. Estos linfocitos, a diferencia del resto de linfocitos B, producen anticuerpos poco específicos y reaccionan frente a componentes de la membrana bacteriana (Murakami y Honjo, 1995; Kaufmann, 1997).

Cuando el organismo experimenta repetidas exposiciones a un antígeno determinado, los linfocitos B interaccionan de manera exclusiva con el complejo antígeno-anticuerpo, pasando a diferenciarse en células plasmáticas y células de memoria. Además, durante este periodo de memoria se incrementan el número de linfocitos T reactivos, así como la afinidad del receptor antigénico (BCR) a los antígenos para los que son específicos (McCullough y Summerfield, 2005).

Los anticuerpos una vez formados se mantienen elevados durante mucho tiempo, proporcionando una inmunidad reforzada, con aumento rápido de linfocitos B y T de memoria. Estas células permanecen como reserva para diferenciarse directamente a células plasmáticas tras futuras exposiciones (Guiguère y Prescott, 2000; Slater y Hannant, 2000).

2.2.2.5.6.2.-LINFOCITOS T

Los linfocitos T necesitan contactar con el antígeno que portan las células presentadoras de antígenos (monocitos y macrófagos) en su superficie para poder activarse. Para ello tiene un receptor antígeno-específico (TCR) como parte integrante de su membrana celular. El TCR se encuentra íntimamente vinculado a un complejo de péptidos transmembranosos denominado CD3. Una vez que el receptor TCR se liga al antígeno, el CD3 es el encargado de activar a la célula. El CD3 sólo está presente en los linfocitos T y es la molécula que se emplea para su identificación (Roitt, 1998, b). Además, los linfocitos T necesitan la presencia de un marcador de superficie para reconocer al antígeno. Este tipo de marcadores celulares pertenecen a un importante

grupo de moléculas conocido como Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y existen a su vez dos tipos específicos: CMH de clase I y CMH de clase II (McDevitt, 2000).

El CMH de clase I está presente prácticamente en todas las células nucleadas del organismo e interviene en el reconocimiento de los antígenos por parte de los llamados linfocitos T citotóxicos (linfocitos CD3⁺ CD8⁺) (Jondal y cols., 1996).

Las moléculas del CMH de tipo II se encuentran en los linfocitos B y en las células presentadoras de antígeno (macrófagos o células del sistema monocito-macrófago). También las células endoteliales y epiteliales pueden actuar como células presentadoras de antígenos cuando son inducidas por el interferón gamma (IFN- γ). También se asocian al CMH de tipo II los linfocitos T cooperadores (linfocitos CD3⁺ CD4⁺) una vez que reconocen los antígenos en la superficie de las células presentadoras de antígeno (Williams, 1997).

Existen dos tipos de receptores específicos para linfocitos T (TCR) atendiendo al tipo de cadenas que lo componen, dando lugar a dos tipos de linfocitos: TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ (Caldwell y cols., 1995; De Rosa y cols., 2004). Los linfocitos TCR $\gamma\delta$ predominan en el epitelio intestinal y la piel, siendo más escasos a nivel de nódulos linfáticos, bazo y timo (Goodman y Lefrançois, 1988; Bucy y cols., 1988; Hein y Mackay, 1991; Roitt, 1998, a, b; McDonough y Moore, 2000). Además, el número de células T $\gamma\delta$ varía con la especie animal. Así, mientras que en rumiantes este tipo celular representa entre el 30 y el 80 % del total de linfocitos T (Hein y MacKay, 1991; Hayday, 2000), en cánidos constituyen el 0,5 al 15 % (Roitt, 1998, a, b; McDonough y Moore, 2000), correspondiendo a los équidos el 1% (Hurley, 2007, comunicación personal).

Los linfocitos T $\gamma\delta$ juegan un papel determinante en el reconocimiento de antígenos bacterianos (Hayday, 2000), ejercen una función citotóxica frente a células tumorales y células autólogas infectadas por patógenos intracelulares (Caldwell y cols., 1995), constituyendo la primera barrera defensiva (Regueiro y cols., 2004)

Otras moléculas de superficie de los linfocitos T son los Cluster de Diferenciación CD4 y CD8. La mayoría de los linfocitos T $\gamma\delta$ carecen de ambas moléculas, sin embargo, dentro de los linfocitos T $\alpha\beta$ se diferencian:

- Los linfocitos T citotóxicos expresan en su superficie el antígeno CD8 y reconocen antígenos exógenos asociados a moléculas de histocompatibilidad de tipo I (Jondal y cols., 1996).

- Los linfocitos T cooperadores presentan el antígeno CD4 y reconocen antígenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (Williams, 1997).

Los linfocitos T citotóxicos contribuyen a la resistencia frente a infecciones intracelulares por virus, protozoos y patógenos bacterianos (Harty y cols., 2000), secretan perforinas que perforan la membrana basal de las células diana y transfieren enzimas almacenadas en gránulos citoplasmáticos, induciendo la apoptosis en ellas (Smyth y Trapani, 1995). Estos linfocitos también participan en los mecanismos inmunitarios, produciendo citoquinas como interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF- α). (Harty y cols., 2000). También pueden actuar como células de memoria tras la infección, según se ha podido constatar en modelos humanos y murinos de leishmaniosis (Müller y cols., 1993; 1994; Mendonça y cols., 1995).

Los linfocitos T cooperadores secretan diversos tipos de citoquinas, induciendo por un lado una respuesta de tipo humoral, estimulando la producción de anticuerpos a partir de los linfocitos B, y por otro lado, una respuesta celular activando macrófagos y células citotóxicas para la destrucción de los patógenos intracelulares (Freitas y Rocha, 2000). Los linfocitos T cooperadores en base a la producción de estas citoquinas se clasifican en Th1 y Th2:

-Los linfocitos Th1 producen principalmente interleuquina 2 (IL2) e interferón- α (IFN- α) e inducen una respuesta inmune de tipo celular, importante para la eliminación de patógenos intracelulares (Akkonyunlu y Fikrig, 2000).

-Los linfocitos Th2 producen interleuquina 4 (IL4) e interleuquina 5 (IL5) e inducen una respuesta inmune de tipo humoral, más orientada a la lucha frente a patógenos extracelulares (Roitt, 1998, a).

Los linfocitos T y B están independientemente regulados, de modo que la ausencia de una de estas poblaciones no se compensa con el aumento de la otra. Un mecanismo similar ocurre entre las poblaciones de linfocitos T de tipo $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$. Sin embargo, dentro de los linfocitos T $\alpha\beta$ las poblaciones CD4 y CD8 son correguladas, es decir, una disminución de una de ellas suele producir un incremento compensatorio de la otra, de tal manera, que el número total de células $\alpha\beta$ se mantiene relativamente estable (Rocha y cols., 1989; Freitas y Rocha, 2000).

A nivel morfológico, se ha observado la presencia de linfocitos granulares grandes. Estas células aumentan considerablemente en ciertos procesos patológicos, fundamentalmente relacionados con neoplasias y estímulos antigénicos crónicos. El análisis inmunofenotípico divide este tipo celular en dos líneas:

-Linfocitos granulares grandes CD3⁺, que no expresan el receptor de células T (TCR), estarían representados por las células NK (McDonough y Moore, 2000).

-Linfocitos granulares grandes CD3⁺, que expresan el receptor de células T (TCR) y representan células T citotóxicas activadas (Loughran y cols., 1988; Scott y Richards, 1992). Suelen ser CD4⁻ y CD8⁺ ó CD8⁻ (Wellman y cols., 1989), aunque los más comunes son los linfocitos CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻ de tipo γδ.

2.2.2.5.6.2.1.-LINFOCITOS T REGULADORES

Los linfocitos T reguladores también conocidos como linfocitos T supresores, se definen como un subtipo especializado de linfocitos T capaces de suprimir la respuesta inmunitaria (Shevach, 2004). Se consideran responsables del mantenimiento de la tolerancia al actuar frente a los linfocitos T autorreactivos que escapan de la selección tímica y emergen como células potencialmente patológicas autorreactivas (Chess y Jiang, 2004; Zou, 2006). Están relacionados con enfermedades autoinmunes graves (Sakaguchi, 2005).

Al igual que el resto de linfocitos T, los linfocitos T reguladores se desarrollan en el timo y suelen expresar moléculas de superficie CD4 y CD25, denominándose linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ o T_{reg} (McDonald, 2002; Zou, 2006), aunque existen linfocitos T que expresan estas mismas proteínas de superficie sin función reguladora. Los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ representan el 5-10% de la población madura de linfocitos T cooperadores en roedores, siendo del 1-2% en humanos (Shevach, 2000; Zou, 2006). Asimismo, existe una población pequeña de linfocitos T reguladores CD8⁺, aunque de función no tan definida como la anterior (Chess y Jiang, 2004).

2.2.2.5.6.3.-LINFOCITOS NATURAL KILLER (NK)

Las células NK son linfocitos granulares grandes que reconocen glucoproteínas de alto peso molecular presentes en la superficie de las células infectadas y ejercen su acción defensiva induciendo la apoptosis de la célula diana (Slater y Hannant, 2000). Se trata de una acción citotóxica producida de manera innata, aunque también interviene en la inmunidad adquirida de tipo celular (McDonough y Moore, 2000). Estas células producen IFN-γ, participando en la activación de los macrófagos (Park y Rikihisa, 1992), poseen receptores naturales capaces de detectar la ausencia de CMH, típico de células infectadas por virus, bacterias y células cancerígenas (Unanue, 1997; Guiguère y Prescott, 2000; Slater y Hannant, 2000) y reconocen células opsonizadas (Regueiro y cols., 2004).

2.2.2.6.-ÓRGANOS Y TEJIDOS

Los órganos y tejidos del sistema inmune pertenecen al sistema linfoide y se clasifican desde el punto de vista anatómico y funcional en (Tyzard, 2007):

-Desde el punto de vista anatómico en órganos de cápsula bien definida, como el bazo, timo, ganglios linfáticos y médula ósea o bien como depósitos difusos o tejido no encapsulado asociado a mucosas (MALT: *mucosal associated lymphoid tissue.*).

-Desde el punto de vista funcional en órganos linfoides primarios, donde se originan los leucocitos, médula ósea y timo, y órganos linfoides secundarios, aquellos que representan el lugar de interacción de linfocitos y antígenos y linfocitos entre sí, entre los que se citan el bazo, los nódulos linfáticos y MALT).

2.2.2.6.1.-ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS

Son los órganos encargados de la producción de linfocitos ya competentes. Esta competencia se genera una vez que se han recombinado los genes necesarios para la codificación de las Ig que conforman los receptores BCR y las proteínas $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$ del receptor del linfocito T (TCR). Este es un proceso estocástico por lo que se generarán receptores para antígenos extraños y propios del organismo y en el que aquellos linfocitos que expresen receptores contra antígenos propios serán eliminados (Miller, 2002).

2.2.2.6.1.1.-MÉDULA ÓSEA

Todas las células del sistema inmune tienen su origen en las células pluripotenciales de la médula ósea, existiendo dos series celulares, la mieloide y la linfoide. Además, ejerce funciones como órgano linfoide secundario, ya que es el lugar donde se encuentran las células plasmáticas y por tanto, en el que se generan la mayoría de los anticuerpos (Montecino-Rodríguez y Dorshkind, 2006).

2.2.2.6.1.2.-TIMO

El timo es el órgano donde se produce la maduración de los linfocitos T, para posteriormente distribuirse a los órganos linfoides secundarios. En este órgano se diferencian dos regiones: cortical y medular.

Los linfocitos inmaduros llegan a la región cortical de timo, donde sufren una selección positiva, por la cual sobrevivirán aquellos que hayan generado receptores TCR capaces de reconocer moléculas MHC y ser capaces de interactuar con células presentadoras de antígeno del organismo. Posteriormente, pasan a la región medular, donde sufren una selección negativa, eliminándose mediante apoptosis los linfocitos que resulten autorreactivos, es decir, aquéllos que reconozcan autoantígenos presentados por el propio CMH (Montecino-Rodríguez y Dorshkind, 2006).

2.2.2.6.2.-ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

Los órganos linfoides secundarios son los lugares donde se produce la interacción de linfocitos y antígenos, permitiendo la producción de una respuesta inmune adaptativa específica. Los linfocitos son células con una gran capacidad migratoria, permitiendo la recirculación intensa a través de la sangre y la linfa por los distintos tejidos con la finalidad de tomar contacto con los antígenos y migrar para transmitir la información al resto de las células del organismo (Tedla y cols., 1998, Heydtmann y Adams, 2002). Mientras que la circulación de los linfocitos vírgenes se produce al azar, los linfocitos de memoria tienen preferencia por el tejido u órgano de contacto con el antígeno (Tedla y cols., 1998; Miyasaka y Tanaka, 2004).

2.2.2.6.2.1.-BAZO

El bazo es un órgano con doble función, la pulpa roja actúa como almacén de eritrocitos, granulocitos y plaquetas, participando en la eliminación de eritrocitos deteriorados. La pulpa blanca actúa como órgano linfoide secundario, permitiendo la interacción entre antígenos y células inmunitarias (Regueiro y cols., 2004).

2.2.2.6.2.2.-NÓDULOS LINFÁTICOS

La función principal de los nódulos linfáticos es la filtración de los antígenos procedentes de la linfa y del líquido intersticial. Los nódulos linfáticos presentan un área cortical, provista de linfocitos B, área paracortical, con linfocitos T y área medular con linfocitos B, macrófagos y células plasmáticas. En el área paracortical existen numerosas células dendríticas que actúan como presentadoras de antígenos a los linfocitos T (Cella y cols., 1997).

En el área cortical y medular se encuentran las células dendríticas foliculares que son células presentadoras de antígenos a los linfocitos B, son de origen desconocido e

intervienen en la formación de los núcleos germinales en los tejidos linfoides. Estos centros germinales son lugares de proliferación activa de linfocitos B estimulados antigénicamente, en los que tiene lugar la maduración y la génesis de linfocitos B de memoria (Park y Choi, 2005).

2.2.2.6.2.3.-MALT (*tejido linfoide no encapsulado asociado a mucosas*)

Son agrupaciones de tejido linfoide no encapsulado situadas en la lámina propia y submucosa del tracto digestivo, respiratorio y urogenital (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006). El MALT reviste una gran importancia, puesto que es la primera línea defensiva del organismo frente a patógenos (Regueiro y cols., 2004; Liebler-Tenorio y Pabst, 2006).

2.3.-CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es un método analítico que permite detectar y cuantificar estructuras y funciones celulares individuales o partículas biológicas aisladas a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica (Stewart, 1997). Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas (Rosell, 2002).

En medicina humana su aplicación se ha dirigido a identificar inmunodeficiencias, caracterizar y monitorizar la respuesta inmunitaria frente a distintas enfermedades, como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), y la respuesta en transplantes de órganos y determinar el inmunofenotipo de leucemias y linfomas (Knapp, 1992; Keren, 1994; Grindem, 1996; Shanahan, 1997).

De manera semejante a su aplicación en medicina humana, en medicina veterinaria su empleo se ha desarrollado considerablemente en la última década (Culmsee y Nolte, 2002), utilizándose en la identificación del estudio de infecciones por los virus de la leucemia felina (FeLV), inmunodeficiencia felina (FIV), en la evaluación de la respuesta al trasplante de órganos en cánidos, y en la caracterización del inmunofenotipo en linfomas en distintas infecciones (Caswell y cols., 1997; Culmsee y Nolte, 2002; Weiss, 2001, a, b; Weiss, 2002; Winnicka y cols., 2002; Guglielmino y cols., 2004).

Debido al número creciente de parámetros biológicos analizables y al desarrollo de citómetros de coste accesible dotados de sistemas informáticos de uso relativamente sencillo y de alta capacidad operativa, la citometría de flujo posee en la

actualidad un amplio abanico de aplicaciones en distintos campos básicos y clínicos, permitiendo la identificación de células o partículas biológicas, la caracterización de sus propiedades o respuestas funcionales y, en determinados casos, su separación física (Rosell, 2002).

En relación a la sangre, la citometría de flujo permite realizar un estudio inmunofenotípico, es decir, identificar y contar los diferentes tipos celulares (Stewart, 1997). Para ello, la sangre se obtiene por punción venosa y se almacena en tubos con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. De la muestra extraída se realizan alicuotas en diferentes tubos y se enfrentan a determinadas combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados con colorantes fluorescentes (fluorocromos). Se procede a la eritrolisis de las muestras y la suspensión celular atraviesa el citómetro de flujo en flujo continuo, célula a célula (Calvelli y cols., 1993), interactuando las células y los fluorocromos que llevan adheridos con la luz láser, emitiendo fluorescencia. Esta emisión fluorescente y la luz dispersada por las células es recogida y convertida en señales electrónicas en el citómetro (McKoy, 1994).

Durante el estudio del inmunofenotipado se identifican de 4 a 5 características diferentes de cada célula. La luz dispersada es recogida desde dos ángulos: uno a 0° en la misma dirección del haz de luz, llamado dispersión frontal de luz láser y otro a 90° del haz, llamado dispersión lateral de luz láser. La información electrónica es digitalizada para su análisis inmediato o bien almacenada en forma de lista de datos para ser analizada posteriormente mediante un programa de análisis de datos (Grindem, 1996; Stewart, 1997). Esta técnica es capaz de llevar a cabo la identificación de células y poblaciones celulares comunes gracias a la combinación de sus propiedades de dispersión de la luz y a sus antígenos de superficie unidos a anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (Shanahan, 1997).

El citómetro de flujo emplea una luz láser monocromática, con una única longitud de onda, altamente focalizada y polarizada. La morfología celular se determina por la observación de las diferencias en la dispersión de la luz entre las células. También realiza una lectura de la intensidad de fluorescencia celular, permitiendo una medida cuantitativa de la tinción celular. Con esta tecnología se pueden analizar un gran número de células, aproximadamente 1000 células al segundo (Shanahan, 1997). La dispersión de la luz se emplea para diferenciar las células por tamaño, contorno o complejidad interior (granularidad). La combinación de la dispersión frontal y lateral de la luz se recoge y analiza en cada célula (McKoy, 1994).

De esta forma, la dispersión frontal de la luz se encuentra relacionada con el tamaño celular, mientras que la dispersión lateral de la luz corresponde al contorno y complejidad celular interna. Los linfocitos dispersan poca luz frontal y lateralmente, ya que son pequeños, de contornos suaves y de escasa granularidad. Los granulocitos son grandes y tienen núcleos multilobulados y numerosos gránulos intracitoplasmáticos, por lo que dispersan gran cantidad de luz tanto en dirección frontal como lateral (McKoy, 1994) (Gráficos 2 y 3).

El registro de dispersión de luz coloca cada uno de los ángulos de dispersión en un eje de coordenadas (Stewart, 1997). Los datos pueden ser emitidos como histogramas monoparamétricos o biparamétricos. Los histogramas monoparamétricos son curvas de probabilidad en los que el número de células o eventos son punteados según la intensidad de la señal. Los histogramas biparamétricos muestran la relación entre dos características celulares independientes (Owens y Loken, 1995).

2.3.1.-DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE POR INMUNOFLUORESCENCIA

Los anticuerpos monoclonales vienen definidos por su capacidad de unión específica a los componentes de origen proteico, lipídico o glucídico que poseen las células en su superficie. Estos anticuerpos se conjugan con fluorocromos que permiten su identificación a través de la emisión de fluorescencia. Cada célula es analizada en base a la existencia o ausencia de emisión de fluorescencia, lo que está relacionado con sus características de membrana (Keren, 1994; Stewart, 1997).

Los fluorocromos más habituales para estudios de inmunofluorescencia de dos colores son el Isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la ficoeritrina (PE). El fluorocromo FITC emite luz verde y el PE luz roja cuando son excitados por el haz de luz láser. La fluoresceína es una pequeña molécula que puede ser fácilmente conjugada con proteínas gracias a un grupo isotiocianato. Es excitable a 488nm (laser de argón) y la emisión máxima de fluorescencia se produce a 530nm, por lo que esta fluorescencia es verde para el ojo. Sin embargo, también es emitida por esta molécula cierta cantidad de luz amarilla y naranja. Es muy estable en pH neutro, pero en condiciones ácidas su fluorescencia se reduce (Owens y Loken, 1995). La ficoeritrina es una molécula grande que aparece de forma natural como parte del aparato fotosintético de bacterias, algas y plantas. Es excitable a 488nm y su espectro de emisión máxima de fluorescencia se sitúa en 575nm. La conjugación de ficoeritrina con los anticuerpos es

mucho más compleja que la de fluoresceína. Sus propiedades fluorescentes son bastante independientes del pH, aunque un pHs extremo podría dissociarla (Owens y Loken, 1995). La emisión del espectro de luz de la fluoresceína y la ficoeritrina son diferenciables y el pico de emisión se encuentra claramente distanciado, por lo que estos fluorocromos pueden emplearse conjuntamente.

En la siguiente figura se presenta un esquema ilustrativo de los espectros de emisión de los tres fluorocromos.

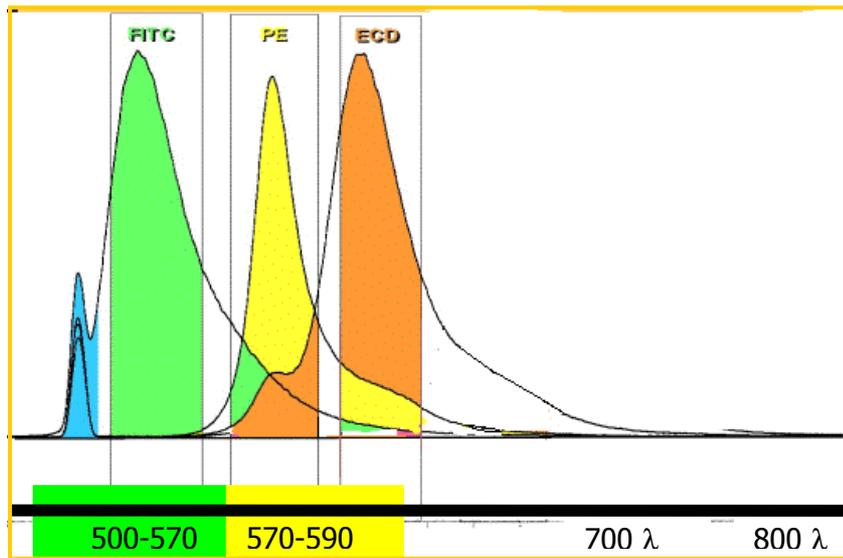


Figura 1.- Espectro de emisión de tres fluorocromos tras la excitación con el laser de 488 nm FITC = isotiocianato de fluoresceína; PE = ficoeritrina; ECD = energy coupled dye®).

2.3.2.-COMPONENTES DEL CITÓMETRO DE FLUJO

2.3.2.1.-SISTEMA ÓPTICO

El sistema óptico del citómetro de flujo enfoca a las partículas, detecta la luz dispersada por ellas y selecciona la fluorescencia emitida a medida que las partículas atraviesan el haz luminoso (Owens y Loken, 1995). Este sistema incluye los componentes para la manipulación del haz de luz láser para la iluminación de las células como las lentes de recolección de luz, los filtros y los detectores empleados para recoger las señales procedentes de las células (Stewart, 1997) (Figura 5)..

2.3.2.2.-SISTEMA DE ILUMINACIÓN

La mayoría de los sistemas de iluminación producen haz de luz láser, por tratarse de una luz monocromática, polarizada, estrecha, estable y de intensidad conocida, aunque otros sistemas disponen de lámparas de mercurio. El citómetro puede disponer de un solo haz de luz láser (longitud de onda de 488nm) o tener más de un haz de luz, lo que permite emplear fluorocromos excitables a longitudes de onda diferentes a 488nm (Owens y Loken, 1995) (Figura 5).

2.3.2.3.-SISTEMA HIDRÁULICO

El sistema hidráulico rodea la suspensión celular con una vaina externa, formada por un fluido libre de partículas que mueve la muestra a velocidad constante, a través de la zona de detección (cámara de flujo) donde las células son expuestas una a una al haz iluminador (Owens y Loken, 1995) (Figura 5).

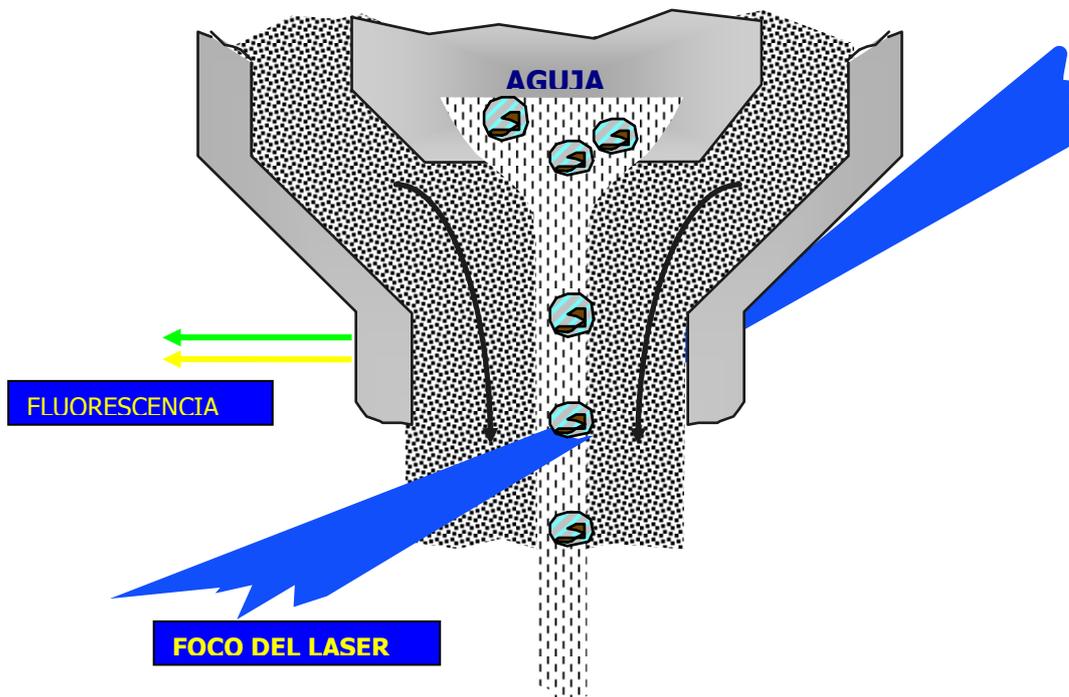


Figura 2.- Esquema ilustrativo del paso de células por el sistema hidráulico en forma de flujo individual y la incidencia del haz de láser sobre cada una de las células.

2.3.2.4.-SISTEMA ELECTRÓNICO

El sistema electrónico procesa las señales originadas en los fotodetectores, es decir, se encarga de la detección y amplificación de la señal en forma analógica y la posterior transformación en señal digital. Existen dos tipos de fotodetectores empleados en los citómetros de flujo: los fotodiodos y los tubos fotomultiplicadores. Los fotodiodos son empleados como detectores de dispersión de luz frontal, ya que su baja sensibilidad se compensa por la intensidad de la luz láser. Los tubos fotomultiplicadores son de alta sensibilidad y se emplean como detectores de dispersión lateral de luz y detectores de fluorescencia (Stewart, 1997).

Los fotodetectores convierten los fotones recibidos por el detector en impulsos eléctricos proporcionales en magnitud al número de fotones recibidos. Cada fotodetector medirá una característica celular distinta, por lo que se emplearán tantos fotodetectores como características celulares se quieran analizar en cada protocolo. La transformación de la señal analógica en digital se lleva a cabo por un conversor analógico-digital (Stewart, 1997) (Figura 5).

2.3.2.5.-SISTEMA DE ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Este sistema permite la adquisición multiparamétrica de datos en tiempo real y en modo lista. Los datos pueden presentarse en forma de histogramas con distribución mono o biparamétrica (Owens y Loken, 1995). Además, la mayoría de los citómetros son compatibles con ordenadores y sistemas operativos comunes (MS-DOS, Windows y McIntosh).

A continuación se muestran dos esquemas representativos del análisis morfológico de las diversas poblaciones leucocitarias y de la fluorescencia emitida por los linfocitos mediante citometría de flujo (imágenes cedidas por Coulter-Beckman ®).

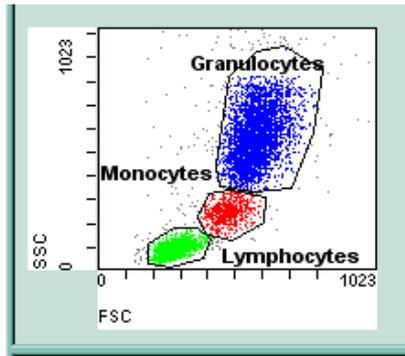


Figura 3.- Representación biparamétrica en función de la dispersión frontal y lateral, análisis morfológico de las poblaciones celulares.

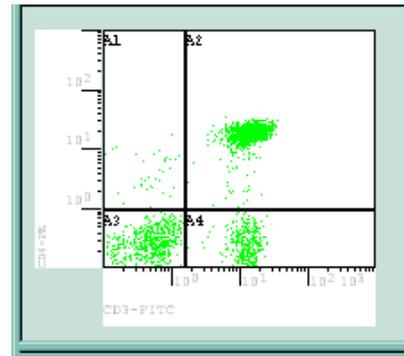


Figura 4.- Representación biparamétrica de la fluorescencia emitida por la población sesgada de linfocitos.

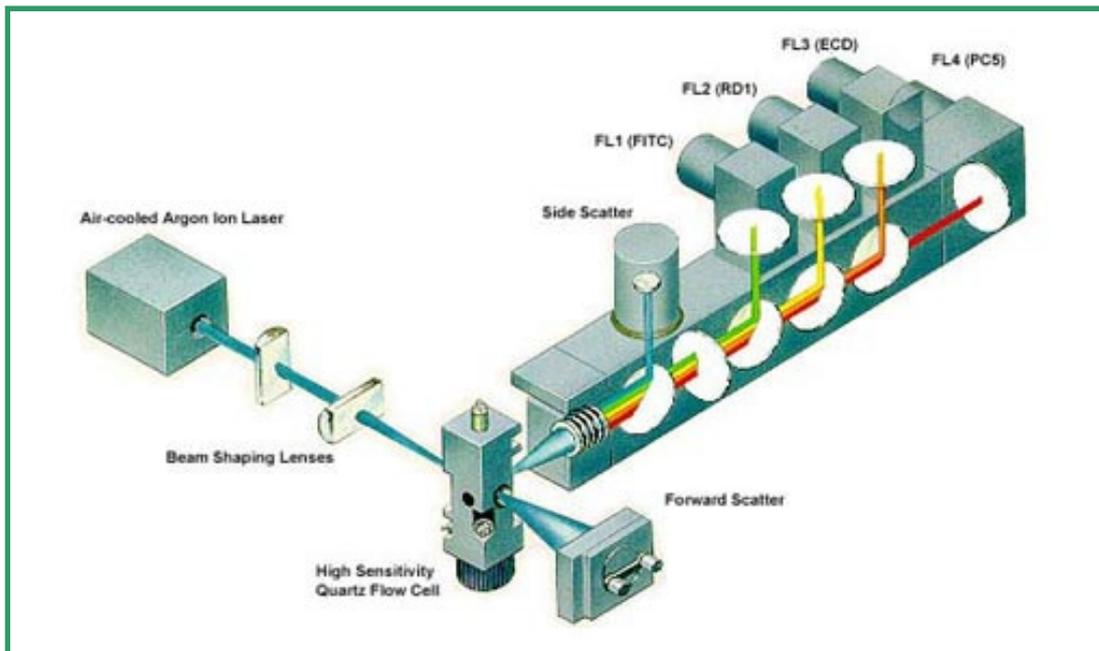


Figura 5.- Esquema de un citómetro de flujo. En él se representan los diferentes componentes del citómetro: Sistema de iluminación: foco de luz láser (*Air-cooled argon ion laser*). Sistema hidráulico (*high sensitivity quartz flow cell*). Sistema óptico: filtros, fotodiodos o receptores de dispersión frontal de luz láser (*Forward scatter = FS*), fotomultiplicadores o detectores de dispersión lateral de luz láser (*Side scatter = SS*) y de fluorescencia. Existen diferentes fotomultiplicadores para la detección de fluorescencia, del FL1 al FL4; cada uno de ellos recibe la dispersión procedente de diferentes longitudes de onda emitida por los diferentes fluorocromos empleados. El FL1 recibe fluorescencia entre 500 y 550 nm y se emplea para la recepción de fluorescencia procedente de la fluoresceína; y el FL2 entre 550 y 600 nm y se emplea para la detección de fluorescencia procedente de la ficoeritrina.

2.3.3.-APLICACIONES CLÍNICAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS

La citometría de flujo permite el análisis tanto de fluidos y sangre, como de suspensiones de tejidos sólidos, y por ello tiene aplicación en numerosos campos de investigación (Nakage y cols., 2005). Uno de estos campos ha sido la investigación clínica, lo que ha permitido su implantación como técnica analítica en el diagnóstico y seguimiento de diferentes enfermedades (Vernau y Moore, 1999; Brown y Wittner, 2000; Tarrant, 2005).

En medicina humana, la disponibilidad de anticuerpos monoclonales (MAbs) contra las proteínas de superficie de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, ha contribuido a un rápido desarrollo de esta técnica y a su aplicación a la caracterización de células en sangre, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y orina. En hematología, la citometría de flujo se emplea sobre todo en la tipificación de leucemias y linfomas, monitorización de enfermos de SIDA y valoración de las propiedades de eritrocitos, leucocitos y plaquetas (Brown y Wittner, 2000).

En medicina veterinaria, la escasez de anticuerpos monoclonales para la tipificación de las diferentes células animales ha dificultado su aplicación clínica (Weiss, 2002; Tarrant, 2005). Sin embargo, son cada vez más numerosos los trabajos de investigación que utilizan esta técnica como método analítico, lo que hace prever una gradual implantación de la misma para el diagnóstico y seguimiento de diferentes enfermedades en el campo de la medicina veterinaria. (Nakage y cols., 2005; Tarrant, 2005).

En este capítulo se realiza un breve resumen de las aplicaciones clínicas actuales de la citometría de flujo tanto en medicina humana como animal.

2.3.3.1.-ANÁLISIS DE ERITROCITOS

Una de las primeras aplicaciones clínicas de la citometría de flujo ha sido el estudio y recuento de eritrocitos. Actualmente, los analizadores automáticos que emplean citometría de flujo como método analítico se han instaurado como sistemas de precisión y calidad en hematología humana. (Tvedten 1993; Tarrant, 2005). Recientemente esta nueva tecnología se ha incorporado en medicina veterinaria y su alta precisión acabará desbancando del mercado los analizadores automáticos anteriores (Weiss, 2002)

Otra aplicación en medicina humana es la detección de eritrocitos fetales en sangre materna, de gran interés en las gestaciones de madres Rh- y feto Rh+, en los que, en un segundo embarazo puede producir la muerte fetal debido a hemólisis (Brown y Wittwer, 2000). Este proceso “eritrolisis del recién nacido” está también descrito en otras especies como équidos y gatos, aunque a conocimiento del autor no existe documentación sobre el empleo de la citometría de flujo en la investigación de este proceso en veterinaria.

La implantación de la citometría de flujo ha permitido incrementar la fiabilidad de los recuentos de reticulocitos, al identificar estas células con mayor precisión, sensibilidad y reproducibilidad que los métodos manuales tradicionales (Nakage y cols., 2005; Tomer, 2006). El empleo de la citometría de flujo para el recuento de reticulocitos se ha aplicado en perros (Abbot y McGrath, 1991), caballos (Segura y cols., 2006) y gatos, especie esta última en la que la citometría de flujo es capaz de diferenciar reticulocitos agregados y punteados, caracterizando las anemias de forma mucha más precisa (Perkins y cols., 1995).

El diagnóstico de la Anemia hemolítica autoinmune se ha implementado gracias al empleo de la citometría de flujo. Esta técnica confiere mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica que el test de Coombs, además de permitir la identificación y cuantificación de los isotipos de los anticuerpos implicados, IgA, IgG o IgM (Wilkerson y cols., 2000; Quigley y cols., 2001; Davies y cols., 2002).

En medicina veterinaria existen dos estudios que comparan la citometría de flujo con el test de Coombs en el diagnóstico de anemias hemolíticas autoinmunes. Uno de estos estudios se realizó en perros y caballos (Wilkerson y cols., 2000) y el otro sólo en perros (Quigley y cols., 2001). La especificidad era prácticamente la misma en ambos métodos, sin embargo, la citometría de flujo demostró una sensibilidad claramente superior a la del test de Coombs. En ambos estudios, la citometría de flujo sirvió además, para monitorizar la respuesta al tratamiento (Wilkerson, 2000)

2.3.3.2.-ANÁLISIS DE PLAQUETAS

El análisis plaquetario con citometría de flujo es cada vez más habitual tanto en el diagnóstico clínico como en la investigación básica (Brown y Wittwer, 2000). La citometría de flujo ha demostrado ser un método eficaz en:

-La realización de recuentos del número total de plaquetas tanto maduras como inmaduras

-La detección de anticuerpos de superficie en enfermedades autoinmunes y

-La valoración de la funcionalidad plaquetaria a través de la cuantificación de plaquetas activadas circulantes y agregados plaquetarios (Brown y Wittwer, 2000; Kingston y cols., 2002; Tarrant, 2005; Segura y cols., 2006).

1.-En casos de trombocitopenias, un número bajo de plaquetas inmaduras mostraría un defecto en la trombopoiesis, mientras que un número alto sería indicativo de trombocitopenias por destrucción plaquetaria (Brown y Wittwer, 2000; Briggs y cols., 2004). En perros y caballos la citometría de flujo ha sido utilizada con éxito para evaluar la regeneración mediante el recuento de plaquetas reticuladas (inmaduras). Los porcentajes de plaquetas reticuladas obtenidos en condiciones fisiológicas presentan un alto margen de variación, entre un 3.9 y un 15% en perros y un 0.9 y un 3.4% en caballos (Russell y cols., 1997; Weiss y Townsend, 1998; Smith III y Thomas, 2002). Estas variaciones tan grandes, probablemente debidas a diferencias metodológicas (Smith III y Thomas, 2002), hacen todavía difícil su utilización clínica en medicina veterinaria

2.-Hasta el empleo de la citometría de flujo, el diagnóstico de trombocitopenias inmunomediadas se basaba en los hallazgos clínicos y en la exclusión de otras patologías (Tarrant, 2005; Tomer, 2006). La detección de anticuerpos en la superficie de las plaquetas mediante citometría de flujo asegura el diagnóstico fiable de trombocitopenias autoinmunes y la valoración de su evolución de una manera rápida y eficaz (Nunez y cols., 2001; Tomer, 2006). Sin embargo, existen limitaciones prácticas y metodológicas que dificultan su empleo rutinario en laboratorios clínicos (Tomer, 2006). En medicina veterinaria se ha empleado esta técnica en caso de trombocitopenias en perros (Wilkerson y cols., 2000) y caballos (McGurrin y cols., 2004). Mientras que algunos autores afirman que su uso clínico en caballos es posible (Davies y cols., 2002; McGurrin y cols., 2004), en perros, los estudios realizados limitan su valor a una simple ayuda al diagnóstico y monitorización de la trombocitopenia inmunomediada (Wilkerson y cols., 2000)

3.- Por último, la más reciente utilización clínica de la citometría de flujo es el análisis funcional de la activación plaquetaria. La activación plaquetaria es un

parámetro importante en el almacenamiento de componentes sanguíneos, en situaciones de circulación extracorpórea y en el tratamiento y prevención de tromboembolismos (Brown y Wittner, 2000; Michelson y cols., 2000). En medicina veterinaria, especialmente en caballos, el único parámetro indicativo de activación plaquetaria cuya técnica analítica está puesta a punto es el volumen plaquetario medio, estando el resto de parámetros en fase experimental (Weiss y Moritz, 2004; Segura y cols., 2006).

2.3.3.3.-VALORACIÓN DE LA FUNCIÓN FAGOCÍTICA CELULAR

La valoración de la función fagocítica celular se realiza midiendo la fagocitosis, la actividad oxidativa y detectando cambios en los antígenos de superficie (Robinson y cols., 1997; Brown y Wittner, 2000; Davies y cols., 2002). La fagocitosis se valora midiendo la interiorización de partículas o microorganismos unidos a un marcador con fluoresceína, mientras que para calcular la actividad oxidativa se cuantifica la capacidad de oxidar dihidro-rodamina 123 (Smits y cols., 1997).

En medicina humana, el uso clínico más interesante de la valoración fagocítica celular es el diagnóstico del síndrome de adhesión leucocitaria deficiente tipo I (Brown y Wittner, 2000). Síndrome causado por una deficiencia congénita del receptor CD11/CD18 que impide que se una al endotelio durante la migración leucocitaria a los lugares de inflamación (van Eaden y cols., 1999).

La complejidad de esta técnica y el bajo número de enfermedades primarias que afecten a los neutrófilos hace que su aplicación clínica sea muy escasa en veterinaria (Weiss, 2002; Tarrant, 2005). Aunque en pequeños animales ha servido para identificar enfermedades congénitas que afectan a receptores de membrana y moléculas de adhesión, como la deficiencia de adhesión leucocitaria del Setter Irlandés (Creevy y cols., 2003; Tarrant, 2005). En caballos esta técnica, se ha empleado para valorar la función neutrofílica en animales con endotoxemias, animales bajo terapia inmunosupresora, para valorar los efectos del ejercicio y el transporte en caballos con procesos inmunosupresores y los efectos sobre el sistema inmune de algunos fármacos como el midazolam (Raidal y cols., 1997; Jensen-Waern y cols., 1999; Raidal y cols., 2000; Massoco y Palermo-Neto, 2003).

2.3.3.4.-TIPIFICACIÓN LEUCOCITARIA. INMUNOFENOTIPADO

La tipificación de las subpoblaciones linfocitarias es posiblemente la mejor herramienta para valorar el sistema inmune. La valoración del sistema inmunitario de un paciente permite predecir la posible aparición de complicaciones infecciosas en el curso de enfermedades que comprometan el sistema inmune, ayudando al pronóstico y a las decisiones terapéuticas de la enfermedad, además de evaluar la evolución de la enfermedad y de la respuesta al tratamiento instaurado (Slater y Hannant, 2000; Witonsky y cols., 2003).

La cuantificación de linfocitos T tanto auxiliares (CD4⁺) como citotóxicos (CD8⁺) y del cociente CD4/CD8 es una técnica habitual para valorar la integridad del sistema inmunitario del paciente (Laurence, 1993; Jiang y cols., 2004; Nakage y cols., 2005). En medicina humana estas cuantificaciones se emplean de manera rutinaria en la monitorización de los individuos infectados con el VIH (virus de la Inmunodeficiencia humana). Según progresa la enfermedad, el número de linfocitos T CD4⁺ disminuye, haciendo de su recuento una manera muy útil de predecir, clasificar y monitorizar la progresión y respuesta al tratamiento de estos pacientes (Laurence, 1993; Brown y Wittwer, 2000; Jiang y cols., 2004).

Se ha observado que el número de linfocitos T CD4⁺ puede ser un indicador de la susceptibilidad del individuo inmunocomprometido a enfermedades oportunistas (Laurence, 1993). Así, un número de linfocitos T CD4⁺ inferior a 200/μl en sangre periférica de humanos, está relacionado con un elevado riesgo de contagio por gérmenes oportunistas, como neumonías por *Pneumocystis carinii*, tuberculosis o abscesos cerebrales ya sea en enfermos de SIDA, u otras enfermedades inmunodepresoras, como la inmunodeficiencia idiopática, o tras recibir quimioterapia o radioterapia (Phair y cols., 1990; Duncan y cols., 1993; Laurence, 1993; Jiang y cols., 2004).

En medicina canina la tipificación linfocitaria se ha empleado en el estudio de infecciones en las que el desarrollo de la enfermedad está íntimamente relacionado con la respuesta inmunitaria del individuo. Así, enfermedades como la erlichiosis y la leishmaniosis han sido objeto de numerosas investigaciones con el objetivo de revelar las implicaciones que el sistema inmune tiene en el desarrollo de las mismas, para valorar el diagnóstico, el pronóstico y la respuesta al tratamiento (Guarga y cols., 2002; Hess y cols., 2006; Miranda y cols., 2007). La tipificación de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias ha sido objeto de estudio en otras enfermedades caninas como el lupus

eritematoso sistémico (Chabanne y cols., 1995), la bartonelosis (Pappalardo y cols., 2001) y la sarna demodéica (Caswell y cols., 1997).

En medicina felina, la caracterización de poblaciones linfocitarias está siendo muy útil en la investigación de determinadas enfermedades víricas producidas por el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), de la leucemia felina (VleF) y de la peritonitis infecciosa felina (PIF) (Grindem, 1996; Hartmann, 1998; Bull y cols., 2003; Tarrant, 2005).

En medicina equina, el estudio inmunofetípico ha permitido determinar la existencia de una menor proporción de linfocitos T CD4⁺, con una mayor proporción de linfocitos CD8⁺ y por tanto, un cociente CD4/CD8 inferior en potros con neumonía por *Rhodococcus equi*, que en potros sanos (Chaffin y cols., 2004). Además, se ha mostrado la existencia de una disminución porcentual y absoluta de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ con una alteración del cociente CD4/CD8 como posible factor predisponente de una infección oportunista por *Pneumocystis carinii* en un potro (Flaminio y cols., 1998).

2.3.3.5.-DIAGNÓSTICO DE DESÓRDENES LEUCOPROLIFERATIVOS

La relevancia de la citometría de flujo en el diagnóstico de desórdenes leucoproliferativos reside en su capacidad de diferenciar las diferentes subpoblaciones leucocitarias de forma más precisa que las técnicas citomorfológicas tradicionales. Las técnicas tradicionales son poco fiables a la hora de identificar linfocitos, especialmente en caso de neoplasias de células precursoras, e inefectivas a la hora de determinar el fenotipo de las células tumorales, (Grindem, 1996; Weiss, 2001, a, b; 2002; Tarrant, 2005). La citometría de flujo es especialmente valiosa en la identificación de la línea celular responsable de la proliferación, la diferenciación entre leucemia linfoide y linfoma primario, entre linfomas y otras neoplasias de tejidos ricos en linfocitos o de células de similar morfología como los timomas (Tarrant, 2005; Lana y cols., 2006).

La definición del tipo celular responsable del trastorno leucoproliferativo es esencial para el pronóstico y tratamiento de la neoplasia. Así por ejemplo y de manera general, los linfomas de linfocitos T tienen peor pronóstico que los de linfocitos B. (Teske y cols., 1994; Grindem, 1996; McClure y cols., 2001; Tarrant, 2005)

Aunque por el momento, en el campo de la oncología veterinaria, la citometría de flujo no se aplica como técnica rutinaria en el diagnóstico, tipificación y seguimiento de neoplasias hematopoiéticas, su empleo en diversos trabajos de investigación ha aportado

interesante información en el estudio de desordenes leucoproliferativos. Así, en la leucemia linfocítica crónica canina se ha podido observar que un 73% de estas leucemias son de linfocitos T, con mayoría CD8⁺, y un 26% son de linfocitos B, todos CD5⁺. Estos resultados contrastan con medicina humana donde el 95% de las leucemias crónicas son proliferaciones de linfocitos B CD5⁺ (Jennings y Foon, 1997). En las leucemias agudas caninas, el 55% son mieloides, el 16% son de linfocitos B, y 10% de NK, el 8% de linfocitos T y el 11% son indiferenciadas (Vernau y Moore, 1999). En el caso de los linfomas entre un 61 y un 80% son de linfocitos B, y entre un 25 y un 38% de linfocitos T, de este 38%, un 60% son CD8⁺, un 25% CD4⁺ y un 15% CD4⁻ CD8⁻ (Grindem y cols., 1998; Miniscalco y cols., 2003, Mondiano y cols., 2005)

En gatos, en linfomas y leucemias linfocíticas, los tumores de células T son mucho más frecuentes que los de linfocitos B, aunque, al contrario que en los perros, son más frecuentes los linfomas de linfocitos T CD4⁺ (Jackson y cols., 1996; Workman y Vernau, 2003).

En un estudio sobre 31 linfomas equinos, el 77% correspondían a linfomas de linfocitos B, proporción parecida a la descrita en seres humanos (Kelley y Mahaffey, 1998). En los únicos estudios encontrados, en los que se han tipificado leucemias en caballos se describen dos casos de leucemias linfocíticas de células B, dos leucemias linfocíticas de linfocitos T CD4⁺ y dos leucemias de origen mielóide (Dascanio y cols., 1992; Buechner-Maxwell y cols., 1994; McClure y cols., 2001).

El gran auge de la oncología como especialidad en medicina veterinaria y el elevado porcentaje de neoplasias hematopoiéticas tanto en la especie canina, felina como en la equina hacen prever un rápido despegue y pronta implantación de la citometría de flujo en el diagnóstico y seguimiento de neoplasias en el campo de la medicina veterinaria (Brown y Wittwer, 2000; Tarrant, 2005).

2.3.3.6.- APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN MEDICINA EQUINA

Gracias a la citometría de flujo se han podido identificar y describir algunas enfermedades asociadas al sistema inmunitario que predisponen al desarrollo de infecciones recurrentes con mala respuesta a los tratamientos convencionales. Estas enfermedades se describen brevemente a continuación:

-El **síndrome de inmunodeficiencia común variable** es un trastorno adquirido, poco común, de caballos adultos, producido por una disminución en la producción

de anticuerpos a consecuencia de una intensa disminución de linfocitos B (Boy y cols., 1992; Flaminio y cols., 2002; Pellegrini-Massini y cols., 2005).

-La **inmunodeficiencia severa combinada** es una enfermedad genética primaria poco común, que afecta a humanos, ratones, caballos y perros, en la que los individuos afectados son incapaces de generar una respuesta inmunitaria de tipo humoral en grado suficiente para protegerse de enfermedades infecciosas, existiendo defectos en los linfocitos B y T (Perryman, 2000; 2004). En caballos se limita a individuos de raza árabe y se hereda como un rasgo autosómico recesivo y suele ir acompañado de una linfopenia B (Perryman y Torbeck 1980; Perryman, 2000). En medicina humana esta afección se considera como la más grave de las inmunodeficiencias primarias (Spickett y cols., 1991). Este síndrome se ha descrito también en 3 razas de perros: Basset Hound (herencia ligada al sexo), Cardigan Welsh Corgi, y Jack Russell Terriers (herencia recesiva autosómica) (Perryman, 2004).

-Por su parte, en la **agammaglobulinemia ligada al sexo** se produce una ausencia casi total de linfocitos B maduros y células plasmáticas, además de sufrir una hipogammaglobulinemia (Pellegrini-Massini y cols., 2005), mientras que los linfocitos T permanecen intactos (McGuire y cols., 1976). Se especula que sea un defecto que impide la diferenciación de precursores de linfocitos B en linfocitos B maduros. Se debe sospechar en cualquier caballo sin IgM, IgA, bajos niveles IgG e IgG(T), ausencia de linfocitos B, y número y funciones normales de linfocitos T (McGuire y cols., 1976; Perryman y McGuire, 1978; 1980). El empleo de la citometría de flujo permite revelar la linfopenia de linfocitos B y diagnosticar la enfermedad.

-La citometría de flujo ha sido decisiva para el diagnóstico y caracterización de otra interesante enfermedad en équidos, **el síndrome de Pony Fell**, caracterizada por anemia, inmunodeficiencia y ganglionopatía (Gardner y cols., 2006). El síndrome de Pony Fell es una enfermedad hereditaria de carácter autosómico recesivo recientemente descrita (Scholes y cols., 1998) en la que la inmunodeficiencia se produce por hipoglobulinemia y linfopenia B, que coexiste con un moderado incremento de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Thomas y cols. 2005). Para diagnosticar esta enfermedad es necesario identificar que la linfopenia sea debida a los linfocitos B (Gardner y cols., 2006) y para ello es imprescindible el empleo de la citometría de flujo.

2.4.-TIPIFICACIÓN LINFOCITARIA EN EL CABALLO

Las células presentan en su superficie diferentes proteínas que permiten su diferenciación e identificación mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Mabs). Los Mabs son anticuerpos producidos por un solo tipo de célula plasmática, que se unen específicamente a moléculas que presentan carácter antigénico, diferenciando cada célula del organismo.

Estas moléculas de la superficie celular se denominan CD (*“cluster of differentiation”*) y vienen seguidas de un número ordinal que identifica específicamente cada molécula de superficie. En medicina humana existen más de 160 proteínas con CD asignado, mientras que en medicina veterinaria el avance ha sido mucho más lento. Se realizaron dos reuniones científicas con el objetivo de identificar estos CD, una de ellas Cambridge, Reino Unido en 1991, y la otra en California en 1998. En dichas reuniones se acordó seguir una nomenclatura mediante la cual a las moléculas homólogas a las descritas en la especie humana se les denomina con la letra CD y su número específico, precedida de una o dos letras que identifican la especie animal, utilizando las letras “eq” para los équidos.

A continuación se describen brevemente los anticuerpos caracterizados y comercializados para identificar las distintas poblaciones linfocitarias en équidos:

2.4.1.-LINFOCITOS T

2.4.1.1.-LINFOCITOS T CD2

En CD2 es una molécula expresada por los linfocitos T, y concretamente en équidos, también por los linfocitos NK (Kydd y cols., 1994). Colaboran en el reconocimiento y adhesión entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno, a la que se une a través de sus ligandos, que son las moléculas CD58 y CD54 (Lunn y cols., 1998; Regueiro y cols., 2004) y ejercen como moléculas co-estimuladoras de los linfocitos T y NK (Yang y cols., 2001). En otras especies, como roedores, también viene expresada por los linfocitos B (Lunn y cols., 1995).

En caballos, los dos clones de Mab anti EqCD2 más utilizados son el MabHA88A, suministrado por *VRMD Inc. Pullman, WA, EE.UU.* y el MCA 1278, comercializado por *AbD-Serotec Ltd, Oxford, Reino Unido*. Los valores porcentuales de CD2 descritos en caballos adultos se encuentran comprendidos entre un 68% (Da Costa y cols., 2003) y un

87,3% (Pellegrini-Massini y cols., 2005), oscilando las formas absolutas entre 3200 cel/ μ l (Da Costa y cols., 2003) y 4300 cel/ μ l (Ferreira-Dias y cols., 2005).

2.4.1.2.-LINFOCITOS T CD3

La molécula CD3 constituye la parte invariable del complejo receptor antígeno de los linfocitos T (Kydd y cols., 1994; Regueiro y cols., 2004). Actúa como transductor de señales al interior de la célula cuando el complejo TCR se une al antígeno. Los clones descritos anti-CD3 marcarían a la población entera de linfocitos T (Lunn y cols., 1998). Sin embargo, dichos anticuerpos anti-CD3 en équidos no superan el 90% de los linfocitos marcados (Flaminio y cols., 2002; Pellegrini-Massini y cols., 2005). En la literatura no se ha descrito el origen comercial de los Mab antiCD3 utilizados en équidos, aunque existen varios clones de anticuerpos comercializados tanto por *VRMD* y como por *AbD-Serotec*.

2.4.1.3.-LINFOCITOS T CD5

La molécula CD5 es un antígeno presente en los linfocitos T a la que se atribuye un papel inmunorregulador (Kydd y cols., 1994). Su ligando es la proteína de superficie CD72 presente en los linfocitos B y las células presentadoras de antígenos. Sin embargo, en équidos no hay evidencias de que los linfocitos B expresen esta molécula.

El clon utilizado de CD5 es el HB19A, con valores porcentuales de referencia descritos en caballos adultos entre el 83% (McFarlane y cols., 2001), 90% (Davies y cols., 2002) y el 92% (Pellegrini-Massini y cols., 2005). En valores absolutos se han descrito valores medios de 2400 cél/ μ l (McFarlane y cols., 2001).

2.4.1.4.-LINFOCITOS T CD4

El CD4 es una molécula de superficie expresada en todos los mamíferos domésticos por los linfocitos Th, en algunos monocitos y células presentadoras de antígenos. Es el co-receptor específico del complejo TCR de moléculas del CMH de tipo II, amplificando la señal generada por el TCR (Tizard, 2007). Juega un papel fundamental estabilizando la interacción entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T cooperadores (Kydd y cols., 1994).

Los clones utilizados de CD4 son casi exclusivamente el HB61 (*VRMD*) y el MCA 1078 (*Serotec*). Los valores porcentuales de linfocitos CD4⁺ en la literatura en caballos adultos oscilan entre un 42% (Da Costa y cols., 2003) y un 66% (Davies y cols., 2002), fluctuando los valores absolutos entre 1800 cél/μl (McFarlane y cols., 2001) y 3000 cél/μl (Witonsky y cols., 2003).

2.4.1.5.-LINFOCITOS T CD8

El CD8 es una molécula de superficie expresada en todos los mamíferos domésticos por los linfocitos Tc. Al igual que el CD4, actúa como co-receptor específico del complejo TCR, aunque en este caso, es específico del complejo MHC de tipo I, presente en todas las células nucleadas del organismo (Kydd y cols., 1994; Tizard, 2007). Los linfocitos T CD8⁺ se definen como una subpoblación de linfocitos T con funciones citotóxicas mutuamente excluyentes de los linfocitos T CD4⁺ (Lunn y cols., 1991).

Los anticuerpos más utilizados para marcar los linfocitos CD8 son el ETC142 (*VRMD*), el HB14, y el MCA1080 (*Serotec*). En caballos adultos los valores porcentuales fluctúan entre un 16,6% (Davies y cols., 2002) y un 30% (Flaminio y cols. 1998) y las formas absolutas entre 500 céls /μl (McFarlane y cols., 2001) y 1600 céls /μl (Flaminio y cols., 2000).

2.4.2.-LINFOCITOS B

Los linfocitos B son capaces de reconocer antígenos nativos gracias a su receptor de superficie (Regueiro y cols., 2004). En un linfocito maduro el receptor de superficie está constituido por una inmunoglobulina de tipo IgM capaz de unirse a los antígenos nativos a través de los dominios variables y por otras dos inmunoglobulinas invariables encargadas de las señales transmembranas. Una vez que el linfocito B ha participado en una respuesta inmunitaria, el BCR puede estar constituido por otros isotipos de inmunoglobulinas, como por ejemplo IgG. Varios marcadores de linfocitos B se basan en el marcaje de la IgM, como los Mab 1.9/3.2 (Davies y cols., 2002) y el E18A (Kydd y cols., 1994; Koo y cols., 2006).

Existen otros Mabs que reconocen otras proteínas expresadas por los linfocitos B equinos. Uno de ellos es el Mab B29A (Smith III y cols., 2002; Witonsky y cols., 2003) que reconoce un antígeno de superficie de los linfocitos B (Kydd y cols., 1994) marcando la

IgM presente en la superficie de estas células y los marcadores de las moléculas de superficie CD21 (Pellegrini-Massini y cols., 2005) y CD19 (Da Costa y cols., 2003). Estas dos últimas son moléculas accesorias de activación de linfocitos B (Regueiro y cols., 2004; Tizard, 2007).

La diversidad de marcadores de linfocito B pone de manifiesto que la identificación de este tipo celular no está bien definida, debido a que el porcentaje de células reconocidas es muy variable. Este hecho ha provocado que diversos autores recurran a utilizar fórmulas matemáticas para estimar el número y porcentaje de estos linfocitos (Da Costa y cols., 2003; Ferreira-Dias y cols., 2005). Los valores porcentuales descritos en équidos adultos varían entre un 11%, con un marcador de IgM (Davies y cols., 2001, McFarlane y cols., 2001) a un 19,0 %, con un marcador CD21 (Witonsky y cols., 2003), fluctuando los valores absolutos entre 250 (McFarlane y cols., 2001) y 2300 cél/ μ l (Da Costa y cols., 2003; Ferreira-Dias y cols., 2005).

2.5.-EFECTOS DE LA EDAD, RAZA Y SEXO SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

La raza, el sexo y la edad son factores que influyen en las características del sistema inmunitario (Faldyna y cols., 2001; Chng y cols., 2004; Jiang y cols., 2004). Conocer la influencia de estos factores en individuos sanos, es fundamental para interpretar las diferencias asociadas a la respuesta inmunitaria de los individuos ante la enfermedad (Rudy y cols., 2002).

2.5.1.-INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

Desde el nacimiento el sistema inmunitario está sometido a profundas reestructuraciones producto tanto a su reacción frente a la incesante estimulación antigénica del entorno, como la involución tímica que se produce al final de la pubertad y a las consecuencias celulares del propio envejecimiento (Heaton y cols., 2002, a, b). Los cambios sufridos por el sistema inmunitario son similares en todas las especies estudiadas, son continuos a lo largo de la vida y explican la mayor incidencia de enfermedades infecciosas en individuos neonatos y en ancianos (McFarlane y cols., 2001; Globerson y Effros, 2000; Licastro y cols., 2005; Vasto y cols., 2006).

Básicamente, los estudios sobre los cambios acaecidos en el sistema inmunitario a lo largo de la vida del individuo se han centrado en dos periodos: el post-natal y el

envejecimiento (Faldyna y cols., 2001). Las variaciones producidas en estos periodos están ampliamente demostradas en roedores y seres humanos, algo menos en perros y gatos (Thoman y Weigle, 1989; Greely y cols., 1996; Heaton y cols., 2001, a, b). y poco documentadas en caballos (MacFarlane y cols., 2001; Fermaglich y Horohov, 2002)

Al nacimiento, el sistema inmunitario es todavía inmaduro en todas las especies animales (Faldyna y cols., 2001). Esta falta de madurez, implica una mayor susceptibilidad a agentes infecciosos, pero también tiene una función protectora tras el parto. Un sistema inmunitario maduro enfrentado al elevado número de neoantígenos con los que enfrentarse un recién nacido produciría una reacción tan enérgica que pondría en grave riesgo la salud del individuo (Adkins y cols., 2003).

Debido al permanente contacto con neoantígenos en los primeros momentos de vida, los linfocitos T y B experimentan una rápida maduración cuyo resultado es el incremento del número de linfocitos y de inmunoglobulinas (Erkeller-Yuksell y cols., 1992, Flaminio y cols., 1999; De Vries y cols., 2000; Campbell y cols., 2001; Faldyna y cols., 2001; Heaton y cols., 2001, a, b). Durante este tiempo, el incremento numérico de linfocitos B y T describe una trayectoria paralela (Erkeller-Yuksell y cols., 1992; Flaminio y cols., 1999; Faldyna y cols., 2001). En relación a los linfocitos T, el aumento numérico de linfocitos T CD8⁺ es superior al de linfocitos T CD4⁺, lo que conlleva una disminución del cociente CD4/CD8 en las primeras etapas de la vida. La expansión de la población linfocitaria en sangre periférica durante la infancia es el resultado, por un lado, de una intensa producción medular y de la maduración en el timo, y por otro, de la expansión clonal que se produce en los órganos linfoides como consecuencia de la presentación y reconocimiento de antígenos (Flaminio y cols., 2000).

Debido a la intensa y rápida expansión de las subpoblaciones linfocitarias, el número de leucocitos alcanza valores comparables a los de adultos a una edad temprana. El número de linfocitos se estabiliza en la especie humana, a los tres años de edad (Kotylo y cols., 1993) en el gato, aproximadamente al año (Heaton y cols., 2001, a) y en el perro, a los tres meses (Toman y cols., 2002), si bien tardan entre uno y dos años, según la raza, en homologarse totalmente a los valores adultos (Faldyna y cols., 2001)

En la especie equina, el número de linfocitos se incrementa hasta 2.5 veces durante los 3 primeros meses de vida, alcanzando valores comparables a los del adulto a los cuatro meses de edad (Flaminio y cols., 2000; Smith III y cols., 2002; Chaffin y cols., 2004). Como en otras especies, son los linfocitos T CD8⁺ los que experimentan una

mayor proliferación, seguidos de los Linfocitos B (Flaminio y cols., 2000; Smith III y cols., 2002). El número de linfocitos B en caballos de 2-4 meses alcanza valores superiores al de animales adultos, este incremento se acompaña de una mayor cantidad de IgG e IgM, lo que indica la activación de la respuesta inmune humoral (Flaminio y cols., 1998; Smith III y cols., 2002).

Al final de la pubertad, tras el periodo de expansión de las poblaciones linfocitarias iniciado con el nacimiento, se produce la involución del timo. Este proceso marca el comienzo de una serie de cambios que afectan tanto a la inmunidad innata como a la adquirida (Globerson y Effros, 2000; Nikolich-Zugich, 2005). La involución tímica produce una disminución progresiva de la capacidad de producción de linfocitos T maduros en individuos adultos (Cosarizza y cols., 1997; Aspinall y Andrew, 2000), hecho que tendrá gran importancia en la posterior etapa de envejecimiento del sistema inmunitario o *inmunosenescencia* (Rink y cols., 1998; Mund y cols., 2001; Nikolich-Zugich, 2005), término descrito por vez primera por Waldorf en 1969, debido al papel central de los linfocitos T en el reconocimiento y eliminación de patógenos, en la producción de citoquinas, y su colaboración con los linfocitos B),

Al disminuir la producción de linfocitos T vírgenes por el timo, los linfocitos T de memoria, generados como respuesta normal y apropiada a la continua exposición antigénica del individuo (Mund y cols., 2001), serán la población predominante. A partir de este momento, las pérdidas naturales de linfocitos T se repondrán mediante proliferación y expansión clonal de linfocitos T de memoria, (Looney y cols., 1999; Heaton y cols., 2002, a).

Los trabajos de investigación sobre la evolución fisiológica del sistema inmunitario son escasos en el periodo comprendido entre el final de la pubertad y el comienzo de la vejez (Rudy y cols., 2002). En la mayoría de ellos se ha verificado, tanto en la especie humana como en diferentes especies animales, una tendencia a la disminución del número total de leucocitos (Rudy y cols., 2002; Chng y cols., 2004; Jiang y cols., 2004). Aunque los resultados en relación a las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias son contradictorios, en general se describe que la población más estable es la de linfocitos T y en particular la de los linfocitos TCD8⁺, existiendo una tendencia al aumento porcentual de los linfocitos T sobre los B, y a la disminución del cociente CD4/CD8 (Erkeller-Yuksell y cols., 1992; Hulstaert y cols., 1994; Greely y cols., 1996; Campbell y cols. 2001; Heaton y cols., 2001, a, b).

Se han postulado distintas teorías para explicar el predominio de linfocitos T CD8⁺ sobre los CD4⁺. Una de ellas describe que esta diferencia es debida a la mayor antigenicidad de los patógenos intracelulares, reconocidos por los CD8⁺, respecto a los extracelulares, reconocidos por los linfocitos CD4⁺ (Lee y cols., 1996; Effros, 2000; Ouyang y cols., 2004). Otra teoría defiende un cambio funcional de los linfocitos CD4⁺, que con la edad pasarían a comportarse como célula señalizadora para el reconocimiento de antígenos, disminuyendo de esta manera su número (Strong y cols., 2001). Por último el predominio de los linfocitos T CD8⁺ sobre los CD4⁺, sería el resultado de adaptaciones a futuras respuestas y a otros factores como el estrés oxidativo y la nutrición del individuo (Heaton y cols., 2002, a, b).

En un único estudio realizado en la especie equina en la que se comparaban caballos adultos jóvenes y potros de seis meses, se confirmó la disminución del número total de linfocitos en la población adulta y que esa disminución es más acusada en la población de linfocitos B. Sin embargo, y al revés de lo descrito para otras especies, el número de linfocitos T CD8⁺ disminuye de forma significativamente más marcada que el de los linfocitos T CD4⁺ (Flaminio y cols., 1999).

La acumulación de los cambios que se inician en la pubertad acaban produciendo un deterioro de la inmunidad protectora, resultado de una compleja interacción de defectos inmunitarios primarios y mecanismos homeostáticos compensatorios (Nikolich-Zugich, 2005), es decir, el envejecimiento del sistema inmunitario o inmunosenescencia (Waldorf, 1969) La inmunosenescencia es una de las causas más importantes del envejecimiento del organismo en su conjunto (Globerson y Effros, 2001; Iglesias, 2003) con influencia en la esperanza de vida, morbilidad y mortalidad (Miller, 1996; Cosarizza y cols., 1997, McFarlane y cols., 2001, Heaton y cols., 2002, a, b).

Se ha observado que a lo largo de la inmunosenescencia se prolongan los cambios que ocurrían en la madurez, continuando la disminución del número total de linfocitos. En la mayoría de los estudios, las poblaciones linfocitarias principalmente afectadas son los linfocitos B y los linfocitos T CD4⁺ (Tollerud y cols., 1989; 1991; Mund y cols., 2001, Heaton y cols., 2002, a, b). La reducción porcentual de CD4⁺ tendría consecuencia sobre sus dos subgrupos funcionales, Th1 y Th2. La disminución en la población de linfocitos CD4⁺ Th1 reduciría la capacidad de los macrófagos para combatir infecciones bacterianas, y la reducción de los linfocitos Th2, afectaría a la respuesta humoral, al repercutir sobre la funcionalidad de los linfocitos B (Mansharamani y cols., 2000).

En la especie humana, los linfocitos NK se comportan de manera distinta al resto de linfocitos, aumentando en número en individuos de edad avanzada. Este aumento podría ser compensatorio a la pérdida de linfocitos T y B (Sansoni y cols., 1993).

En la especie equina, estudios realizados en caballos de más de veinte años, constatan una disminución del número de linfocitos en todas las subpoblaciones linfocitarias. Sin embargo, al contrario de lo observado en otras especies animales, la población más afectada es la de los linfocitos T CD8⁺, produciendo un aumento del cociente CD4/CD8 (Guirnalda y cols., 2001; McFarlane y cols., 2001).

A cambios cuantitativos descritos, se producen alteraciones cualitativas asociadas a la edad en todas las líneas linfocitarias (Horohov, 2000; Globerson y Effros, 2000; Fermaglich y Horohov, 2002). En individuos longevos está demostrado un mayor grado de apoptosis celular y una menor respuesta a la activación y a las señales de proliferación linfocitaria, con repercusiones directas sobre la función inmune (Miller, 1996; Rink y cols., 1998; Ginaldi y cols., 2000; Heaton y cols., 2001, a, b; McFarlane y cols., 2001).

En los linfocitos B se observa una menor producción de anticuerpos que además sufren una pérdida de afinidad por los antígenos, especialmente en caso de neoantígenos, lo que explica la menor eficacia vacunal observada en individuos geriátricos (Remarque, 1999; Fermaglich y Horohov, 2002; Iglesias, 2003; Goto y cols., 1993; Horohov y cols., 1999).

En la población de Linfocitos T, la funcionalidad de los linfocitos Th1 parece afectarse más que la de los linfocitos Th2, lo que podría influir en la aparición de una respuesta inmunológica de tipo humoral en individuos longevos, aunque menos efectiva que en individuos jóvenes (Albright y Albright, 1994; Bernstein y cols., 1999; Lio y cols., 2000; Fermaglich y Horohov, 2002).

Uno de los cambios cualitativos más llamativos es la aparición de múltiples expansiones clonales de linfocitos T, especialmente de los CD8⁺ (Globerson y Effros, 2000). En seres humanos geriátricos gran parte de los linfocitos T representan expansiones de un número reducido de clones, resultado de previas infecciones víricas crónicas (Ku y cols., 1997; Kyle y Rajkumar, 1999; Ouyang y cols., 2004; Nikolich-Zugich, 2005). Además, la intensa proliferación de estos clones de linfocitos T de memoria, origina mutaciones en muchas de estas líneas celulares, disminuyendo su funcionalidad (Nikolich-Zugich, 2005).

La inmunidad innata sufre pocos cambios a lo largo de la vida del individuo (Heaton y cols., 2002, a, b), e incluso podría encontrarse potenciada en individuos ancianos para compensar el declive de la inmunidad adquirida (Lesourd y Mazari, 1999).

Parece ser que los macrófagos son las células que más se alteran con la edad, consecuencia de una menor producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T. Una menor actividad macrofágica reduciría, a su vez, la producción de citoquinas, y con ello la respuesta proliferativa de los propios linfocitos T (Pawelec, 1999; Lloberas y Celada, 2002).

Entre los cambios observados en la inmunidad innata en humanos se citan, menor capacidad fagocítica, mayor apoptosis de neutrófilos (Fulop y cols., 1997; Ginaldi y cols., 2000) y menor funcionalidad de los linfocitos NK, que se compensaría por el incremento numérico ya descrito (Miller, 1996; Pawelec, 1999).

En roedores se ha observado que tanto la actividad neutrofílica como la de los macrófagos pulmonares no se alteran con la edad (Widde y cols., 1989).

En medicina equina, son escasos los estudios realizados hasta la fecha y en relación a la función de los linfocitos NK y al número de monocitos y granulocitos circulantes, parece ser que la edad tiene escasa influencia sobre la inmunidad innata. (Horohov y cols., 1999; Campbell y cols., 2001; Guirnalda y cols., 2001). La caracterización de cambios etarios en las subpoblaciones linfocitarias en esta especie resulta conflictiva, existiendo numerosos estudios con resultados contradictorios (Miller, 1996; McFarlane y cols., 2001, Chng y cols., 2004).

2.5.2.-INFLUENCIA DEL SEXO EN EL SISTEMA INMUNITARIO

El sexo influye notablemente en el sistema inmunitario (Lamason y cols., 2006), siendo, tras la edad, el factor que más modifica la composición de las diferentes subpoblaciones linfocitarias (Rudy y cols., 2002). En general, las hembras de todas las especies animales disfrutan de un sistema inmunitario más potente (Klein, 2000; 2004), por lo que son más resistentes a la mayoría de infecciones por bacterias, virus, hongos y parásitos aunque, y sin embargo más susceptibles a padecer enfermedades autoinmunes que los machos (Faldyna y cols., 2001; Wizemann y Pardue, 2001; Klein, 2004).

La existencia de un sistema inmunitario más eficaz en hembras parece estar relacionado con una inmunidad adquirida más potente (Klein, 2004). Sin embargo a nivel

de la inmunidad innata, un estudio reciente en ratones post-puberales demostró la existencia de una mayor expresión de los genes involucrados en la inmunidad innata en ratones machos que en hembras, lo que explicaría la mayor resistencia de los machos a determinados parásitos, como el *Toxoplasma gondii* (Lamason y cols., 2006).

La existencia de receptores de esteroides sexuales en órganos y células del sistema inmunitario, (timo, linfocitos T, linfocitos NK y células dendríticas, entre otros) (Da Costa y cols., 2003; Mao y cols., 2005; Nakaya y cols., 2006) ilustra la íntima conexión entre los sistemas inmunitario y endocrino (Klein, 2004).

Los andrógenos actúan como inmunosupresores con propiedades antiinflamatorias que disminuyen la síntesis de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral, e incrementan la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 (D'Agostino y cols., 1999). Los andrógenos participan activamente en la involución tímica, ejercen acción supresora sobre los linfocitos T al reducir la producción de IL-7 (Roden y cols., 2004; Heng y cols., 2005), y favorecen la elevación del número de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺, colaborando en el equilibrio entre autoinmunidad e inmunidad protectora (Kendall y cols., 1990). La mayor parte de estos efectos se frenan mediante la castración, quirúrgica o química, habiéndose observado una mayor resistencia a infecciones en ratones machos gonadectomizados respecto a machos íntegros (Klein, 2004; Page y cols., 2006)

Los estrógenos, por su parte, tienen propiedades estimulantes sobre el sistema inmunitario, aumentando la supervivencia y activación de linfocitos B autorreactivos, debido a una pérdida de selección negativa de los linfocitos B (Peeva y cols., 2005; Grimaldi y cols., 2007), favorecen la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1, la IL-10 y el interferón- α (Klein, 2004), aumentan la producción de inmunoglobulinas tras un estímulo antigénico (Schuurs y Verheul, 1990), incrementan la respuesta proliferativa de los linfocitos T al estimular la producción de IFN- γ por los linfocitos CD4⁺ (Klein, 2004; Gourdy y cols., 2005) y, al menos en ratones, hacen crecer el número y la actividad de los linfocitos NK (Souza y cols., 2001)

La acción estimulante de los estrógenos es la causa de la estimulación del sistema inmunitario que se produce en la mujer inicio de la pubertad. La influencia estrogénica junto con cambios en la adhesividad bacteriana a las mucosas explicarían la predisposición a infecciones uterinas en determinadas fases del ciclo estral observadas en yeguas, vacas, perras y ratas (Morell, 1995; Da Costa y cols., 2003).

La progesterona, sin embargo, tiene una función inmunosupresora, inhibe mecanismos fagocitarios de los macrófagos, reduce la producción de anticuerpos y favorece la respuesta inmune de tipo humoral (Klein, 2004). Según algunos autores, la finalidad principal de las hormonas sexuales femeninas y la progesterona en particular, sería controlar la reproducción, suprimiendo parcialmente el sistema inmunitario durante la gestación, con el fin de aceptar a un feto que es semialogénico (Mund y cols., 2001). Se han encontrado receptores de progesterona en células epiteliales, macrófagos y linfocitos, con efectos sobre la inmunidad innata y adquirida (Klein, 2004).

En relación a las poblaciones linfocitarias parecen existir diferencias cuantitativas entre géneros (Rudy y cols., 2002; Chng y cols., 2004) describiéndose un mayor número de linfocitos T, linfocitos B y linfocitos T CD4⁺ en hembras que en machos (Tollerud y cols., 1989; 1991; Reichert y cols., 1994; Hoffmann-Fezer y cols., 1992; Lee y cols., 1996; Greely y cols., 1996, Faldyna y cols., 2001; Mund y cols., 2001; Rudy y cols., 2002). No se han descrito diferencias en el recuento de linfocitos T CD8⁺ ligadas al sexo (Jiang y cols., 2004), mientras que el recuento de linfocitos NK suele ser más numeroso en machos que en hembras (Lee y cols., 1996; Mund y cols., 2001; Rudy y cols., 2002; Chng y cols., 2004). Sin embargo, otros estudios no han mostrado diferencias significativas entre machos y hembras (Jiang y cols., 2004; Chng y cols., 2004).

2.5.3.-INFLUENCIA DE LA RAZA SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

La influencia de la raza sobre el sistema inmunitario ha sido poco estudiada, si bien en medicina humana están descritas diferencias étnicas en la susceptibilidad a determinadas enfermedades infecciosas (Doherty y cols., 1995), en la incidencia de enfermedades autoinmunes (Tench e Isenberg, 2000), en el rechazo a trasplantes de riñón (Meier-Kriesche y cols., 2000) y en la respuesta del sistema inmune a determinados agentes ambientales (Tollerud y cols., 1991). Se han observado también diferencias cuantitativas entre las subpoblaciones linfocitarias de individuos de origen caucásico, árabe, y oriental (Rudy y cols., 2002; Al Qouzi y cols., 2002; Chng y cols., 2004).

En medicina veterinaria no existen estudios semejantes, si bien, la predisposición de determinadas razas al desarrollo de enfermedades de base inmunológica indica que el funcionamiento del sistema inmunitario es propio de cada raza (Faldyna y cols. 2001).

3.-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.-PLAN DE TRABAJO

Ante los objetivos planteados en la introducción de este estudio se propuso el siguiente plan de trabajo:

- Selección de ganaderías de caballos de Pura Raza Española en la Comunidad Valenciana y Murcia con planes sanitarios y condiciones de manejo y nutricionales idóneos.
- Selección de los individuos y distribución en cuatro grupos de edad divididos equitativamente en machos y hembras.
- Organización de un plan de trabajo que permitiese la realización de las extracciones de sangre a los animales y su procesamiento en un plazo no superior a 6 horas.
- Estudio comparativo de datos hematológicos y de la distribución de las poblaciones linfocitarias en los diferentes grupos de edad y sexo establecidos.
- Estudio analítico de los datos hematológicos y de las poblaciones linfocitarias en los diferentes grupos de edad.

3.2.-SELECCIÓN DE LOS ANIMALES

Todos los animales incluidos en este estudio procedían de yegadas de Pura Raza Española localizadas en la Comunidad Valenciana y Murcia. Para participar en este estudio las ganaderías debían disponer de un plan sanitario anual para prevención de enfermedades infecciosas y parasitarias y de planes nutricionales ajustados a la edad y actividad de cada animal que garantizaran un estado de nutrición óptima de todos los individuos incluidos en el estudio.

Se contó con la colaboración de las siguientes yegadas bajo consentimiento informado de los responsables D. José Luis Paradís, D. Fernando Navarro Casas, D. José Muñoz Fernández, D. José Luis Lérida, D. Francisco Ballester, D. Vicente Andrés, Hermanos Esteban, Hermanos Martí, Tarazón, Dimosa, Herrera, Picassent, la Mariposa,

San Antonio, El Cortijo, Lo Perdiguero, Tres estrellas y Clínica Veterinaria Equina La Bonanza.

Los criterios de inclusión de animales para el estudio fueron:

- Caballos Pura Raza Española (PRE)
- Edad comprendida entre 1 y 7 años.
- Ausencia de signos clínicos de enfermedad tras ser sometidos a una exhaustiva exploración física general.
- Estar al corriente de vacunaciones y desparasitaciones.
- Ausencia en el historial clínico de enfermedad reciente.
- No estar recibiendo ni haber recibido medicación en los tres meses previos a la extracción sanguínea.

La distribución definitiva de los 159 animales por grupos de edad y sexo queda reflejada en la siguiente tabla:

GRUPOS DE EDAD	EDAD	N	Sexo
A	1-2 años	39	21 M / 18 H
B	2-3 años	38	16 M / 22 H
C	3-4 años	41	19 M / 22 H
D	4-7 años	41	21 M / 20 H

Tabla 3.- Distribución de los 159 animales Pura Raza Española en grupos de edad y sexo (M: machos; H: hembras).

3.3.-OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS

La colección de sangre se efectuó mediante punción en la vena yugular externa, previa asepsia del área interesada, utilizando jeringas desechables con cono luer (*Discardit II®*, *Becton Dickinson*) de 20 ml y agujas de 25 mm de longitud y de calibre 20G (*Sterican®*, *Braun Melsungen AG*).

Para minimizar las variaciones asociadas al momento del día, la toma de muestra se realizó siempre durante la mañana, entre las 9:00 y las 13:00 horas.

Inmediatamente tras de la extracción de sangre, se procedió a la realización de los frotis sanguíneos, utilizando para ello dos portaobjetos esmerilados (*Knittel Glaser®*, Alemania), y a su posterior fijación para la preservación hasta el momento de la tinción.

Se extrajeron un total de 12 ml de sangre a cada uno de los animales. Para las determinaciones hematológicas y la caracterización del inmunofenotipado se utilizaron dos tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*Tapval®*) como anticoagulante. El resto de la sangre se almacenó en tubos con heparina-litio (*Tapval®*) como anticoagulante para la determinación de las proteínas plasmáticas totales.

Las muestras sanguíneas se transportaron a temperatura ambiente y llegaron al laboratorio antes de 3 horas. Todas las determinaciones cuantitativas se llevaron a cabo dentro de las 4-6 horas posteriores a la recogida.

Las muestras heparinizadas se centrifugaron en el laboratorio a 3500 rpm durante 10 min, se separó el plasma y se congeló a -20° C hasta su posterior procesamiento.

Las determinaciones hematológicas y bioquímicas se realizaron en el laboratorio del Hospital Clínico de Referencia de la Universidad CEU Cardenal Herrera y los análisis mediante citometría de flujo en el Servicio de Citometría de Flujo del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

3.4.-ANÁLISIS LABORATORIAL

3.4.1.-HEMATOLOGÍA

Las determinaciones analíticas hematológicas se realizaron mediante un contador celular semiautomático (*Sysmex-F 820*), con el que se estimaron los siguientes parámetros:

- Recuento de glóbulos rojos (GR)
- Concentración de hemoglobina (HB)
- Valor hematócrito (HTO)
- Volumen corpuscular medio (VCM)

- Hemoglobina corpuscular media (HCM)
- Concentración hemoglobínica corpuscular media (CHCM)
- Recuento total de glóbulos blancos (GB)
- Recuento total de plaquetas (PLAQ)

El recuento diferencial de glóbulos blancos (linfocitos, neutrófilos en banda, neutrófilos segmentados, eosinófilos, monocitos y basófilos), así como el estudio de la morfología de los elementos formes de la sangre, se realizó sobre las extensiones sanguíneas utilizando el método panóptico rápido Diff Quick (*Gailand Chemical Co, Flintshire, UK*). Una vez teñido el frotis, se procedió a su estudio microscópico a 1000 X. Para el recuento diferencial se contaron un total de 200 células.

Una vez realizado el recuento diferencial, el número absoluto se calculó en función del número de leucocitos totales determinado mediante citometría de flujo.

3.4.2.-BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

El procesamiento de las proteínas plasmáticas se realizó una vez terminada todo el trabajo de campo, se descongelaron todas las muestras guardadas el mismo día y se procedió a la valoración de las proteínas plasmáticas totales mediante espectrofotometría en el que se empleó un espectrofotómetro *Clima M5-15, RAL* con reactivos pertenecientes a *RAL (RAL técnica para el laboratorio; Sant Joan Despí, Barcelona, España)*.

3.4.3.-CITOMETRÍA DE FLUJO

Las muestras sanguíneas fueron analizadas en un citómetro de flujo tipo *EPICS XL-MCL* con cargador automático de muestras.

Los parámetros del análisis incluyeron:

-Dispersión frontal de luz láser (FS): proporcional tamaño de la partícula analizada. Esta señal fue recogida y amplificada por un fotodetector dotado de un filtro de densidad neutra (NDI).

-Dispersión lateral de luz láser (SS): proporcional a la granularidad o complejidad de la partícula analizada. Esta señal fue recogida y amplificada en dirección perpendicular al haz de luz mediante un fotomultiplicador provisto de dos filtros: *488DC + 488BP*.

-Fluorescencia verde: proporcional a los antígenos revelados con un anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína o a la fluorescencia inespecífica de un isotipo adecuado. Esta señal era recogida y amplificada en modo logarítmico mediante un fotomultiplicador provisto de los filtros *550DC + 525 BP*.

-Fluorescencia amarilla-anaranjada: proporcional a los antígenos revelados con un anticuerpo monoclonal conjugado con ficoeritrina o a la fluorescencia inespecífica de un isotipo adecuado. Esta señal fue recogida y amplificada en modo logarítmico mediante un fotomultiplicador provisto de los filtros *574DC + 550BP*.

Las señales de dispersión luminosa y de intensidad de fluorescencia fueron calibradas diariamente en los fotomultiplicadores logarítmicos, utilizando microesferas (*Flow-check Beckman-Coulter, Hialeah, FL, USA*).

Los datos fueron adquiridos en forma de histograma (mono y biparamétrico) y en modo lista. La adquisición de datos en este modo nos permitió el análisis posterior de los datos utilizando el software *System II® (Bekman-Coulter, Hialeah, FL; USA)*, con el cual fue posible recombinar los parámetros obtenidos y redefinir diferentes regiones en la selección.

Mediante el ordenador del citómetro (*Program System II v 3.0*) se definió un protocolo de adquisición de datos que incluyeron los siguientes histogramas:

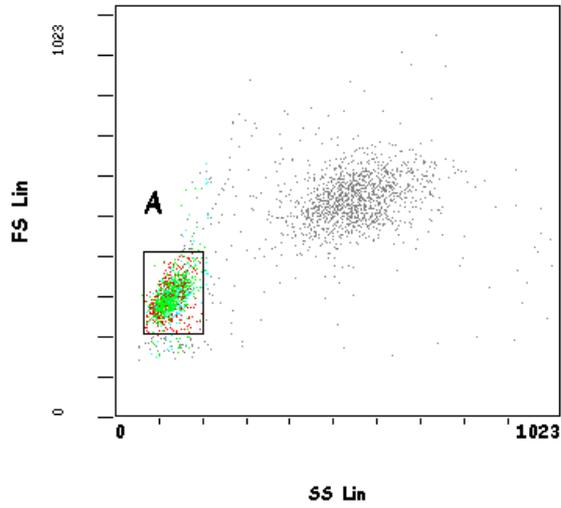
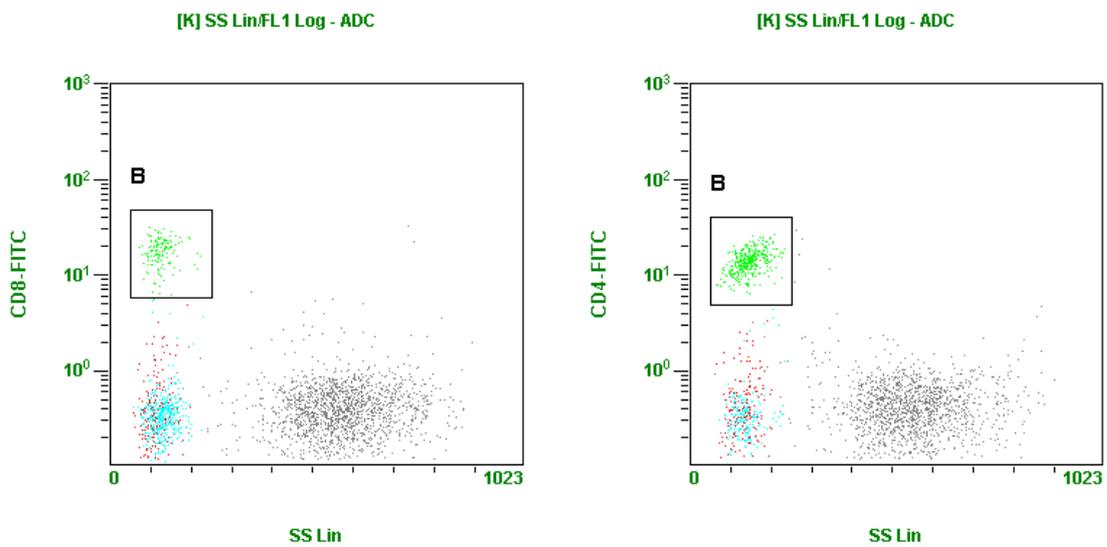


Figura 6.- Histograma biparamétrico de FS frente a SS con acotamiento de la ventana de linfocitos



Figuras 7 y 8.- Histogramas biparamétricos de SS frente a CD4 y CD8 que muestran como las células positivas a CD4 y CD8 se corresponden morfológicamente con linfocitos.

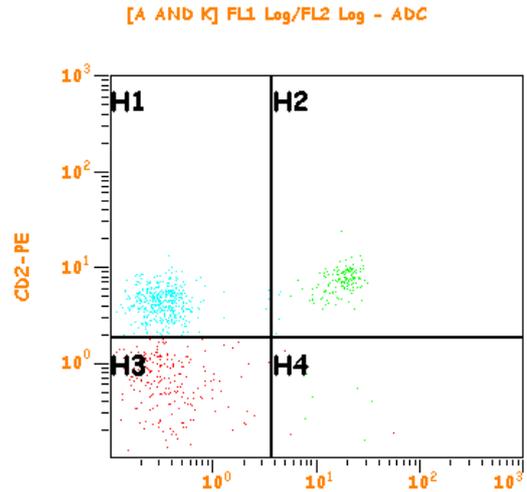


Figura 9.- Histograma biparamétrico de CD2 frente a CD8 que incluye únicamente las células acotadas en la región de linfocitos

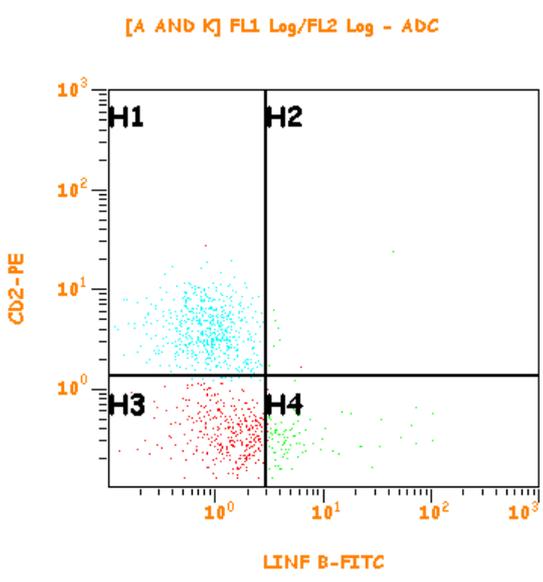


Figura 10.- Histograma biparamétrico de CD2 frente a linfocitos B que incluye únicamente las células acotadas en la región de linfocitos

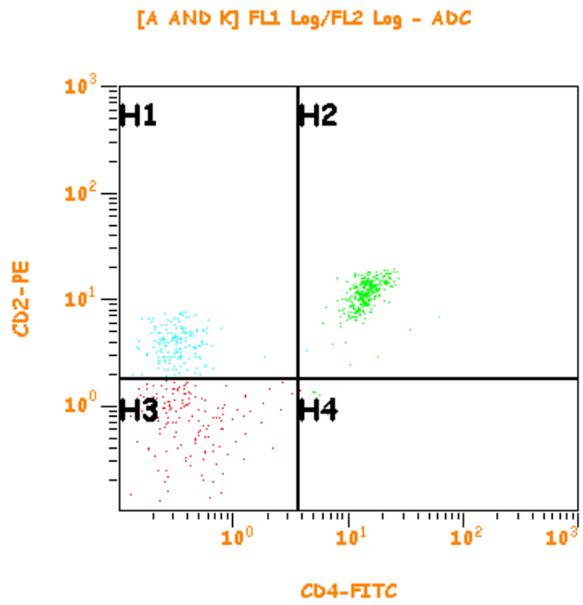


Figura 11.- Histograma biparamétrico CD2 frente a CD4 que incluye únicamente las células acotadas en la región de linfocitos.

La adquisición mínima fue de 10.000 eventos sobre el histograma de leucocitos, utilizando los distintos anticuerpos monoclonales siempre combinados con el anticuerpo monoclonal CD2. Los parámetros citométricos se analizaron a partir de ficheros almacenados en forma de matriz multidimensional (modo lista), que permite reproducir de forma rápida y en tiempo diferido el proceso de análisis así como modificar, en caso necesario, las regiones acotadas inicialmente. La visualización y el análisis de los datos

se realizaron en programas de análisis celulares compatibles con la configuración de los citómetros empleados (*Cytologic XL, Works Station*).

Se realizó una primera clasificación según la dispersión luminosa, la sección donde se disponían los linfocitos se delimitaba para crear unos márgenes de máxima confianza y con los datos de esa ventana se estudiaba la fluorescencia emitida (Loken y cols., 1990).

3.4.3.1.-ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales empleados en este estudio fueron suministrados por VMRD (*VMRD, Inc. Pullman, WA 99163, EE.UU.*). Las especificidades de estos anticuerpos se establecieron por inmunoprecipitación antigénica, inmunohistoquímica realizada en tejidos linfoides y por citometría de flujo realizada en células derivadas de órganos linfoides centrales y periféricos y estudios funcionales de subpoblaciones periféricas de células T definidas por estos anticuerpos (Moore y cols., 1992).

En la siguiente tabla se incluyen los clones concretos de anticuerpos monoclonales empleados, así como su especificidad, isotipos y fluorocromos con los que estaban marcados.

Monoclonal	Especificidad	Clon	Isotipo	Fluorocromo
CD2	Linfocitos T y NK	HB88A	IgG1	FITC
CD4	Linfocitos T auxiliares	HB61A	IgG1	PE
CD8	Linfocitos T citotóxicos	HT14A	IgG1	PE
Linfocitos B	Linfocitos B	E18A	IgG2a	PE

Tabla 4.-Anticuerpos monoclonales empleados en el estudio

Como marcador de linfocitos T y Natural Killer se empleó un anti-CD2 (Weiss 2001, a), de linfocitos B un anti-IgM, y para caracterizar las subpoblaciones de linfocitos T en linfocitos T cooperadores (Th) y linfocitos T citotóxicos (Tc) un anti-CD4 y un anti-CD8, respectivamente.

Posteriormente, se enfrentó el anti-CD2 a cada uno de los anticuerpos monoclonales, por lo que fue necesario marcarlos con dos fluorocromos diferentes. Se empleó un marcaje indirecto con ficoeritrina (PE), utilizando *Zenon® R-Phycoerythrin Mouse IgG (Invitrogen; EE.UU.)* para el anticuerpo anti-CD2. Los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-linfocitos B se conjugaron de manera directa con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en el laboratorio *Immunostep S.L. (Salamanca)*. También fue necesaria una conjugación indirecta para el anticuerpo monoclonal anti-CD2, en la que tuvo que enfrentarse a un segundo anticuerpo (*Zenon® R-Phycoerythrin Mouse IgG (Invitrogen; EE.UU.)*) conjugado con PE, que reconocía al anticuerpo anti-CD2 como antígeno. Como la FITC emite fluorescencia verde y la PE fluorescencia naranja, nos permitió diferenciar un anticuerpo monoclonal de otro cuando se emplearon simultáneamente. De esta manera, se realizaron combinaciones de anticuerpos monoclonales de 2 en 2, estando presente siempre el anti-CD2 de la siguiente forma:

Nº de tubos	Anticuerpo monoclonal
1	CD2/CD4
2	CD2/CD8
3	CD2/ Linfocitos B

De cada muestra sanguínea conservada en EDTA se prepararon tres tubos en los que se combinó:

-100 µl de sangre entera + 2µl CD2-Zenon-PE + 5µl de CD4-FITC

-100 µl de sangre entera + 2µl CD2-Zenon-PE + 5µl de CD8 FITC

-100 µl de sangre entera + 2µl CD2-Zenon-PE + 5µl Linfocitos B (LB)- FITC diluido.

Estos tubos se mezclaron e incubaron durante 30 minutos. Posteriormente, la muestra se introdujo en una estación semiautomática de preparación de muestras,

Sistema EPILS Multi Q-PREP de Coulter®, donde se realizó el lisado eritrocitario, fijado y estabilización de la muestra se sangre entera para destruir los hematíes y trabajar únicamente con leucocitos en suspensión. El líquido de hemólisis empleado fue *OptiLyse C® (Immunotech, Marsella, Francia)*. Finalmente, las muestras se procesaron en el citómetro de flujo.

3.4.3.2.-POBLACIONES LINFOCITARIAS E INMUNOFENOTIPO

A continuación se describen cada una de las poblaciones linfocitarias analizadas y la determinación específica en cada caso:

-La población de linfocitos se determinó y cuantificó por estudio biparámetro FS y SS.

-El recuento de linfocitos CD2⁺ se obtuvo realizando la media de los recuentos de linfocitos CD2⁺ en los tres tubos.

-Los linfocitos T cooperadores corresponden a los linfocitos CD2⁺CD4⁺

-Los linfocitos T citotóxicos estarían representados por los linfocitos CD2⁺CD8⁺

-Los linfocitos T procedían de la suma de linfocitos CD2⁺CD4⁺ y CD2⁺CD8⁺ (Da Costa y cols., 2003; Ferreira-Dias y cols., 2005).

-Los linfocitos B estarían representados por las células CD2⁻LB⁺ en la ventana de linfocitos. Además se decidió aplicar diversas fórmulas matemáticas cuyos resultados se compararía con el número de linfocitos CD2⁻LB⁺ obtenidos, con el fin de validar la más afín:

-Nº total de Linfocitos – Linfocitos CD2⁺ (Da Costa y cols., 2003; Ferreira-Dias y cols., 2005).

-Linfocitos (CD2⁻CD4⁻) - linfocitos (CD2⁻CD8⁺)

-Linfocitos (CD2⁻CD8⁻) - linfocitos (CD2⁻CD4⁺)

-La población de células NK se obtuvo a partir de las siguientes fórmulas:

-(Linfocitos CD2⁺) - (Linfocitos CD2⁺CD4⁺ + Linfocitos CD2⁺CD8⁺)

-(Linfocitos CD2⁺CD8⁻) - (linfocitos CD2⁺CD4⁺)

-(Linfocitos CD2⁺CD4⁻) - (Linfocitos CD2⁺CD8⁺)

Para poder cuantificar en números absolutos cada una de las poblaciones linfocitarias se empleó *Flow-Count Fluorospheres®* de *Beckman Coulter*. Las fluorosferas son partículas de látex fluorescentes que se añaden a una concentración conocida al volumen de sangre a analizar (Stewart y Steinkamp, 1982). De esta manera, se puede calcular el número total de leucocitos, linfocitos, linfocitos CD2⁺, Linfocitos T CD4⁺, Linfocitos T CD8⁺ y linfocitos B mediante la siguiente fórmula (Reinman y cols., 2000):

$$\text{Células por mm}^3 = [(\text{células contadas}) / (\text{fluorosferas contadas})] \times \text{fluorosferas} / \text{mm}^3$$

Como resumen, dentro de la población leucocitaria se han analizado:

-Número absoluto de leucocitos totales.

-Recuento diferencial de leucocitos: neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos, expresados en valores porcentuales y absolutos.

-Recuento diferencial de linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK expresado en valores porcentuales y absolutos.

-Recuento diferencial de linfocitos Th y linfocitos Tc, expresados en valores porcentuales y absolutos en relación al número de linfocitos T.

3.4.4.-ESTUDIO ESTADÍSTICO

El estudio estadístico, así como los gráficos de los datos obtenidos en el presente estudio se realizaron con los programas informáticos SPSS (v. 15.0 para Windows) y Windows Office XL.

Los resultados se clasificaron en función de la edad y el sexo de los animales. Se calcularon los estadísticos básicos, como la media, los valores máximos y mínimos y la desviación estándar (DE). Se comprobó la normalidad en todos los grupos considerados.

En aquellos casos en los que los parámetros no cumplían las condiciones de normalidad, se procedió a la transformación logarítmica para poder ser comparados mediante métodos no paramétricos.

Las comparaciones entre géneros, se realizaron mediante el test t de Student. En los casos en los que los datos no mostraron una distribución normal, se empleó el test comparativo de Mann-Whitney.

Para analizar el efecto de la edad (A, B, C y D) se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, previa transformación logarítmica de los datos, para cumplir las condiciones de normalidad y homocedasticidad mediante el Test de Kolmogorov-Smirnoff. En aquellos casos en los que este análisis mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas, se aplicó seguidamente un test de *Tukey HSD*. Para las variables no distribuidas normalmente, se empleó un test comparativo de Krustal-Wallis. Cuando las diferencias fueron estadísticamente significativas, las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test de Mann-Whitney con ajuste de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

4.-RESULTADOS

Para una mejor exposición de los datos obtenidos en la presente investigación, el apartado de resultados se ha subdividido en los siguientes epígrafes.

4.1.-Establecimiento de los valores hematológicos de referencia en el caballo PRE.

4.1.1.-Valores de referencia del eritrograma, del número de plaquetas y concentración de proteínas plasmáticas en el caballo PRE. En este primer apartado se han considerado de forma conjunta las 159 muestras sanguíneas obtenidas.

4.1.1.1.-Influencia del sexo sobre el eritrograma, número de plaquetas y concentración de proteínas plasmáticas totales.

4.1.1.2.-Influencia de la edad sobre el eritrograma, número de plaquetas y concentración de proteínas plasmáticas totales, estableciendo para ello cuatro grupos de edad.

4.1.1.3.-Influencia del sexo y la edad sobre el eritrograma, número de plaquetas y concentración de proteínas plasmáticas totales.

4.1.2.-Valores de referencia del leucograma en el caballo PRE, considerando al igual que para el eritrograma, las 159 muestras sanguíneas obtenidas.

4.1.2.1.-Influencia del sexo sobre el leucograma.

4.1.2.2.-Influencia de la edad sobre el leucograma.

4.1.2.3.-Influencia del sexo y la edad sobre el leucograma

4.2.-Caracterización de las poblaciones linfocitarias en el caballo PRE. En este segundo apartado se han analizado las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T, linfocitos B y NK, considerando las 159 muestras sanguíneas obtenidas.

4.2.1.-Valores linfocitarios de referencia en el caballo PRE

4.2.1.1.-Influencia del sexo sobre las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.

4.2.1.2.-Influencia de la edad sobre las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.

4.2.1.3.-Influencia del sexo y la edad sobre las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.

4.2.2.-Subpoblaciones linfocitarias (linfocitos Th y linfocitos Tc) y cociente CD4/CD8

4.3.-Correlaciones entre los diversos parámetros hematológicos y linfocitarios en el caballo PRE.

4.1.-ESTABLECIMIENTO DE LOS VALORES HEMATOLÓGICOS DE REFERENCIA EN EL CABALLO PRE

4.1.1.-VALORES DE REFERENCIA DEL ERITROGRAMA, NÚMERO DE PLAQUETAS Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES

En la siguiente tabla se recopilan los estadísticos básicos de las diversas variables hematológicas correspondientes al eritrograma, número de plaquetas y concentración de proteínas plasmáticas totales para el conjunto de la población equina analizada.

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	159	6,00	12,00	8,04	1,36
HB (g/dl)	159	10,30	17,70	13,65	1,71
HTO (%)	159	27,40	56,00	38,85	6,18
VCM (fl)	159	40,60	58,40	48,55	4,18
HCM (pg)	159	12,30	21,60	17,21	2,12
CHCM (g/dl)	159	27,10	43,20	35,39	3,88
PLAQ (10³/μl)	159	71,00	330,00	142,40	74,18
PPT (g/dl)	159	5,60	8,40	7,20	0,77

Tabla 5.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales en los 159 équidos PRE (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

4.1.1.1.-INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE EL ERITROGRAMA, NÚMERO DE PLAQUETAS Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES.

En las tablas 6 y 7 se presentan los estadísticos básicos de las variables eritrocitarias, el número de plaquetas y la concentración de proteínas plasmáticas totales en machos y hembras, de modo respectivo.

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	77	6,00	12,00	8,15	1,33
HB (g/dl)	77	10,60	17,70	13,96	1,75
HTO (%)	77	29,80	56,00	39,20	6,13
VCM (fl)	77	41,60	56,60	47,75	3,20
HCM (pg)	77	12,30	21,20	17,31	1,96
CHCM (g/dl)	77	27,60	43,20	36,26	3,63
PLAQ (10³/μl)	77	78,00	330,00	139,30	53,27
PPT (g/dl)	77	5,60	8,40	7,17	0,78

Tabla 6.-Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales de sexo macho (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	82	6,00	11,00	7,91	1,51
HB (g/dl)	82	10,30	16,80	13,30	1,69
HTO (%)	82	27,40	54,60	38,52	6,91
VCM (fl)	82	40,60	58,40	48,59	3,94
HCM (pg)	82	13,00	21,60	17,14	2,15
CHCM (g/dl)	82	27,10	42,30	35,32	3,76
PLAQ (10³/μl)	82	71,00	330,00	146,60	56,53
PPT (g/dl)	82	5,60	8,40	7,25	0,71

Tabla 7.-Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales de sexo hembra (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

El análisis de variación entre machos y hembras mostró diferencias significativas en la concentración de hemoglobina (Figura 12).

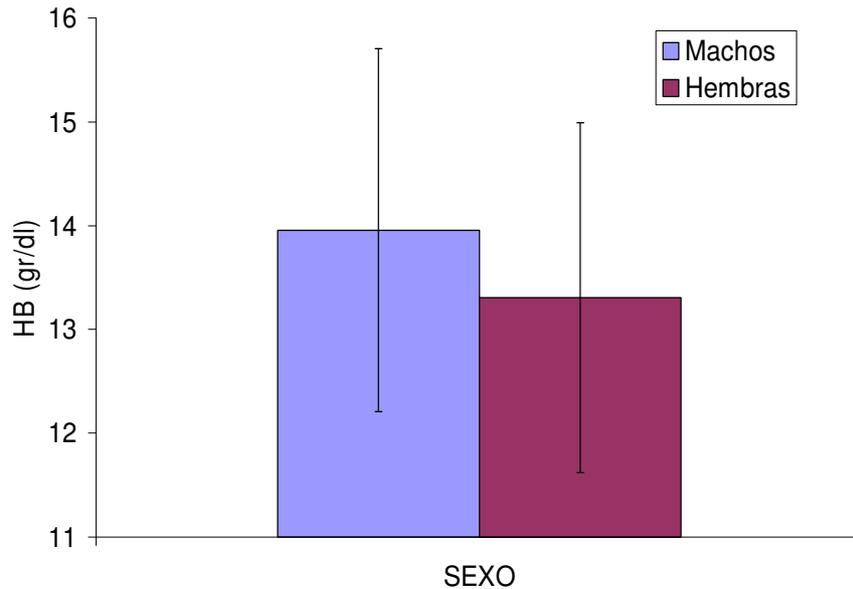


Figura 12.- Diferencias estadísticamente significativas en la concentración de hemoglobina entre machos y hembras, en la totalidad de la población analizada. (t de Student: $p=0,043$).

4.1.1.2.-INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE EL ERITROGRAMA, NÚMERO DE PLAQUETAS Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES.

En las tablas 8, 9, 10 y 11 se exponen los resultados de los estadísticos básicos del eritrograma, del número de plaquetas y de la concentración de proteínas plasmáticas totales correspondiente a cada uno de los grupos de edad (A, B, C y D).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR ($10^6/\mu\text{l}$)	39	6,00	10,00	7,93	1,23
HB (g/dl)	39	10,70	15,90	13,03	1,53
HTO (%)	39	27,90	44,80	36,38	5,36
VCM (fl)	39	41,60	48,70	45,87	1,59
HCM (pg)	39	12,30	18,80	16,56	1,58
CHCM (g/dl)	39	27,60	39,30	34,86	3,04
PLAQ ($10^3/\mu\text{l}$)	39	80,00	296,00	162,50	59,37
PPT (g/dl)	39	5,80	8,40	7,17	0,74

Tabla 8.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales del grupo de edad A (1-2 años) (GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	38	6,00	12,00	8,78	1,62
HB (g/dl)	38	11,10	16,80	14,25	1,78
HTO (%)	38	29,00	56,00	40,54	7,56
VCM (fl)	38	41,10	52,40	46,21	2,30
HCM (pg)	38	13,40	20,00	16,45	1,42
CHCM (g/dl)	38	29,60	41,80	35,85	3,21
PLAQ (10³/μl)	38	85,00	330,00	135,30	42,84
PPT (g/dl)	38	5,60	8,40	7,21	0,83

Tabla 9.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales del grupo de edad B (2-3 años) (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	41	6,00	11,00	8,02	1,52
HB (g/dl)	41	10,60	17,70	13,64	1,88
HTO (%)	41	27,40	54,60	38,35	7,23
VCM (fl)	41	40,60	56,10	48,01	3,76
HCM (pg)	41	13,00	21,60	17,28	2,21
CHCM (g/dl)	41	27,10	42,30	36,22	4,04
PLAQ (10³/μl)	41	72,00	324,00	142,20	59,34
PPT (g/dl)	41	6,00	8,40	7,41	0,72

Tabla 10.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales del grupo de edad C (3-4 años) (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	41	6,00	11,00	7,46	1,19
HB (gr/dl)	41	10,30	16,40	13,33	1,61
HTO (%)	41	28,70	52,40	38,39	1,66
VCM (fl)	41	47,40	58,40	51,53	3,02
HCM (pg)	41	13,20	21,50	18,10	2,32
CHCM (g/dl)	41	27,10	43,20	35,56	4,29
PLAQ (10³/μl)	41	71,00	257,00	127,30	41,76
PPT (gr/dl)	41	5,60	8,40	7,22	0,64

Tabla 11.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales del grupo de edad D (4-7 años) (*GR*: eritrocitos; *HB*: concentración de hemoglobina; *HTO*: valor hematócrito; *VCM*: volumen corpuscular medio; *HCM*: hemoglobina corpuscular media; *CHCM*: concentración hemoglobínica corpuscular media; *PLAQ*: plaquetas; *PPT*: proteínas plasmáticas totales).

El análisis de variación entre los grupos de edad reveló diferencias significativas en el número de glóbulos rojos (Figura 13), VCM (Figura 14), HCM (Figura 15) y número de plaquetas (Figura 16).

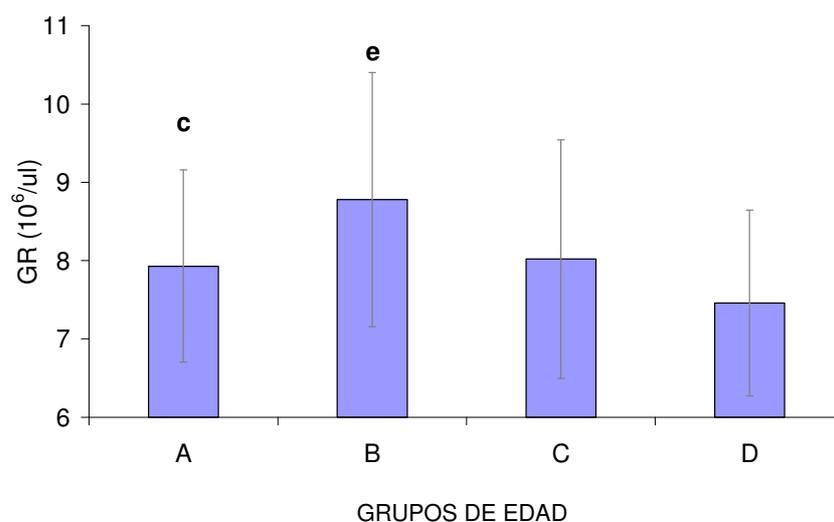


Figura 13.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de glóbulos rojos entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (*c*: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p=0,009$); *e*: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p=0,002$)).

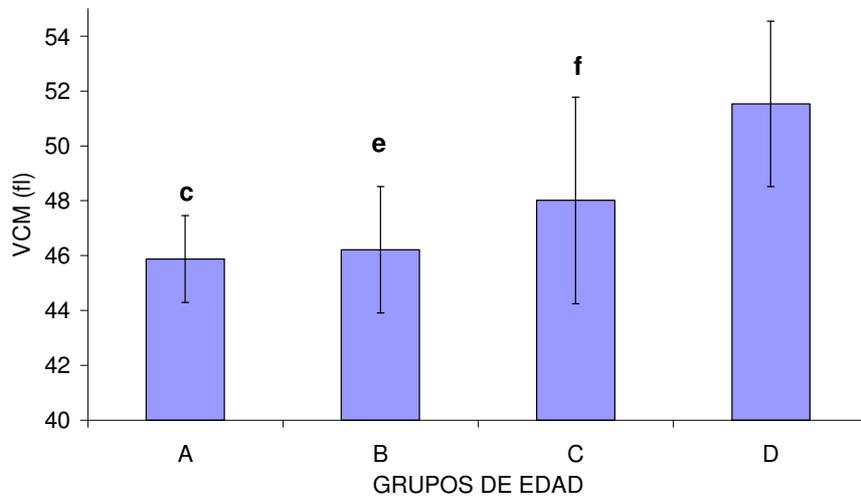


Figura 14.- Diferencias estadísticamente significativas en el VCM entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (c: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p < 0,001$); e: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p < 0,001$); f: diferencias entre los grupos de edad C y D ($p < 0,001$)).

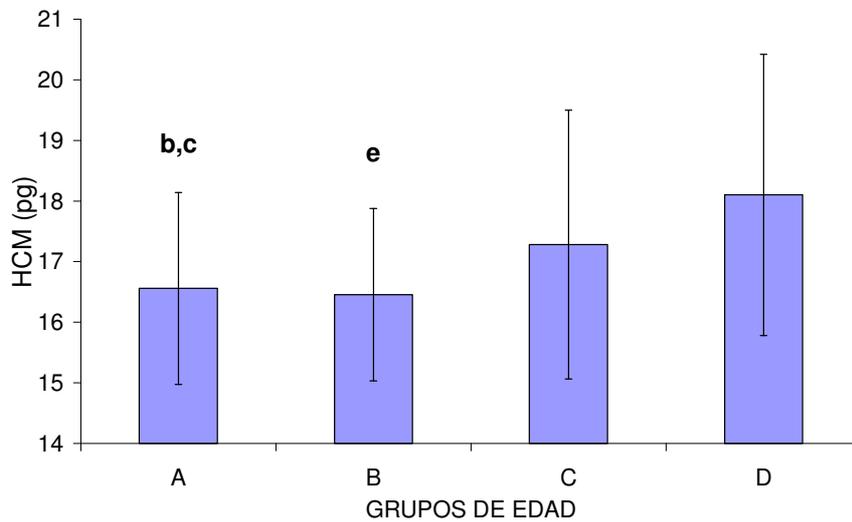


Figura 15.- Diferencias estadísticamente significativas en la HCM entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (b: diferencias entre los grupos de edad A y C ($p = 0,022$); c: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p < 0,001$); e: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p = 0,003$)).

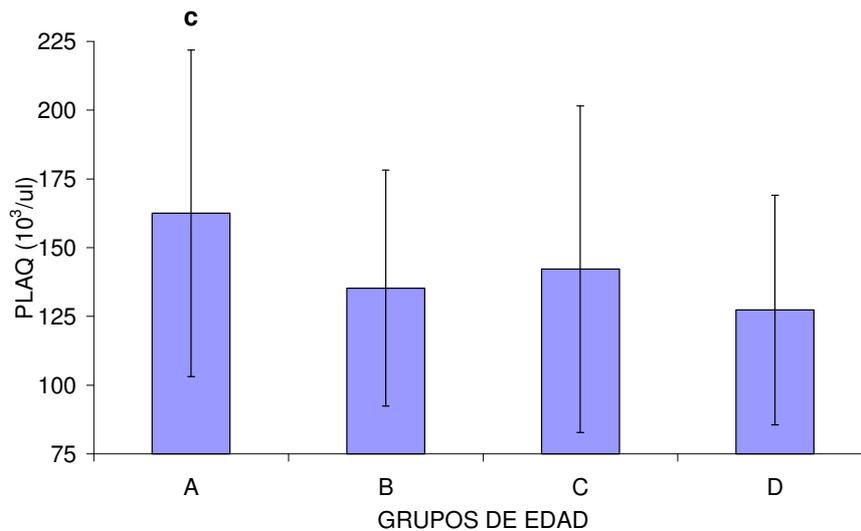


Figura 16.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de plaquetas entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (*c: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p=0,021$)*).

4.1.1.3.-INFLUENCIA DEL SEXO Y LA EDAD SOBRE EL ERITROGRAMA, NÚMERO DE PLAQUETAS Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES.

Los estadísticos básicos del eritrograma, número de plaquetas y concentración de proteínas plasmáticas totales en machos y hembras dentro de cada grupo de edad se detallan en las tablas 12 a la 19.

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	21	7,00	10,00	8,38	1,22
HB (g/dl)	21	10,90	15,90	13,46	1,70
HTO (%)	21	30,00	44,80	36,84	5,90
VCM (fl)	21	41,60	48,70	44,39	3,30
HCM (pg)	21	12,00	19,60	16,23	2,00
CHCM (g/dl)	21	27,00	39,30	34,94	3,26
PLAQ (10³/μl)	21	102,00	296,0	156,40	63,68
PPT (g/dl)	21	5,80	8,20	7,22	0,92

Tabla 12.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los machos del grupo de edad A (1-2 años) (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	18	6,00	10,00	8,25	1,18
HB (g/dl)	18	10,70	15,70	13,23	1,91
HTO (%)	18	27,90	44,60	36,25	5,88
VCM (fl)	18	42,00	47,20	46,37	2,40
HCM (pg)	18	13,30	18,40	16,12	1,55
CHCM (g/dl)	18	30,20	39,10	34,79	2,97
PLAQ (10³/μl)	18	80,00	283,00	167,60	56,72
PPT (g/dl)	18	5,80	8,40	7,16	0,67

Tabla 13.-Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a las hembras del grupo de edad A (1-2 años) (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	16	7,00	12,00	8,66	1,54
HB (g/dl)	16	12,10	16,60	14,17	1,44
HTO (%)	16	32,50	56,00	40,56	7,01
VCM (fl)	16	41,70	52,30	46,93	2,92
HCM (pg)	16	13,40	19,50	16,59	1,77
CHCM (g/dl)	16	29,60	43,00	35,42	3,90
PLAQ (10³/μl)	16	86,00	330,00	152,00	52,76
PPT (g/dl)	16	5,70	8,40	7,05	0,74

Tabla 14.-Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los machos del grupo de edad B (2-3 años) (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	22	6,00	11,00	8,30	1,47
HB (g/dl)	22	11,10	16,80	13,90	1,67
HTO (%)	22	29,00	49,70	38,98	6,94
VCM (fl)	22	41,10	52,40	46,98	2,31
HCM (pg)	22	13,60	20,00	17,00	1,70
CHCM (g/dl)	22	27,00	42,50	36,16	3,87
PLAQ (10³/μl)	22	85,00	321,00	122,90	29,14
PPT (g/dl)	22	5,60	8,40	7,20	0,91

Tabla 15.-Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a las hembras del grupo de edad B (2-3 años) (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	19	6,00	11,00	8,17	1,14
HB (g/dl)	19	10,60	17,70	14,32	1,95
HTO (%)	19	31,40	51,40	38,95	5,21
VCM (fl)	19	42,00	53,40	47,83	2,86
HCM (pg)	19	15,20	19,50	17,59	1,41
CHCM (g/dl)	19	32,80	40,40	36,84	2,59
PLAQ (10³/μl)	19	83,00	203,00	128,80	31,15
PPT (g/dl)	19	6,00	8,40	7,09	0,79

Tabla 16.-Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los machos del grupo de edad C (3-4 años) (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	22	6,00	11,00	7,98	1,56
HB (g/dl)	22	10,70	17,60	13,54	1,82
HTO (%)	22	27,40	54,60	38,58	7,71
VCM (fl)	22	40,60	56,10	48,53	4,00
HCM (pg)	22	13,00	21,60	17,31	2,44
CHCM (g/dl)	22	27,10	42,30	35,70	4,47
PLAQ (10³/μl)	22	72,00	324,00	154,20	75,31
PPT (g/dl)	22	6,20	8,40	7,58	0,66

Tabla 17.-Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a las hembras del grupo de edad C (3-4 años) (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	21	6,00	10,00	7,43	0,97
HB (g/dl)	21	11,30	16,40	13,80	1,31
HTO (%)	21	29,80	46,30	38,71	4,95
VCM (fl)	21	47,40	58,40	52,34	5,15
HCM (pg)	21	14,70	22,50	18,77	2,15
CHCM (g/dl)	21	22,50	43,20	35,26	5,37
PLAQ (10³/μl)	21	71,00	172,00	113,80	32,92
PPT (g/dl)	21	5,60	8,40	7,11	0,80

Tabla 18.-Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los machos del grupo de edad D (3-4 años) (*GR: eritrocitos; HB: concentración de hemoglobina; HTO: valor hematócrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobínica corpuscular media; PLAQ: plaquetas; PPT: proteínas plasmáticas totales*).

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GR (10⁶/μl)	20	6,00	11,00	7,30	1,41
HB (g/dl)	20	10,30	16,00	12,86	1,61
HTO (%)	20	28,70	52,40	38,28	6,14
VCM (fl)	20	47,60	58,40	52,81	3,81
HCM (pg)	20	13,20	21,50	17,95	2,53
CHCM (g/dl)	20	27,10	38,60	33,94	3,69
PLAQ (10³/μl)	20	85,00	257,00	141,70	46,13
PPT (g/dl)	20	5,80	8,20	7,14	0,69

Tabla 19.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a las hembras del grupo de edad D (3-4 años) (*GR*: eritrocitos; *HB*: concentración de hemoglobina; *HTO*: valor hematócrito; *VCM*: volumen corpuscular medio; *HCM*: hemoglobina corpuscular media; *CHCM*: concentración hemoglobínica corpuscular media; *PLAQ*: plaquetas; *PPT*: proteínas plasmáticas totales).

El análisis de variación de los parámetros eritrocitarios entre machos y hembras en cada grupo de edad mostró diferencias significativas en el número de eritrocitos (Figura 17) y en la concentración de hemoglobina (Figura 18) en el grupo de edad B.

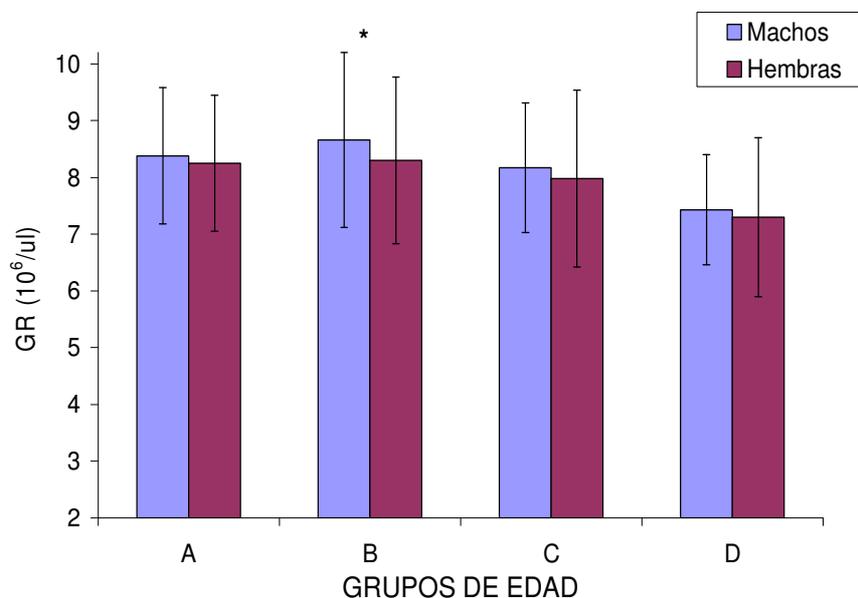


Figura 17.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de eritrocitos entre machos y hembras en cada grupo de edad. T de Student (*: $p=0,047$).

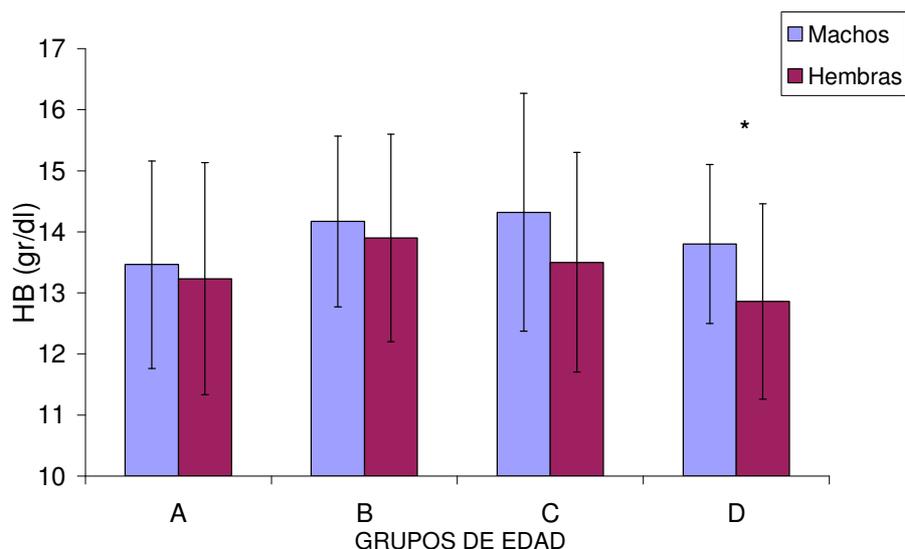


Figura 18.- Diferencias estadísticamente significativas en la concentración de hemoglobina entre machos y hembras en cada grupo de edad. T de Student (*: $p=0,048$).

4.1.2.-VALORES DE REFERENCIA DEL LEUCOGRAMA EN EL CABALLO PRE

En las tablas 20 y 21 se presentan los estadísticos descriptivos de las variables leucocitarias tanto en valores absolutos como porcentuales correspondientes a los 159 animales analizados.

(cél/ul)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	159	5.348,00	17.033,00	9.394,99	2.422,77
LINF	159	1.537,00	7.978,00	4.194,46	1.399,77
NFS	159	1.739,00	8.747,00	4.239,11	1.412,41
NFS SEG	159	1.739,00	7.911,00	4.127,59	1.302,30
NFS BANDA	159	0,00	370,00	48,34	77,12
EOFS	159	0,00	2.033,00	240,68	247,73
MON	159	0,00	892,00	194,29	195,31
BFS	159	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 20.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos correspondientes a los 159 animales (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	159	20,04	64,60	44,77	9,90
NFS	159	21,00	70,00	45,98	10,60
NFS SEG	159	20,00	69,00	45,55	10,14
NFS BANDA	159	0,00	4,00	0,58	0,91
EOFS	159	0,00	12,00	2,40	2,08
MON	159	0,00	10,00	2,05	1,96
BFS	159	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	159	0,28	2,67	1,00	0,45

Tabla 21.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales correspondientes a los 159 animales (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

4.1.2.1.-INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE EL LEUCOGRAMA

Los estadísticos básicos de los parámetros leucocitarios expresados en valores absolutos y porcentuales en machos y hembras en el colectivo animal total analizado se exponen en las tablas 22 a la 25.

(cél/ul)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	77	5.348,00	17.033,00	9.255,58	2.529,48
LINF	77	1.591,70	7.978,21	4.130,96	1.424,21
NFS	77	1.739,00	7.898,00	4.161,67	1.198,24
NFS SEG	77	1.739,25	7.897,53	4.111,34	1.206,16
NFS BANDA	77	0,00	369,76	49,60	69,02
EOFS	77	0,00	955,68	221,84	200,36
MON	77	0,00	796,23	194,19	204,90
BFS	77	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 22.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo macho (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	77	25,27	60,53	44,73	8,59
NFS	77	21,00	68,50	46,22	10,30
NFS SEG	77	20,00	67,50	45,65	10,37
NFS BANDA	77	0,00	3,00	0,61	0,77
EOFS	77	0,00	12,50	2,33	2,08
MON	77	0,00	9,50	2,04	1,81
BFS	77	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	77	0,29	2,58	1,01	0,46

Tabla 23.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo macho (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	82	6.139,00	16.847,00	9.523,21	2.228,58
LINF	82	1.537,10	7.862,94	4.252,33	1.383,67
NFS	82	2.101,00	8.747,00	4.312,47	1.593,61
NFS SEG	82	2.030,58	7.910,84	4.143,41	1.397,60
NFS BANDA	82	0,00	364,72	47,20	84,16
EOFS	82	0,00	2.033,28	257,51	283,60
MON	82	0,00	892,00	194,37	188,28
BFS	82	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 24.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo hembra (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	82	20,04	64,58	44,80	10,98
NFS	82	21,00	70,00	45,76	10,93
NFS SEG	82	20,00	69,00	44,87	10,49
NFS BANDA	82	0,00	4,00	0,55	0,96
EOFS	82	0,00	9,00	2,46	2,09
MON	82	0,00	10,00	2,06	1,91
BFS	82	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	82	0,28	2,67	1,00	0,46

Tabla 25.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo hembra (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

El análisis comparativo entre machos y hembras no mostró diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas y porcentuales de las variables leucocitarias analizadas.

4.1.2.2.-INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE EL LEUCOGRAMA EN EL CABALLO PRE

En las tablas 26 a la 33 se suman los estadísticos básicos de las formas absolutas y porcentuales leucocitarias correspondientes a cada uno de los grupos de edad.

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	39	6.957,00	16.497,00	10.931,85	2.647,11
LINF	39	3.384,00	7.978,00	5.304,09	1.184,57
NFS	39	1.739,00	8.747,00	4.911,11	1.785,21
NFS SEG	39	1.739,00	7.911,00	4.734,58	1.633,23
NFS BANDA	39	0,00	345,00	45,32	77,56
EOFS	39	0,00	1.034,00	236,93	228,10
MON	39	0,00	644,00	179,80	172,85
BFS	39	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 26.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales del grupo de edad A (1-2 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	39	24,32	61,73	47,47	9,63
NFS	39	21,00	70,00	43,97	11,50
NFS SEG	39	20,00	65,00	43,06	10,58
NFS BANDA	39	0,00	3,00	0,67	0,98
EOFS	39	0,00	9,00	1,85	1,74
MON	39	0,00	5,00	1,63	1,48
BFS	39	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	39	0,28	1,86	0,87	0,37

Tabla 27.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales del grupo de edad A (1-2 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/ul)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	38	7.116,00	16.847,00	9.940,95	1.962,20
LINF	38	2.255,00	8.263,00	4.823,38	1.216,65
NFS	38	1.941,00	8.552,00	4.375,06	1.611,60
NFS SEG	38	1.941,00	8.087,00	4.205,88	1.444,13
NFS BANDA	38	0,00	370,00	54,14	78,74
EOFS	38	0,00	757,00	256,41	195,10
MON	38	0,00	796,00	230,89	211,36
BFS	38	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 28.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales del grupo de edad B (2-3 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	38	26,36	60,88	47,83	8,42
NFS	38	24,00	68,00	43,75	11,09
NFS SEG	38	24,00	67,00	43,89	10,45
NFS BANDA	38	0,00	4,00	0,50	0,76
EOFS	38	0,00	8,00	2,63	2,09
MON	38	0,00	9,00	2,35	2,16
BFS	38	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	38	0,30	2,43	0,91	0,49

Tabla 29.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales del grupo de edad B (2-3 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	41	5.760,00	17.033,00	8.835,42	2.351,24
LINF	41	1.971,00	7.863,00	3.794,32	1.277,54
NFS	41	2.300,00	14.648,00	4.299,68	2.153,13
NFS SEG	41	2.300,00	7.087,00	3.840,70	1.045,37
NFS BANDA	41	0,00	225,00	50,58	73,03
EOFS	41	0,00	2.033,00	260,46	349,30
MON	41	0,00	773,00	183,80	188,00
BFS	41	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 30.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales del grupo de edad C (3-4 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	41	24,37	64,58	44,82	9,56
NFS	41	30,00	63,00	45,63	8,97
NFS SEG	41	28,00	63,00	45,00	9,06
NFS BANDA	41	0,00	3,00	0,61	0,92
EOFS	41	0,00	12,00	2,68	2,59
MON	41	0,00	9,00	2,05	1,97
BFS	41	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	41	0,46	2,67	1,06	0,49

Tabla 31.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales del grupo de edad C (3-4 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/ μ l)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	41	5.348,00	12.720,00	8.224,71	1.900,04
LINF	41	1.537,10	5.751,81	3.117,90	950,41
NFS	41	2.006,00	6.547,00	4.040,15	1.188,00
NFS SEG	41	2.006,00	6.547,00	3.995,82	1.168,44
NFS BANDA	41	0,00	364,72	43,21	81,51
EOFS	41	0,00	890,40	209,91	184,68
MON	41	0,00	892,00	184,27	209,12
BFS	41	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 32.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales del grupo de edad D (4-7 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	41	20,04	62,08	39,29	9,75
NFS	41	26,00	69,00	50,07	9,88
NFS SEG	41	26,00	69,00	49,54	9,61
NFS BANDA	41	0,00	4,00	0,54	0,98
EOFS	41	0,00	7,00	2,44	1,76
MON	41	0,00	10,00	2,17	2,16
BFS	41	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	41	0,41	2,67	1,14	0,64

Tabla 33.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales del grupo de edad D (4-7 años) (*GB*: leucocitos totales; *LINF*: linfocitos; *NFS*: neutrófilos; *NFS SEG*: neutrófilos segmentados; *NFS BANDA*: neutrófilos en banda; *EOFS*: eosinófilos; *MON*: monocitos; *BFS*: basófilos).

Respecto a la edad, el análisis de variación mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de leucocitos (Figura 19), en las formas porcentuales y absolutas de linfocitos (Figura 20 y Figura 21) y neutrófilos (Figura 22 y Figura 23) y cociente N/L (Figura 24).

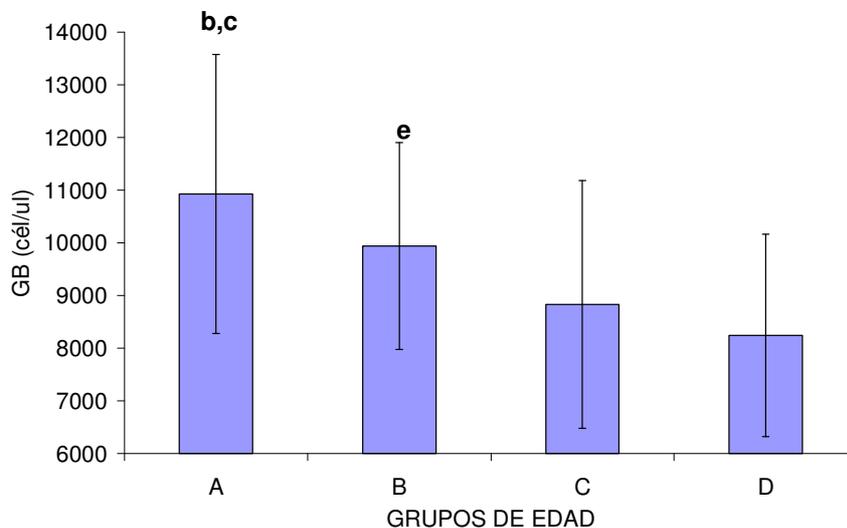


Figura 19.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de leucocitos totales entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (*b*: diferencias significativas entre los grupos de edad A y C ($p=0,001$); *c*: diferencias significativas entre los grupos de edad A y D ($p<0,001$); *e*: diferencias significativas entre los grupos de edad B y D ($p=0,006$)).

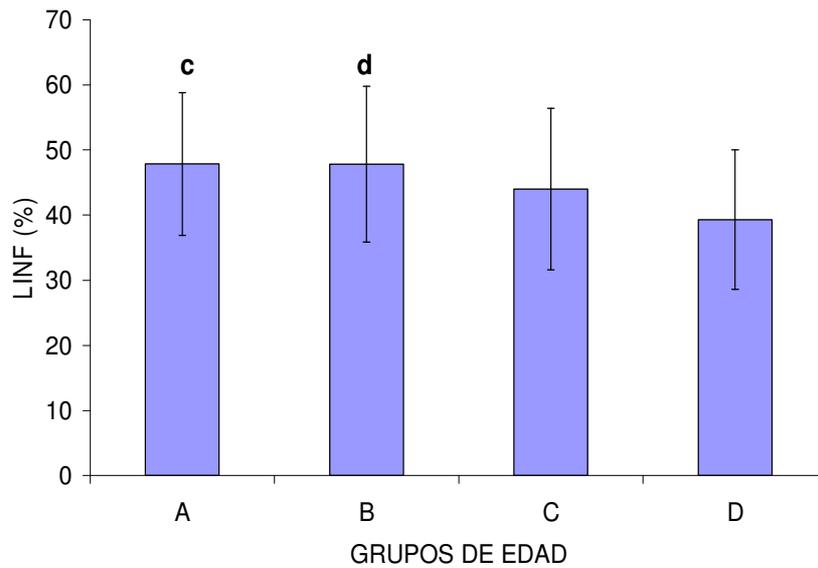


Figura 20.- Diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (c: diferencias significativas entre los grupos de edad A y D ($p < 0,001$); d: diferencias significativas entre los grupos de edad B y D ($p = 0,006$)).

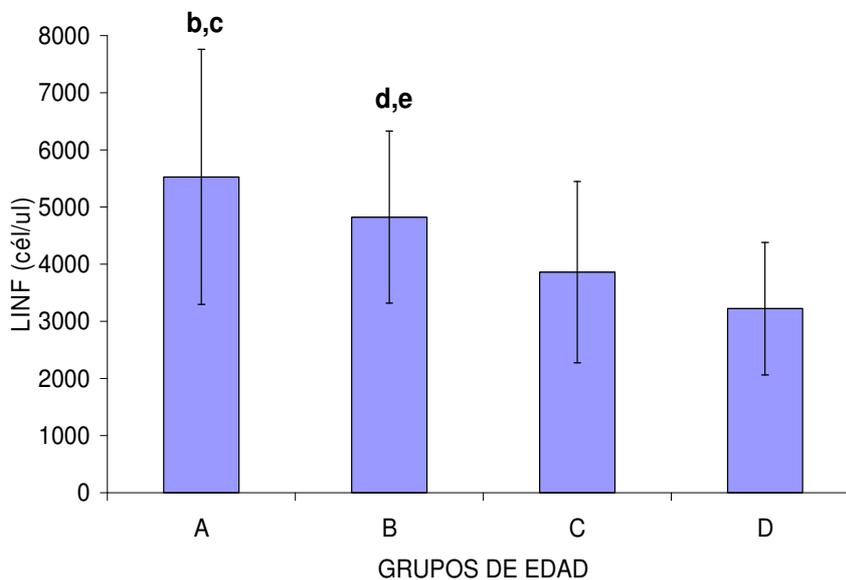


Figura 21.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de linfocitos entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (b: diferencias entre los grupos de edad A y C ($p = 0,004$); c: diferencias entre el grupo A y D ($p < 0,001$); d: diferencias entre el grupo B y D ($p < 0,001$); e: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p = 0,042$)).

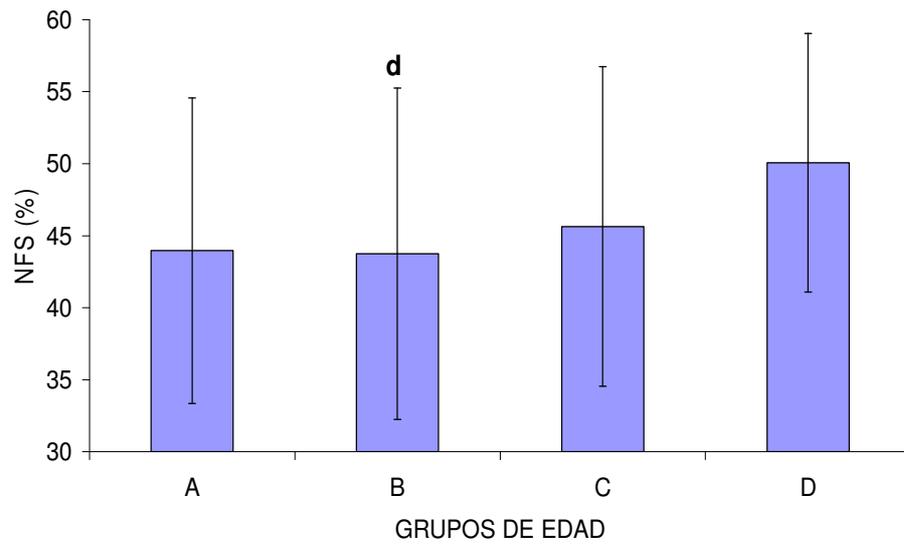


Figura 22.- Diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de neutrófilos entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (*d: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p=0,049$)*).

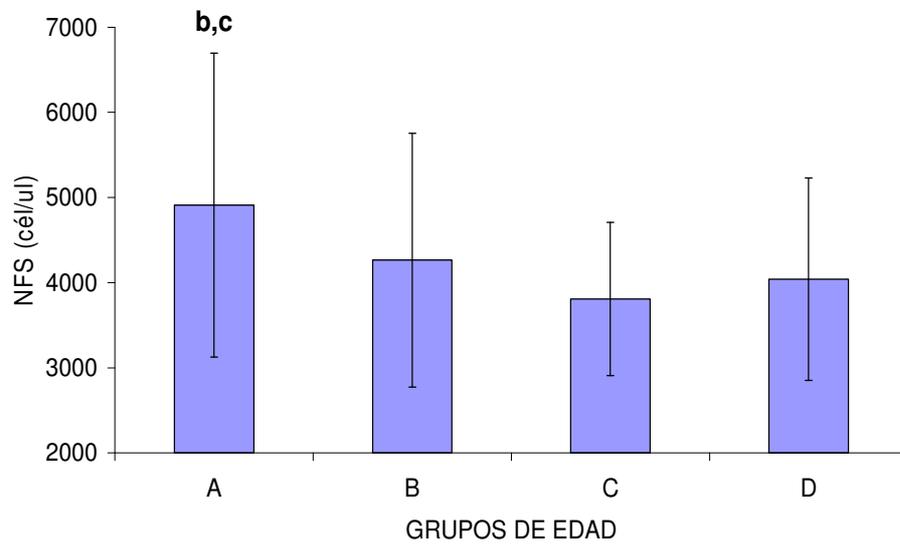


Figura 23.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de neutrófilos entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (*b: diferencias entre los grupos de edad A y C ($p=0,004$); c: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p=0,033$)*).

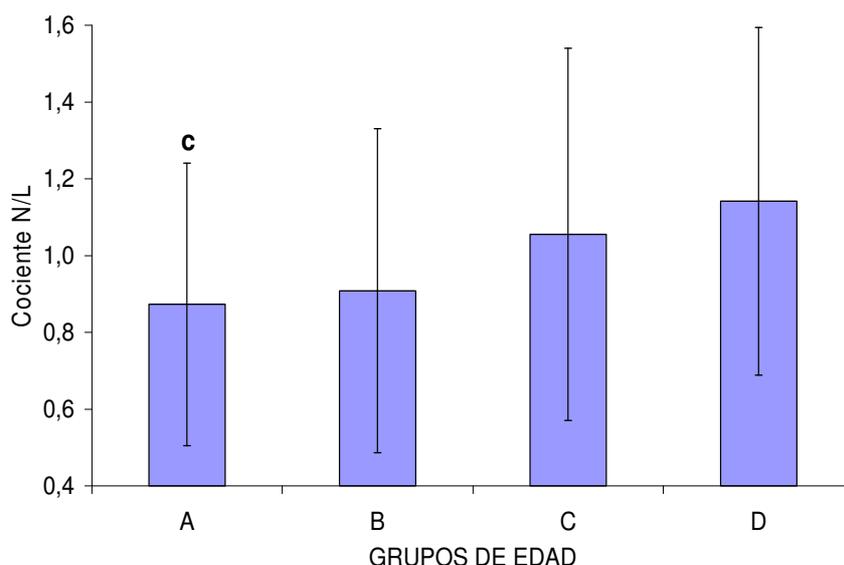


Figura 24.- Diferencias estadísticamente significativas en el cociente N/L entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (*b*: diferencias entre los grupos de edad A y C; *c*: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p=0,026$)).

4.1.2.3.-INFLUENCIA DEL SEXO Y LA EDAD SOBRE EL LEUCOGRAMA

En las tablas 34 a la 49 se muestran los estadísticos básicos de los parámetros leucocitarios expresados en valores absolutos y porcentuales, tanto en machos como en hembras en cada uno de los grupos de edad.

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	21	6.957,00	21.457,00	11.738,61	3.719,40
LINF	21	3.384,00	7.978,00	5.287,47	1.295,92
NFS	21	1.739,00	7.898,00	4.686,76	1.489,30
NFS SEG	21	1.739,00	7.898,00	4.650,41	1.495,98
NFS BANDA	21	0,00	157,00	36,33	59,28
EOFS	21	0,00	682,00	241,80	200,77
MON	21	0,00	644,00	208,84	179,21
BFS	21	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 34.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad A (1-2 años) (*GB*: leucocitos totales; *LINF*: linfocitos; *NFS*: neutrófilos; *NFS SEG*: neutrófilos segmentados; *NFS BANDA*: neutrófilos en banda; *EOFS*: eosinófilos; *MON*: monocitos; *BFS*: basófilos).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	21	31,43	60,60	48,14	8,99
NFS	21	21,00	65,00	42,71	11,89
NFS SEG	21	20,00	65,00	43,50	11,52
NFS BANDA	21	0,00	3,00	0,53	0,84
EOFS	21	0,00	5,00	1,84	1,42
MON	21	0,00	5,00	1,79	1,44
BFS	21	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	21	0,29	1,86	0,88	0,42

Tabla 35.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de los animales de sexo macho del grupo de edad A (1-2 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/ul)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	18	7.664,00	20.989,00	12.242,05	4.310,2
LINF	18	3.541,00	7.288,00	5.319,77	1.106,1
NFS	18	2.292,00	8.747,00	5.123,00	2.046,9
NFS SEG	18	2.183,00	7.911,00	4.818,76	1.802,9
NFS BANDA	18	0,00	345,00	54,32	93,39
EOFS	18	0,00	1.034,00	232,30	256,56
MON	18	0,00	437,00	153,67	167,12
BFS	18	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 36.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad A (1-2 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	18	24,32	61,73	46,83	10,40
NFS	18	21,00	70,00	45,05	11,36
NFS SEG	18	20,00	57,00	42,67	9,99
NFS BANDA	18	0,00	3,00	0,80	1,11
EOFS	18	0,00	9,00	1,85	2,03
MON	18	0,00	4,00	1,47	1,54
BFS	18	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	18	0,29	1,42	0,87	0,32

Tabla 37.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo hembra del grupo de edad A (1-2 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	16	7.363,00	12.620,00	9.889,38	1.543,04
LINF	16	2.255,00	7.093,00	4.790,37	1.259,50
NFS	16	1.941,00	6.745,00	4.428,19	1.280,56
NFS SEG	16	1.941,00	6.712,00	4.344,08	1.291,19
NFS BANDA	16	0,00	370,00	84,07	90,04
EOFS	16	0,00	757,00	255,36	241,80
MON	16	0,00	796,00	276,24	252,29
BFS	16	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 38.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo macho del grupo de edad B (2-3 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	16	30,63	60,53	47,88	7,81
NFS	16	21,00	68,00	45,06	12,17
NFS SEG	16	28,00	67,00	45,73	10,92
NFS BANDA	16	0,00	4,00	0,88	0,96
EOFS	16	0,00	6,00	2,50	2,16
MON	16	0,00	9,00	3,07	2,66
BFS	16	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	16	0,28	1,42	0,93	0,32

Tabla 39.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo macho del grupo de edad B (2-3 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	22	7.116,00	18.540,00	10.060,86	2.537,71
LINF	22	2.966,00	6.361,00	4.684,75	967,56
NFS	22	2.347,00	8.552,00	4.126,11	1.667,16
NFS SEG	22	2.347,00	7.425,00	3.867,43	1.294,15
NFS BANDA	22	0,00	185,00	32,37	62,88
EOFS	22	0,00	569,00	257,18	159,07
MON	22	0,00	587,00	197,90	174,75
BFS	22	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 40.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo hembra del grupo de edad B (2-3 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	22	26,36	60,88	47,80	9,01
NFS	22	24,00	66,00	42,70	10,35
NFS SEG	22	24,00	65,00	42,50	10,15
NFS BANDA	22	0,00	1,00	0,23	0,43
EOFS	22	0,00	8,00	2,73	2,07
MON	22	0,00	6,00	1,86	1,64
BFS	22	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	22	0,30	1,47	0,93	0,39

Tabla 41.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo hembra del grupo de edad B (2-3 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	19	5.760,00	17.033,00	8.816,32	2.505,21
LINF	19	1.971,00	6.148,00	3.803,19	1.038,17
NFS	19	2.628,00	4.767,00	3.764,50	728,14
NFS SEG	19	2.548,00	4.767,00	3.710,24	760,90
NFS BANDA	19	0,00	185,00	51,39	67,90
EOFS	19	0,00	956,00	238,65	239,08
MON	19	0,00	773,00	206,41	231,65
BFS	19	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 42.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo macho del grupo de edad C (3-4 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	19	33,52	54,81	45,06	6,75
NFS	19	32,00	60,00	45,56	7,48
NFS SEG	19	31,00	60,00	44,83	7,62
NFS BANDA	19	0,00	3,00	0,68	0,95
EOFS	19	0,00	12,00	2,95	3,03
MON	19	0,00	9,00	2,21	2,32
BFS	19	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	19	0,51	2,07	0,98	0,36

Tabla 43.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo macho del grupo de edad C (2-3 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	22	6.185,00	13.995,00	8.851,91	2.269,37
LINF	22	2.030,00	7.863,00	3.786,72	1.478,10
NFS	22	2.300,00	6.647,00	3.844,25	1.047,14
NFS SEG	22	2.300,00	6.647,00	3.795,80	1.046,28
NFS BANDA	22	0,00	225,00	49,88	78,80
EOFS	22	0,00	2.033,00	279,28	427,43
MON	22	0,00	528,00	164,28	143,06
BFS	22	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 44.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo hembra del grupo de edad C (3-4 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	22	24,37	64,58	44,63	11,52
NFS	22	30,00	63,00	45,70	10,33
NFS SEG	22	28,00	63,00	45,20	10,39
NFS BANDA	22	0,00	3,00	0,55	0,91
EOFS	22	0,00	7,00	2,43	2,16
MON	22	0,00	6,00	1,91	1,66
BFS	22	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	22	0,51	2,07	1,12	0,57

Tabla 45.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo hembra del grupo de edad C (3-4 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	21	5.348,00	10.488,00	7.622,81	1.559,36
LINF	21	1.592,00	4.773,00	2.973,28	873,31
NFS	21	2.006,00	6.157,00	3.873,95	1.059,21
NFS SEG	21	2.006,00	6.157,00	3.841,41	1.058,34
NFS BANDA	21	0,00	155,00	32,46	51,95
EOFS	21	0,00	404,00	163,03	108,53
MON	21	0,00	524,00	108,06	124,48
BFS	21	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 46.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo macho del grupo de edad D (4-7 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	21	25,27	54,01	38,96	7,61
NFS	21	34,00	67,00	50,52	8,56
NFS SEG	21	34,00	67,00	50,10	8,53
NFS BANDA	21	0,00	2,00	0,43	0,68
EOFS	21	0,00	5,00	2,10	1,34
MON	21	0,00	5,00	1,38	1,43
BFS	21	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	21	0,52	2,58	1,19	0,49

Tabla 47.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo macho del grupo de edad D (2-3 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(cél/ul)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
GB	20	6.139,00	12.720,00	8.856,70	2.054,23
LINF	20	1.537,00	5.752,00	3.277,74	1.028,75
NFS	20	2.101,00	6.547,00	4.223,84	1.320,40
NFS SEG	20	2.031,00	6.547,00	4.166,49	1.286,44
NFS BANDA	20	0,00	365,00	54,51	104,34
EOFS	20	0,00	890,00	259,14	233,28
MON	20	0,00	892,00	264,28	250,20
BFS	20	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 48.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo hembra del grupo de edad D (4-7 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
LINF	20	20,04	62,08	39,64	11,79
NFS	20	26,00	69,00	49,60	11,31
NFS SEG	20	26,00	69,00	48,95	10,83
NFS BANDA	20	0,00	4,00	0,65	1,23
EOFS	20	0,00	7,00	2,80	2,09
MON	20	0,00	10,0	3,00	2,49
BFS	20	0,00	0,00	0,00	0,00
COCIENTE N/L	20	0,41	2,10	1,09	0,41

Tabla 49.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo hembra del grupo de edad D (2-3 años) (*GB: leucocitos totales; LINF: linfocitos; NFS: neutrófilos; NFS SEG: neutrófilos segmentados; NFS BANDA: neutrófilos en banda; EOFS: eosinófilos; MON: monocitos; BFS: basófilos*).

La única variable que difirió significativamente al comparar machos y hembras en cada grupo de edad fue el número de leucocitos totales (Figura 25).

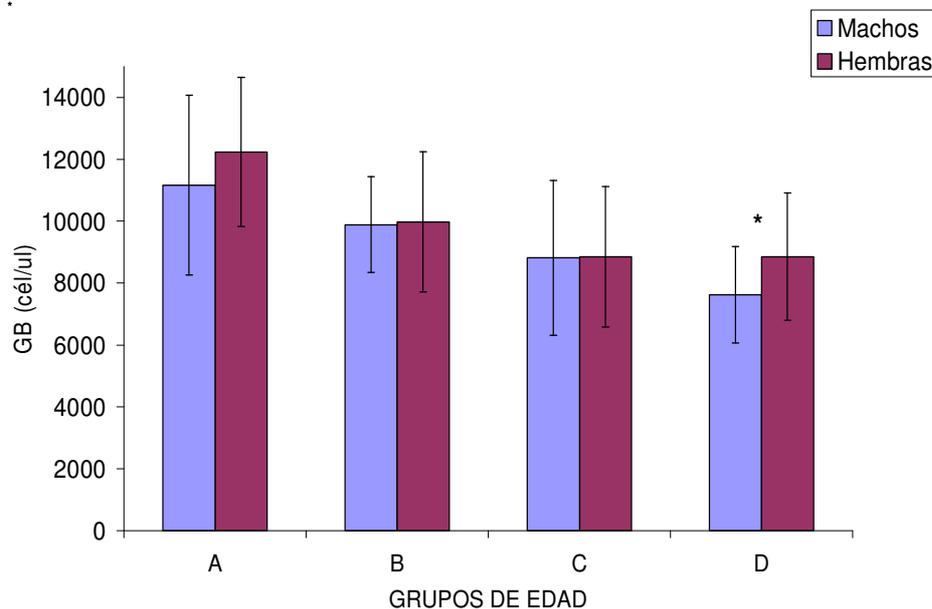


Figura 25.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de leucocitos totales entre machos y hembras en los cuatro grupos de edad. T de Student (*: $p=0,036$).

4.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN EL CABALLO PRE.

En este segundo apartado se han analizado las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T, linfocitos B y NK, considerado de forma conjunta las 159 muestras sanguíneas obtenidas. La estimación del número y porcentaje de linfocitos B se ha realizado mediante marcaje con anticuerpo específico y fórmula matemática. Las formas relativas y absolutas de linfocitos NK también fueron calculadas mediante procedimiento matemático. Debido a que el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre dichas fórmulas, consideramos atenernos a los formularios utilizados con mayor frecuencia en la literatura para esta especie (Da Costa y cols., 2003; Ferreira-Dias y cols., 2005), como se describe a continuación:

$$\text{LINFOCITOS B} = \text{Linfocitos} - \text{Linfocitos CD2}^+$$

$$\text{LINFOCITOS NK} = \text{Linfocitos T} - (\text{Linfocitos CD4}^+ + \text{Linfocitos CD8}^+)$$

4.2.1.-VALORES LINFOCITARIOS DE REFERENCIA EN EL CABALLO PRE

En las tablas 50 y 51 se exponen los estadísticos básicos de las formas porcentuales y absolutas de las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T, linfocitos B y NK correspondientes a los 159 animales considerados.

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	159	44,59	81,00	65,03	7,76
Linfocitos T	159	37,20	80,95	58,49	8,05
Linfocitos Th	159	24,02	61,39	42,98	6,77
Linfocitos Tc	159	7,17	27,34	15,37	4,00
CD2 ⁺ LB ⁺	159	4,77	17,93	10,49	2,74
LB	159	19,01	52,66	34,71	7,39
NK	159	-2,27	15,57	6,80	3,35

Tabla 50.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los 159 animales (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/ul)	N	MÍNIM	MÁXI	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	15	1.042,	5.459,	2.751,	887,25
Linfocitos T	15	1.195,	4.158,	2.451,	722,24
Linfocitos Th	15	642,0	3.444,	1.808,	580,45
Linfocitos Tc	15	251,0	1.436,	660,77	256,73
CD2 ⁺ LB ⁺	15	100,0	1.071,	452,14	197,14
LB	15	303,0	3.112,	1.426,	596,32
NK	15	-72,00	820,0	279,32	173,40

Tabla 51.-Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los 159 animales (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

4.2.1.1.-INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE LAS POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

En las tablas 52 a la 55 se recopilan los estadísticos básicos de los parámetros linfocitarios en valores absolutos y relativos en machos y hembras, de forma respectiva.

(cél/ul)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	77	1.177,00	4.896,00	2.670,10	877,61
Linfocitos T	77	1.256,00	4.158,00	2.384,19	728,13
Linfocitos Th	77	790,00	3.201,00	1.746,00	57,21
Linfocitos Tc	77	255,00	1.436,00	652,00	259,65
CD2 ⁺ LB ⁺	77	100,00	1.071,00	452,14	197,14
LB	77	303,00	3.112,00	1.426,41	596,32
NK	77	-72,00	747,00	270,89	165,19

Tabla 52.-Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2⁺	77	44,59	81,00	64,84	8,26
Linfocitos T	77	41,97	80,95	59,03	8,06
Linfocitos Th	77	24,02	59,86	42,70	7,36
Linfocitos Tc	77	7,17	26,24	15,43	4,18
CD2⁺LB⁺	77	4,77	17,93	10,46	2,80
LB	77	19,01	52,13	34,46	7,39
NK	77	-2,27	13,89	6,72	3,28

Tabla 53.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2⁺	82	1.042,00	5.459,00	2.823,48	894,89
Linfocitos T	82	1.195,00	3.893,00	2.512,96	715,86
Linfocitos Th	82	642,00	3.444,00	1.864,40	587,26
Linfocitos Tc	82	251,00	1.412,00	668,47	255,50
CD2⁺LB⁺	82	205,00	1.015,00	462,80	188,89
LB	82	430,00	3.105,00	1.453,96	620,35
NK	82	-38,00	820,00	292,46	182,42

Tabla 54.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2⁺	82	47,34	78,59	65,23	7,380
Linfocitos T	82	40,42	77,78	58,50	7,540
Linfocitos Th	82	27,83	61,39	43,27	6,270
Linfocitos Tc	82	7,880	27,34	15,32	3,890
CD2⁺LB⁺	82	6,110	16,25	10,64	2,390
LB	82	19,01	52,66	37,61	8,840
NK	82	-0,68	15,57	6,86	3,44

Tabla 55.-Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre machos y hembras en ninguno de los parámetros linfocitarios analizados.

4.2.1.2.-INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE LAS POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

En las tablas 56 a la 63 se detallan los estadísticos básicos de los valores porcentuales y absolutos linfocitarios correspondientes a cada grupo de edad (A, B, C y D).

(cél/μl)	N	MÍNIM	MÁXI	MEDIA	DE
Linfocitos CD2⁺	39	2.355,	4.896,	3.338,9	659,07
Linfocitos T	39	1.954,	3.993,	2.899,6	550,33
Linfocitos Th	39	1.394,	3.150,	2.128,4	450,57
Linfocitos Tc	39	363,0	1.436,	806,35	231,70
CD2⁺LB⁺	39	248,0	1.071,	584,03	203,33
LB	39	926,0	3.112,	1.828,5	634,48
NK	39	-31,00	820,00	401,75	176,44

Tabla 56.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad A (1-2 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIM	MÁXIM	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	3	44,59	78,59	61,97	9,15
Linfocitos T	3	37,20	71,68	54,04	8,76
Linfocitos Th	3	24,02	50,21	39,61	6,90
Linfocitos Tc	3	7,88	27,34	14,40	4,35
CD2 ⁺ LB ⁺	3	6,11	16,25	10,64	2,39
LB	3	19,01	52,66	37,61	8,84
NK	3	-0,68	15,57	8,05	3,59

Tabla 57.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad A (1-2 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	38	48,75	76,65	66,42	6,72
Linfocitos T	38	41,20	71,89	59,39	6,60
Linfocitos Th	38	29,41	56,15	44,62	6,50
Linfocitos Tc	38	7,17	22,46	14,78	3,24
CD2 ⁺ LB ⁺	38	4,77	17,83	9,69	2,30
LB	38	23,35	51,25	33,78	6,81
NK	38	1,65	12,22	7,06	2,70

Tabla 58.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad B (2-3 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2⁺	38	1.177,00	5.459,00	3.209,72	862,40
Linfocitos T	38	1.649,00	4.158,00	2.851,72	619,44
Linfocitos Th	38	790,00	3.444,00	2.143,59	571,73
Linfocitos Tc	38	316,00	1.412,00	728,55	249,20
CD2⁻LB⁺	38	219,00	1.015,00	475,36	192,11
LB	38	716,00	2.804,00	1.613,66	502,97
NK	38	56,00	777,00	349,29	173,53

Tabla 59.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad B (2-3 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2⁺	41	1.475,00	4.204,00	2.428,90	716,26
Linfocitos T	41	1.256,00	3.873,00	2.160,73	650,76
Linfocitos Th	41	908,00	2.813,00	1.587,72	470,47
Linfocitos Tc	41	270,00	1.370,00	598,12	255,58
CD2⁻LB⁺	41	190,00	906,00	377,83	146,81
LB	41	485,00	2.424,00	1.285,28	516,22
NK	41	37,00	421,00	224,150	103,39

Tabla 60.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad C (3-4 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2⁺	41	52,17	75,68	64,82	6,47
Linfocitos T	41	47,43	73,30	58,45	6,70
Linfocitos Th	41	32,68	53,01	42,28	5,28
Linfocitos Tc	41	8,15	26,88	16,02	4,23
CD2⁺LB⁺	41	5,79	13,81	9,77	1,98
LB	41	24,32	47,83	35,12	6,44
NK	41	1,10	13,94	6,56	3,01

Tabla 61.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad C (3-4 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2⁺	41	1.042,00	3.787,00	2.102,54	642,34
Linfocitos T	41	1.195,00	3.525,00	1.967,68	566,11
Linfocitos Th	41	642,00	2.536,00	1.419,92	445,12
Linfocitos Tc	41	251,00	934,00	527,84	200,12
CD2⁺LB⁺	41	100,00	987,00	385,50	178,26
LB	41	303,00	2.391,00	1.065,44	463,09
NK	41	-72,00	440,00	148,00	105,96

Tabla 62.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad D (4-7 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2⁺	41	46,71	81,00	66,75	7,890
Linfocitos T	41	44,27	80,95	61,89	8,210
Linfocitos Th	41	31,84	61,39	45,25	7,080
Linfocitos Tc	41	8,190	26,24	16,19	3,930
CD2⁺LB⁺	41	6,300	17,93	11,86	2,990
LB	41	19,01	48,57	32,44	6,650
NK	41	-2,270	13,23	5,690	3,510

Tabla 63.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad D (4-7 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

El análisis estadístico reveló variaciones significativas en el número y porcentaje de linfocitos CD2⁺ (Figura 26 y Figura 27), linfocitos T (Figura 28 y Figura 29), linfocitos Th (Figura 30 y Figura 31), número de linfocitos Tc (Figura 32), linfocitos B estimados mediante marcaje con anticuerpo monoclonal específico (Figura 33 y Figura 34) y fórmula matemática (Figura 35 y Figura 36) y linfocitos NK (Figura 37 y Figura 38).

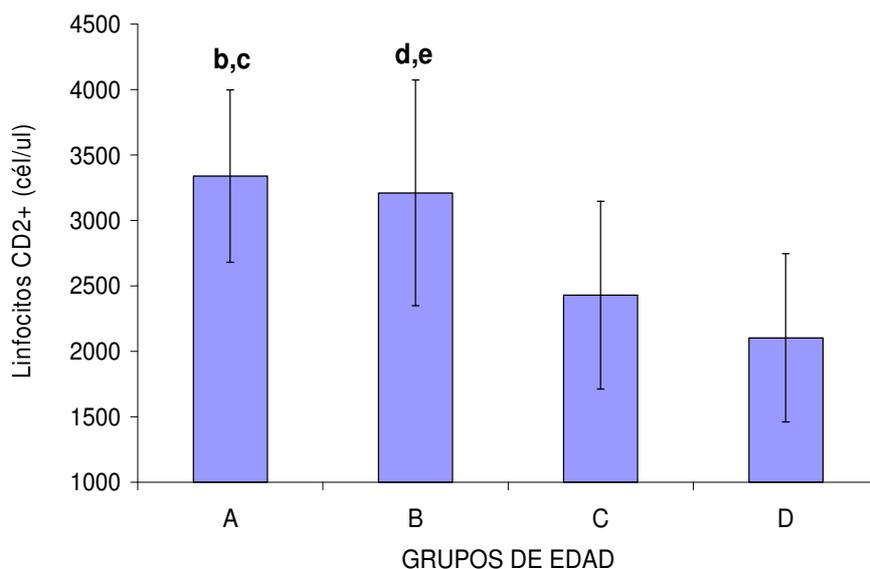


Figura 26.-Diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas de linfocitos CD2⁺ entre los grupos de edad ANOVA (*b*: diferencias entre los grupos de edad A y C; *c*: diferencias entre los grupos de edad A y D; *d*: diferencias entre los grupos de edad B y C; *e*: diferencias entre los grupos de edad B y D) ($p < 0,001$).

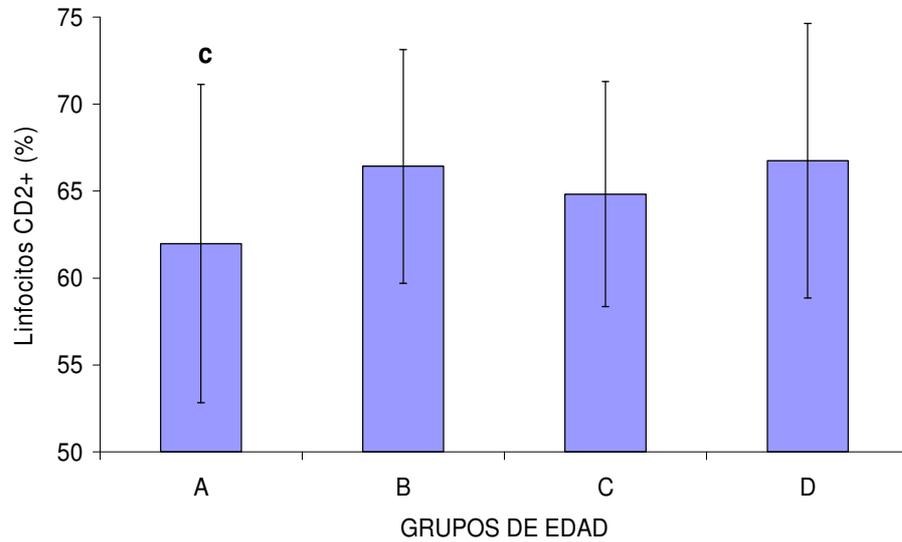


Figura 27.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas porcentuales de linfocitos CD2+ entre los grupos de edad ANOVA (*c*: diferencias entre los grupos de edad A y D). ($p=0,034$).

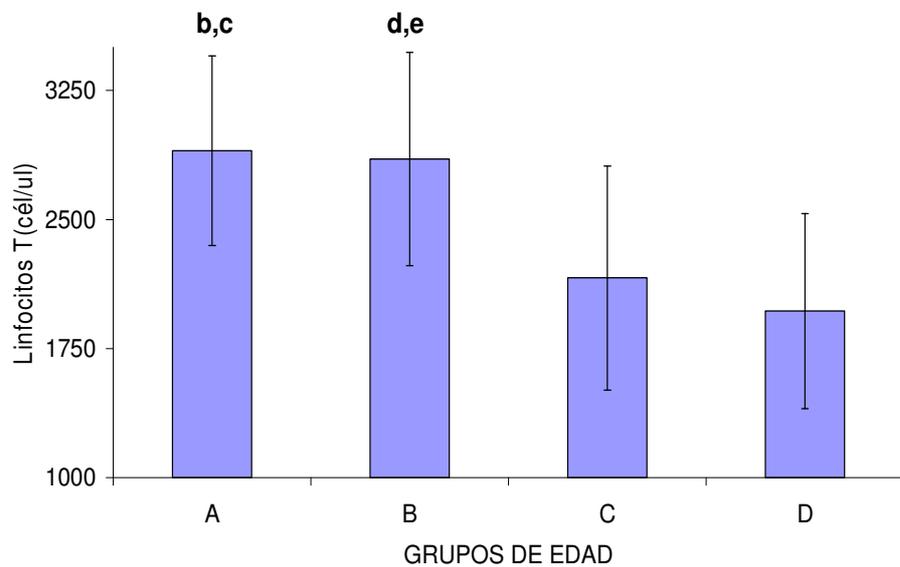


Figura 28.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas de linfocitos T entre los grupos de edad ANOVA (*b*: diferencias significativas entre los grupos de edad A y C; *c*: diferencias significativas entre los grupos de edad A y D; *d*: diferencias significativas entre los grupos de edad B y C; *e*: diferencias significativas entre los grupos de edad B y D). ($p<0,001$).

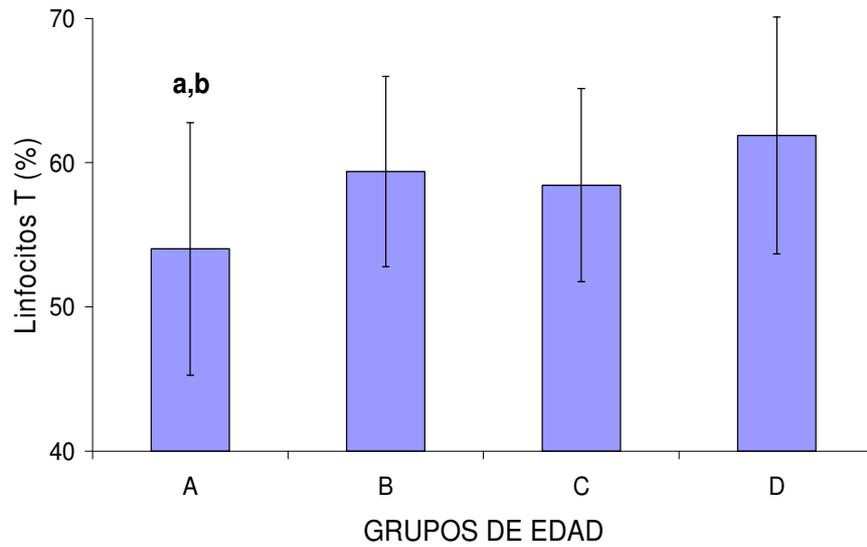


Figura 29.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas porcentuales de linfocitos T entre los grupos de edad ANOVA (*a*: diferencias entre los grupos de edad A y B ($p=0,007$); *b*: diferencias entre los grupos de edad A y C ($p=0,001$)).

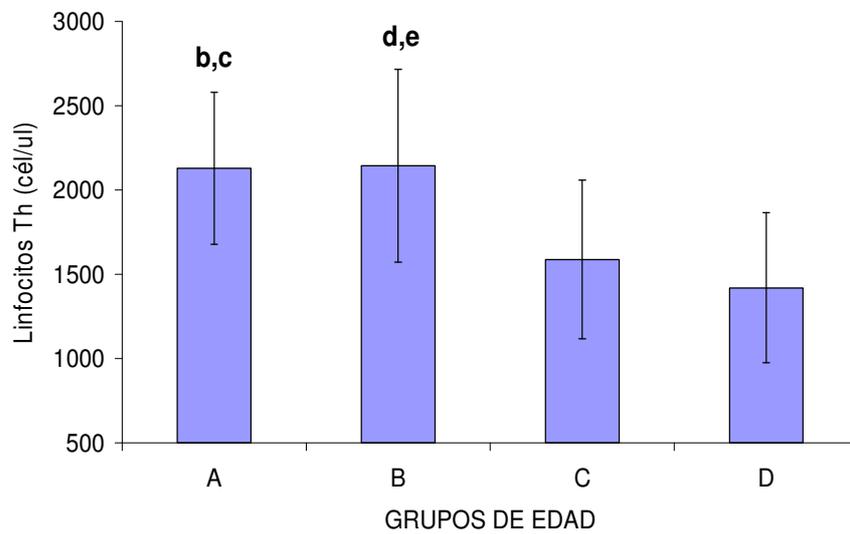


Figura 30.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas de linfocitos Th entre los grupos de edad ANOVA (*b*: diferencias entre los grupos de edad A y C ($p<0,001$); *c*: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p<0,001$); *d*: diferencias entre los grupos de edad B y C ($p=0,044$); *e*: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p<0,001$)).

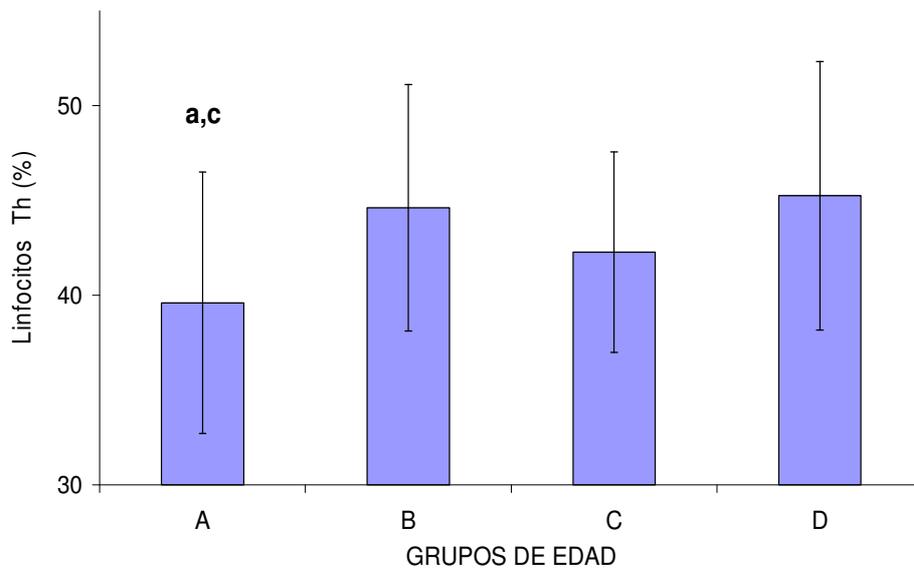


Figura 31.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas porcentuales de linfocitos Th entre los grupos de edad ANOVA (*a*: diferencias entre los grupos de edad A y B ($p=0,006$); *c*: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p=0,001$)).

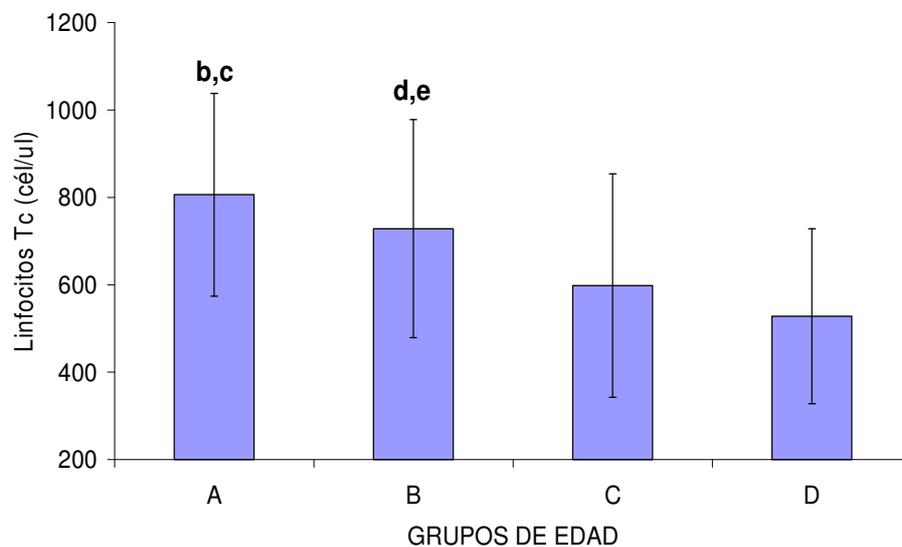


Figura 32.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas de linfocitos Tc entre los grupos de edad ANOVA (*b*: diferencias entre los grupos de edad A y C); *c*: diferencias entre los grupos de edad A y D; *d*: diferencias entre los grupos de edad B y C; *e*: diferencias entre los grupos de edad B y D). ($p<0,001$)

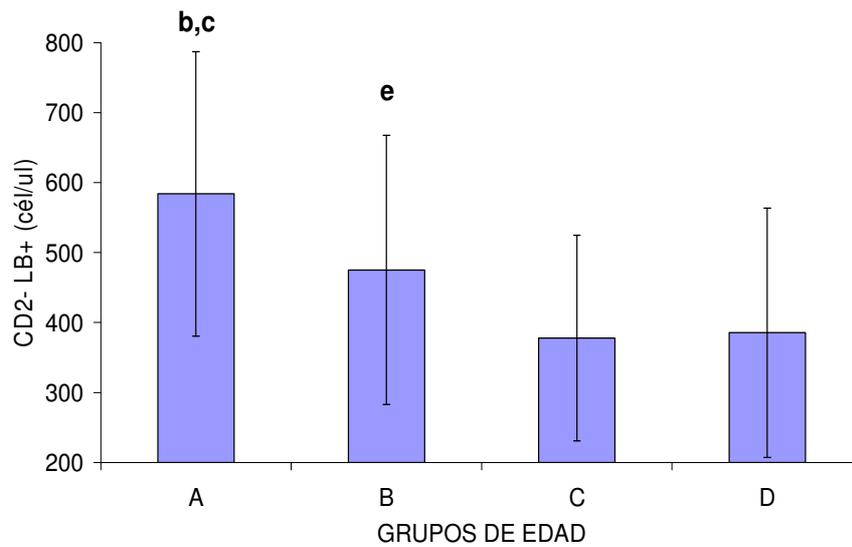


Figura 33.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal entre los grupos de edad. ANOVA (*b*: diferencias entre los grupos de edad A y C ($p<0,001$); *c*: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p<0,001$); *e*: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p=0,038$)).

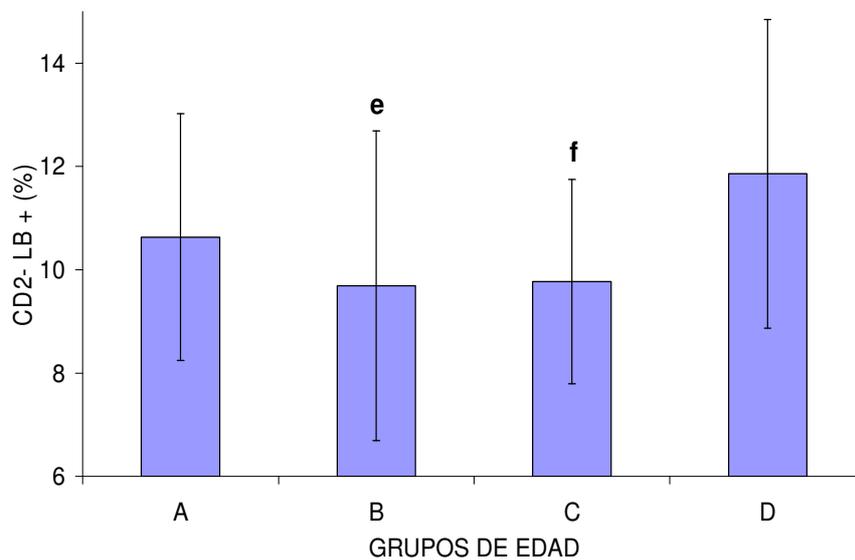


Figura 34.- Diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos marcados con anticuerpo monoclonal entre los cuatro grupos de edad ANOVA (*e*: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p=0,002$); *f*: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p=0,003$)).

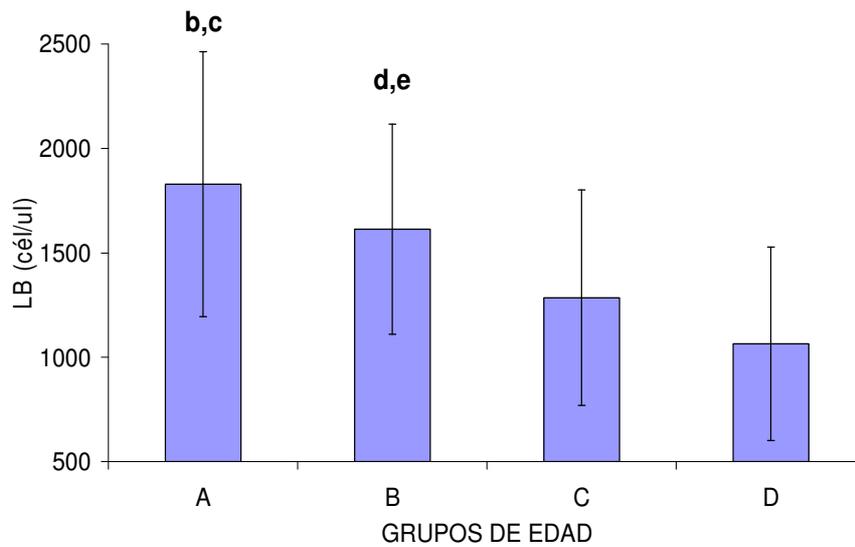


Figura 35.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de linfocitos B calculado mediante fórmula matemática (linfocitos-linfocitos CD2⁺) entre los grupos de edad ANOVA (*b*: diferencias entre los grupos de edad A y C ($p=0,001$); *c*: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p<0,00$); *d*: diferencias entre los grupos de edad B y C ($p=0,024$); *e*: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p<0,001$)).

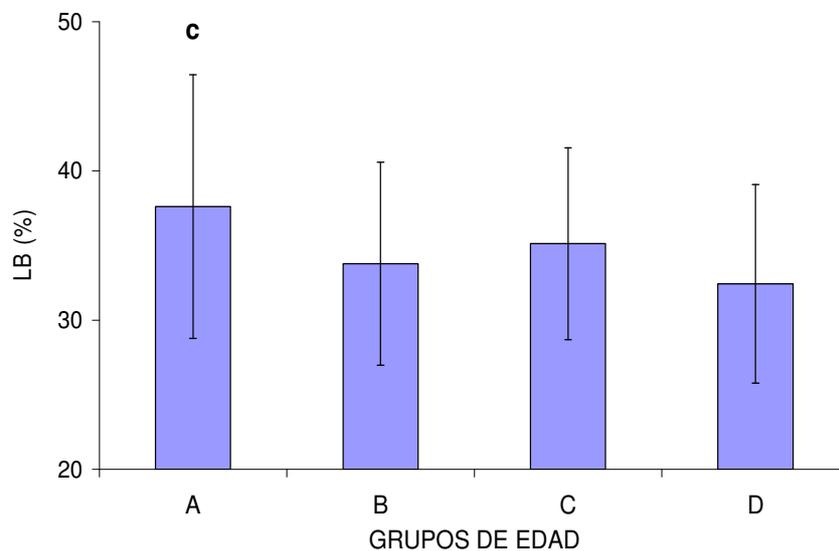


Figura 36.- Diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos B calculado mediante fórmula matemática (linfocitos-linfocitos CD2⁺) entre los grupos de edad ANOVA (*c*: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p=0,015$)).

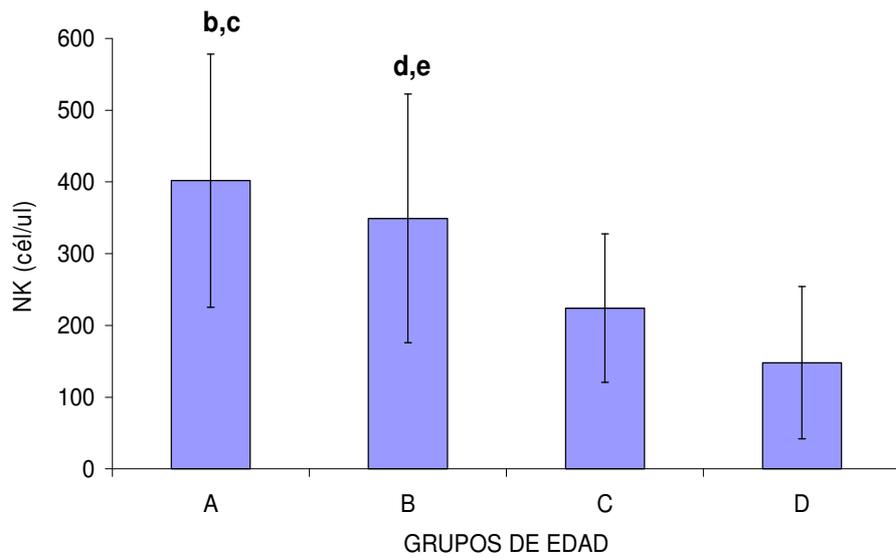


Figura 37.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas de linfocitos NK entre los grupos de edad ANOVA (*b*: diferencias entre los grupos de edad A y C ($p<0,001$); *c*: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p<0,001$); *d*: diferencias entre los grupos de edad B y C; *e*: diferencias entre los grupos de edad B y D ($p<0,001$)).

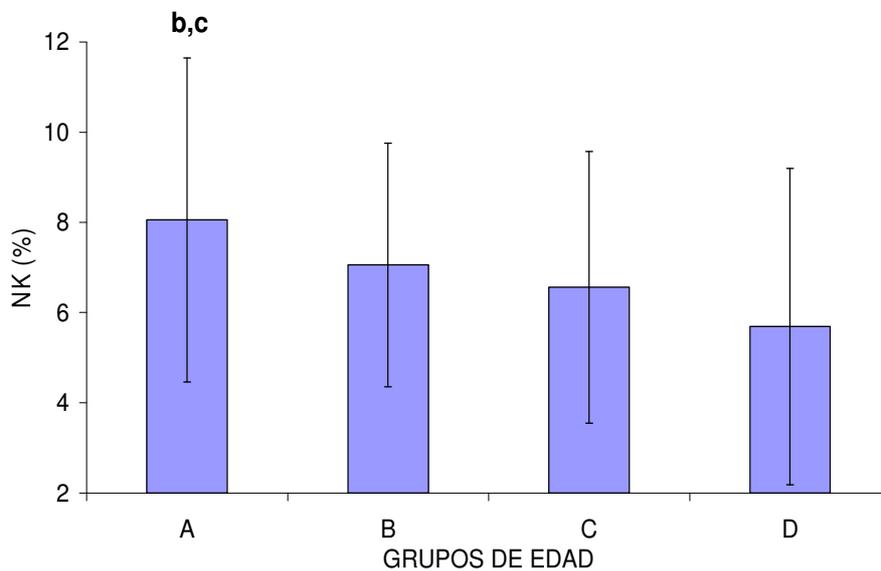


Figura 38.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas porcentuales de linfocitos NK entre los grupos de edad ANOVA (*b*: diferencias significativas entre los grupos A y C ($p=0,041$); *c*: diferencias entre los grupos de edad A y D ($p=0,008$)).

4.2.1.3.-INFLUENCIA DEL SEXO Y LA EDAD SOBRE LAS POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

En las tablas 64 a la 79 se exponen los estadísticos descriptivos de las formas absolutas y porcentuales correspondientes a machos y hembras en cada grupo de edad.

(cél/ul)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2⁺	21	2.355,00	4.896,00	3.334,20	694,01
Linfocitos T	21	1.954,00	3.993,00	2.851,00	531,17
Linfocitos Th	21	1.394,00	2.728,00	2.063,80	354,15
Linfocitos Tc	21	363,00	1.436,00	841,54	285,52
CD2⁺LB⁺	21	248,00	1.071,00	577,79	245,57
LB	21	926,00	2.527,00	1.696,79	516,21
NK	21	140,00	919,00	441,94	191,25

Tabla 64.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad A (1-2 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos	21	44,59	72,65	62,08	8,80
Linfocitos T	21	41,97	68,96	55,43	8,12
Linfocitos Th	21	24,02	49,24	39,04	7,76
Linfocitos Tc	21	8,90	22,60	14,49	4,14
CD2⁺LB⁺	21	6,11	16,25	10,53	2,90
LB	21	27,36	52,13	36,89	7,87
NK	21	3,45	13,89	8,54	2,81

Tabla 65.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad A (1-2 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	18	2.528,00	4.593,00	3.343,51	643,28
Linfocitos T	18	2.187,00	3.893,00	2.945,79	578,47
Linfocitos Th	18	1.503,00	3.150,00	2.189,66	528,63
Linfocitos Tc	18	447,00	1.174,00	773,01	167,23
CD2 ⁺ LB ⁺	18	325,00	958,00	589,60	163,38
LB	18	964,00	3.112,00	1.937,12	714,55
NK	18	-31,00	820,00	393,45	197,75

Tabla 66.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad A (1-2 años) (Linfocitos CD2⁺: linfocitos CD2⁺; Linfocitos T: linfocitos T; Linfocitos Th: linfocitos T cooperadores; Linfocitos Tc: linfocitos T citotóxicos; Linfocitos CD2⁺LB⁺: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; LB: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; NK: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	18	47,34	78,59	61,86	9,72
Linfocitos T	18	40,42	71,68	54,49	8,33
Linfocitos Th	18	27,83	50,21	40,15	6,15
Linfocitos Tc	18	7,88	27,34	14,31	4,66
CD2 ⁺ LB ⁺	18	7,22	14,49	10,73	1,91
LB	18	19,01	52,66	38,23	9,74
NK	18	-0,68	15,57	7,86	4,17

Tabla 67.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad A (1-2 años) (Linfocitos CD2⁺: linfocitos CD2⁺; Linfocitos T: linfocitos T; Linfocitos Th: linfocitos T cooperadores; Linfocitos Tc: linfocitos T citotóxicos; Linfocitos CD2⁺LB⁺: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; LB: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; NK: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	16	1.177,00	4.469,00	3.182,30	921,44
Linfocitos T	16	1.649,00	4.158,00	2.936,40	716,83
Linfocitos Th	16	790,00	3.201,00	2.168,20	645,95
Linfocitos Tc	16	316,00	1.181,00	661,89	240,44
CD2 ⁻ LB ⁺	16	219,00	882,00	489,55	189,41
LB	16	871,00	2.624,00	1.607,88	480,50
NK	16	109,00	590,00	362,69	141,33

Tabla 68.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad B (2-3 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	16	48,75	76,65	66,01	7,40
Linfocitos T	16	41,99	66,97	58,48	6,96
Linfocitos Th	16	34,82	53,68	44,96	6,02
Linfocitos Tc	16	7,17	20,36	13,52	3,45
CD2 ⁻ LB ⁺	16	4,77	17,83	10,25	2,88
LB	16	23,35	51,25	33,99	7,40
NK	16	3,23	10,79	7,28	2,06

Tabla 69.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad B (2-3 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	22	1.891,00	5.459,00	3.229,64	838,42
Linfocitos T	22	1.755,00	3.813,00	2.791,24	550,07
Linfocitos Th	22	1.210,00	3.444,00	2.125,68	526,39
Linfocitos Tc	22	400,00	1.412,00	774,00	250,16
CD2 ⁻ LB ⁺	22	250,00	1.015,00	465,03	197,82
LB	22	494,00	2.424,00	1.224,55	485,75
NK	22	56,00	777,00	339,55	196,35

Tabla 70.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad B (2-3 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	22	53,88	76,62	66,72	6,34
Linfocitos T	22	44,96	71,88	60,05	6,40
Linfocitos Th	22	29,41	56,15	44,37	6,96
Linfocitos Tc	22	10,90	22,46	15,69	2,82
CD2 ⁻ LB ⁺	22	5,38	16,71	9,27	3,08
LB	22	23,38	46,12	33,63	6,52
NK	22	1,65	12,22	6,54	3,04

Tabla 71.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad B (2-3 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	19	1.486,00	3.769,00	2.414,30	585,76
Linfocitos T	19	1.256,00	3.541,00	2.127,00	578,19
Linfocitos Th	19	960,00	2.361,00	1.560,10	427,81
Linfocitos Tc	19	376,00	1.304,00	610,19	218,53
CD2 ⁻ LB ⁺	19	190,00	607,00	364,40	115,37
LB	19	485,00	2.379,00	1.349,21	552,37
NK	19	41,00	418,00	229,21	102,57

Tabla 72.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad C (3-4 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	19	53,55	75,38	64,45	6,95
Linfocitos T	19	47,58	73,30	58,35	6,73
Linfocitos Th	19	32,68	53,01	41,46	5,87
Linfocitos Tc	19	10,92	23,59	16,54	3,91
CD2 ⁻ LB ⁺	19	5,79	13,22	9,710	2,07
LB	19	24,62	46,45	35,65	6,68
NK	19	-0,68	13,06	6,33	3,24

Tabla 73.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad C (3-4 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	22	1.474,92	4.204,00	2.441,39	826,29
Linfocitos T	22	1.326,00	3.873,00	2.191,29	723,10
Linfocitos Th	22	907,73	2.813,00	1.611,38	513,52
Linfocitos Tc	22	270,29	1.370,00	587,78	288,58
CD2 ⁻ LB ⁺	22	204,57	906,00	389,34	171,28
LB	22	430,00	1.994,00	1.073,37	388,69
NK	22	37,00	924,00	269,86	204,68

Tabla 74.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad C (3-4 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	22	52,17	75,68	65,12	6,21
Linfocitos T	22	47,43	71,60	58,53	6,82
Linfocitos Th	22	35,77	52,68	42,92	4,81
Linfocitos Tc	22	8,15	26,88	15,61	4,51
CD2 ⁻ LB ⁺	22	6,37	13,81	9,77	1,95
LB	22	24,32	47,83	34,66	6,34
NK	22	1,10	13,94	6,59	3,18

Tabla 75.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad C (3-4 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	21	1.289,00	2.979,00	1.929,80	440,18
Linfocitos T	21	1.279,00	2.947,00	1.823,00	435,23
Linfocitos Th	21	929,00	2.372,00	1.311,60	364,13
Linfocitos Tc	21	255,00	870,00	518,32	190,36
CD2 ⁻ LB ⁺	21	100,00	982,00	355,49	186,04
LB	21	303,00	2.391,00	1057,90	534,46
NK	21	-72,00	566,00	145,10	131,43

Tabla 76.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad D (4-7 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	21	46,71	81,00	67,47	8,34
Linfocitos T	21	45,44	80,95	62,82	8,82
Linfocitos Th	21	31,84	59,86	45,19	7,95
Linfocitos Tc	21	9,22	26,24	16,81	4,46
CD2 ⁻ LB ⁺	21	6,30	17,93	11,23	3,20
LB	21	19,01	41,52	31,51	7,13
NK	21	-2,27	11,87	4,70	3,38

Tabla 77.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad D (4-7 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁻LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(cél/μl)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	20	1.042,00	3.787,00	2.333,89	772,71
Linfocitos T	20	1.195,00	3.525,00	2.128,12	657,37
Linfocitos Th	20	642,00	2.536,00	1.533,67	500,95
Linfocitos Tc	20	251,00	934,00	537,82	214,39
CD2 ⁺ LB ⁺	20	215,00	987,00	417,00	168,60
LB	20	430,00	1.994,00	1.073,37	388,69
NK	20	-38,00	527,00	215,75	151,20

Tabla 78.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad D (4-7 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Linfocitos CD2 ⁺	20	51,43	75,78	66,85	6,27
Linfocitos T	20	44,27	77,78	60,86	7,59
Linfocitos Th	20	32,73	61,39	45,32	6,20
Linfocitos Tc	20	8,19	20,92	15,44	3,27
CD2 ⁺ LB ⁺	20	7,59	16,43	12,52	2,67
LB	20	24,22	48,57	33,32	6,22
NK	20	0,36	13,23	6,79	3,40

Tabla 79.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad D (4-7 años) (*Linfocitos CD2⁺*: linfocitos CD2⁺; *Linfocitos T*: linfocitos T; *Linfocitos Th*: linfocitos T cooperadores; *Linfocitos Tc*: linfocitos T citotóxicos; *Linfocitos CD2⁺LB⁺*: linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal; *LB*: linfocitos B calculados mediante fórmula matemática; *NK*: linfocitos Natural Killer).

El estudio estadístico entre machos y hembras en cada grupo de edad únicamente mostró variaciones significativas en las formas porcentuales de linfocitos Tc en el grupo de edad B (Figura 39).

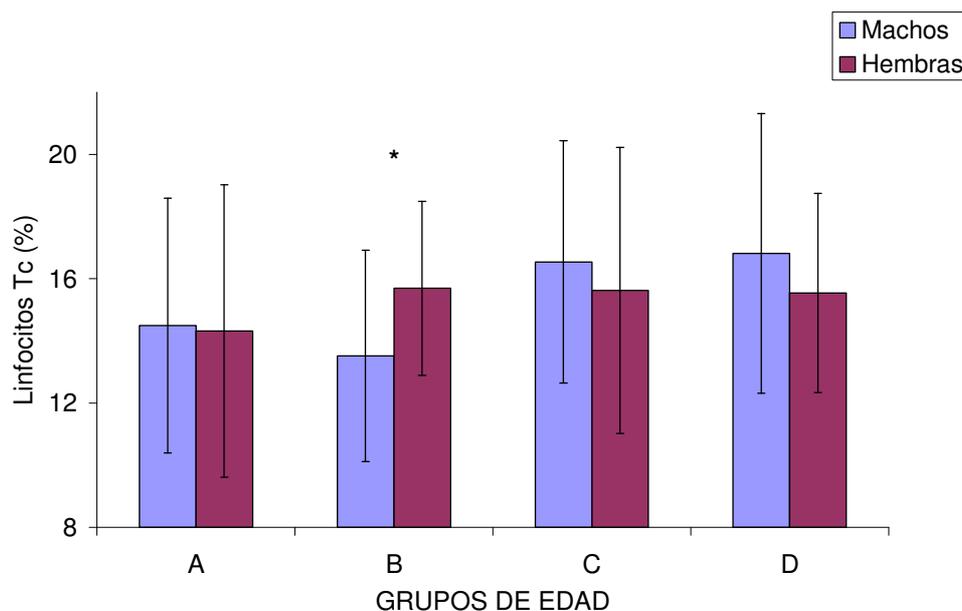


Figura 39.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas porcentuales de linfocitos Tc entre machos y hembras en cada grupo de edad T de Student (*: $p=0,040$).

4.2.2.-SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS (LINFOCITOS Th y LINFOCITOS Tc) Y COCIENTE CD4/CD8

4.2.2.1.- SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS (LINFOCITOS Th y LINFOCITOS Tc)

En la tabla 80 se exponen los estadísticos básicos de los valores porcentuales de linfocitos Th, linfocitos Tc respecto a la población de linfocitos T, correspondientes a la población total de animales analizados y en cada uno de los grupos de edad y sexo.

	(%)	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
Población	Linfocitos	159	50,07	84,09	73,39	6,09
total	Linfocitos	159	15,92	49,93	26,61	6,09
Machos	Linfocitos	77	50,07	84,09	72,99	6,74
	Linfocitos	77	15,91	49,93	27,01	6,74
Hembras	Linfocitos	82	61,52	83,52	73,74	5,46
	Linfocitos	82	16,48	38,48	26,26	5,46
Grupo A:	Linfocitos	39	61,52	83,19	72,87	6,34
	Linfocitos	39	16,81	38,48	27,14	6,34
1-2 años						
Machos	Linfocitos	21	63,47	83,19	72,36	6,60
grupo A	Linfocitos	21	16,81	36,53	27,64	6,60
Hembras	Linfocitos	18	61,52	82,50	73,35	6,22
grupo A	Linfocitos	18	17,50	38,48	26,65	6,22
Grupo B:	Linfocitos	38	63,59	84,09	74,98	5,46
	Linfocitos	38	15,92	36,41	25,02	5,46
2-3 años						
Machos	Linfocitos	16	68,59	84,09	76,92	4,99
grupo B	Linfocitos	16	15,92	31,41	23,08	4,99
Hembras	Linfocitos	22	63,59	81,75	73,58	5,52
grupo B	Linfocitos	22	18,25	36,41	26,42	5,52
Grupo C:	Linfocitos	41	61,90	83,52	72,62	5,84
	Linfocitos	41	16,48	38,10	27,38	5,84
3-4 años						
Machos	Linfocitos	19	61,90	82,82	71,41	5,64
grupo C	Linfocitos	19	17,18	38,10	28,59	5,64
Hembras	Linfocitos	22	62,46	83,52	73,67	5,94
grupo C	Linfocitos	22	16,48	37,54	26,33	5,94
Grupo D:	Linfocitos	41	50,07	82,45	73,17	6,56
	Linfocitos	41	17,55	49,93	26,83	6,56
4-7 años						
Machos	Linfocitos	21	50,07	82,45	72,00	8,10
grupo D	Linfocitos	21	17,55	49,93	28,00	8,10
Hembras	Linfocitos	20	65,94	82,25	74,39	4,28
grupo D	Linfocitos	20	17,75	34,06	25,61	4,28

Tabla 80.- Estadísticos básicos de los valores porcentuales de linfocitos Th, linfocitos Tc respecto a la población de linfocitos T correspondientes a la población total de animales analizados y en cada grupo de edad y sexo (*Th*: linfocitos T cooperadores; *CD4*; *Tc*: linfocitos T citotóxicos; *CD8*).

4.2.2.2.-COCIENTE CD4/CD8

En la siguiente tabla se muestran los estadísticos básicos del cociente CD4/CD8 en el colectivo total analizado, y en cada uno de los grupos de edad y sexo.

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DE
POBLACIÓN TOTAL	159	1,00	5,28	2,98	0,90
MACHOS	77	1,00	5,28	2,96	0,98
HEMBRAS	82	1,62	5,07	3,00	0,83
GRUPO A: 1-2 años	39	1,62	4,95	2,96	0,93
Machos grupo A	21	1,74	4,95	2,83	0,99
Hembras grupo A	18	1,62	4,72	2,95	0,93
GRUPO B: 2-3 años	38	1,75	5,28	3,20	0,95
Machos grupo B	16	2,18	5,28	3,53	1,01
Hembras grupo B	22	1,75	4,48	2,95	0,85
GRUPO C: 3-4 años	41	1,63	5,07	2,83	0,87
Machos grupo C	19	1,63	4,82	2,64	0,80
Hembras grupo C	22	1,66	5,07	2,99	0,92
GRUPO D: 4-7 años	41	1,00	4,70	2,92	0,84
Machos grupo D	21	1,00	4,70	2,82	0,95
Hembras grupo D	20	1,94	4,63	3,01	0,70

Tabla 81.- Estadísticos básicos del cociente CD4/CD8 en el colectivo animal analizado, y en cada grupo de sexo y edad.

El análisis comparativo del cociente CD4/CD8 reveló diferencias significativas entre grupos de edad en la población general de animales analizados (Figura 40) y cuando se compararon machos y hembras dentro de cada grupo de edad (Figura 41).

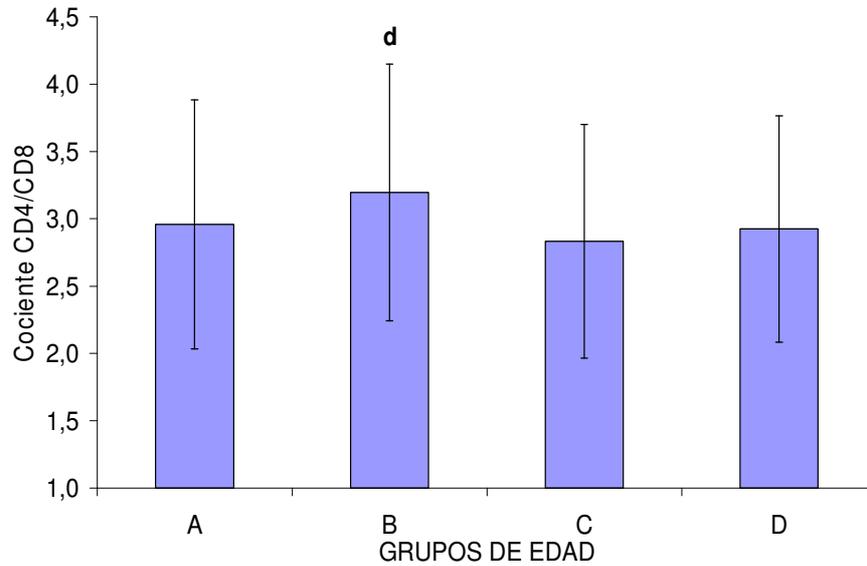


Figura 40.- Diferencias estadísticamente significativas en el cociente CD4/CD8 entre los cuatro grupos de edad. ANOVA (*d: diferencias estadísticamente significativas entre el grupo B y C ($p=0,042$)*).

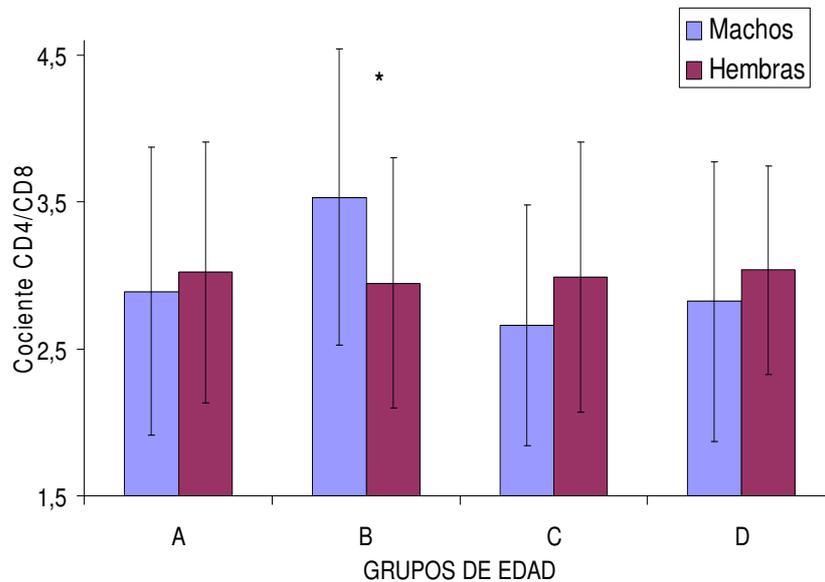


Figura 41.- Diferencias estadísticamente significativas en el cociente CD4/CD8 entre machos y hembras dentro de cada grupo de edad. T de Student (**: $p=0,047$*).

4.3.-CORRELACIONES ENTRE LAS DIVERSAS VARIABLES HEMATOLÓGICAS Y LINFOCITARIAS EN EL CABALLO PRE

En las tablas 82 a la 96 se presentan los coeficientes de correlación entre las variables hematológicas y linfocitarias analizadas en el efectivo total de animales PRE.

	GR (10 ⁶ /μl)	HB (g/dl)	HTO (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	PLAQ (10 ³ /μl)	PPT (g/dl)
GR (10⁶/μl)								
HB (g/dl)	0,671*							
HTO (%)	0,873*	0,727*						
VCM (fl)	-0,262*	0,112	0,176*					
HCM (pg)	-0,599*	0,117	-0,375*	0,542*				
CHCM (g/dl)	-0,412*	0,103	0,528*	-0,094	0,711*			
PLAQ (10³/μl)	0,333*	0,057	0,369*	0,003	-0,370*	-0,385*		
PPT (g/dl)	0,024*	0,208	0,078	0,155	0,189	0,107*	0,067	

Tabla 82.- Coeficientes de correlación entre los parámetros eritrocitarios, las plaquetas y las proteínas plasmáticas totales en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	GB (cél/μl)	LINF (cél/μl)	NFS (cél/μl)	NFS SEG (cél/μl)	NFS BANDA (cél/μl)	EOFS (cél/μl)	MON (cél/μl)	BSF (cél/μl)
GR (10 ⁶ /μl)	0,141	0,244	-0,063	-0,070	0,089	0,013	0,223	-0,014
HB (g/dl)	0,028	0,026	-0,072	-0,073	-0,022	0,141	0,206	0,015
HTO (%)	0,026	0,042	-0,129	-0,134	0,031	-0,008	0,236	-0,061
VCM (fl)	-0,207	-0,432*	-0,122	-0,114	-0,123	-0,052	-0,002	-0,083
HCM (pg)	-0,104	-0,317*	0,015	0,025	-0,127	0,181	-0,067	0,031
CHCM (g/dl)	0,027	-0,052	0,074	0,081	-0,065	0,238	-0,072	0,081
PLAQ (10 ³ /μl)	0,231	0,258*	-0,003	-0,004	0,037	-0,037	0,128	-0,116
PPT (g/dl)	0,167	0,088	0,010	0,005	0,009	0,042	-0,094	0,180

Tabla 83.- Coeficientes de correlación entre los parámetros eritrocitarios, plaquetas, proteínas plasmáticas y valores absolutos leucocitarios en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	GB (%)	LINF (%)	NFS (%)	NFS SEG	NFS BANDA	EOFS (%)	MON (%)	BSF (%)
GR (10 ⁶ /μl)	0,301*	-0,206	-0,211	0,111	0,054	0,185	0,017	-0,223
HB (g/dl)	0,124	-0,145	-0,145	-0,021	0,159	0,203	0,015	-0,121
HTO (%)	0,158	-0,150	-0,153	0,066	0,036	0,227	0,063	-0,179
VCM (fl)	-0,234	0,133	0,138	-0,117	0,045	0,082	0,081	0,111
HCM (pg)	-0,260	0,158	0,165	-0,152	0,279	-0,003	0,034	0,194
CHCM (g/dl)	-0,045	0,063	0,068	-0,114	0,283	-0,060	0,085	0,132
PLAQ (10 ³ /μl)	0,219	-0,129	-0,137	0,107	0,114	0,083	0,119	-0,165
PPT (g/dl)	0,111	-0,128	-0,136	0,043	0,041	-0,112	0,178	-0,134

Tabla 84.- Coeficientes de correlación entre los parámetros eritrocitarios, plaquetas, proteínas plasmáticas y los valores porcentuales leucocitarios en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	CD2	LINF T	Th	Tc	CD4/CD8	LB	NK
	(%)	(%)	(%)	(%)		(%)	(%)
GR (10⁶/μl)	-0,009	-0,024	-0,135	0,107	-0,132	-0,040	0,114
HB	0,012	0,012	-0,106	0,110	-0,116	-0,035	-0,012
(g/dl)							
HTO	0,098	-0,004	-0,080	0,224	-0,193	0,032	0,041
(%)							
VCM	0,191	0,001	0,141	0,203	-0,035	0,132	-0,174
(fl)							
HCM	0,082	0,050	0,127	0,058	0,079	0,065	-0,161
(pg)							
CHCM	-0,062	0,032	0,034	-0,090	0,148	-0,069	-0,030
(g/dl)							
PLAQ (10³/μl)	0,054	0,017	-0,106	0,133	-0,127	0,019	0,168
PPT	-0,149	0,073	-0,080	-0,093	0,076	0,015	-0,021
(g/dl)							

Tabla 85.- Coeficientes de correlación entre los parámetros eritrocitarios, plaquetas, proteínas plasmáticas y los valores porcentuales linfocitarios en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	CD2 (cél/μl)	LINF T (cél/μl)	Th (cél/μl)	Tc (cél/μl)	LB (cél/μl)	NK (cél/μl)
GR (10⁶/μl)	0,257*	0,245	0,202	0,275*	0,156	0,244*
HB (g/dl)	0,019	0,029	-0,008	0,108	-0,030	0,034
HTO (%)	0,078	0,074	0,019	0,180	0,028	0,095
VCM (fl)	0,400*	-0,382*	0,384*	-0,244	-0,300*	-0,346*
HCM (pg)	0,343*	-0,311*	0,299*	-0,254	-0,250	-0,319*
CHCM (g/dl)	-0,110	-0,086	-0,066	-0,120	-0,092	-0,119
PLAQ (10³/μl)	0,277	0,241	0,200	0,266	0,173	0,246
PPT (g/dl)	0,095	0,075	0,093	0,031	0,091	0,080

Tabla 86.- Coeficientes de correlación entre los parámetros eritrocitarios, plaquetas, proteínas plasmáticas y los valores absolutos linfocitarios en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	GB (cél/μl)	LINF (cél/μl)	NFS (cél/μl)	NFS SEG (cél/μl)	NFS BANDA (cél/μl)	EOFS (cél/μl)	MON (cél/μl)	BSF (cél/μl)
GB (cél/μl)								
LINF (cél/μl)	0,76*							
NFS (cél/μl)	0,606*	0,165						
NFS SEG (cél/μl)	0,603*	0,165	0,998*					
NFS BANDA (cél/μl)	0,143	0,015	0,131	0,079				
EOFS (cél/μl)	0,102	0,088	0,023	0,019	0,066			
MON (cél/μl)	0,174	0,188	0,016	0,012	0,048	0,024		
BSF (cél/μl)	-0,065	-0,032	-0,015	-0,019	-0,014	0,016	-0,035	

Tabla 87.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos leucocitarios en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	LINF (%)	NFS (%)	NFS SEG	NFS BANDA	EOFS (%)	MON (%)	BSF (%)	N/L
GB (cél/μl)	0,136	-0,07	-0,07	0,1	-0,101	0,026	-0,072	-0,128
LINF (cél/μl)	0,637*	-0,440*	0,437*	-0,011	-0,101	0,035	-0,039	-0,482
NFS (cél/μl)	-0,356*	0,638*	0,637*	0,101	-0,090	-0,036	-0,019	0,619
NFS SEG (cél/μl)	-0,350*	0,638*	0,640*	0,049	-0,091	-0,042	-0,023	0,619
NFS BANDA (cél/μl)	-0,090	0,092	0,031	0,983*	0,014	0,095	-0,016	0,078
EOFS (cél/μl)	-0,001	-0,046	0,053	0,068	0,953*	0,005	0,015	0,018
MON (cél/μl)	0,087	-0,071	0,073	0,036	-0,053	0,965*	-0,037	-0,034
BSF (cél/μl)	0,001	-0,042	0,035	-0,024	0,016	-0,055	1,000*	-0,029

Tabla 88.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos y porcentuales leucocitarios en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	LINF	NFS	NFS SEG	NFS BND	EOFS	MON	BSF
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
LINF (%)							
NFS (%)	-0,657*						
NFS SEG (%)	-0,650	0,997					
NFS BANDA (%)	-0,170	0,124	0,057				
EOFS (%)	0,037	-0,020	0,089	-0,024			
MON (%)	0,040	-0,010	0,089	-0,017	-0,015		
BSF (%)	0,001	-0,040	0,025	-0,034	0,018	-0,056	
COCIENTE	0,643*	0,982*	0,978*	0,097	0,066	0,050	-0,027
N/L							

Tabla 89.- Coeficientes de correlación entre los valores porcentuales leucocitarios en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	CD2	Th	Tc	LINF T	CD4/CD8	LB	NK
	(%)	(%)	(%)	(%)		(%)	(%)
GB (cél/μl)	-0,288	-0,245	-0,139	-0,133	0,032	0,031	0,069
LINF (cél/μl)	-0,312	-0,287	-0,237	-0,098	0,009	-0,176	0,286
NFS (cél/μl)	-0,171	-0,084	-0,123	-0,152	0,06	0,121	-0,061
NFS SEG (cél/μl)	-0,175	-0,086	-0,131	-0,153	0,066	0,116	-0,059
NFS BANDA (cél/μl)	-0,028	-0,054	0,064	0,028	-0,064	0,06	-0,01
EOFS (cél/μl)	-0,02	-0,064	0,01	0,057	-0,051	-0,032	0,021
MON (cél/μl)	0,104	-0,041	0,079	-0,017	-0,122	0,057	0,165
BSF (cél/μl)	-0,134	-0,002	-0,098	-0,084	0,066	-0,05	-0,004

Tabla 90.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos leucocitarios y porcentuales linfocitarios en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	CD2 (cél/μl)	Th (cél/μl)	Tc (cél/μl)	LINF T (cél/μl)	LB (cél/μl)	NK (cél/μl)
GB (cél/μl)	0,67	0,635	0,543	0,661	0,617	0,446
LINF (cél/μl)	0,944	0,887	0,729	0,919	0,72	0,691
NFS (cél/μl)	0,164	0,182	0,106	0,171	0,271	0,058
NFS BANDA (cél/μl)	0,054	0,05	0,036	0,057	0,093	0,067
NFS SEG (cél/μl)	0,163	0,18	0,103	0,169	0,269	0,059
EOFS (cél/μl)	0,064	0,061	0,097	0,085	0,038	0,047
MON (cél/μl)	0,14	0,11	0,15	0,143	0,097	0,137
BSF (cél/μl)	-0,065	-0,041	-0,108	-0,063	-0,039	-0,061

Tabla 91.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos leucocitarios y linfocitarios en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	CD2 (cél/μl)	Th (cél/μl)	Tc (cél/μl)	LINF T (cél/μl)	LB (cél/μl)	NK (cél/μl)
LINF (%)	0,648*	0,639*	0,459*	0,646*	0,382*	0,549*
NFS (%)	-0,443^	-0,415*	0,365*	-0,436*	-0,238	-0,369*
NFS BANDA (%)	-0,442*	-0,413*	0,362*	-0,433*	-0,237	-0,367*
NFS SEG (%)	0,041	0,03	0,042	0,036	0,101	0,001
EOFS (%)	-0,109	-0,094	-0,066	-0,088	-0,121	-0,074
MON (%)	0,015	0,008	0,016	0,018	-0,021	0,056
BSF (%)	-0,07	-0,046	-0,112	-0,067	-0,043	-0,067
COCIENTE N/L	-0,463*	-0,416*	0,405*	-0,451*	-0,271	-0,386*

Tabla 92.- Coeficientes de correlación entre los valores porcentuales leucocitarios y absolutos linfocitarios en valores absolutos en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	CD2	Th	Tc	LINF T	CD4/CD8	LB	NK
	(%)	(%)	(%)	(%)		(%)	(%)
LINF (%)	-0,08	-0,052	-0,177	-0,027	0,132	-0,382	0,249
NFS (%)	0,066	0,119	0,079	-0,041	0,025	0,196	-0,126
NFS BANDA (%)	0,069	0,123	0,075	-0,041	0,029	0,196	-0,121
NFS SEG (%)	-0,032	-0,082	0,08	0,043	-0,104	0,125	-0,033
EOFS (%)	0,05	0,028	0,02	0,114	-0,005	-0,023	-0,028
MON (%)	0,186	0,057	0,072	0	-0,063	0,067	0,154
BSF (%)	-0,13	0,003	-0,095	-0,082	0,066	-0,048	-0,009
COCIENTE N/L	0,126	0,198	0,063	-0,041	0,082	0,184	-0,133

Tabla 93.- Coeficientes de correlación entre los valores porcentuales leucocitarios y linfocitarios en 159 animales PRE (*: significativo $p < 0,05$).

	CD2 (cél/μl)	Th (cél/μl)	Tc (cél/μl)	LINF T (cél/μl)	LB (cél/μl)	NK (cél/μl)
CD2 (cél/μl)						
Linf Th (cél/μl)	0,951*					
Linf Tc (cél/μl)	0,802*	0,638*				
Linf T (cél/μl)	0,986*	0,968*	0,803*			
LB (cél/μl)	0,626*	0,592*	0,463*	0,597*		
NK (cél/μl)	0,717*	0,575*	0,493*	0,602*	0,461	

Tabla 94.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos linfocitarios en 159 animales PRE (*: significativo a $p < 0,05$).

	CD2 (cél/μl)	Th (cél/μl)	Tc (cél/μl)	LINF T (cél/μl)	LB (cél/μl)	NK (cél/μl)
CD2 (%)	-0,085	-0,067	-0,025	-0,055	-0,543	-0,08
Th (%)	-0,149	0,069	-0,365	-0,059	-0,412	-0,351
Tc (%)	-0,119	-0,282	0,374*	-0,102	-0,345	-0,229
LINF T (%)	-0,116	-0,127	-0,017	-0,101	-0,162	-0,058
CD4/CD8	-0,033	0,221	-0,575	-0,006	0,037	-0,006
LB (%)	-0,286	-0,315	-0,223	-0,315	0,466*	-0,211
NK (%)	0,271	0,157	0,124	0,17	0,062	0,706*

Tabla 95.- Coeficientes de correlación entre los valores porcentuales y absolutos linfocitarios en 159 animales PRE (*: significativo a $p < 0,05$).

	CD2	Th	Tc	LINF T	CD4/CD8	LB	NK
	(%)	(%)	(%)	(%)		(%)	(%)
CD2 (%)							
Th (%)	0,718*						
Tc (%)	0,501*	0,059					
LINF T (%)	0,027	-0,065	0,111				
CD4/CD8	-0,034	0,517*	0,752*	-0,106			
LB (%)	-0,282	-0,189	-0,075	-0,034	-0,009		
NK (%)	0,145	-0,177	-0,123	0,006	0,012	-0,173	

Tabla 96.- Coeficientes de correlación entre los valores porcentuales linfocitarios en 159 animales PRE (*: significativo a $p < 0,05$).

5.-DISCUSIÓN

En la presente investigación se han evaluado los valores basales hematológicos y las poblaciones linfocitarias en 159 animales PRE. A lo largo de la discusión se compararán los datos obtenidos con los presentados en la literatura para diversas razas equinas. Asimismo, se valorará la influencia de la edad y el sexo sobre dichos parámetros, proponiéndose hipótesis para explicar los resultados obtenidos e igualmente, se subrayará la importancia clínica derivada de los cambios analíticos asociados a los factores anteriormente descritos.

5.1.-VALORES HEMATOLÓGICOS DE REFERENCIA EN EL CABALLO PRE

Este trabajo de investigación representa el primer estudio laboratorial sanguíneo llevado a cabo en caballos PRE para definir valores hematológicos de referencia, considerando de forma concreta la edad y el sexo de cada uno de los animales. El hecho de disponer de valores de referencia ajustados para una raza concreta en función de la edad y el sexo aporta una información extremadamente interesante al clínico de équidos, ya que se ha mostrado que la variabilidad de los parámetros hematológicos se reduce sustancialmente, cuando se dispone de un rango de referencia estrecho al considerar de forma independiente determinados factores como raza, edad y sexo (Rose y Hodgson, 1994). Además, dichos resultados podrían servir para establecer un diagnóstico hematológico correcto, precisar las posibles repercusiones sistémicas de una enfermedad, así como valorar el pronóstico y la respuesta al tratamiento.

5.1.1.-VALORES DE REFERENCIA DEL ERITROGRAMA, NÚMERO DE PLAQUETAS Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES EN EL CABALLO PRE: INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL SEXO

5.1.1.1.-ERITROCITOS

El número medio de eritrocitos en la totalidad de la población y en cada uno de los grupos de edad y sexo quedó comprendido dentro del intervalo de referencia determinado por diversos autores para équidos adultos sanos (Eikmeier, 1982; Tyler y cols., 1987; Blood y Radostic, 1989; Latimer y Rakich, 1992; Lassen y Swardson, 1995; Messer, 1995; Kramer, 2000) y fue ligeramente superior al presentado en caballos Lipizianos (Čebulj-Kadunc y cols., 2002). Cabe destacar que el número medio de eritrocitos en sangre en

caballos PRE con edades comprendidas entre 4 y 15 años y en caballos Lusitanos, fueron muy similares a los obtenidos en la presente investigación (Rubio y cols., 1994, a, b; 1995; Escribano y cols., 1995, c; Gouveia, 2003). Los investigadores citados analizaron diversas poblaciones de caballos PRE, de sexo macho y en el caso de Rubio y cols. (1994, a, b; 1995) y Escribano y cols. (1995, c), pertenecientes a distinta región geográfica que los animales introducidos en la presente investigación. Estos resultados podrían indicar la escasa influencia del sexo sobre los parámetros hematológicos considerados y el carácter homogéneo de la Raza Española.

La acción limitada del sexo sobre el número de glóbulos rojos circulantes, en principio, parece conflictiva. Se ha demostrado que los machos, debido a la influencia de los andrógenos, concretamente de la testosterona, poseen un volumen sanguíneo total superior (Persson, 1967; 1983; 1997). No obstante, no existe una correlación directa entre el número total de hematíes y el número circulante, debido a la importancia cuantitativa del reservorio esplénico en el rendimiento deportivo, similar en ambos sexos, debido al mecanismo compensatorio de las hembras y de los machos castrados, creando una circulación hipocinética, con una mayor extracción de oxígeno por parte del músculo (Persson y Ullberg, 1974). Por otro lado, Ponce y cols. (1979) trabajando con caballos PSI mostraron que no había diferencias en el número de eritrocitos con el sexo, aunque al comparar la eritrocitemia en reposo y después de la carrera, los valores eran superiores en hembras que en machos, debido a la mayor capacidad de almacenamiento de eritrocitos por parte del bazo. Un segundo punto a considerar sería la diferencia de estrés inducido por la venipunción en los dos sexos. De forma genérica, los jinetes consideran que los machos enteros y las hembras en diversos momentos de su ciclo reproductor, concretamente durante el estro, manifiestan un comportamiento más excitable. En conocimiento de los autores, no existe ninguna investigación que analice la posible existencia de diferencias en la activación del eje simpático-adrenal en los dos sexos durante las extracciones sanguíneas.

Sin embargo, algunas investigaciones realizadas en caballos de diversas razas han documentado datos medios de hematíes superiores a los de la presente investigación, como PSI, Árabe, Criollo, Standardbred (Rose y cols., 1983; Jain, 1993; Lassen y Swardson, 1995; Car, 2000; Lacerda y cols., 2006) y yeguas PRE de Estirpe Cartujana (Satué, 2004). La variedad racial a la que pertenece el animal tiene un peso específico notable en la génesis de las modificaciones eritrocitarias. Dicha variedad viene fundamentalmente recogida en dos grandes grupos de razas, de sangre caliente (*hot-blooded*) y de sangre fría (*cold-blooded*). La variedad de sangre caliente comprende a la

mayor parte de los caballos de deporte, como PSI, Árabes, Angloárabes, Appaloosas, Cuartos de Milla, trotones Standardbred. La variedad de sangre fría recoge a las razas pesadas, como Percherón, Clydesdale y las razas de ponies (McLeod y Ponder, 1946; Coles, 1974; Parry y Brobst, 1997; Satué, 2004; Cuenca y Pastor, 2006). Se estima que el número de eritrocitos, la concentración de hemoglobina y el valor hematócrito son mayores en el conjunto de razas de sangre caliente en comparación con las de sangre fría (Morris, 2000). No está claramente definido en qué variedad se encuadra el caballo PRE, aunque existe un estudio que establece mayor proximidad de los parámetros eritrocitarios a la variedad de sangre fría, por tratarse de una raza con temperamento linfático (Satué, 2004).

Aunque el análisis estadístico no mostró variaciones en función del sexo, se han observado modificaciones significativas asociadas a la edad en la mayoría de los parámetros analizados. Así, la edad indujo una reducción significativa del número de eritrocitos circulantes en los équidos de la presente investigación. En general, se acepta que los animales de edad avanzada se caracterizan por tener una masa eritrocitaria relativa inferior a la de los animales más jóvenes, como se ha demostrado en la raza Lipiziana (Čebulj-Kadunc y cols., 2002), si bien otro estudio realizado por McFarlane y cols. (1998) ha mostrado una tendencia hacia el descenso en este parámetro, sin lograr la significación estadística. Esta dinámica eritrocitaria con la edad se ha observado en seres humanos (Williams, 1980; Kubota y cols., 1991; Takubo y Tatsumi, 2000; Martin y cols., 2001) y otras especies animales, como vacuno (Pereira y cols., 1987; Monke y cols., 1998), ovino (Ramos y cols., 1992), gatos (Nakai y cols., 1992), perros (Mosier, 1989; Harper y cols., 2003) y asnos (Zinkl y cols., 1990). Allen y Archer (1976) propusieron que la disminución del recuento de eritrocitos con la edad se acompaña de un incremento en la concentración de hemoglobina y un aumento compensatorio del tamaño eritrocitario.

Sin embargo, a pesar de esta tendencia decreciente de la eritrocitemia, se observó un incremento del número de eritrocitos en el grupo de animales con edades comprendidas entre 2 y 3 años. Además, estas mismas modificaciones se mantuvieron cuando se consideró el sexo de los animales, haciéndose más manifiestas en machos que en hembras. Dicha dinámica eritrocitaria también había sido descrita previamente en un estudio realizado en animales de sangre caliente (Schalm y cols., 1975). Sin embargo, en caballos Lipizianos no se evidenció este tipo de comportamiento, existiendo una disminución constante del número de hematíes en animales desde 1 a 3 años de edad, estabilizándose posteriormente (Čebulj-Kadunc y cols., 2002).

Una de las posibles causas que podrían originar este aumento del número de eritrocitos en los animales del grupo de edad B podría ser el grado de excitación y estrés durante la extracción de la muestra (Rose y Hodgson, 1994). Se conoce que la excitación del animal conlleva a la elevación del número de glóbulos rojos circulantes, de la concentración de hemoglobina y del valor hematocrito como consecuencia de la esplenotomía, inducida por la liberación de adrenalina y noradrenalina (Gohary y Bickhardt, 1979; Kurosawa y cols., 1998; Nagata y cols., 1999). El principal factor limitante del estrés fisiológico inducido en estos animales es el tiempo necesario para la colección de sangre. Está demostrado que una venipunción de duración superior a 30 segundos altera significativamente el hemograma (Persson, 1967; Nagata y cols., 1999). El mayor nivel de estrés en este grupo de animales podría deberse al escaso contacto mantenido con el hombre en las explotaciones en las que se llevó a cabo este estudio de investigación, como previamente mostraron Plotka y cols. (1988) en équidos salvajes.

El descenso del número de hematíes a partir de los 3 años de edad confirmó los resultados descritos previamente en diversas razas equinas, como Lipiziana (Cebulj-Kadunc y cols., 2002), PRE de Estirpe Cartujana (Satué, 2004), équidos salvajes (Ralston y cols., 1988) y otras razas (Schalm y cols., 1975; McFarlane y cols., 1998). Esta misma evolución de los parámetros eritrocitarios se ha observado en seres humanos (Williams 1980; Kubota y cols., 1991, Takubo y Tatsumi, 2000; Martín y cols., 2001) y diversas especies domésticas, como asnos (Zinkl y cols., 1990), cánidos (Harper y cols., 2003), félidos (Nakai y cols., 1992), bóvidos (Monke y cols., 1998) y óvidos (Ramos y cols., 1992). No obstante, hay que citar que no todos los investigadores están de acuerdo con estas observaciones anteriores. De hecho, Uchiyama y cols. (1985) describieron un aumento del número de hematíes, de la concentración de hemoglobina y del valor hematocrito con la edad en el perro, mientras que Lowseth y cols. (1990) mostraron que la edad no era un factor condicionante del eritrograma en esta misma especie.

5.1.1.2.-CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA

La concentración de hemoglobina media en los animales de la presente investigación quedó comprendida dentro del rango de referencia establecido para équidos adultos sanos de diversas razas (Tyler y cols., 1987; Blood y Radostic, 1989; Latimer y Rakich 1992; Lassen y Swardson, 1995; Messer, 1995; Kramer, 2000), fue similar a la descrita en PSI (Rose y Hodgson, 1994), trotón Standardbred (Harvey y cols., 1984; Jain, 1986), Criollo (Lacerda y cols., 2006), Cuarto de Milla (Kastner y cols., 1999), Apaloosa

(Harvey y cols., 1984), PRE (Riber y cols., 1995; Rubio y cols., 1995) y Árabe (Knill y cols., 1969; Schalm y cols., 1975). Si bien, se han presentado valores medios inferiores en équidos de sangre fría, como percherones (Coles, 1974; Jain, 1986; 1993) y yeguas PRE de Estirpe Cartujana (Satué, 2004).

En comparación con los datos medios aportados previamente para el caballo PRE, los animales de la presente investigación se caracterizaron por valores medios de hemoglobina inferiores a los mostrados para machos de la misma raza (Rubio, M.D. Comunicación personal). Una explicación razonable para esta divergencia de resultados podría ser el efecto del ejercicio programado. Los animales analizados por Rubio, M.D. (Comunicación personal) eran machos sometidos a un programa de entrenamiento. Se sabe que la actividad física que desempeña el caballo PRE condiciona una mejoría de su capacidad aerobia (Agüera y cols., 1994; Escribano y cols., 1995, b; Muñoz y cols., 1999). Quizás esta adaptación al entrenamiento haya condicionado, en cierto grado, una concentración mayor de hemoglobina en estos animales, en comparación con los équidos de la presente investigación. El hecho de disponer de una cantidad superior de hemoglobina podría ser beneficioso para el rendimiento físico, al acompañarse de una potenciación en el transporte de oxígeno (Persson, 1983; Muñoz y cols., 1999).

La dinámica que experimentó la concentración de hemoglobina con la edad fue similar a la del número de eritrocitos, aunque en este caso no se alcanzó la significación estadística. Esta misma tendencia también fue descrita previamente en animales de sangre caliente (Schalm y cols., 1975).

Se han observado variaciones significativas en la concentración de hemoglobina en función del sexo, describiéndose niveles superiores en machos que en hembras. Esta diferencia estuvo presente en todos los grupos de edad, si bien sólo fue significativa en los animales con edades comprendidas entre 4 y 7 años. En la literatura existen descripciones aparentemente contradictorias respecto a la influencia del sexo en la concentración de hemoglobina. Así, mientras que unos autores observaron en caballos PSI y Cuartos de Milla que el número de eritrocitos, la concentración de hemoglobina y el valor hematocrito eran superiores en hembras que en machos (Schalm, 1964; Schalm y cols., 1975; Gill y Rastawicka, 1986), otros autores en équidos de raza Lipiziana y trotones Standardbred, estimaron valores medios superiores en machos (Persson y Ullberg, 1974; Cebulj-Kadunc y cols., 2002). Estos últimos investigadores asociaron este aumento de la concentración de hemoglobina en machos a la acción de los andrógenos sobre la eritropoyesis.

5.1.1.3.-VALOR HEMATÓCRITO

El valor hematocrito medio para la totalidad de la población de animales PRE analizada también estuvo comprendido dentro de los valores de referencia establecidos para équidos adultos sanos (Tyler y cols., 1987; Blood y Radostic, 1989; Latimer y Rakich, 1992; Lassen y Swardson, 1995; Messer, 1995; Kramer, 2000; Satué, 2004), aunque fue inferior a los datos presentados en caballos PSI (Irvine, 1958; Mason y Kwok, 1977; Revington, 1983), trotones Standardbred, Cuartos de Milla, Criollo, Apaloosa, Árabe (Knill y cols., 1969; Coles, 1974; Schalm y Carlson, 1982; Jain, 1993; Lacerda y cols., 2006) y PRE (Rubio y cols., 1994, a, b; 1995; Escribano y cols., 1995, b y c). Cabe destacar que los datos presentados por Rubio y cols. (1994, a, b; 1995) y Escribano y cols. (1995, b, c) procedían en su mayoría de animales de sexo macho en respuesta a un ejercicio programado o durante un entrenamiento. Se conoce que el acondicionamiento deportivo conlleva al aumento de los valores basales del número de glóbulos rojos, de la concentración de hemoglobina y del valor hematocrito (Stewart y cols., 1970; Stewart y Steel, 1974; Marbach, 1978). Por el contrario, se han descrito niveles inferiores en équidos PRE (Riber y cols., 1995), si bien, este último estudio fue realizado con un número reducido de animales y con una media de edad ligeramente superior a la de los animales incluidos en el presente estudio.

No se han observado diferencias significativas del valor hematocrito asociadas a la edad, aunque la evolución de dicho parámetro es similar a la que experimentó el número de eritrocitos y la concentración de hemoglobina. El comportamiento de ambos parámetros podría deberse a que el aumento del VCM habría atenuado el descenso del número de glóbulos rojos entre los animales de mayor edad y los animales más jóvenes, como fue mostrado previamente por Schalm y cols. (1975) en animales de sangre caliente. Estos investigadores presentaron valores superiores de valor hematocrito en animales de dos años de edad, aunque otros autores, en caballos Lipizanos observaron niveles máximos en équidos mayores de cuatro años (Cebulj-Kadunc y cols., 2002).

Aunque en el presente estudio de investigación no se han mostrado diferencias significativas en función del sexo en el número de glóbulos rojos y el valor hematocrito, al igual que ha sido observado en caballos Lipizianos (Čebulj-Kadunc y cols., 2002), en otras razas equinas se han documentado valores significativamente superiores en machos que en hembras (Schalm y cols., 1975).

Tanto el número de glóbulos rojos, como en la concentración de hemoglobina y el valor hematocrito alcanzaron su valor máximo en los animales con edades comprendidas

entre 2 y 3 años. Se conoce que estos parámetros se elevan en respuesta al estrés, como sucede en el manejo en el momento de la venipunción (Carlson, 1987; Plotka y cols., 1988). Por este motivo, el incremento del valor hematocrito en este grupo de edad podría asociarse al estrés de la misma forma que se ha discutido en el apartado correspondiente al número de glóbulos rojos. De forma general, en las yeguas de PRE los équidos no comienzan la doma hasta los tres años y medio de edad, aproximadamente, por lo que cabría suponer que los animales de 1 a 2 años y de 2 a 3 años habrían estado menos sometidos a la influencia de la mano del hombre, y en consecuencia, podrían ser más fácilmente estresables que otros. De esta forma, los valores obtenidos para este parámetro en los animales mayores de 4 años podría ser debido a la adaptación a la aproximación y manejo por el ser humano tras iniciar el proceso de doma, con un menor grado de esplenocntracción en respuesta a la venipunción, así como al aumento leve del volumen plasmático dando lugar a un cierto grado de hemodilución (McKeever y cols., 2002). Cabe destacar que los animales incluidos en la presente investigación procedían de ganaderías selectas en las que se realizaban controles parasitológicos e infecciosos reglados, por lo que en todos los casos, se descartó la existencia de signos clínicos o hallazgos hematológicos compatibles con anemia durante el periodo de tiempo en el que se llevó a cabo la investigación.

5.1.1.4.-VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO

El VCM en la población de animales de la presente investigación presentó valores medios inferiores a los descritos para caballos PSI (Irvine, 1958; Revington, 1983, Rose y Hodgson, 1994) y Lipizianos (Čebulj-Kadunc y cols., 2002), superiores a los datos obtenidos en PSI (Mason y Kwok, 1977; Schalm y cols., 1975; Lassen y Swardson, 1995), trotones Standardbred (Harvey y Hambright, 1985; Jain, 1986), Cuarto de Milla (Kastner y cols., 1999) y Apaloosa (Harvey y Hambright, 1985) y similares a los mostrados en animales PRE (Agüera y cols., 1994; Rubio y cols 1994, a, b; 1995; Escribano, 1994; Escribano y cols., 1995, a; Plaschka y cols., 1996; Muñoz 1997; Manso y cols., 1998; Satué, 2004). Es interesante destacar que a pesar de las diferencias existentes entre autores en relación al número de eritrocitos y al valor hematocrito en el caballo PRE, estas divergencias no se hicieron patentes a la hora de evaluar este parámetro. Por otro lado, en caballos Árabes y PRE se ha observado una ligera disminución del VCM durante el ejercicio (Rubio y cols., 1995).

Desde el punto de vista clínico existen dos importantes factores a considerar en la interpretación de este índice: la liberación de hematíes tras la esplenotomía y la salida a circulación periférica de células jóvenes en respuesta a una situación de anemia regenerativa (Carlson, 1987; Car, 2000). De hecho, en respuesta al incremento de las concentraciones circulantes de las hormonas simpáticas, la población de hematíes microcíticos se incrementa (Persson, 1967; 1997).

En relación al segundo factor, resulta oportuno especificar que, en ninguna de las muestras sanguíneas analizadas, se encontraron características laboratoriales compatibles con anemia. No obstante, se conoce que en los équidos, la salida de células rojas inmaduras a la circulación periférica no es un proceso común en situaciones de anemia regenerativa (Schalm y Carlson, 1982). Pese a estas aseveraciones, algunos autores consideran que el aumento de VCM refleja la naturaleza regenerativa del proceso subyacente, bien fisiológico, bien patológico (Morris, 1998).

Respecto a la evolución del VCM con la edad, se ha observado una tendencia hacia el incremento desde el primer al tercer año de edad, aunque el aumento significativo se produce exclusivamente en los animales mayores de 4 años. Esta misma dinámica también se había observado en otros estudios de investigación realizados en animales de sangre caliente (Tyler y cols., 1987; Rose y Hodgson, 1994; Lassen y Swardson, 1995). El incremento del tamaño de los glóbulos rojos parece ser un hallazgo constante asociado a la edad en équidos (Ralston y cols., 1988; MacFarlane y cols., 1998; Cebulj-Kadunc y cols., 2002). Este hecho también se ha descrito en el hombre (Araki y Rifkind, 1980) y otras especies animales como, bóvidos (Pereira y cols., 1987) y óvidos (Ramos y cols., 1992).

El incremento del VCM podría reflejar cambios en la maduración celular del eritrocito. En personas, el aumento del VCM en individuos de edad avanzada se ha asociado a un déficit de Vitamina B₁₂ y de ácido fólico (Stott y cols., 1997). De forma genérica, los équidos no suelen ser deficitarios en vitamina B₁₂ y ácido fólico. La única fuente natural de vitamina B₁₂ es la síntesis bacteriana a nivel del tracto digestivo. Se ha especulado que el mayor VCM observado en équidos geriátricos podría ser consecuencia de una capacidad digestiva más limitada que los animales jóvenes, restringiendo su potencial de absorción y producción de ciertos nutrientes (MacFarlane y cols., 1998). Algunos investigadores consideran que el aumento del VCM refleja la naturaleza regenerativa de un proceso subyacente, bien fisiológico o patológico (Morris, 1998). Sin embargo, a pesar de que en el presente estudio no existen animales que puedan considerarse geriátricos, se ha observado la misma tendencia en todos los grupos de

edad, por lo que posiblemente existan otras razones aún desconocidas que puedan explicar este hecho.

5.1.1.5.-HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

Los valores medios obtenidos para el índice HCM en los animales de la presente investigación fueron superiores a los descritos previamente en la literatura para caballos PSI (Rose y Hodgson, 1994), Árabes (Knill y cols., 1969), caballos trotones Standardbred (Harvey y Hambricht, 1985; Jain, 1986), Cuarto de Milla (Kastner y cols., 1999) y Apaloosa (Harvey y Hambricht, 1985), similares a los mostrados en otros estudios realizados en caballos PRE (Agüera y cols., 1994; Escribano, 1994; Rubio y cols., 1994, a, b; 1995; Escribano y cols., 1995, c) e inferiores a los obtenidos en yeguas PRE de Estirpe Cartujana (Satué, 2004). Posiblemente, las razas equinas de deporte posean mayor concentración de hemoglobina, hecho que habría condicionado valores más elevados de HCM.

Resulta factible preguntarse si el valor mayor de HCM para estas razas equinas, en comparación con los équidos de la presente investigación derivaría de la intensidad de la esplenocntracción asociada a la venipunción, ya que según Persson (1967), el aumento en las concentraciones circulantes de catecolaminas induce la liberación de eritrocitos hiperocrómicos desde el bazo. No obstante, la característica de hiperocromía posiblemente represente la respuesta al incremento de hematíes microcíticos. Esta hipótesis, sin embargo, no pudo ser aceptada ni refutada en la presente investigación, ya que no se ha podido determinar la importancia cuantitativa de la activación del eje simpático-adrenal.

Aunque el sexo no ejerció influencia sobre este parámetro, la edad indujo modificaciones similares al VCM en el colectivo animal analizado. Este hecho había sido mostrado previamente en équidos (Satué, 2004), y según el análisis de correlación, probablemente refleje el mayor tamaño de los hematíes y no una elevación verdadera de este índice.

5.1.1.6.-CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

El valor medio de CHCM fue similar al obtenido en la mayoría de los estudios de investigación realizados en diversas razas equinas (Schalm, 1964, Revington, 1983; Jain,

1993; Rose y Hodgson, 1994; Eades y Bounous, 1997) y superior al descrito yeguas PRE de Estirpe Cartujana (Satué, 2004). Según mostró el análisis de correlación, no se ha podido precisar si el condicionante de las variaciones en este índice eritrocitario fue la concentración de hemoglobina o el valor hematócrito. Este parámetro no se modificó cuando se consideraron el sexo y la edad de los animales.

Cabe destacar que existen diversos factores que condicionan el eritrograma en équidos, como la raza, sexo, edad, estado fisiológico, alimentación, momento de extracción de las muestras, aptitud, temperamento.... (Archer y Jeffcott, 1977; Snow y cols., 1983; Jain, 1993; Rose y Hodgson, 1994; Car, 2000). La influencia de algunos de estos factores ha sido minimizada en la presente investigación, ya que todos los animales fueron sometidos al mismo régimen de manejo y alimentación y la obtención de las muestras de sangre se llevó a cabo con la misma pauta temporal. La homogeneización de las condiciones de toma de muestra y manejo de las extracciones sanguíneas ocasionó una disminución de las desviaciones estándar y por tanto, la obtención de resultados más precisos y fiables dentro de cada uno de los grupos, aunque no deben obviarse las diferencias interindividuales.

5.1.1.7.-PLAQUETAS

El rango de referencia para el número de plaquetas según este estudio de investigación fue de 71.000 a 330.000/mm³, ligeramente inferior a los presentados por otros autores, como Sellon (1998) y Mandell (2000) y superior a los mostrados por Lumsden y cols. (1980), Schalm y Carlson (1982), Jain (1986, 1993), Messer (1995), Eades y Bounous (1997) y Satué (2004).

Cabe destacar, que la metodología empleada para la determinación de este último parámetro, unida a la tendencia a la agregación plaquetaria inducida al utilizar EDTA para llevar a cabo el análisis en contador semiautomático podría haber ocasionado la elevada desviación estándar de los resultados obtenidos (Pastor y cols., 1998; Satué, 2004).

En la presente investigación se observó que los équidos más jóvenes presentaron un número periférico de trombocitos superior a los animales de mayor edad. Estos resultados coincidieron con los expuestos por McFarlane y cols. (1998) y Satué (2004). Estos investigadores describieron una tendencia a la trombocitopenia relativa en caballos viejos, sin alcanzar diferencias significativas con los animales más jóvenes. En general, el efecto de la edad sobre el plaquetocrito no está claro, existiendo opiniones contradictorias

en este sentido. Así, mientras que Jain (1993), Ralston y cols. (1988) y Zinkl y cols. (1990) observaron una reducción del número de plaquetas, Takubo y Tatsumi (2000) en un estudio llevado a cabo en personas, no apreciaron modificaciones significativas de este parámetro asociadas a la edad. A diferencia de la edad, el número de plaquetas no mostró variaciones asociadas al sexo.

5.1.1.7.-PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES

Las proteínas plasmáticas totales de los équidos PRE estuvieron comprendidas dentro de los límites fisiológicos aceptados para équidos adultos sanos (Lumsden y cols., 1980; Schalm y Carlson, 1992; Jain, 1993; Rose y Hodgson, 1994; Lassen y Swardson, 1995, Messer, 1995, Eades y Bounous, 1997; Satué, 2004; Lacerda y cols., 2006). El control de la evolución de este parámetro es importante en una yeguada donde existen animales en diferentes edades sometidos a distintos programas de entrenamiento y ejercicio, con necesidades energéticas variadas, que deben ser suplidas por la dieta. Según se deriva de los datos hallados en este trabajo, se podría afirmar que el aporte alimenticio a los animales a lo largo del periodo de toma de muestras fue correcto.

Se ha descrito que las proteínas plasmáticas totales permanecen relativamente estables durante toda la vida del animal hasta la senectud, momento en el que se produce un descenso significativo (Tumbleson y cols., 1972; Kaneko, 1997; Siciliano, 2002). Esta observación previa confirma los resultados de la presente investigación. Parece ser que la proteinemia en el colectivo animal analizado no se ve influenciada por la edad ni el sexo. Sin embargo, en esta misma especie McFarlane y cols. (1998) y Satué (2004), mostraron un ligero incremento de la concentración media de proteínas plasmáticas totales con el avance de la edad, aunque en el estudio de McFarlane y cols. (1998) no se alcanzó la significación estadística. Satué (2004) en yeguas PRE de Estirpe Cartujana manifestó que la reducida desviación estándar mostrada por este parámetro, permitió que variaciones muy pequeñas de las concentraciones de proteínas plasmáticas fuesen estadísticamente significativas.

En el presente estudio parece ser que la edad no es un factor asociado a hipoproteinemia, como se ha descrito en caballos geriátricos (Siciliano, 2002). Este estado de hipoproteinemia en animales de edad avanzada se debe a problemas dentales y digestivos en general, que reducen la capacidad de absorción proteica. En segundo lugar, el correcto manejo de los efectivos equinos de las yegudas analizadas, con control dental y nutricional, habría minimizado la influencia de la edad sobre la

proteinemia. Finalmente, se debe tener en cuenta que los animales permanecían sueltos en la pradera gran parte del día, de modo que el ejercicio físico habría promovido un mejor estado corporal, restringiendo la acción del sedentarismo sobre el catabolismo proteico.

Sin embargo, a pesar de estas afirmaciones previas no se puede descartar que la edad haya afectado a las diversas fracciones proteicas, no determinadas en la presente investigación. Se analizaron las proteínas plasmáticas totales, y no la albúmina, globulina y fibrinógeno de forma individualizada. En opinión de los autores, la cuantificación del fibrinógeno plasmático podría aportar datos importantes al conocimiento de la evolución de la proteinemia con la edad, ya que un porcentaje elevado de animales de edad media a avanzada suelen presentar patologías crónicas subclínicas, que se manifestarían con una tendencia hacia la hiperfibrinogenemia.

5.1.2.-VALORES DE REFERENCIA DEL LEUCOGRAMA EN EL CABALLO PRE: INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL SEXO

5.1.2.1.-LEUCOCITOS

El número de leucocitos totales en los animales de la presente investigación quedó comprendido dentro del rango de referencia estimado para équidos adultos (Tyler y cols., 1987; Blood y Radostic, 1989; Latimer y Rakich, 1992; Lassen y Swardson, 1995; Messer, 1995; Kramer, 2000; Gavazza y cols., 2002; Lacerda y cols., 2006). Se debe especificar que no se halló ninguna modificación cualitativa a reseñar en las extensiones sanguíneas.

No obstante, en caballos PRE (Escribano, 1994; Escribano y cols., 1995, b; Rubio y cols., 1995) y otras razas equinas, como PSI (Mason y Kwok, 1977; Rose y Hodgson, 1994), Árabe (Knill y cols., 1969), Standardbred (Lumsden y cols., 1980), Lipizianos (Čebulj-Kadunc y cols., 2002) y caballos de razas ligeras (Jain, 1986; Carlson, 1990) se han mostrado valores ligeramente inferiores a los de la presente investigación.

Las diferencias entre los resultados en principio, no podrían ser debidas a la raza, debido a la influencia limitada de la raza sobre el leucograma, describiéndose rangos de referencia similares para caballos de razas ligeras y pesadas (Morris, 1990, b; Latimer y Rakich, 1992; Lassen y Swardson, 1995; Messer, 1995; Eades y Bounous, 1997), si bien,

Schalm (1964) y Coles (1974) describieron un número de leucocitos circulantes superior en caballos PSI que en caballos de tiro.

En caballos sanos, se conoce que el número total de leucocitos y la proporción de las diferentes poblaciones celulares están condicionados por la edad y el sexo. Entre ellos, la edad parece ser el factor que más limita el leucograma en équidos (Schalm y cols., 1975; Lassen y Swardson, 1995; MacFarlane y cols., 2001; Čebulj-Kadunc y cols., 2002). De hecho, en la presente investigación, se ha observado un descenso significativo del número de glóbulos blancos con el avance de la edad. Estos resultados confirman los resultados de la mayoría de investigaciones previas realizadas en humanos (Kubota y cols., 1991), bóvidos (Theilen y cols., 1967), félicos (Heaton y cols., 2002, a; Campbell y cols., 2004) y cánidos (Faldyna y cols. 2001; Blount y cols., 2005). En équidos, esta tendencia hacia la leucopenia se ha observado en PSI (Lassen y Swardson, 1995), Lipizianos (Cebulj-Kadunc y cols., 2002), yeguas PRE de Estirpe Cartujana (Satué, 2004) y animales de otras razas (McFarlane y cols., 1998). Cabe destacar que el estudio realizado por McFarlane y cols. (1998) evidenció una tendencia aunque no significativa hacia el descenso del número de leucocitos en caballos geriátricos. No obstante, Schalm y cols. (1975) en équidos de sangre caliente de similares rangos de edad, mostraron valores medios ligeramente superiores a los de la presente investigación. Sin embargo, en caballos criollos no se han descrito modificaciones leucocitarias asociadas a la edad (Lacerda y cols., 2006).

Hay que puntualizar que el descenso del número de leucocitos con el avance de la edad no condicionó leucopenia, ya que en ningún caso se alcanzaron cifras por debajo de los rangos fisiológicos establecidos para animales sanos, por lo que en opinión de los autores, esta dinámica leucocitaria es exclusivamente dependiente de la edad en el caballo. No obstante, los équidos durante la vida están expuestos a muchas situaciones que implican estrés. De hecho, muchos de estos animales viven en situaciones estresantes a diario y gran parte de ellas, están causadas por el hombre y se relacionan con la rutina de entrenamiento, largas temporadas de competición, cambios ambientales, situaciones de calor o frío, transporte, dolor, determinadas patologías de origen vírico y otros procesos patológicos, entre otras. Aunque los animales aprenden a adaptarse a estas circunstancias, cualquier situación estresante afecta de forma inmediata al sistema endocrino del caballo, liberando epinefrina y norepinefrina a través del sistema nervioso simpático y en situaciones de estrés crónico, conduciendo a la liberación de cortisol. La exposición crónica al estrés y la liberación de cortisol estableciendo un impacto negativo sobre los sistemas inmunológicos, digestivo, reproductor y cardiovascular.

Concretamente, a nivel inmunológico, el estrés crónico condiciona modificaciones en las distintas proporciones de neutrófilos y linfocitos, por tratarse de una hormona inhibidora de la proliferación linfocitaria, conduciendo a una respuesta leucocitaria alterada. De esta forma, la interpretación de los resultados leucocitarios habrá que realizarla con cautela cuando se considera de forma independiente la edad del animal.

A diferencia de la edad, el sexo no ejerció una influencia tan marcada sobre el leucograma en el caballo PRE. Así, aunque en el conjunto de la población y en los grupos de edad A, B y C, el número de leucocitos en hembras fue superior al de los machos, las diferencias entre ellos no alcanzaron la significación estadística. Sin embargo, en los animales mayores de 4 años, el número de leucocitos fue estadísticamente superior en hembras que en machos. Otros estudios realizados en diversas razas equinas de sangre caliente, han descrito valores superiores en machos que en hembras (Schalm y cols., 1975; Lassen y Swardson, 1995; Cebulj-Kadunc y cols., 2002). Estas divergencias según Cebulj-Kadunc y cols. (2002) podrían sugerir una maduración leucocitaria más lenta en hembras que en machos. A pesar de ello, otras investigaciones no han mostrado diferencias en el leucograma en función del sexo (Lacerda y cols., 2006).

5.1.2.2.-LINFOCITOS

En referencia al recuento diferencial, los équidos de este estudio mostraron unos valores medios de linfocitos superiores a los descritos en caballos PSI (Mason y Kwok, 1977; Rose y Hodson, 1994) y razas equinas de sangre caliente (Coles, 1974; Schalm y Carlson, 1982; Jain, 1993), quedando en todos los casos comprendidos dentro del rango de referencia para esta especie.

Estas diferencias en el número de linfocitos, también habían sido descritas por Satué (2004) en yeguas PRE de Estirpe Cartujana. Sin embargo, los valores medios hemáticos de los équidos de este último estudio fueron inferiores a los presentados en animales de sangre caliente, lo cual podría ser interpretado como una respuesta simpático-adrenal de magnitud inferior. Sin embargo, se acepta que la esplenotomía se manifiesta con linfocitosis, ya que el bazo es un órgano esencial en el almacenamiento de esta población celular (Persson, 1967). Por tanto, la presencia de valores superiores de linfocitos en caballos PRE parece controvertida.

Por otro lado, la extracción matinal de las muestras sanguíneas podría haber favorecido la obtención de un leucograma determinado por una tendencia hacia la

hipercortisolemia (Stull y Rodiek, 2000), que daría lugar a una linfopenia, circunstancia no observada en los équidos de la presente investigación.

Mientras que el análisis estadístico no mostró variaciones significativas en el número de linfocitos en función del sexo, la edad condicionó una disminución de las formas absolutas y porcentuales de este parámetro, de forma similar a la descrita en el número de leucocitos totales. Estos mismos resultados se han mostrado en el hombre (Globerson, 1995; Pawelec y cols., 1997) y diversas especies animales, como bóvidos (Pereira y cols., 1987; Monke y cols., 1998), félidos (Nakai y cols., 1992; Heaton y cols., 2002, b), cánidos (Greely y cols., 1996; Monke y cols., 1998; Heaton y cols., 2002, a; Harper y cols., 2003) y équidos (Allen y Powell, 1983; Kramer, 2000; Čebulj-Kadunc y cols., 2002, Satué, 2004). En la especie canina, concretamente, se ha apreciado la influencia del factor racial en la magnitud de la disminución de linfocitos con la edad (Lowseth y cols., 1990). En personas, la tendencia hacia la linfopenia se debe tanto a la reducción del número de linfocitos B, como a la de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Sansoni y cols., 1993). Parece ser que la respuesta linfopénica al envejecimiento se debe a la disminución de la función mitótica y de los niveles de algunas citoquinas, como la IL 2 (Negoro, 1992; Globerson, 1995; Pawelec y cols., 1997).

El descenso de linfocitos circulantes podría tener importantes implicaciones clínicas en équidos de edad superior a los 7 años como previamente había considerado Satué (2004). En primer lugar, podría presentar un dilema diagnóstico frente a determinadas patologías víricas, en la que se aprecia una linfopenia durante los primeros días de la infección (Mason y cols., 1989, 1990). En segundo lugar, se ha descrito que la mayoría de los équidos de edad media avanzada muestran infecciones latentes por herpesvirus (Fermaglich y Horohov, 2002), aunque en las yegudas analizadas el control inmunológico e infeccioso era estricto. Tomando en consideración estas premisas importantes, cabría preguntarse si este tipo de respuesta inmunológica condicionaría la respuesta vacunal y la funcionalidad de los mecanismos inmunológicos. En opinión de los autores, sería difícil valorar la eficacia de la utilización de vacunas vivas atenuadas en animales a partir de los 7 años de edad.

5.1.2.3.-NEUTRÓFILOS

El número de neutrófilos en los équidos PRE de la presente investigación, también quedó comprendido dentro del rango de referencia para équidos adultos sanos (Jeffcott, 1977; Tyler y cols., 1987; Morris y Large, 1990, b; Lassen y Swardson, 1995; Messer,

1995; Eades y Bounous, 1997; Kramer, 2000; Čebulj-Kadunc y cols., 2002), y fue ligeramente inferior al obtenido en yeguas PRE de Estirpe Cartujana (Satué, 2004) y en potros PRE (Escribano y cols., 1995, a). No se ha podido dilucidar si estas diferencias indican una característica propia de la raza, representan una respuesta neuroendocrina a la venipunción o bien son debidas al estado fisiológico, ya que los animales utilizados en la investigación de Satué (2004) correspondían a yeguas gestantes, si bien en este último grupo de animales la gestación ocasionó descensos significativos en las formas absolutas y porcentuales de neutrófilos totales

Los valores medios de las formas inmaduras neutrofílicas y neutrófilos segmentados, expresados tanto de forma absoluta como porcentual, quedaron comprendidos dentro del rango de referencia para équidos adultos sanos (Latimer y Rakich, 1992; Lassen y Swardson, 1995; Messer, 1995; Eades y Bounous, 1997). La edad y el sexo no parecen afectar de forma significativa al número de neutrófilos en banda, a pesar de la supuesta intervención estrogénica. En otras especies animales, se ha confirmado que el hiperestrogenismo estimula las unidades formadoras de colonias neutrofílicas a nivel medular, condicionando una leucocitosis neutrofílica (Gaunt y Pierce, 1986). Los resultados hallados en la presente investigación parecen confirmar que el principal factor determinante de la variación en la cuantificación de las formas neutrofílicas inmaduras en sangre periférica sería la demanda incrementada asociada a estados patológicos subclínicos.

La disminución de las formas absolutas de neutrófilos totales en los équidos de la presente investigación fue un hallazgo inesperado, ya que la edad condiciona un incremento de la neutrofilia, como ha sido mostrado en animales de esta misma especie (Harvey y cols., 1984; Zinkl y cols., 1990; Lassen y Swardson, 1995; Čebulj-Kadunc y cols., 2002; Satué, 2004), si bien este comportamiento se produjo en las formas relativas de este parámetro. Esta aparente contradicción es posiblemente debida a los diferentes rangos de edad analizados por cada uno de los autores. Mientras que en la presente investigación no hay individuos que puedan considerarse geriátricos, en el resto de los estudios se comparan animales adultos con individuos de edad superior a 15 años.

Aunque entre los équidos de la presente investigación no se han considerado animales con edades superiores a 7 años, se conoce que el aumento relativo del número de neutrófilos en animales geriátricos se relaciona con la variación de la concentración sanguínea de corticoides, debida a la tendencia al hipoadrenocorticismos en animales de edad avanzada (Horohov y cols., 1999). No obstante, esta afirmación resulta controvertida, ya que los caballos de edad avanzada pueden presentar

hiperadrenocorticismo subclínico por el desarrollo de adenomas hipofisarios. Otra justificación razonable sería la exposición más prolongada a diversos agentes, infecciosos o no a lo largo de la vida, que potencien de alguna forma la actuación de este tipo celular (Jain, 1993).

Al igual que los leucocitos, no se han mostrado diferencias significativas ni en el número, ni en el porcentaje de neutrófilos entre machos y hembras. Esta ausencia de diferencias confirma los resultados de investigaciones previas realizadas en diversas razas equinas (Latimer y Rakich, 1992; Lassen y Swardson, 1995; Eades y Bounous, 1997; Lacerda y cols., 2006). En otras especies animales se ha confirmado que el hiperestrogenismo estimula las unidades formadoras de colonias neutrofílicas medulares, lo cual condiciona una leucocitosis neutrofílica (Gaunt y Pierce, 1985).

Sin embargo, no todos los autores defienden esta idea. De hecho, determinados estudios realizados en animales de experimentación, afirman que los estrógenos presentan un efecto regulador negativo a nivel medular sobre la serie blanca y una acción supresora de la hematopoyesis en los huesos largos, induciendo neutropenia, linfopenia y eosinopenia (Gaunt y Pierce, 1985; Medina y cols., 1993; Kincade y cols., 1994; Masuzawa y cols., 1994; Medina y Kincade, 1994; Miyaura, 1997; Erben y cols., 1998; Perry y cols., 2000). La adición de estrógenos a sistemas *in vivo* o *in vitro*, tiene una influencia supresora sobre el desarrollo de las células linfocitarias B, tras la actuación de los estrógenos sobre los receptores de dichas células (Masuzawa y cols., 1994; Smithson y cols., 1995; Medina y cols., 2001).

5.1.2.4.-COCIENTE N/L

El cociente N/L en los équidos de la presente investigación mostró una media ligeramente superior a la descrita en yeguas PRE de Estirpe Cartujana (Satué, 2004) y potros PRE de 4 años de edad (Escribano, 1994). El mayor predominio neutrofílico en las formas leucocitarias parece caracterizar más a las razas de sangre fría que a las de sangre caliente. Esta afirmación se considera lógica si se acepta la menor importancia de la esplenotomía en el primer conjunto de razas, con la consiguiente disminución en la eliminación de linfocitos hacia el torrente circulatorio.

Las diferencias en los linfocitos y neutrófilos halladas al comparar los tres grupos de edad de los équidos de la presente investigación se manifestaron en el cociente N/L, que experimentó un incremento con la edad, aunque las diferencias sólo fueron

significativas entre los animales más jóvenes y los de mayor edad. Este tipo de respuesta ha sido descrita ampliamente en la literatura, llegando a mostrar según algunos autores un valor de 2/1 en caballos geriátricos (Harvey y cols., 1984; Zinkl y cols., 1990; Jain, 1993; Lassen y Swardson, 1995).

5.1.2.5.-EOSINÓFILOS, MONOCITOS Y BASÓFILOS

Los valores medios de eosinófilos en la presente investigación fueron similares a los obtenidos en la mayoría de estudios previos realizados en équidos (Schalm, 1964; Jeffcott, 1977; Lumsden y cols., 1980, Jain, 1986; Lassen y Swardson, 1995; Messer 1995; Eades y Bounous, 1997; Cebulj-Kadunc y cols., 2002; Lacerda y cols., 2006). En la yegua PRE de Estirpe Cartujana, Satué (2004) mostró valores superiores a los anteriores. Según esta última autora la justificación probable a este hallazgo laboratorial podría ser las suaves condiciones climáticas del Sur de España, lugar en el que se realizó el estudio (Cádiz), que habría facilitado la supervivencia de parásitos en el pasto durante gran parte del año, el contacto permanente entre animales de diferentes edades, muchos de ellos potros, con un estado inmunológico aún sin desarrollar completamente, y la salida de los animales diariamente a la pradera, donde el control parasitario podría verse dificultado.

Al igual que ocurrió para los eosinófilos, en los équidos de la presente investigación se evidenciaron valores medios de monocitos ligeramente superiores a los descritos por la mayoría de autores referenciados, si bien comprendidos dentro de los márgenes fisiológicos (Schalm, 1964; Jeffcott, 1977; Lumsden y cols., 1980, Jain, 1986; Lassen y Swardson, 1995; Messer 1995; Eades y Bounous, 1997; Čebulj-Kadunc y cols., 2002, Satué, 2004; Lacerda y cols., 2006). Los valores medios para la población de hembras del presente estudio fueron similares a los obtenidos por Satué (2004) en hembras PRE de Estirpe Cartujana.

En relación a los basófilos, aunque se trata de la población celular con menor importancia clínica, los équidos de la presente investigación presentaron unas medias similares a las descritas en la literatura revisada (Jones, 1976; Masson y Kwok, 1977; Rose y Hodgson, 1994; Messer, 1995; Lassen y swardson, 1995; Eades y Bounous, 1997; Satué, 2004).

El estudio comparativo de la influencia de la edad y el sexo sobre el número de eosinófilos, monocitos y basófilos no mostró variaciones significativas, al igual que diversos autores (Jain, 1993; Lassen y Swardson, 1995; Cebulj-Kadunc y cols., 2003; Lacerda y cols., 2006). Sin embargo, algunos investigadores han descrito un aumento

(Zinkl y cols., 1990; Satué, 2004), mientras que otros mostraron una disminución del número de eosinófilos asociado a la edad (McFarlane y cols., 1998).

Como resumen de este capítulo, y en base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que los parámetros hematológicos en los équidos PRE se encuentran comprendidos dentro de los límites de referencia establecidos para la especie equina. El sexo ejerce una influencia limitada sobre la hematología de esta población equina,, siendo la concentración de hemoglobina superior en los machos y el número total de leucocitos, en las hembras. La edad se caracterizó por la reducción en el número de eritrocitos circulantes, desarrollándose un mecanismo compensatorio con aumento de VCM y HCM, disminución del número de leucocitos totales, número de plaquetas, de las formas absolutas de linfocitos y neutrófilos totales, con aumento de las formas porcentuales neutrofílicas y del cociente N/L, sin modificaciones de los neutrófilos en banda, eosinófilos, monocitos y basófilos y fluctuaciones de dirección variable de la concentración de proteínas plasmáticas totales.

5.2.-CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN EL CABALLO PRE

La evaluación de las distintas poblaciones linfocitarias, linfocitos T, linfocitos T cooperadores y citotóxicos, linfocitos B y NK representa uno de los métodos más eficaces para evaluar la integridad de la inmunidad celular en un individuo,, colaborando en la caracterización de procesos patológicos como leucemias, linfomas, enfermedades autoinmunes e infecciosas, inmunodeficiencias y otras patologías relacionadas con el sistema inmunitario (Tarrant, 2005).

De forma genérica, existe controversia en lo referente al establecimiento de los valores de referencia, los procedimientos para su obtención y su aplicación diagnóstica. Como patrones normales, comúnmente se utilizan valores en su mayoría determinados en animales adultos que se caracterizan por tener una marcada variabilidad. Estudios realizados en humanos (Tollerud y cols., 1989; 1991; Chng y cols., 2004; Jiang y cols., 2004) y diversas especies animales, como, cánidos (Faldyna y cols., 2001; Blount y cols., 2005), félidos (Heaton y cols., 2002, a, b; Campbell y cols., 2004) y équidos (MacFarlane, 2001) han mostrado modificaciones importantes de los parámetros linfocitarios cuando se consideran de forma independiente la raza, la edad y el sexo.

En équidos, las aplicaciones del inmunofenotipado se han centrado por un lado, en caracterizar las poblaciones de linfocitos B y T en determinadas patologías que cursan con desequilibrios del sistema inmunitario (Deeg y cols., 2001; Flaminio y cols., 2002; Castillo-Olivares y cols., 2003; Pellegrini-Massini y cols. 2005; Thomas y cols. 2005; Kleiber y cols., 2005; Gardner y cols., 2006; De Bruijn y cols., 2007; Lewis y cols., 2007; Rendle y cols., 2007), evaluar el grado de susceptibilidad a determinadas bacterias, virus y hongos (Flaminio y cols., 1999; Russell y cols., 1998; Fraser y cols., 2002; Chaffin y cols., 2004) así como analizar el estado inmunitario en la yegua durante el ciclo estral, gestación, anestro y periodo postparto (Da Costa y cols., 2003; Ferreira-Dias y cols., 2005; Agrícola y cols., 2008). Por otro lado, esta técnica ha permitido definir las variaciones normales que se producen en las células inmunitarias durante el crecimiento y desarrollo en potros, así como valorar la respuesta linfocitaria tras la exposición a determinados antígenos ambientales (Flaminio y cols., 1998; 1999; 2000). En todos estos casos, los resultados de dichas investigaciones se compararon con grupos control de animales sanos con un amplio rango de edad sin especificar el sexo concreto de cada uno de ellos.

Debido a la inexistencia de referencias bibliográficas en poblaciones equinas sanas, y particularmente en el caballo PRE, surge la necesidad de identificar y definir valores concretos en équidos en relación a la edad y sexo. De esta forma, la recopilación de datos cuantitativos en un grupo de animales dentro de una condición fisiológica concreta, dará consistencia a los resultados de la investigación y podrá servir como parámetros comparativos a otros estudios que utilicen la misma metodología. Asimismo, los resultados serán seguros y fidedignos, y tendrán gran utilidad desde el punto de vista clínico para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de enfermedades relacionadas directa o indirectamente con el sistema inmunitario, haciendo más fiable y precisa la interpretación de los resultados. A pesar de ello, las diferentes técnicas empleadas para determinar los números absolutos y relativos de las diversas subpoblaciones, las diferencias en el procesamiento de las muestras, el uso de diversos reactivos y la metodología empleada en el análisis laboratorial, serán factores a tener en cuenta para la interpretación de los resultados.

5.2.1.-VALORES LINFOCITARIOS DE REFERENCIA EN EL CABALLO PRE: INFLUENCIA DEL SEXO Y LA EDAD

5.2.1.1.-LINFOCITOS T

Los números absolutos de linfocitos T, linfocitos Th y linfocitos Tc en los équidos de la presente investigación mostraron valores medios inferiores a los presentados previamente en équidos de raza Lusitana (Da Costa y cols., 2003; Ferreira-Dias y cols., 2005; Agrícola y cols., 2008), PSI (Pellegrini-Masini y cols., 2005) y otras razas equinas (Davies y cols., 2002). En relación a las formas porcentuales, en équidos de diversas razas, Davies y cols. (2002) y Witonsky y cols. (2003) obtuvieron valores superiores de linfocitos Th y ligeramente inferiores de linfocitos Tc a los de la presente investigación.

No obstante, los resultados de las investigaciones de Da Costa y cols. (2003), Ferreira-Dias y cols. (2005) procedían de yeguas reproductoras en diferentes momentos del ciclo reproductor, presentando gran similitud entre ellos. Estos investigadores sugirieron que tanto el ciclo estral como el anestro no modifican el sistema inmunitario en la yegua, a diferencia de lo que acontece en determinados animales de investigación, en los que la proliferación linfocitaria se ve reducida por la influencia del fotoperiodo (Drazen y cols., 2001; Pendergast y cols., 2001). Este declive de la respuesta inmunitaria también se ha mostrado en yeguas durante la gestación, y se ha relacionado con la disminución de linfocitos Th y Tc (Agrícola y cols., 2008).

En comparación con los datos medios aportados previamente para el caballo Quarter Horse y PSI (Flaminio y cols., 1999), los animales de la presente investigación se caracterizaron por poseer valores medios de linfocitos ligeramente inferiores. Por el contrario, McFarlane y cols. (2001) en équidos de razas ligeras obtuvieron valores medios inferiores a los de los équidos de este estudio. Las diferencias entre los resultados de los distintos autores en principio, podrían estar relacionadas con la edad, la raza y la metodología utilizada en el análisis laboratorial. Los distintos rangos de edades de los animales incluidos en las investigaciones podrían haber condicionado dichas variaciones. Así, mientras que en este estudio se han considerado individuos con edades inferiores a 7 años, en el resto de investigaciones se extendió a 16 años.

La raza también parece ejercer una influencia marcada sobre la composición de las diferentes poblaciones y subpoblaciones linfocitarias. De hecho, en humanos y cánidos se han descrito diferencias significativas entre razas o grupos étnicos (Faldyna, y cols. 2001; Chng y cols., 2004). Como se ha especificado previamente en el apartado de

hematología, en la especie equina se conoce que la raza es un parámetro fisiológico a tener en cuenta en la interpretación del leucograma. Así, Schalm (1964), Coles (1974) y Harvey y cols. (1984) mostraron un número superior de leucocitos en caballos PSI en comparación con razas de tiro. Estas mismas observaciones hematológicas podrían extrapolarse a la composición de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias. En conocimiento de los autores, no existen estudios comparativos en la bibliografía sobre las poblaciones linfocitarias entre équidos de la variedad de sangre caliente (*hot-blooded*) y sangre fría (*cold-blooded*). Sería interesante en un futuro poder analizar las diferencias en la composición de las diversas poblaciones y subpoblaciones linfocitarias entre ambas categorías y valorar las implicaciones desde el punto de vista fisiológico y clínico.

Asimismo, las diversas metodologías empleadas en las investigaciones podrían haber condicionado las variaciones entre los resultados. Dentro de la cuantificación de las formas absolutas de las diferentes subpoblaciones linfocitarias, el uso de tecnologías de doble plataforma se considera una de las fuentes de variabilidad más importante (O’Gorman y Gelman, 1997; Lau y cols., 2002; Chng y cols., 2004). Estos últimos investigadores cuantificaron el número de leucocitos totales con un contador hematológico y las formas porcentuales de linfocitos y subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo. Así, el uso de doble plataforma lleva inherente la suma de los errores de cada uno de los métodos empleados. Sin embargo, en el presente estudio se ha utilizado un sistema de plataforma única, en el que las formas absolutas y porcentuales de cada una de las poblaciones linfocitarias se han analizado mediante citometría de flujo. Entre las dos metodologías se prefiere esta última técnica, ya que ha mostrado ser más fiable y precisa (Barnett y cols., 1999).

5.2.1.1.1.--SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS (LINFOCITOS Th Y LINFOCITOS Tc)

Aunque en la presente investigación no se han observado diferencias entre machos y hembras en las formas absolutas y porcentuales de linfocitos T y linfocitos Th, el porcentaje de linfocitos Tc en los animales entre 2 y 3 años fue discretamente superior en hembras que en machos. Diversos estudios realizados en seres humanos y roedores han descrito variaciones entre géneros. Así, mientras que unos autores muestran un incremento del número de linfocitos Th en machos respecto de las hembras (Lee y cols., 1996; Barnett y cols., 1999), otros, describen un aumento de linfocitos Tc y NK en hembras en comparación con los machos (Reichert y cols., 1991; Lau y cols., 2002; Chng y cols., 2004). Estas diferencias entre sexos se han asociado con la influencia de las hormonas sexuales, estrógenos, andrógenos y progesterona.

La edad indujo una disminución significativa del número total de linfocitos T y las formas absolutas de las subpoblaciones linfocitarias de linfocitos Th y Tc, al igual que McFarlane y cols. (2001), aunque el rango de edades en este último estudio fue superior al de los équidos PRE. Estos investigadores mostraron una disminución del número total de linfocitos T, linfocitos Th y Tc, que también se manifestó en las formas porcentuales en animales mayores de 20 años, respecto a un grupo control con edades comprendidas entre 5 y 12 años.

Por otro lado, estudios previos realizados en potros menores de 6 meses mostraron un incremento lineal del número de linfocitos Th y Tc desde el nacimiento a los 6 meses de edad (Faminio y cols., 1999; Chaffin y cols., 2004). Cabe destacar que los valores medios de estas poblaciones linfocitarias tras el parto, fueron similares a los de animales adultos. Además, estos mismos investigadores mostraron que las modificaciones experimentadas por los linfocitos T son dependientes de las variaciones producidas en las formas absolutas y no en las formas porcentuales de cada una de las subpoblaciones linfocitarias que las integran. Estas observaciones en potros confirmaron los resultados de investigaciones previas realizadas en niños (Heldrup y cols., 1992; Stern y cols., 1992). En niños, se ha mostrado un incremento del número total de linfocitos, linfocitos Th y linfocitos Tc durante los primeros meses de vida, aunque declinan posteriormente, sugiriendo la existencia de una inmunidad más marcada en los individuos más jóvenes.

De forma contraria a la dinámica experimentada por las formas cuantitativas, las formas porcentuales de las subpoblaciones de linfocitos T y Th se incrementaron con el avance de la edad. No obstante, este efecto fue más marcado en machos que en hembras, mostrando un aumento, si bien no significativo en los animales con edades comprendidas entre 2 y 3 años, respecto al resto de los grupos de edad. Aunque los efectos del estrés sobre la composición de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias han sido bien documentados en el hombre (Dhabhar, 1998; Segal y cols., 2006), en los équidos esta dinámica podría compararse a la que experimentan los parámetros hematológicos de la serie blanca bajo la influencia del estrés. Se conoce que el estrés en el momento de la venipunción en un caballo no acostumbrado al contacto con el ser humano se incrementa notablemente (Plotka y cols., 1988), provocando una marcada leucocitosis con linfocitosis, debido a la movilización de células sanguíneas bajo estimulación simpático-adrenal (Rose y cols., 1983). En humanos, frente a determinados niveles de excitación se ha postulado que el estrés agudo induce un reforzamiento de la

inmunidad por la redistribución reversible de linfocitos mediada por las hormonas adrenales (Dhabhar, 1998).

5.2.1.1.2.-COCIENTE CD4/CD8

El cociente CD4/CD8 medio en la totalidad de la población analizada fue superior al obtenido en yeguas Lusitanas por Da Costa y cols. (2003) y Ferreira-Dias y cols. (2005) y en potros Quarter Horse y PSI por Flaminio y cols. (1999). Estas diferencias en principio, podrían relacionarse con el incremento de células que expresan CD4 (linfocitos Th) frente a CD8 (linfocitos Tc), como ha sido mostrado por otros autores en esta misma especie (Bendali-Alcène y cols., 1995; Flaminio y cols., 1999).

Por el contrario se han descrito cocientes superiores en animales de razas ligeras con un rango de edad superior a la presente investigación (McFarlane y cols., 2001). En este caso, la disminución de los linfocitos Tc en el grupo de animales geriátricos (mayores de 20 años) ocasionó el aumento del cociente CD4/CD8, en comparación con el grupo de animales de 5 a 12 años de edad. Según estos resultados, mientras que en los animales geriátricos los valores del cociente CD4/CD8 dependen fundamentalmente de la dinámica experimentada por los linfocitos Tc, en los animales jóvenes y adultos parece ser que las variaciones dependen en mayor medida de las modificaciones en los linfocitos Th. De forma genérica, aunque se trata de un marcador inespecífico, el incremento del cociente CD4/CD8 experimentado en el estudio de McFarlane y cols. (2001) podría sugerir la presencia de procesos inflamatorios, como enfermedades inflamatorias intestinales o neumonías granulomatosas, que se ponen de manifiesto en animales geriátricos (Bewig y cols., 1999; Fireman y cols., 1999).

A pesar de todas estas consideraciones previas, la edad no condicionó modificaciones en el cociente CD4/CD8 en la población de équidos PRE de esta investigación. La inexistencia de diferencias entre los valores medios del cociente CD4/CD8 entre los grupos de edad, en primer lugar, podría ser debida a que la dinámica experimentada por las subpoblaciones linfocitarias de linfocitos Th y Tc son dependientes del descenso producido en el número total de linfocitos T. En segundo lugar, el descenso de los números absolutos de las subpoblaciones de linfocitos Th y linfocitos Tc, aunque compensado con el aumento en las formas porcentuales de linfocitos T y linfocitos Th, podría haber condicionado este tipo de respuesta. Estas aseveraciones sugieren la importancia del análisis cuantitativo de las formas absolutas frente a las formas

porcentuales en esta investigación, ya que la interpretación en base a estas últimas conduciría a resultados erróneos.

Por el contrario, Flaminio y cols. (1999) en un estudio comparativo entre potros menores de 6 meses y animales adultos con edades comprendidas entre 5 y 15 años, evidenciaron en los primeros, un cociente inferior al de los équidos de la presente investigación, sin embargo, en los animales adultos este cociente se incrementó, alcanzando cifras superiores a las de este estudio. Asimismo, Chaffin y cols. (2004) en potros también documentaron cifras superiores a las de los équidos PRE. Según estos resultados, el cociente CD4/CD8 superior en potros conllevaría a una inmunidad activa frente a las primeras exposiciones a diferentes microorganismos ambientales y por tanto, al desarrollo de la memoria inmunológica.

Asimismo, el análisis comparativo entre machos y hembras tampoco arrojó variaciones importantes en el cociente CD4/CD8. Sin embargo, cuando se consideraron de forma independiente cada uno de los grupos de edad, los machos de 2 a 3 años presentaron un cociente CD4/CD8 significativamente superior al de las hembras. Estas variaciones se relacionan con el aumento del porcentaje de linfocitos Tc en las hembras, respecto de los machos en este grupo de edad.

Contrariamente a lo que acontece en el caballo, la mayoría de estudios realizados en humanos (Jiang y cols., 2004; Chng y cols., 2004) y diversas especies animales, como cánidos (Heaton y cols., 2002, a; Blount y cols., 2005), félidos (Heaton y cols., 2002, b) y bóvidos (Ayoub y Yang, 1996) han mostrado una disminución del cociente CD4/CD8 con el avance de la edad. Por este motivo, el aumento de linfocitos T de memoria afectaría más a los linfocitos Tc que a los linfocitos Th, dado el carácter intracelular de los antígenos a los que responde (Globerson y Effros, 2000). Aunque no podemos precisar con exactitud, probablemente, la intervención de factores como, las diversas metodologías empleadas en las determinaciones analíticas, el momento de la venipunción, las condiciones ambientales, el estrés, el ejercicio físico o bien la nutrición, podrían haber condicionado, en parte, las variaciones en los resultados de las diversas investigaciones.

5.2.1.2.-LINFOCITOS B

Cabe destacar que el anticuerpo monoclonal empleado en la presente investigación como marcador de linfocitos B, ha identificado un número escaso de

células. Este anticuerpo anti-CD2 comúnmente marca todos los linfocitos T y NK, por lo que los linfocitos que no identifica, es decir CD2⁻, se consideran linfocitos B. Debido a que el porcentaje de linfocitos CD2⁻CD4⁺ y CD2⁻CD8⁺ es muy pequeño (0,5% y 0,7%, respectivamente), consideramos al igual que Da Costa y cols. (2003) y Ferreira-Dias y cols. (2005) utilizar fórmulas matemáticas para la cuantificación de linfocitos B.

Existe una gran variabilidad entre los resultados dependiendo de los diferentes marcadores utilizados para la identificación de linfocitos B. De esta forma, se han descrito valores absolutos superiores (Pellegrini-Masini y cols., 2005) e inferiores tanto en las formas absolutas como porcentuales (McFarlane y cols., 2001; Witonsky y cols., 2003; Chaffin y cols., 2004) a los obtenidos en los équidos de la presente investigación. Los valores medios en los animales de este estudio fueron superiores a los descritos en potros tras el nacimiento por Flaminio y cols. (1999), aunque a los 6 meses se alcanzaron cifras superiores tanto en formas absolutas como porcentuales. Estos hallazgos confirmaron observaciones previas en humana (Erkeller-Yuksel y cols., 1992), apuntando una inmunidad más activa en individuos jóvenes que en adultos.

Sin embargo, los resultados derivados de las investigaciones que utilizan anticuerpos monoclonales o fórmulas matemáticas similares minimizan dicha variabilidad. De esta forma, en este estudio se ha empleado el mismo anticuerpo monoclonal que utilizaron previamente Davies y cols. (2002), obteniéndose resultados similares. Asimismo, las fórmulas matemáticas para el cálculo de las formas absolutas y porcentuales empleadas en el presente trabajo fue la misma que la utilizada por Da Costa y cols. (2003), Ferreira-Dias y cols. (2005) y Agrícola y cols. (2008), lográndose igualmente resultados equivalentes.

La edad condicionó una disminución de las formas absolutas y porcentuales de linfocitos B en el colectivo animal analizado, confirmando los resultados de investigaciones realizadas en humana (Paganelli y cols., 1992; Ginaldi y cols., 2000) y diversas especies animales, como cánidos (Faldyna y cols. 2001, Blount y cols., 2005), félidos (Heaton y cols., 2002, a; Campbell y cols., 2004) y équidos (McFarlane y cols., 2001). No obstante, el declive de linfocitos B no parecer ser un hecho defendido por todos los autores (Chopra y cols., 1989; Greely y cols., 2001; Chng y cols., 2004; HogenEsch y cols., 2004). Aunque ambas poblaciones de linfocitos T y B decrecen con la edad en los équidos PRE de la presente investigación, la disminución experimentada por los linfocitos B, parece depender más del porcentaje de este tipo celular, como fue descrito previamente por Flaminio y cols. (1999) en potros. El declive de ambas poblaciones celulares con el avance de la edad, sugiere ser una condición natural del sistema

inmunitario en individuos sanos, que acontece en todas las especies animales y que podría sentar las bases del origen de la inmunosenescencia que se pone de manifiesto en individuos geriátricos.

5.2.1.3.-LINFOCITOS NK

Aunque existe un anticuerpo monoclonal para identificar específicamente los linfocitos NK en équidos (Viveiros y Antczak, 1999), éste no se comercializa en España. Por este motivo, para el cálculo de las formas absolutas y porcentuales de esta población celular se han empleado fórmulas matemáticas. Existen una serie de marcadores que comparten varias células linfoides, como el CD2, que lo expresan tanto los linfocitos T como los NK. La utilización de este anticuerpo monoclonal ha permitido calcular matemáticamente este grupo de linfocitos, restando al total de linfocitos CD2⁺ la suma de linfocitos Th y Tc, al igual que Da Costa y cols. (2003), Ferreira-Dias y cols. (2005) y Agrícola y cols. (2008) en yeguas Lusitanas,, obteniéndose resultados similares en dichas investigaciones. El empleo de este tipo de procedimientos conlleva un error inherente al sistema de cálculo, provocando que en algunos individuos se hayan obtenido valores medios negativos, por lo cual asumimos el margen de error que pudiera derivarse de su uso.

Aunque el estudio estadístico no reveló diferencias significativas entre machos y hembras en el número de linfocitos NK, en seres humanos se ha observado que los machos presentan un número mayor de linfocitos NK que las hembras. Estas diferencias entre géneros se han relacionado con el efecto de las hormonas sexuales, sugiriendo una inmunidad innata más potente en machos que en hembras (Lee y cols., 1996; Mund y cols., 2001; Chng y cols., 2004; Klein, 2004).

La edad condicionó una disminución significativa de las formas porcentuales y absolutas de linfocitos NK, que también se manifestó en machos y hembras. Estos resultados confirmaron observaciones previas realizadas en seres humanos (Sansoni y cols., 1993; Ginaldi y cols., 2000) y félidos (Campbell y cols., 2004), si bien Ginaldi y cols. (2000) mostraron una disminución significativa en los números absolutos, que no se hizo patente en las formas porcentuales.

Por otro lado, en potros, Flaminio y cols. (1999) observaron que la suma total de los distintos porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias fue superior al 100%, hecho que no sucedía en animales adultos. La presencia de linfocitos T doble positivos descrita

en el hombre, suidos y bóvidos (Blue y cols., 1985; Mathy y cols., 1997), no ha sido confirmada en équidos. Estos linfocitos T doble positivos corresponden a células inmaduras inactivas originarias en la corteza del timo, que en ocasiones, alcanzan el torrente sanguíneo (Fridkis-Hareli y cols., 1995). Aunque estas formas linfocitarias son exclusivas de animales jóvenes, Flaminio y cols. (1999) no las identificaron en potros. Estos últimos investigadores propusieron que estos tipos celulares podrían identificarse como moléculas de superficie CD4 y CD8 en monocitos y macrófagos (Denny y cols., 1996). En el presente estudio no se ha podido comprobar la existencia de moléculas de superficie propias de monocitos y macrófagos, por tanto, no hemos podido confirmar la presencia de linfocitos doble positivo.

En base a los resultados obtenidos en este apartado, se puede afirmar que las poblaciones de linfocitos B, linfocitos T, y las subpoblaciones de linfocitos TCD2, Th y Tc y linfocitos NK, aun con ligeras variaciones se encuentran comprendidos dentro de los límites de referencia establecidos para équidos adultos sanos. Las variaciones de las formas porcentuales en los linfocitos B, así como las formas absolutas en los linfocitos T refuerzan los resultados de la investigación. Mientras que el sexo no modifica la dinámica de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias, la edad condiciona un decrecimiento de los linfocitos T, linfocitos Th, linfocitos Tc, linfocitos B y NK, sin modificaciones en el cociente CD4/CD8, sugiriendo ser una condición natural del individuo sano, que acontece en todas las especies animales y que podría ser el origen de la inmunocompetencia que se pone de manifiesto en animales geriátricos.

6.-CONCLUSIONES

1.-El caballo PRE manifiesta un comportamiento hematológico homogéneo, siendo sus datos medios similares a los obtenidos previamente en esta raza y más próximos a las razas equinas de sangre caliente que a las de sangre fría.

2.-En el caballo PRE el sexo ejerce una influencia limitada sobre los parámetros eritrocitarios, siendo la concentración de hemoglobina superior en machos que en hembras.

3.-La edad en el caballo PRE afecta significativamente las dinámicas de producción y maduración de eritrocitos y de plaquetas, manifestándose con una reducción de la masa circulante de hematíes, parcialmente compensada por el incremento del volumen corpuscular medio y de la hemoglobina corpuscular media, con un descenso del número de plaquetas y fluctuaciones de dirección variable de la concentración de proteínas plasmáticas totales.

4.-En el caballo PRE el sexo no es un factor condicionante de los parámetros leucocitarios, excepto en el grupo de animales con edades comprendidas entre 4 y 7 años, en el que el número de leucocitos totales fue significativamente superior en hembras que en machos.

5.-El leucograma en el caballo PRE se encuentra supeditado a la edad, manifestándose con una reducción del número de leucocitos totales, de las formas absolutas de linfocitos y neutrófilos totales, con aumento de las formas porcentuales neutrofílicas y del cociente N/L, sin modificaciones de los neutrófilos en banda, eosinófilos, monocitos y basófilos.

6.-En el caballo PRE, las poblaciones de linfocitos B, linfocitos T y las subpoblaciones de linfocitos T, TCD2, Th y Tc y linfocitos NK, aun con ligeras variaciones se encuentran

comprendidos dentro de los límites de referencia establecidos para équidos adultos sanos.

7.-En el caballo PRE el sexo no ha sido un factor determinante de las poblaciones de linfocitos T, B y NK, ejerciendo una influencia limitada sobre la subpoblación de linfocitos Tc, manifestándose con un incremento en las hembras respecto de los machos y en cociente CD4/CD8, incrementándose en los machos respecto de las hembras en el grupo de animales con edades comprendidas entre 2 y 3 años.

8.-Las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias están fuertemente condicionadas por la edad en el caballo PRE, mostrándose una reducción significativa del número total de linfocitos T, de las formas absolutas de linfocitos Th y Tc, linfocitos B y NK, con aumento de las formas porcentuales de linfocitos T y Th. El declive de las formas numéricas linfocitarias refuerza los resultados de la investigación y sugieren ser una condición natural del sistema inmunitario en individuos sanos.

9.-La ausencia de variaciones en el cociente CD4/CD8 con la edad en el caballo PRE, podría ser debida a que la dinámica experimentada en las formas cuantitativas de linfocitos Th y Tc son dependientes del descenso producido en el número total de linfocitos T o bien al descenso de linfocitos Th y linfocitos Tc, compensado con el aumento en las formas porcentuales de linfocitos T y linfocitos Th, sin modificaciones del cociente CD4/CD8.

7.-RESUMEN

CARACTERIZACIÓN HEMATOLÓGICA E INMUNOFENOTÍPICA DEL CABALLO PURA RAZA ESPAÑOLA

La evaluación conjunta de los parámetros hematológicos y las distintas poblaciones y subpoblaciones linfocitarias representa uno de los métodos más eficaces para caracterizar procesos como leucemias, linfomas, enfermedades autoinmunes e infecciosas, entre otras, y analizar las posibles repercusiones sistémicas, el pronóstico, así como, la respuesta al tratamiento. Para la interpretación clínica de estos parámetros se hace necesario partir de valores de referencia y valorar las posibles variaciones que se producen debido a la edad y el sexo. Por este motivo, los objetivos planteados en la presente investigación fueron los siguientes 1) Establecer valores hematológicos de referencia en caballos PRE; 2) Analizar la influencia de la edad y el sexo sobre los parámetros hematológicos en el caballo PRE; 3) Caracterizar las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en el caballo PRE, y 4) Valorar las modificaciones de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias asociadas a la edad y el sexo.

Se ha estudiado un total de 159 équidos PRE, divididos en 77 machos y 82 hembras. Los animales fueron clasificados en cuatro grupos de edad: A (entre 1 y 2 años), B (entre 2 y 3 años), C (entre 3 y 4 años) y D (entre 4 y 7 años). Se obtuvieron muestras de sangre venosa, por las mañanas, durante un periodo de duración de 4 meses. De la extracción realizada a cada uno de los animales, se separaron tres fracciones, almacenándose dos de ellas en cantidades similares en tubos con EDTA, para las determinaciones hematológicas e inmunofenotípicas. La tercera fracción se almacenó en un tubo con Heparina-Litio, para la extracción de plasma. Mediante contador semiautomático Sysmex (*F-820*) se han determinado los siguientes parámetros hematológicos: número de eritrocitos, concentración de hemoglobina, valor hematócrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media y número de plaquetas. Las fórmulas leucocitarias se realizaron mediante recuento diferencial en frotis de linfocitos, neutrófilos en banda, neutrófilos segmentados, eosinófilos, monocitos y basófilos. Las proteínas plasmáticas totales se cuantificaron mediante espectrofotometría en plasma. El número total de glóbulos blancos y las formas absolutas y porcentuales de linfocitos totales, de linfocitos T y las subpoblaciones de linfocitos Th, Tc se han determinado mediante citometría de flujo. La determinación de las formas relativas y absolutas de linfocitos B se ha realizado mediante marcaje con anticuerpo monoclonal específico, y fórmula matemática. Las

formas absolutas y relativas de linfocitos NK también se cuantificaron mediante fórmula matemática.

Los parámetros hematológicos en los équidos PRE se encuentran comprendidos dentro de los límites de referencia establecidos para la especie equina. El sexo ejerció una influencia limitada sobre los parámetros hematológicos en esta población equina, siendo la concentración de hemoglobina superior en los machos y el número total de leucocitos, en las hembras. La edad se caracterizó por la reducción en el número de eritrocitos circulantes, desarrollándose un mecanismo compensatorio con aumento de VCM y HCM, disminución del número de leucocitos totales, número de plaquetas, de las formas absolutas de linfocitos y neutrófilos totales, con aumento de las formas porcentuales neutrofílicas y del cociente N/L, sin modificaciones de los neutrófilos en banda, eosinófilos, monocitos y basófilos y fluctuaciones de dirección variable de la concentración de proteínas plasmáticas totales.

Las poblaciones de linfocitos B, linfocitos T, y las subpoblaciones de linfocitos Th y Tc y linfocitos NK, aun con ligeras variaciones se encuentran comprendidos dentro de los límites de referencia establecidos para équidos adultos sanos. Mientras que el sexo no modificó la dinámica de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias, la edad condicionó un declive de las formas absolutas de linfocitos T, linfocitos Th, linfocitos Tc, linfocitos B y NK, con aumento de las formas porcentuales de linfocitos T y Th, sin modificaciones del cociente CD4/CD8.

En conclusión, los parámetros hematológicos y las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T, Th, Tc, linfocitos B y NK se encuentran comprendidos dentro de los rangos de referencia presentados para équidos adultos sanos. La edad y en menor medida el sexo influyen significativamente el hemograma y el inmunofenotipo en el caballo PRE, justificando la creación de rangos de referencia ajustados a dichas condiciones fisiológicas. El declive de los parámetros linfocitarios con la edad es una condición natural del individuo sano, que acontece en todas las especies animales y que podría ser el origen de la inmunocompetencia que se pone de manifiesto en animales geriátricos.

PALABRAS CLAVE: Edad. Sexo. Hematología. Citometría de flujo. Poblaciones linfocitarias. Caballo.

8.-SUMMARY

HEMATOLOGICAL AND IMMUNOPHENOTIPICAL CHARACTERIZATION IN ANDALUSIAN HORSE

Simultaneous assessing of haematological parameters and lymphocyte subsets is a the most effective method for characterizing disorders such as leukaemia, lymphomas, autoimmune diseases and infectious process, offering a prognosis and evaluating the response to the treatment. In order to clinically interpret these parameters, it is necessary to set the normal reference values, estimating the age- and gender-related variations. For these reasons the following objectives were proposed: 1) To establish the reference values of haematological parameters of Andalusian horses. 2) To assess the influence of age and gender in the haematological parameters of the Andalusian horses e. 3) To characterize lymphocyte subpopulations in the Andalusian horse 4) To evaluate age and gender-related variations of the lymphocyte subsets in the Andalusian horses

159 horses, 77 male and 82 females, sorted in four age groups: Group A (animals between 1 and 2 years old), Group B (between 2 and 3 years old); Group C (between 3 and 4 years old) and Group D (between 4 to 7 years old). All blood samples were obtained from the jugular vein between 9 and 12 AM, during a period of four months. Immediately after sampling blood smears were carried out. For haematological and immunophenotyping determinations tubes with EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) as anticoagulant were used. The remaining blood was kept in lithium-heparin tubes for plasmatic protein determinations.

The following parameters were determined by means of a semiautomatic cell-counter (Sysmex F-800): red blood cell count, haemoglobin concentration, packed cell volume (PCV), mean corpuscular volume (MCV), mean haemoglobin concentration (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), number of platelets and white blood cell count. By means of blood smear, the differential white blood cell count was estimated by counting lymphocytes, band neutrophils, total neutrophils, eosinophils, monocytes and basophiles. Serum total proteins were also quantified by a mass spectrophotometry. Flow Cytometry was applied to determine the white cell count and the number and percentage of total lymphocytes, B lymphocytes, T lymphocytes, Th cells and Tc lymphocytes. Total number and percentage of B cells were also estimated mathematically by subtracting – from 100% – the percentage of T and NK cells (CD2+). Natural killer cell (NK) numbers were also calculated mathematically by subtracting total T

cells from CD2+ cells, as in the horse, the latter epitope is expressed on the surface of all T lymphocytes and NK cells.

Haematological parameters were within the reference range for this species according to published data. Gender has a limited influence over these parameters, being the haemoglobin concentration higher in males and total white blood cell count higher in females. Aging caused a reduction in the number of red blood cells along with a compensatory increase of MCV and MCH, a decline in the number of leukocytes, platelets, lymphocytes and neutrophils as well as an increase in the percentage of neutrophils and the N/L ratio. There were no age-related differences in band neutrophils, eosinophils, monocytes and basophils together with a variable fluctuation in the total plasma protein content.

B-cell, T-cell, including Th and Tc lymphocytes and NK cells, were within the reference ranges for adult horses. Whereas sex did not exert any influence over lymphocytes subsets, there were an age-related decrease in the number of T cells, Th and Tc lymphocytes, B cells and NK cells, together with an increase in the percentage of total T and Th cell, without differences related age in the CD4/CD8 ratio.

In conclusion, haematological parameters and populations of T, Th, Tc, B and NK cells are within the reported reference range for adult horses. Age and, to a lesser extent, gender, have a significant influence in the haemogram and the immunophenotype of the Andalusian horse, warranting the production of a reference range specific for age and gender. The decline of lymphocyte population numbers with age is normal in all species and would account for immunosuppression observed in geriatric individuals.

KEY WORDS: Age. Sex. Haematology. Flow Cytometry. Subset lymphocytes. Horse.

9.-INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

9.1.-ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. .- Espectro de emisión de tres fluorocromos tras la excitación con el láser de 488 nm.....	76
Figura 2.- Esquema ilustrativo del paso de células por el sistema hidráulico en forma de flujo individual y la incidencia del haz de láser sobre cada una de las células.....	78
Figura 3.- Representación biparamétrica en función de la dispersión frontal y lateral, análisis morfológico de las poblaciones celulares.....	79
Figura 4.- Representación biparamétrica de la fluorescencia emitida por la población sesgada de linfocitos.	79
Figura 5.- Esquema de un citómetro de flujo.....	80
Figura 6.- Histograma biparamétrico de FS frente a SS con acotamiento de la ventana de linfocitos.....	109
Figuras 7 y 8.- Histogramas biparamétricos frente a CD4 y CD8 que muestran como las células positivas a CD4 y CD8 se corresponden morfológicamente con linfocitos ...	109
Figura 9.- Histograma biparamétrico de CD2 frente a CD8 que incluye únicamente las células acotadas en la región de linfocitos	110
Figura 10.- Histograma biparamétrico de CD2 frente a linfocitos B que incluye únicamente las células acotadas en la región de linfocitos.....	110
Figura 11.- Histograma biparamétrico CD2 frente a CD4 que incluye únicamente las células acotadas en la región de linfocitos.....	110
Figura 12.- Diferencias estadísticamente significativas en la concentración de hemoglobina entre machos y hembras, en la totalidad de la población analizada....	120
Figura 13.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de glóbulos rojos entre los cuatro grupos de edad.	123
Figura 14.- Diferencias estadísticamente significativas en el VCM entre los cuatro grupos de edad.....	123
Figura 15.- Diferencias estadísticamente significativas en la HCM entre los cuatro grupos de edad.....	124

Figura 16.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de plaquetas entre los cuatro grupos de edad.....	124
Figura 17.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de eritrocitos entre machos y hembras en cada grupo de edad.	129
Figura 18.- Diferencias estadísticamente significativas en la concentración de hemoglobina entre machos y hembras en cada grupo de edad.....	129
Figura 19.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de leucocitos totales entre los cuatro grupos de edad.	137
Figura 20.- Diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos entre los cuatro grupos de edad.....	137
Figura 21.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de linfocitos entre los cuatro grupos de edad.	138
Figura 22.- Diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de neutrófilos entre los cuatro grupos de edad.	138
Figura 23.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de neutrófilos entre los cuatro grupos de edad.....	139
Figura 24.- Diferencias estadísticamente significativas en el cociente N/L entre los cuatro grupos de edad.....	139
Figura 25.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de leucocitos totales entre machos y hembras en los cuatro grupos de edad.....	148
Figura 26.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas de linfocitos CD2+ entre los grupos de edad	156
Figura 27.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas porcentuales de linfocitos CD2+ entre los grupos de edad.	156
Figura 28.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas de linfocitos T entre los grupos de edad.	157
Figura 29.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas porcentuales de linfocitos T entre los grupos de edad.	157
Figura 30.-- Diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas de linfocitos Th entre los grupos de edad.	158
Figura 31.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas porcentuales de linfocitos Th entre los grupos de edad.	158

Figura 32.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas de linfocitos Tc entre los grupos de edad.....	159
Figura 33.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de linfocitos B marcados con anticuerpo monoclonal entre los grupos de edad.....	159
Figura 34.- Diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos marcados con anticuerpo monoclonal entre los cuatro grupos de edad.....	160
Figura 35.- Diferencias estadísticamente significativas en el número de linfocitos B calculado mediante fórmula matemática (linfocitos-linfocitos CD2 ⁺) entre los grupos de edad.	160
Figura 36.- Diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos B calculado mediante fórmula matemática (linfocitos-linfocitos CD2 ⁺) entre los grupos de edad.	161
Figura 37.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas absolutas de linfocitos NK entre los grupos de edad.....	161
Figura 38.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas porcentuales de linfocitos NK entre los grupos de edad.....	162
Figura 39.- Diferencias estadísticamente significativas en las formas porcentuales de linfocitos Tc entre machos y hembras en cada grupo de edad.....	170
Figura 40.- Diferencias estadísticamente significativas en el cociente CD4/CD8 entre los distintos grupos de edad.....	174
Figura 41.- Diferencias estadísticamente significativas en el cociente CD4/CD8 entre machos y hembras dentro de cada grupo de edad.	174

9.2.-ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Representación esquemática de los diversos tipos de policitemia descritos para équidos.....	18
Tabla 2.- Componentes proteicos del suero en équidos.	51
Tabla 3.- Distribución de los 159 animales Pura Raza Española en grupos de edad y sexo.....	105
Tabla 4.- Anticuerpos monoclonales empleados en el estudio.	111
Tabla 5.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales en los 159 équidos PRE.....	118

Tabla 6.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales de sexo macho.	119
Tabla 7.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales de sexo hembra.	119
Tabla 8.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales del grupo de edad A (1-2 años).	121
Tabla 9.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales del grupo de edad B (2-3 años).	121
Tabla 10.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales del grupo de edad C (3-4 años).	122
Tabla 11.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los animales del grupo de edad D (4-7 años).	122
Tabla 12.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los machos del grupo de edad A (1-2 años).	125
Tabla 13.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a las hembras del grupo de edad A. (1-2 años).	125
Tabla 14.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los machos del grupo de edad B (2-3 años).	126
Tabla 15.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a las hembras del grupo de edad B (2-3 años).	126
Tabla 16.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los machos del grupo de edad C (3-4 años).	127

Tabla 17.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a las hembras del grupo de edad C (3-4 años).	127
Tabla 18.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a los machos del grupo de edad D (3-4 años).	128
Tabla 19.- Estadísticos básicos de los parámetros eritrocitarios, de las plaquetas y de las proteínas plasmáticas totales correspondientes a las hembras del grupo de edad D (3-4 años).	128
Tabla 20.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos correspondientes a los 159 animales.....	130
Tabla 21.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales correspondientes a los 159 animales.....	130
Tabla 22.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo macho.	131
Tabla 23.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo macho.....	131
Tabla 24.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo hembra.	132
Tabla 25.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo hembra.	132
Tabla 26.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales del grupo de edad A (1-2 años).	133
Tabla 27.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales del grupo de edad A (1-2 años).....	133
Tabla 28.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales del grupo de edad B (2-3 años).	134
Tabla 29.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales del grupo de edad B (2-3 años).....	134
Tabla 30.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales del grupo de edad C (3-4 años).	135

Tabla 31.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales del grupo de edad C (3-4 años).....	135
Tabla 32.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales del grupo de edad D (4-7 años).	136
Tabla 33.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales del grupo de edad D (4-7 años).....	136
Tabla 34.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad A (1-2 años)...	140
Tabla 35.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de los animales de sexo macho del grupo de edad A (1-2 años).	140
Tabla 36.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad A (1-2 años)..	141
Tabla 37.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo hembra del grupo de edad A (1-2 años).....	141
Tabla 38.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo macho del grupo de edad B (2-3 años).	142
Tabla 39.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo macho del grupo de edad B (2-3 años).....	142
Tabla 40.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo hembra del grupo de edad B (2-3 años).....	143
Tabla 41.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo hembra del grupo de edad B (2-3 años).....	143
Tabla 42.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo macho del grupo de edad C (3-4 años).	144
Tabla 43.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo macho del grupo de edad C (2-3 años).....	144
Tabla 44.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo hembra del grupo de edad C (3-4 años).....	145
Tabla 45.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo hembra del grupo de edad C (3-4 años).	145
Tabla 46.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo macho del grupo de edad D (4-7 años).	146

Tabla 47.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo macho del grupo de edad D (2-3 años).....	146
Tabla 48.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores absolutos en los animales de sexo hembra del grupo de edad D (4-7 años).....	147
Tabla 49.- Estadísticos básicos de las variables leucocitarias en valores porcentuales en los animales de sexo hembra del grupo de edad D (2-3 años).	147
Tabla 50.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los 159 animales.	149
Tabla 51.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los 159 animales.	149
Tabla 52.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho.	150
Tabla 53.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho.	150
Tabla 54.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra.....	151
Tabla 55.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra.....	151
Tabla 56.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad A (1-2 años).....	152
Tabla 57.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad A (1-2 años).....	152
Tabla 58.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad B (2-3 años).....	153
Tabla 59.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad B (2-3 años).....	153
Tabla 60.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad C (3-4 años).	154
Tabla 61.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad C (3-4 años).....	154
Tabla 62.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad D (4-7 años).	155

Tabla 63.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes al grupo de edad D (4-7 años).....	155
Tabla 64.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad A (1-2 años).	162
Tabla 65.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad A (1-2 años).	162
Tabla 66.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad A (1-2 años).	163
Tabla 67.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad A (1-2 años).	164
Tabla 68.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad B (2-3 años).	164
Tabla 69.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad B (2-3 años).	165
Tabla 70.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad B (2-3 años).	165
Tabla 71.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad B (2-3 años).	166
Tabla 72.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad C (3-4 años).	166
Tabla 73.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad C (3-4 años).	167

Tabla 74.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad C (3-4 años).	167
Tabla 75.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad C (3-4 años).	168
Tabla 76.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad D (4-7 años).	168
Tabla 77.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo macho del grupo de edad D (4-7 años).	169
Tabla 78.- Estadísticos básicos de las formas absolutas linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad D (4-7 años).	169
Tabla 79.- Estadísticos básicos de las formas porcentuales linfocitarias respecto al total de linfocitos correspondientes a los animales de sexo hembra del grupo de edad D (4-7 años).	170
Tabla 80.- Estadísticos básicos de los valores porcentuales de linfocitos Th, linfocitos Tc respecto a la población de linfocitos T correspondientes a la población total de animales analizados y en cada grupo de edad y sexo.	172
Tabla 81.- Estadísticos básicos del cociente CD4/CD8 en el colectivo animal analizado, y en cada grupo de sexo y edad.	173
Tabla 82.- Coeficientes de correlación entre los parámetros eritrocitarios, las plaquetas y las proteínas plasmáticas totales en 159 animales PRE.	175
Tabla 83.- Coeficientes de correlación entre los parámetros eritrocitarios, plaquetas, proteínas plasmáticas y valores absolutos leucocitarios en 159 animales PRE.	176
Tabla 84.- Coeficientes de correlación entre los parámetros eritrocitarios, plaquetas, proteínas plasmáticas y los valores porcentuales leucocitarios en 159 animales PRE.	177
Tabla 85.- Coeficientes de correlación entre los parámetros eritrocitarios, plaquetas, proteínas plasmáticas y los valores porcentuales linfocitarios en 159 animales PRE.	178
Tabla 86.- Coeficientes de correlación entre los parámetros eritrocitarios, plaquetas, proteínas plasmáticas y los valores absolutos linfocitarios en 159 animales PRE.	179

Tabla 87.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos leucocitarios en 159 animales PRE.....	180
Tabla 88.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos y porcentuales leucocitarios en 159 animales PRE.....	181
Tabla 89.- Coeficientes de correlación entre los valores porcentuales leucocitarios en 159 animales PRE.....	182
Tabla 90.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos leucocitarios y porcentuales linfocitarios en 159 animales PRE.	183
Tabla 91.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos leucocitarios y linfocitarios en 159 animales PRE.....	184
Tabla 92.- Coeficientes de correlación entre los valores porcentuales leucocitarios y absolutos linfocitarios en valores absolutos en 159 animales PRE.	185
Tabla 93.- Coeficientes de correlación entre los valores porcentuales leucocitarios y linfocitarios en 159 animales PRE.....	186
Tabla 94.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos linfocitarios en 159 animales PRE.....	187
Tabla 95.- Coeficientes de correlación entre los valores absolutos y porcentuales linfocitarios en 159 animales PRE.....	188
Tabla 96.- Coeficientes de correlación entre los parámetros linfocitarios en valores porcentuales linfocitarios en 159 animales PRE.....	189

Abbas, AK; Lichtman, AH y Pillai, S. Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system. WB Saunders Company. Philadelphia, 2001.

Abbott DL y McGrath JP. Evaluation of flow cytometric counting procedure for canine reticulocytes by use of thiazole orange. *Am. J. Vet. Res.*, 1991; 52 (5): 723-727.

Adkins, B; Williamson, T; Guevara, P y Bu Y. Murine neonatal lymphocytes show rapid early cell cycle entry and cell division. *J. Immunol.*, 2003; 170 (9): 4548-456.

Agrícola, R; Carvalho, H; Barbosa, M; Pereira, M; Medeiros, JA y Ferreira-Dias, G. Blood lymphocyte subpopulations, neutrophil phagocytosis and proteinogram during late pregnancy and postpartum in mares. *Reprod. Domest. Anim.*, 2008; 43 (2): 212-217.

Agüera, EI; Rubio, MD; Agüera, S; Escribano, B y Castejón, FM. Efectos de una prueba de ejercicio de intensidad creciente en parámetros bioquímicos sanguíneos en potros Pura Raza Española. *Arch. Zootecn.*, 1994; 43 (162): 153-164.

Akkoyunlu, M y Fikrig, E. Gamma interferon dominates the murine cytokine response to the agent of human granulocytic ehrlichiosis and helps to control the degree of early rickettsemia. *Infect. Immun.*, 2000; 68 (4): 1827-1833.

Al Qouzi, S; Al Salamah, A; Al Rasheed, R; Al Musalam, A; Al Khairy, K; Kheir, O; Al Ajaji, S y Haje, AH. Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes in Saudi Men. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2002; 9 (2): 279-281.

Albright, JW y Albright JF. Ageing alters the competence of the immune system to control parasitic

infection. *Immunol. Lett.*, 1994; 40 (3): 279-285.

Allard, RL; Carlos, AD y Faltin, EC. Canine hematological changes during gestation and lactation. *Comp. Anim. Pract. Hematol. Reprod.*, 1989; 19 (3): 3-6.

Allen, BV y Archer, RK. Some haematological values in English Thoroughbred horses. *Vet. Rec.*, 1976; 98 (10): 195.

Allen, BV y Powell, DJ. Effects of training and time of day of blood sampling on the variation of some common haematological parameters in the normal thoroughbred racehorses. En: *Equine Exercise Physiology*. Snow DH; Persson SGB, y Rose RJ (eds). Cambridge, UK. Granta Editions; 1983; pp. 328-335.

Alonso, AJ; Orden, MA; Prieto, F; Gutiérrez, C y Gonzalo, JM. Estudio hematológico en ovinos merinos trashumantes de León. Elementos formes y proteinograma. *Ann. Vet. Murcia.*, 1987; 3: 71-75.

Alonso, AJ; de Teresa, R; García, M; González, JR y Vallejo, M. The effects of age and reproductive status on serum and blood parameters in Merino Breed Sheep. *J. Vet. Med. A.*, 1997; 44 (4): 223-231.

Andrews, FM; Geiser, DR; White, SL; Williamson, LH; Maykuth PL y 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.

Araki, K y Rifkind, JM. Age dependent changes in osmotic hemolysis of human erythrocytes. *J. Gerontol.*, 1980; 35 (4): 499-505.

Archer, RK y Jeffcott, LB. En: *Comparative clinical haematology*. 1ª ed. Archer, RK. (ed). Oxford, Blackwell Scientific; 1977; pp. 161-185.

- Archer, RK. The normal haemograms and coagulograms of the English Thoroughbred horse. *J. Comp. Pathol.*, 1959; 6: 390-399.
- Aspinall, R y Andrew D. Thymic involution in aging. *J. Clin. Immunol.*, 2000; 20 (4): 250-256.
- Ayoub, IA y Yang, TJ. Age-dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: a longitudinal study. *Dev. Comp. Immunol.*, 1996; 20 (5): 353-363.
- Balasuriya, UBR y McLachlan, NJ. The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2004; 102 (3): 107-129.
- Balloch, AJ y Cauchi, MD. Reference ranges for haematology parameters in pregnancy derived from patient populations. *Clin. Lab. Haemat.*, 1993; 15 (1): 7-14.
- Banks, KL. y Henson, JB. Quantitation of immunoglobulin-bearing lymphocyte responses to mitogens in horses persistently infected by equine infectious anemia virus. *Infect. Immunol.*, 1973; 8: 679-682.
- Barman, BN; Ashwood, ER y Giddings JC. Separation and size distribution of red blood cells of diverse size, shape, and origin by flow/hyperlayer field-flow fractionation. *Anal. Biochem.*, 1993; 212 (1): 35-42.
- Barnett, D; Granger V; Whitby L; Storie I, y Reilly JT. Absolute CD4⁺ T-lymphocyte and CD34⁺ stem cell counts by single-platform flow cytometry: the way forward. *Br. J. Haematol.*, 1999; 106 (4): 1059-1062.
- Baumler, H; Neu, B; Mitlohner, R; Georgieva, R; Meiselman, HJ y Kiesewetter, H. Electrophoretic and aggregation behavior of bovine, horse and human red blood cells in plasma and in polymer solutions. *Biorheology*, 2001; 38 (1): 39-51.
- Bautista, CR y Mosqueda, JJ. Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria. *Vet. Méx.*, 2005; 36 (4): 453-468.
- Bayly, WM; Meyers, KM; Keck, MT; Huston, LJ y Grant, BD. Exercise-induced alterations in haemostasis in thoroughbred horses. En: *Equine Exercise Physiology*. Snow, DH; Persson, SGB, y Rose, RJ. (eds). Cambridge, UK. Granta Editions; 1983; pp. 336-343.
- Bendali-Alcène, S; Monier, J; Fontaine, M; Greenland, T y Cadoré, T. Flow cytometric analysis of blood lymphocyte phenotypes in horses infected with the equine infectious anemia virus. *J. Equine Vet. Sci.*, 1995; 15 (8): 360-364.
- Berggren, PC. Aplastic anemia in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1981; 179 (12): 1400-1402.
- Berlink, B; Correa, J; Evangelista, A; Peixoto, R y Penteado, C. Constituintes hematimétricos do sangue de éguas gestantes de raça árabe. *Vet. Notícias, Uberiândia*, 2000; 6 (1): 51-55.
- Bernstein, E; Kaye, D; Abrutyn, E; Gross, P; Dorfman, M y Murasko, DM. Immune response to influenza vaccination in a large healthy elderly population. *Vaccine*, 1999; 17 (1): 82-94.
- Bewig, B; Mariske, I y Botthcer, H. Crohn's disease mimicking sarcoidosis in bronchoalveolar lavage. *Respiration*, 1999; 66 (5): 467-469.
- Bienzle, D. Monocytes and macrophages. En: *Schalm's Veterinary Hematology*. Feldman, BF; Zinkl, JG y Jain, NC (eds). Lippincott Williams & Wilkins. Oxford, UK., 2000; pp. 318-320.

- Blach-Olszewska, Z. Innate immunity: cells, receptors and signaling pathways. *Arch. Immunol. Ther. Exper.*, 2005; 53 (3): 245-253.
- Blanchard, TL; Orsini, JA; García, MC; Elmore, RG; Youngquist, RS y Bierschwal, J. Influence of dystocia on white blood cell and blood neutrophil counts in mares. *Theriogenology*, 1986; 25 (2): 347-351.
- Blood, DC y Radostic, OM. *Veterinary Medicine*. 7ª ed. Philadelphia, E.E.UU: Bailliere Tindall; 1989.
- Blount, DG; Pritchard, DI, y Heaton, PR. Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005; 108 (3-4): 399-407.
- Blue, ML; Daley, JF; Levine, H y Schlossman, SF. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J. Immunol.*, 1985; 134 (4): 2281-2286.
- Bogg, DR. The kinetics of neutrophilic leukocytes in health and in disease. *Blood*, 1967; 4: 359-386.
- Botella, J y Clavero, JA. Cambios generales del organismo materno durante la gestación. En: Tratado de ginecología. Tomo I. Fisiología femenina. 10ª ed. Científico-Médica, 1974; pp. 269-285.
- Boucher, JH; Lessin, LS y McMeekin, RR. Echinocytosis: The cause of equine exertional diseases- a hypothesis. En: Proceedings of the 5th Annual Scientific Meeting, Association of Equine Sports Medicine. Lawrenceville, EE.UU. 1985, pp 92-97
- Boy, MG; Zhang, C; Antczak, DF; Hamir, AN, y Whitlock, RH. Unusual selective immunoglobulin deficiency in an Arabian foal. *J. Vet. Intern. Med.*, 1992; 6 (4): 201-205.
- Branch, DW. Physiologic adaptations of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1992; 28 (3-4): 120-122.
- Brenon, HC. Erythrocyte and haemoglobin studies in thoroughbred racing horses. *Am J. Vet. Med. Assoc.*, 1956; 128 (7): 343-345.
- Briggs, C; Kunka, S; Hart, D; Oguni, S y Machin, SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br. J. Haematology.*, 2004; 125 (1): 93-99.
- Brito, GF; Yamazaki, MA; Espinosa, PSS; Vázquez, TO; Huerta-López, J y Berrón-Pérez, R. Eosinófilos: Revisión de la literatura. *Alerg. Asma Inmunol. Pediatr.*, 2003; 12 (2): 56-62.
- Brown, M y Wittwer, C. *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. *Clin Chem. Blood.*, 2000; 46 (8): 1221-1229.
- Bruin, G; Kuipers, H; Keizer, HA y Vander Vusse, GJ. Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training load. *J. Appl. Physiol.*, 1994; 76: 1908-1913.
- Bubna, LH y Jaksch, W. Pilot study of daily variations in blood values of horses of different ages. *Wiener-Tierärztliche Monatsschrift.*, 1986; 73: 293-299.
- Bucy, RP; Chen, CL; Cihak, J; Löscher, U y Cooper, MD. Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J. Immunol.*, 1988; 141 (7): 2200-2205.
- Buechner-Maxwell, V; Zhang, C; Robertson, J; Jain NC; Antczak, DF; Feldman, BF, y Murray, MJ. Intravascular leukostasis and systemic aspergillosis in a horse with subleukemic acute myelomonocytic leukemia. *J. Vet. Intern. Med.*, 1994; 8 (4): 258-263.

- Bull, ME; Kennedy-Stoskopf, S; Levine, JF, y Loomis, M. Evaluation of T lymphocytes in captive African lions (*Panthera leo*) Infected with feline immunodeficiency virus. *Am. J. Vet. Res.*, 2003; 64 (10): 1293-1300.
- Burguez, PN; Ousey, J; Cash, RS y Rossdale, PD. Changes in blood neutrophil and lymphocyte counts following administration of cortisol to horses and foals. *Equine Vet. J.*, 1983; 15 (1): 58-60.
- Butterworth, AE y Davis, JR. Eosinophil function. *N. Engl. J. Med.*, 1981; 304 (3): 154-156.
- Caldwell, CW; Everett, ED; McDonald, G; Yesus, YW y Roland, WE. Lymphocytosis of gamma/delta T cells in human ehrlichiosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1995; 103 (6): 761-766.
- Calvelli, T; Denny, TN; Paxton, H; Gelman, R, y Kagan, J. Guidelines for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. *Cytometry*, 1993; 14 (7): 702-715.
- Campbell, DJ; Rawlings, JM y Koelsch, S. Age-related differences in leukocyte populations, lymphocyte subsets and immunoglobulin productions in the cat. *Scand. J. Immunol.*, 2001; 54 (1): 24-59.
- Campbell, DJ; Rawlings, JM; Koelsch, S; Wallace, J; Strain, JJ, y Hannigan, BM. Age-related differences in parameters of feline immune status. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2004; 100 (1-2): 73-80.
- Car, BD. Erythropoiesis and erythrokinetics. En: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman, BF; Zinkl, JG y Jain, NC. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp. 105-108.
- Caracostas, MC; Moore, WE y Smith, JE. Intravascular neutrophilic granulocyte kinetics in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1981; 42 (4): 623-625.
- Carlson, G.P. Clinical chemistry test. En: Large Animal Internal Medicine. Smith, B. P., (ed.), C.V. Mosby Company, St. Louis, 1990; pp. 386-414.
- Carlson, GP. Hematology and body fluids in the equine athlete: A review. En: Equine Exercise Physiology 2. Gillespie JR y Robinson, NE (eds). California, USA, 1987; pp. 393-425.
- Castillo-Olivares, J; Tearle, J; y Montesco, F. Detection of equine arteritis virus (EAV)-specific cytotoxic CD8+ T lymphocyte precursors from EAV-infected ponies. *J. Gen. Virol.*, 2003; 84 (10): 2745-2753.
- Caswell, JL; Yager, JA; Parker, WM y Moore, PF. A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histologic lesions of canine demodicosis. *Vet. Pathol.*, 1997; 34 (4): 279-287.
- Cebulj-Kadunc, N; Bozic, M; Kosec, M y Cestnik, V. The influence of age and gender on haematological parameters in Lipizzan horses. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 2002; 49 (4): 217-221.
- Cebulj-Kadunc, N; Kosec, M y Cestniki, V. The variations of white blood cell count in Lipizzan horses. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 2003; 50 (5): 251-253.
- Cella, M; Sallusto, F y Lanzavecchia, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 1997; 9 (1): 10-16.
- Center for Diseases Control Prevention (CDCP). Guidelines for the Prevention of Opportunistic Infections in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. *MMWR* 1999; 48(RR-10):1-59.

- Chabanne, L; Fournel, C; Caux, C; Bernaud, J; Bonnefond, C; Monier, JC y Rigal, D. Abnormalities of lymphocyte subsets in canine systemic lupus erithematosus. *Autoimmunity*, 1995; 22 (1): 1-8.
- Chaffin, MK; Cohen, ND; Marten, RJ; Edwards, RF; Nevill M y Smith, R III. Hematologic and immunophenotypic factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals at equine breeding farms with endemic infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2004; 100 (1-2): 33-48.
- Chess, L y Jiang, H. Resurrecting CD8⁺ suppressor T cells. *Nature Immunol.*, 2004; 5 (5): 469-471.
- Chiboka, O y Thomas, KD. Changes in the blood and foetal fluid composition at different stages of gestation in ewes. *Beitrage zur Tropischen Landwirtschaft und Veterinarmedizin*, 1985; 23 (1): 65-71.
- Chng, WJ; Tan, GB y Kuperan, P. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004; 11 (1): 168-173.
- Chopra, RK; Holbrook, NJ y Powers, DC. Interleukin 2, interleukin 2 receptor and interferon-gamma synthesis and m-RNA expression in forbol myriastate acetate and calcium ionophore A23187-stimulated T cell from elderly humans. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1989; 53 (2): 297-308.
- Clarke, LL; Ganjam, VK y Fichtenbaum, B. Effects of feeding on renin-angiotensin-aldosterone system of the horse. *Am. J. Physiol.*, 1988; 254: 524-530.
- Clarkson, GT. Haematology and serum iron in the racehorse. M. V. Sc. Thesis. University of Melbourne, U.K.; 1968.
- Cole, DJ y Whitney, MS. Interpreting a bovine CBC: collecting a sample and evaluating the erythron. *Vet. Med.*, 1997; 460-468.
- Coles, DJ. *Veterinary Clinical Pathology*. 2^a ed. W.B Saunders Co; Philadelphia, U.S.A., 1974.
- Cooper, C; Sears, W y Bienzle, D. Reticulocyte changes after experimental anemia and erythropoietin treatment of horses. *J. Appl. Physiol.*, 2005; 99 (3): 915-921.
- Cornelius, CE; Baker, NF; Kaneko, JJ y Douglas, JR. Distribution and turnover of iodine-131 tagged bovine albumin in normal and parasitized cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1962; 23: 837-842.
- Cosarizza, A; Ortolani, C; Monti, D y Francheschi, C. Cytometric analysis of immunosenescence. *Cytometry*, 1997; 27 (4): 297-313.
- Craddock, CG; Longmire, R y McMillan R. Lymphocytes and the immune response. I. *N. Eng. J. Med.*, 1971, a; 285 (6): 324-331.
- Craddock, CG; Longmire, R y McMillan R. Lymphocytes and the immune response. II. *N. Eng. J. Med.*, 1971, b; 285 (7): 178-384.
- Creevy, KE; Bauer, TR, Jr.; Tuschong, LM; Embree, LJ; Colenda, L; Cogan K; Starost MF; Haskins, ME y Hickstein, DD. Canine leukocyte adhesion deficiency colony for investigation of novel hematopoietic therapies. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2003; 94 (1-2): 11-22.
- Cuenca, R y Pastor, J. Utilidad del hemograma en la clínica equina. *Equinus*, 2006; 14: 1-27.
- Culmsee K y Nolte I. Flow cytometry and its application in small animal oncology. *Methods Cell Sci.*, 2002; 24 (1-3): 49-54.

- Da Costa, RP; Carvalho, H; Agrícola, R; Alpoim-Moreira, J; Martins, C, y Ferreira-Dias, G. Peripheral Blood Neutrophil Function and Lymphocyte Subpopulations in Cycling Mares. *Reprod. Domest. Anim.*, 2003; 38 (6):464-469.
- Daels, PF; Jorge De Moras, M; Stabenfeldt, GH; Hughes, H y Lesley, B. The corpus luteum a major source of oestrogen during early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1991; 44: 502-508.
- D'Agostino, P; Milano, S, Barbera, C; Di Bella, G; La Rosa, M; Ferlazzo, V; Farruggio, R; Miceli, DM; Miele, M; Castagnetta, L y Cillari, E. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1999; 876: 426-429.
- Dalton, R.G. The significance of variations with activity and sedation in the haematocrit, plasma protein concentration and erythrocyte sedimentation rate of horses. *Br. Vet. J.*, 1972; 128 (9): 439-445.
- Dascanio, JJ ; Zhang, CH; Antczak, DF; Blue, JT, y Simmons, TR. Differentiation of chronic lymphocytic leukemia in the horse. A report of two cases. *J. Vet. Intern. Med.*, 1992; 6 (4): 225-229.
- Davies, EG; Wilkerson, MJ y Rush, BR. Flow cytometry: clinical applications in equine medicine. *J. Vet. Intern. Med.*, 2002; 16 (4): 404-410.
- Day, MJ. Biology of lymphocytes and plasma cells. En: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman, BF; Zinkl, JG y Jain, NC. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp. 240-246.
- De Bruijn, C; Veenman JN; Rutten VP; Teske E; van Nieuwstadt RA; y van den Ingh TS. Clinical, histopathological and immunophenotypical findings in five horses with cutaneous malignant lymphoma. 2007; *Res. Vet. Sci.*, 83 (1): 63-72.
- De Gaetano, G; Cerletti, C; Nanni-Costa, MP y Poggi, A. The blood platelet as an inflammatory cell. *Eur. Respir. J. Suppl.*, 1989; 6: 441-445.
- De Rosa, SC; Andrus, JP; Perfetto, SP; Mantovani, JJ; Herzenberg, LA; Herzenberg, LA y Roederer, M. Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J. Immunol.*, 2004; 172 (3): 1637-1645.
- De Vries, E; de Bruin-Versteeg, S; Comans-Bitter, WM; de Groot, R; Hop, WCJ; Boerma, GJM; Lotgering, FK y van Dongen, JMM. Longitudinal Survey of Lymphocyte Subpopulations in the First Year of Life. *Pediatr. Res.*, 2000; 47 (4): 528-537.
- Deeg, CA; Kaspers, B; Gerhards, H; Turau, SR; Wollanke, B y Wildner, G. Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001; 42 (2): 393-398.
- Denny, TN; Stein, D; Mui, T; Scolpino A, y Holland, B. Quantitative determination of surface antibody binding capacities of immune subsets present in peripheral blood of healthy adult donors. *Cytometry*, 1996; 26 (4): 265-274.
- Dhabhar, FS. Stress-Induced Enhancement of Cell-Mediated Immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1998; 840 (1): 359-372.
- Díez, I; De Vicente, C; Prieto, F; Montes, A y Gonzalo, JM. Estudio hematológico en bovinos de la raza Avileña: Elementos morfológicos y proteinograma. I Congr. Nac. Patol. Bovina, León, 1982; pp. 253-260.
- Doherty, MJ; Davies, PD; Bellis, MA y Tocque, K. Tuberculosis in England and Wales. Ethnic origin is more important than social deprivation. *BMJ*, 1995; 15: 310 (6998): 967-969.

Domingo, R. Actuación del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona en yeguas Pura Raza Española durante la gestación. Tesis Doctoral. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad CEU-Cardenal Herrera. Valencia, 2008.

Drazen, DL; Demas, GE y Nelson, RJ. Leptin effects on immune function and energy balance are photoperiod dependent in siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology*, 2001; 142 (7): 2768-2775.

Duncan S, Prasse KW. Leukocytes. En: Veterinary laboratory medicine clinical pathology. Duncan, JR y Prasse, KW (ed.) Ames: Iowa State University Press, 1986; pp 31-60.

Duncan, RA; von Reyn, CF; Alliegro, GM; Toossi, Z; Sugar, AM y Levitz, SM. Idiopathic CD4+ T lymphocytopenia four patients with opportunistic infections and no evidence of HIV infection. *N. Engl. J. Med.*, 1993; 328 (6): 393-398.

Dunlap, JS y Dickson, WM. The effect of age and pregnancy on ovine blood proteins fractions. *Am. J. Vet. Res.*, 1955; 16 (58): 91-95.

Eades, SC y Bounous, DI. En: Laboratory profiles of equine diseases. St Louis, USA. Mosby, 1997.

Easley, JR. Erytogram and red cell distribution width of equidae with experimentally induced anemia. *Am. J. Vet. Res.*, 1985; 46 (11): 2378-2384.

Effros, RB. Long-term immunological memory against viruses. *Mech. Ageing Dev.*, 2000; 121 (1-3): 161-171.

Eikmeier, H. Reference values in the laboratory diagnosis of the horse. *Tierarztl. Prax.*, 1982; 10 (2): 261-263.

Erben, R.G.; Raith, S.; Eberle, J. y Stangassinger, M. Ovariectomy augments B lymphopoiesis and generation of monocyte-macrophage precursors in rat bone marrow. *Am. J. Physiol.*, 1998; 274: 476-483.

Erkeller-Yuksel, FM; Deneys, V y Yuksel, B. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J. Pediatr.*, 1992; 120 (2): 216-222.

Escribano, B. Respuesta de diversos parámetros hematológicos en caballos de pura raza española sometidos a un ejercicio de intensidad creciente. Tesina de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba; 1994.

Escribano, BM; Castejón FM; Agüera EI; Muñoz, A y Rubio MD. Estudios de leucograma en potros de pura raza española sometidos a un ejercicio de intensidad creciente. *Med. Vet.*, 1995, b; 12 (3): 188-193.

Escribano, BM; Castejón FM; Agüera EI; Muñoz, A y Rubio MD. Respuesta hemática en potros de pura raza árabe sin entrenar sometidos a un ejercicio de intensidad creciente. *Med. Vet.*, 1995, c; 12 (4): 257-265.

Escribano, BM; Castejón, FM; Agüera, EI; Muñoz, A, y Rubio, MD. Effects of training in diverse hematologic parameter in Andalusian horses. *Rev. Esp. Fisiol.*, 1995, a; 51 (4): 207-212.

Escribano, BM; Castejón, FM; Santisteban, R; Vivo, R y Rubio, MD. Gender differences in non-specific immune response to exercise in the lactate threshold: A study in equine athletes. *Res. Vet. Sci.*, 2008; 85 (2): 250-256.

Escribano, BM; Castejón, FM; Vivo, R; Agüera, S; Agüera, EI y Rubio, MD. Nonespecific immune response of Peripherals blood neutrophils in two horse breeds (Anglo-Arabian and Spanish-Arabian): response

to exercise. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2005; 28 (2): 145-154.

Evans, DL; Jeffcott, LB y Knight, PK. Performance related problems and exercise physiology. En: *The equine manual*. Higgins y Wright (eds.). Philadelphia, 1995; pp 934-935.

Faldyna, M; Leva, L; Knotigova, P y Toman, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs- a flow cytometric study. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 2001; 82 (1-2): 23-37.

Fay, RA; Hughes, AO y Farron, NT. Platelets in pregnancy. Hyperdestruction in pregnancy. *Obst. Gynecol.*, 1983; 61: 238.

Fearon, DT y Locksley, RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 1996; 272 (5258): 50-54.

Felbinger, U. Selected serum constituents in pregnant and lactating thoroughbred mares. *Isr. J. Med.*, 1987; 43: 96-103.

Fermaglich, DH y Horohov, DW. The effect of ageing on immune responses. *Vet. Clin. N. Am. Equine Prac.*, 2002; 18 (3): 621-630.

Ferreira-Dias, G; Claudino, G; Carvalho, H; Agrícola, R; Alpoim-Moreira, J y Robalo Silva, J. Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status. *Domestic Anim. Endocrinol.*, 2005; 29 (1): 203-213.

Fireman, E; Lopilski, I; Greif, J; Lerman, Y; Chuarz, Chuarz, ; Man, A y Topilsky, M. Induced sputum compared to bronchoalveolar lavage for evaluating patients with sarcoidosis and non-granulomatous interstitial lung disease. *Respir. Med.*, 1999; 93 (11): 827-834.

Flaminio, MJB; LaCombe, V; Kohn, CW y Antczak, DF. Common variable immunodeficiency in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2002; 221 (9): 1296-1302.

Flaminio, MJB; Rush, BR y Shuman, W. Peripheral Blood lymphocyte subpopulation and immunoglobulin concentrations in healthy foals and foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *J. Vet. Intern. Med.*, 1999; 13 (3): 206-212.

Flaminio, MJB; Rush, BR; Cox, JH y Moore, WE. CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytopenia in a filly with *pneumocystis carinii* pneumonia. *Aust. Vet. J.*, 1998; 76 (6): 399-402.

Flaminio, MJB; Rush, BR; Davis, EG, Hennessy, K; Shuman, W y Wilkerson MJ. Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2000; 73 (3-4): 267-285.

Fraser DG; Oaks J; Brown W y McGuire TC. Identification of broadly recognized, T helper 1 lymphocyte epitopes in an equine lentivirus. *Immunology*, 2002; 105 (3): 295-305.

Freitas, AA y Rocha, B. Lymphocyte lifespans: homeostasis, selection and competition. *Immunol. Today*, 1993; 14 (1): 25-29.

Freitas, AA y Rocha, B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 83-111

Fridkis-Hareli, M; Mehr, R; Abel, L y Globerson, A. Developmental interactions of CD4 T cells and thymocytes: age-related differential effects. *Mech. Ageing Dev.*, 1995; 73 (3): 169-178.

- Friend, TH. Dehydration, stress and water consumption of horses during long-distance commercial transport. *J. Anim. Sci.*, 2001; 78 (10): 2568-2580.
- Fulop, T Jr; Fouque, C; Allaire, P; Perrin, N; Lacombe, G; Stankova, J; Rola-Pleszczynski, M; Gagné, D; Wagner, JR; Khalil, A y Dupuis G. Changes in apoptosis in human polymorphonuclear granulocytes with ageing. *Mech. Ageing Dev.*, 1997; 96 (1-3): 15-34.
- Gardner, RB; Hart, KA; Stokol, T; Divers, TJ y Flaminio, MJ. Fell Pony syndrome in a pony in North America. *J. Vet. Intern. Med.*, 2006; 20 (1): 198-203.
- Gatta, D; Greppi, GF; Casini, L; Pasquini, M; Colombani, B y Nordio, C. Feeding schedule and daily fluctuation of haematological parameters in horses. *Gesellschaft fur Ernährungsphysiologie*. Gottingen, Alemania; 1992; p. 86.
- Gaunt, S.D. y Pierce, K.R. Effects of estradiol on hematopoietic and marrow adherent cell of dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1986; 47 (4): 906-909.
- Gaunt, SD, y Pierce, KR. Myelopoiesis and marrow adherent cells in estradiol-treated mice. *Vet. Pathol.*, 1985; 22 (4): 403-408.
- Gavazza, A; Delgadoillo, A; Gugliucci, B; Pasquini, A; Lubas, G; Haematological Alterations observed in equine routine complete blood counts. A retrospective investigation. *Comp. Clin. Pathol.*, 2002; 11 (3): 131-139.
- Gentry, PA y Nyarko, K. Platelet lipids and prostaglandins. En: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman, BF; Zinkl, JG y Jain, NC. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp. 453-458.
- Gentry, PA. Platelet Biology. En: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman, BF; Zinkl, JG y Jain, NC. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp. 459-467.
- George, LW; Divers, TJ; Mahaffey, EA, y Suárez, MJ. Heinz body anemia and methemoglobinemia in ponies given red maple (*acer rubrum L*) leaves. *Vet. Pathol.*, 1982; 19 (5): 521-533.
- Gibson, KT y Alders, RC. Eosinophilic enterocolitis and dermatitis in two horses. *Equine Vet. J.*, 1987; 19 (3): 247-252.
- Gill, J y Kownacka, M. Seasonal changes in erythrocyte, hemoglobin and leukocyte indexes in pregnant mares of thoroughbred horses. *Bull. Acad. Pol. Sci. Biol.*, 1979; 27 (2): 143-148.
- Gill, J y Rastawicka, M. Diurnal changes in the hematological indices in the blood of racing. Arabian horse. *Polskie Archiwum Weteryjne*, 1986; 26: 169-179.
- Gill, J y Wanska, E. Seasonal changes in erythrocyte, hemoglobin and leukocyte indexes in barren mares of thoroughbred horses. *Bull. Acad. Pol. Sci. Biol.*, 1978; 26 (5): 347-353.
- Gill, J.; Flisinska-Bojanowska, A y Grzelkowska, K. Diurnal and seasonal changes in the WBC number, neutrophil percentage and lysozyme activity in the blood of barren, pregnant and lactating mares. *Advan. Agr. Sci.*, 1994; 3 (1): 15-23.
- Gilles, RG y Monif, MD. Interpretation of the maternal white blood cell count in the postpartum period. *Infect. Med.*, 2002; 19 (3): 106.
- Ginaldi, L; De Martinis, M; Modesti, M; Loreto, F; Corsi, MP, y Quaglino, D. Immunophenotypical changes of T lymphocytes in the elderly. *Gerontology*, 2000; 46 (5): 242-248.

- Ginther, OJ. Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects. Equine services Publishing, Cross Plains, Wisconsin, USA, 1979.
- Globerson, A y Effros RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol. Today*, 2000; 21 (10): 515-21.
- Globerson, A, T lymphocytes and aging. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1995; 107 (4): 491-497.
- Goetzl, EJ; Foster, DW y Payan, DG. A basophil-activating factor from human T lymphocytes. *Immunology*, 1984; 53 (2): 227-234.
- Gohary, GS y Bickhardt, K. The influence of blood sampling stress on blood values of sheeps. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 1979; 86 (6): 225-228.
- Golland, LC; Evans, DL; McGowan, CM; Hodgson, DR, y Rose, RJ. The effects of overtraining on blood volumes in Standardbred racehorse. *Equine Vet. J.*, 2003; 165 (3): 228-232.
- Gonzalo, JM; Prieto, F; Montes, A; Orden, MA; Benedito, JL; Vigil, E y García, P. Estudio comparativo de los valores hemáticos en las razas autóctonas bovinas: retinta, asturiana de los valles, avileña y rubia gallega. *Rev. Buiatria Esp.*, 1986; 2: 80-84.
- Goodman, T y Lefrançois, L. Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8⁺ intraepithelial lymphocytes. *Nature*, 1988; 333 (6176): 855-858.
- Goto, H; Yamamoto, Y; Ohta, C; Sirahata, T; Higuchi, T y Ohishi, H. Antibody responses of Japanese horses to influenza viruses in the past few years. *J. Vet. Med. Sci.*, 1993; 5 (1): 33-37.
- Gourdy, P; Araujo, LM; Zhu, R; Garmy-Susini, B; Diem, S y Laurell, H. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN- γ production by invariant natural killer T cells. *Blood*, 2005; 105: 2415-2420.
- Gouveia, AJ. Valoración de las pruebas de ejercicio aerobio en la estimación de la aptitud para el esfuerzo en el caballo de Raza Lusitana. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba; 2003.
- Greely, E; Ballam, J; Harrison, J; Kealy, R; Lawler, D y Segre, M. The influence of age and gender on the immune system: a longitudinal study in Labrador Retriever dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2001; 82 (1-2): 57-71.
- Greely, EH; Ballam, JM; Harrison, JM; Kealy, RD; Lawler, DF, y Segre, M. The influence of age on the canine immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1996; 55 (1-3): 1-10.
- Greppi, GF; Casini, L; Gatta, D; Orlandi, M, y Pasquini, M. Daily fluctuations of haematology and blood biochemistry in horses fed varying levels of protein. *Equine Vet. J.*, 1996; 28 (5): 350-353.
- Grimaldi, C; Nashi, E; Venkatesh, J y Diamond, B. B cell hyporesponsiveness and autoimmunity: a new paradigm. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007; 596: 181-190.
- Grindem, CB. Blood cell markers. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.*, 1996; 26 (5): 1043-1064.
- Grindem, CB; Page, RL; Ammerman, BE, y Breitschwerdt, EB. Immunophenotypic comparison of blood and lymph node from dogs with lymphoma. *Vet. Clin. Pathol.*, 1998; 27 (1): 16-20.
- Guarga, JL; Moreno, J; Lucientes, J; Gracia, MJ; Peribáñez, MA, y Castillo, JA. Evaluation of a specific immunochemotherapy or the treatment of canine

visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002; 88: 13-20.

Guglielmino, R; Miniscalco, B; Tarducci, A; Borgarelli, M; Riondato, F; Zini, E; Borrelli, A, y Bussadori, C. Blood lymphocyte subsets in canine idiopathic pericardial effusion. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2004; 98 (3-4): 167-173.

Guiguère, S y Prescott, JF. Equine immunity to bacteria. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.*, 2000; 16 (1): 29-47.

Guirnalda, P; Malinowski, K; Roegner, V y Horohov DW. Effects of age and recombinant equine somatotropin (eST) administration on immune function in female horses. *J. Anim. Sci.*, 2001; 79 (10): 2651-2658.

Guyton, AC. Tratado de fisiología médica. 8ª ed. Madrid: Interamericana; 1992.

Hansen, MF y Todd, AC. Preliminary report on the blood picture in the Arabian horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1951; 118: 26.

Hansen, MF; Todd, AC, y McGee, WR. Blood pictures of lactating and non-lactating thoroughbred mares. *Vet. Med.*, 1950, a; 45 (6): 228-230.

Hansen, MF; Todd, AC; Kelley, GW y Full, FE. Studies on hematology of the thoroughbred horse. I. Mares in foal. *Am. J. Vet. Res.*, 1950, b; 11(49): 296-300.

Hanson, CM; Kline, KH; Foreman, JH; Frey, LP, y Cooper SM. Heart and spleen mass related to blood parameter changes after epinephrine injection. *Equine Vet. J. Suppl.*, 1995; 18: 113-116.

Hanzawa, K; Kubo, K; Kai, M; Hiraga, A, y Watanabe, S. Effects of exercise on erythrocytes in normal and

splenectomized Thoroughbred horses. *Equine Vet. J. Suppl.*, 1995; 18: 439-442.

Harewood, WJ; Gillin, A; Hennessy, A; Armitstead, J; Horvath, JS y Tiller, DJ. The effects of the menstrual cycle, pregnancy and early lactation on haematology and plasma biochemistry in the baboon (*Papio hamadryas*). *J. Med. Primatol.*, 2000; 29 (6): 415-420.

Harper, EJ; Hackett, RM; Wilkinson, J, y Heaton, PR. Age-related variations in hematologic and plasma biochemical test results in Beagles and Labrador Retrievers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2003; 223 (10): 1436-1442.

Harris, PA; Marlin, DJ; Scott, CM; Harris, RC; Mills, PC; Michell, AR; Orme, CE; Roberts, CA; Schroter, RC y Marr CM. Electrolyte and total protein changes in nonheat acclimated horses performing treadmill exercise in cool (20 degrees C/40%RH), hot, dry (30 degrees C/40%RH) or hot, humid (30 degrees C/80%RH) conditions. *Equine Vet. J. Suppl.*, 1995; 20: 85-96.

Hartmann, K. Feline immunodeficiency virus infection. An overview. *Vet. J.*, 1998; 155 (2): 123-137.

Harty, JT; Tvinnereim, AR y White, DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 275-308.

Harvey RB; Hambright, MB, y Rowe, LD. Clinical biochemical and hematologic values of the American Miniature Horse: reference values. *Am. J. Vet. Res.*, 1984; 45 (5): 987-990.

Harvey, J.W.; Pate, M.; Kivipelto, J.; Asquith, R. Clinical biochemistry of pregnant and nursing mares. *Vet. Clin. Pathol.*, 2005; 34 (3): 248-254.

Harvey, JW; Asquith, RL; Pate, MG; Kivipelto, J; Chen, CL y Ott, EA. Haematological findings in pregnant, postparturient and nursing mares. *Comp. Hematol. Int.*, 1994; 4(1): 25-29.

Harvey, JW; Pate, M; Kivipelto, J y Asquith, R. Clinical biochemistry of pregnant and nursing mares. *Vet. Clin. Pathol.*, 2005; 34 (3): 248-254.

Harvey, R.B. y Hambright, M.B. Normal serum chemistry and hematology values of the American miniature horse. *Equine Pract.*, 1985; 7: 6-8.

Harvey, RB y Hambright, MB. Normal serum chemistry and hematology values of the American miniature horse. *Equine Pract.*, 1985; 7(3): 6-8.

Harvey, RB; Hambright, MB y Rowe, LD. Clinical biochemical and hematologic values of the american miniature horse: reference values. *Am. J. Vet. Res.*, 1984; 45 (5): 97-101.

Hauss, E. Chronobiology of circulating blood cells and platelets. En: *Biologic rhythms in clinical and laboratory medicine*. Touitou, Y. y Hauss E (eds.). Berlin, Alemania: Springer-Verlag; 1994; pp. 504-526.

Hayday, AC. $\gamma\delta$ Cells: A right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 975-1026.

Heaton P; Devlin P; Blount D, y Pritchard D. Aging and the immune system. *Waltham Focus*, 2002, c; 12 (1): 2-13.

Heaton, P; Blount, DG; Mann, SJ; Devlin, P; Koelsch, S; Smith, BHE; Stevenson, J; Harper, EJ, y Rawlings, JM. Assessing age related changes in Peripheral blood Leukocyte phenotypes in Domestic Shorthaired cats using flow cytometry. *J. Nutr.*, 2002, a; 132 (6): 1607-1609.

Heaton, P; Blount, DG; Mann, SJ; Devlin, P; Koelsch, S; Smith, BHE; Stevenson, J; Harper, EJ, y Rawlings, JM. Assessing age related changes in Peripheral blood Leukocyte phenotypes in Labrador Retriever dogs using flow cytometry. *J. Nutr.*, 2002, b; 132 (6): 1655-1657.

Hein, WR y Mackay, CR. Other surface antigens identified on sheep leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1991; 27 (1-3): 115-118.

Heldrup, J; Kalm, O y Prellner, K. Blood T and B lymphocyte subpopulations in healthy infants and children. *Acta Paediatr.*, 1992; 81 (2): 125-132.

Heng, TS; Goldberg, GL; Gray, DH; Sutherland, JS; Chidgey, AP y Boyd, RL. Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution. *J. Immunol.*, 2005; 175 (5): 2982-2993.

Hess, PR; English, RV; Hegarty, BC; Brown, GD, y Breitschwerdt, EB. Experimental Ehrlichia canis infection in the dog does not cause immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2006; 109 (1-2): 117-125.

Heydtmann, M y Adams, DH. Understanding selective trafficking of lymphocyte subsets. *Gut*, 2002; 50 (2): 150-152.

Hinchcliff, KW; Kociba, GJ y Mitten, LA. Diagnosis of EDTA dependent pseud thrombocytopenia in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1993; 203 (12): 1715-1716.

Hoffmann-Fezer, G; Thum, J; Ackley, C; Herbold, M; Mysliwetz, J; Thefeld, S; Hartmann, K y Kraft, W. Decline in CD4+ cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *J. Virol.*, 1992; 66 (3): 1484-1488.

HogenEsch, H; Thompson, S; Dunham, A; Ceddia, M, y Hayek, M. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2004; 97 (1-2): 77-85.

Holtan, DW; Nett, TM y Estergreen, VL. Plasma progesterone in pregnant postpartum and cycling mares. *J. Anim. Sci.*, 1975; 40 (2): 251-260.

Hopkins, J y McConnell, I. Immunological aspects of lymphocyte recirculation. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1984; 6(1-2): 3-33.

Horohov, D; Kydd, J y Hannant, D. The effect of aging on T cell responses in the horse. *Dev. Comp. Immunol.*, 2002; 26 (1): 121-128.

Horohov, DW. Equine T-cell cytokines. Protection and pathology. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.*, 2000; 16 (1): 1-14.

Horohov, DW; Dimock, A y Guirnalda, P. Effects of exercise on the immune response of young and old horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1999; 60 (5): 643-647.

Horton, GMJ. Lamb production, feed utilization, and hematologic and blood chemical changes in sheep exposed to cold. *Am. J. Vet. Res.*, 1978; 39 (11): 1845-1849.

Hulstaert, F; Hannet, I; Deneys, V; Munhyeshuli, V; Reichert, T; De Bruyere, M y Strauss, K. Age related changes in human blood lymphocyte subpopulations II. Varying kinetic of percentage and absolute counts measurements. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1994; 70 (2): 152-158.

Hurley D, University of Georgia Athens GA USA. Comunicación personal. 2007.

Iglesias M. Inmunosenescencia y autoinmunidad. *Reumatología*, 2003; 19 (2): 61-67.

Irvine, CH. The blood picture in the race horse. I. The normal erythrocyte and hemoglobin status; a dynamic concept. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1958; 133 (2): 97-101.

Jackson, CW; Steward, SA; Ashmun, RA y McDonald, TP. Megakaryocytopoiesis and platelet production are stimulated during late pregnancy and early postpartum in the rat. *Blood*, 1992; 79 (7): 1672-1678.

Jackson, ML; Wood, SL; Misra, V y Haines, DM. Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: relation to feline leukemia virus status, tumor site, and patient age. *Can. J. Vet. Res.*, 1996; 60 (3): 199-204.

Jain, NC. Comparative haematology of common domestic animals. En: *Essentials of veterinary haematology*. 1ª ed Philadelphia: Lea & Febiger; 1993; pp. 19-53.

Jain, NC. The horse. Normal haematologic with comments on response to disease. En: *Schalm's veterinary hematology*. 4 ed. Jain N.C. (ed.). Lea & Febiger. Philadelphia, USA, 1986; pp. 140-177.

Janeway, CA Jr y Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002; 20: 197-216.

Janeway, CA Jr. How the immune system protects the host from invasion. *Microbes Infect.*, 2001; 3 (13): 1167-1171.

Jarvis, GE y Evans, RJ. Platelet activating factor and not thromboxane A2 is an important mediator of endotoxin-induced platelet aggregation in equine

- heparinised whole blood in vitro. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 1996; 7 (2): 194-198.
- Jeffcott, LB. Clinical haematology of the horse. En: *Comparative Clinical Haematology*. Archer RK y Jeffcott L.B (eds.). Blackwell Scientific Publications; 1977; pp. 161-213.
- Jeffcott, LB. Haematology in relation to performance and potential. 2. Some specific aspects. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 1974; 45: 279-286.
- Jennings, CD y Foon, KA. Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. *Blood*, 1997; 90 (8): 2863-2892.
- Jensen-Waern, M; Lindberg, A; Johannisson, A; Gröndahl, G, y Essén-Gustavsson, B. The effects of an endurance ride on metabolism and neutrophil function. *Equine Vet. J.*, 1999; 30: 605-609.
- Jiang, W; Kang, L; Lu, HZ; Pan, X; Lin, Q; Pan, Q; Xue, Y; Wengh, X, y Tan, YW. Normal values for CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy Chinese adults from Shanghai. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004; 11 (4): 811-813.
- Jondal M, Schirmbeck R Reimann J. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity*, 1996; 5 (4): 295-302.
- Jones, D.M. The husbandry and veterinary care of wild horses in captivity. *Equine Vet. J.*, 1976; 8: 140-146.
- Judson, G.J.; Mooney, G.J. y Thornbury, R. Plasma biochemical values in thoroughbred horses in training. En: *Equine exercise physiology*. Snow, D.H., Persson, S.G.B. y Rose, R.J. (eds.). Granta editions, Cambridge, 1983, b; pp. 354-361.
- Judson, GJ; Frauenfelder, HC, y Mooney, GJ. Plasma biochemical values in thoroughbred racehorses following submaximal and maximal exercise. En: *Equine exercise physiology*. Snow, DH; Persson, SGB y Rose, RJ (eds.). Granta editions. Cambridge, UK; 1983, a; pp. 408-415.
- Kaneko, J. Serum proteins and the dysproteinemias. En: *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5^a ed. Kaneko, J; Harvey, JW, y Bruss, ML. (eds). Academic Press; 1997; pp. 117-137.
- Kastner, E; Feige, M; Weishaut, M, y Auer, J. Heart rate and hematological responses of Quarter horses to a reining competition. *J. Equine Sci.*, 1999; 19 (2): 127-131.
- Kaufmann, SHE. The roles of conventional and unconventional T cells in antibacterial immunity. *ASM News*. 1997; 63: 251-255.
- Kedzierski, W y Bergero, D. Comparison of plasma biochemical parameters in Thoroughbred and Purebred Arabian horses during the same-intensity exercise. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2006; 9 (4): 233-238.
- Kelley, LC y Mahaffey, EA. Equine malignant lymphomas: morphologic and immunohistochemical classification. *Vet. Pathol.*, 1998; 35 (4): 241-252.
- Kendall, MD; Fitzpatrick, FT; Greenstein, BD; Khoylou, F; Safieh, B y Hamblin, A. Reversal of ageing changes in the thymus of rats by chemical or surgical castration. *Cell Tissue Res.*, 1990; 261 (3): 555-564.
- Keren DF. History and evolution of surface marker assays. En: *Flow cytometry and clinical diagnosis*. Keren DF (ed.). Chicago, USA: American Society of Clinical Pathologists; 1994; pp. 1.
- Kerr, MG; y Snow, DH. Alterations in haematocrit, plasma proteins and electrolytes in horses following the

- feeding of hay. *Vet. Rec.*, 1982; 110: 538-540.
- Kidd, D. Interpreting the leukogram: noninfectious factors that affect leukocyte production. *Vet. Med.*, 1991; 472-479.
- Kincade, P.W.; Medina, K.L. Smithson, G y Scott, D.C. Pregnancy: a clue to normal regulation of B lymphopoiesis. *Immunol. Today*, 1994; 15 (11): 539-544.
- Kingston, JK; Bayly, WM; Sellon, DC; Meyers, KM, y Wardrop, KJ. Effects of formaldehyde fixation on equine platelets using flow cytometric methods to evaluate markers of platelet activation. *Am. J. Vet. Res.*, 2002; 63 (6): 840-844.
- Kleiber, C; McGorum, B; Horohov, D y Pirie RI. Cytokine profiles of peripheral blood and airway CD4 and CD8 T lymphocytes in horses with recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005; 104 (1-2): 91-97.
- Klein, SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2000; 24 (6): 27-38.
- Klein, SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol.*, 2004; 26 (6-7): 247-264.
- Kline, K, y Foreman, J. Heart and spleen weights as a function of breed and somatotype. En: *Equine exercise physiology 3*. Persson, SGB; Lindholm, A, y Jeffcott, LB (eds.). Davis, USA. ICEEP Publications, 1991; pp. 17-31.
- Knapp, W. Antibody-defined surface molecules of normal and malignant hematopoietic cells. En: *Flow cytometry in hematology*. Laerum ED y Bjerkness, R (eds.). Londres: Academic Press; 1992; pp. 213.
- Knill, LM; McConaughy, C; Camarena, I, y Day, M. Hemogram of the Arabian horse. *Am. J. Vet. Res.*, 1969; 30 (2): 295-328.
- Kociba, GJ; Bayly, WM; Milne, DW; Wigton, DH; Gabel, AA y Muir, WW. Furosemide: effects on the hemostatic mechanism of resting and exercised standardbred horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1984; 45 (12): 2603-2606.
- Kolb, E. *Fisiología Veterinaria*. 2ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza. España, 1976.
- Komosa, M; Flisinska-Bojanowska, A y Gill, J. Diurnal changes in the haemoglobin level, red blood cell number and mean corpuscular haemoglobin in foals during the first 13 weeks of life and in their lactating mothers. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 1990; 96 (1): 151-155.
- Koo, H; Ryu, SH; Ahn, HJ; Jung, WK; Park, YK; Kwon, NH Kim SH Kim JM; Yoo, BW; Choi, SI Davis WC, y Park, YH. Immunostimulatory effects of the anionic alkali mineral complex Barodon on equine lymphocytes. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2006; 13 (11): 1255-1266.
- Kottmann, JW. Circadian variations in the eosinophile values in the blood of horses. Inaugural Dissertation *Tierärztliche Hochschule*, Hannover, 1973.
- Kotylo, PK; Fineberg, NS; Freeman, KS; Redmond, NL y Charland, C. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1993; 100 (2): 111-115.
- Kramer, JW. Normal hematology of the horse. En: *Shalm's Veterinary Hematology*. Feldman, BF; Zinkl, JG, y Jain, NC (eds.). Baltimore, USA. Lippincott Williams & Wilkins; 2000; pp. 1069-1074.
- Ku, CC; Kotzin, B; Kappler, J y Murrack, P. CD8+ T-cell clones in old mice. *Immunol. Rev.*, 1997; 160: 139-144.

Kubota, K; Shirakura, T; Orui, T; Muratani M, Maki T; Tamura, J y Morita, T. Changes in the blood cell counts with aging. *Ronen Igakkai Zasshi*, 1991; 28 (4): 509-514.

Kunugiyama, I; Ito, N; Narizuka, M; Kataoka, S; Furukawa, Y; Hiraga, A; Kai, M y Kubo, K. Measurement of erythrocyte volumes in splenectomized horses and sham-operated horses at rest and during maximal exercise. *J. Vet. Med. Sci.*, 1997; 59 (9): 733-737.

Kurosawa, M; Nagata, S; Takeda, F; Mima, K; Hiraga, A; Kai, M, y Taya, K. Plasma catecholamine, adrenocorticotropin and cortisol responses to exhaustive incremental treadmill exercise of the thoroughbred horse. *J. Equine Sci.*, 1998; 9 (1): 9-18.

Kydd, J; Antczak, DF; Allen, WR; Barbis, D; Butcher, G; Davis, W; Duffus, WP; Edington, N; Grunig, G y Holmes, MA. Report of the First International Workshop on Equine Leucocyte Antigens, Cambridge, UK, July 1991. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1994; 42 (1): 3-60.

Kyle, RA y Rajkumar, SV. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 1999; 13 (6): 1181-1202.

Lacerda, L; Campos, R; Sperb M, Soares, E; Barbosa Godinho, E;erreira, R; Santos, V y González, FH. Hematological and biochemical parameters in three high performance horse breeds from southern Brazil. *Arch. Vet. Sci.*, 2006; 11 (2): 40-44.

Lamason, R; Zhao P; Rawat, R; Davis, A, Davis, A; Hall, JC; Chae, JJ; Agarwal, R; Cohen, P; Rosen, A; Hoffman, EP y Nagaraju, K. Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC Immunol.*, 2006; 22 (7): 2.

Lana, S; Plaza, S; Hampe, K; Burnett, R, y Avery, AC.

Diagnosis of mediastinal masses in dogs by flow cytometry. *J. Vet. Intern. Med.*, 2006; 20 (5): 1161-1165.

Larson, BL y Kendall, KA. Changes in specific blood serum proteins levels associated with parturition in the bovine. *J. Dairy Sci.*, 1957; 40: 659.

Lassen ED y Swardson CJ. Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 1995; 11 (3): 351-389.

Lasser, A. The mononuclear phagocytic system: a review. *Human Pathol.*, 1983; 14: 108-126.

Latimer, KS y Mejer, D. En: Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat. 3^a ed. Ettinger, SJ. (ed.) Philadelphia: WB Saunders; 1989; pp. 2181-2224.

Latimer, KS y Rakich, PM. Peripheral blood smears. En: Cytology and hematology of the horse. Cowell RL y Tyler RD. (eds.). California, USA. American Veterinary Publications, INC; 1992; pp. 191-235.

Latimer, KS. Leukocytic hematopoiesis. En: Equine medicine and surgery. 5^a ed. Colahan, P. (ed). St. Louis: Mosby; 1999; pp. 1992-2001.

Lau, LG; Tan, GB y Kuperan P. CD4 lymphocyte enumeration in patients with human immunodeficiency virus infection using three-colour and four-colour dual-platform flow cytometry: an interlaboratory comparative evaluation. *Ann. Acad. Med. Sing.*, 2002; 31 (6): 765-771.

Laurence, J. T-Cell Subsets in health, Infectious Disease, and Idiopathic CD4⁺ T Lymphocytopenia. *Ann. Intern. Med.*, 1993; 119 (1): 55-62.

- Lee, BW; Yap, HK; Chew, FT; Quah, TC; Prabhakaran, K; Chan, GS; Wong, SC, y Seah, CC. Age- and sex-related changes in lymphocyte subpopulations of healthy Asian subjects: from birth to adulthood. *Cytometry*, 1996; 6 (1): 8-15.
- Lepherd, EE. Effect of exercise on platelet size and number in ponies. *Vet. Rec.*, 1977; 101 (24): 488.
- Lesourd, B y Mazari, L. Nutrition and immunity in the elderly. *Proc. Nutr. Soc.*, 1999; 58 (3): 685-695.
- Lewis, S; Valberg, S; y Nielsen, IL. Suspected immune-mediated myositis in horses. *J. Vet. Intern. Med.*, 2007; 21 (3): 495-503.
- Licastro, F; Candore, G; Lio, D; Porcellini E; Colonna-Romano, G; Franceschi, C, y Caruso, C. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun. Ageing*, 2005; 2: 8
- Liebler-Tenorio, EM y Pabst, R. MALT structure and function in farm animals. *Vet. Res.*, 2006; 37 (3): 257-280.
- Lindner, A. y Birks, EK. Collection of venous blood samples from competition horses: a new approach. *Equine Vet. J.*, 1994; 26 (6): 503-505.
- Lio, D; Balisteri, CR, Candore, G, D'Anna, C; Di Lorenzo, G; Gervasi, F; Listě, F; Scola, L; Caruso, C. In vitro treatment con IL-2normalizes type 1 citokine production by lymphocytes form the elderly. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2000; 22 (2): 195-203.
- Lloberas, J y Celada, A. Effect of aging on macrophage function. *Exp. Gerontol.*, 2002; 37 (12): 1325-1331.
- Loken, MR; Brosnan, JM; Bach, BA y Ault, KA. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry*, 1990; 11: 453-459.
- Looney, RJ; Falsey, A; Campbell, D; Torres, A; Kolassa, J; Brower, C; McCann, R; Menegus, M; McCormick, K; Frampton, M; Hall, W, y Abraham, GN. Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin. Immunol.*, 1999; 90 (2): 213-219.
- Loughran, TP Jr; Stakerbaum, G y Aprile, JA. Rearrangement and expression of T-cell receptor genes in large granular lymphocyte leukemia. *Blood*, 1988; 71 (3): 822-824
- Lovell, JD; Stabenfeldt, GH; Hudghes, JP y Evans, JW. Endocrine pattterns of the mare at term. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1975; 23: 449-456.
- Lowseth, LA; Gillett, NA; Gillet, NA, y Muggenburg, BA. The effects of aging on hematology and serum chemistry values in the beagle dog. *Vet. Clin. Pathol.*, 1990; 19 (1): 13-19.
- Lubas, G; Casini, L; Greppi, GF y Gavazza, A. Investigation on circadian rhythm of hemogram values in horses. *Ippologia*, 1996; 6 (2): 23-33.
- Lumsden JH; Rowe R, y Mullen K. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. *Can. J. Comp. Med.*, 1980; 44 (1): 32-42.
- Lunn DP; Holmes, MA, y Duffus, WP. Three monoclonal antibodies identifying antigens on all equine T lymphocytes, and two mutually exclusive T-lymphocyte subsets. *Immunology*, 1991; 74 (2): 251-257.

- Lunn, DP; Holmes, MA, y Antczak, DF. Report of the second equine leucocyte antigen workshop, Squaw Valley, California, July 1995. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998; 62 (2): 101-143.
- Lunn, P; Holmes, MA; Schram, V Duffus y PH. Monoclonal antibodies specific for equine IgG subtypes including an antibody which recognizes B Lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1995; 47 (3-4): 239-251.
- Luppi, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. *Vaccine*, 2003; 21(24): 3352-3357.
- Luppi, P; Haluszczak, C; Betters, D; Craig, A; Trucco, M y DeLoia, JA. Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. *J. Leuc. Biol.*, 2002; 72(5): 874-884.
- MacKay, RJ; French, TW; Nguyen, HT y Mayhew, IG. Effects of large doses of phenylbutazone administration to horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1983; 44 (5): 774-780.
- Madewell, BR; Carlson, GP; MacLachlan, NJ y Feldman, BF. Lymphosarcoma with leukemia in a horse. *Am. J. Vet. Res.*, 1982; 43 (5): 807-812.
- Mahaffey, EA y Moore, JN. Erythrocyte agglutination associated with heparin treatment in three horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1986; 189 (11): 1478-1480.
- Mandell, CP. Essential thrombocytopenia and reactive thrombocytosis. En: Schalm's Veterinary Hematology. 5ª ed. Feldman, B; Zinkl, JG, y Jain, N. (eds.). Baltimore, MA, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000; pp. 501-508.
- Mani, H; Kirchmayr, K; Klaffling, C; Schindewolf, M; Luxembourg, B; Linnemann, B y Lindhoff-Last, E. Influence of blood collection techniques on platelet function. *Platelets*, 2004; 15 (5): 315-318.
- Mansharamani, NG; Balachandran, D; Vernovsky, I; Garland, R y Koziel H. Peripheral blood CD4 + T-lymphocyte counts during *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Ches*, 2000; 118 (10): 712-720.
- Manso, M; Aguilera, E; Estepa, JC, y Martínez, J y Mayer R. Valores hematológicos en yeguas puerperales y potros neonatos pura raza española y árabe. *Med. Vet.*, 1998; 15 (6): 353-355.
- Mao, A; Paharkova-Vatchkova, V; Hardy, J; Miller, MM y Kovats, S. Estrogen selectively promotes the differentiation of dendritic cells with characteristics of Langerhans cells. *J. Immunol.*, 2005; 175 (8): 5146-5151.
- Marbach, W. Haematological parameters of the fitness of racehorses and the effect of Coforta/Catosal on the fatigued horse. *Vet. Med. Rev.*, 1978; 82-92.
- Martin, H; Langenhan, K; Huth M; Sauer, I, y Weisbrich, C. Clinical laboratory diagnosis and aging. 3: Evaluation of a study of aging complete blood and urine status. *Z. Gerontol. Geriatr.*, 2001; 34 (3): 183-189.
- Martínez, R; Godoy, A; Naretto, E, y White, A. Neuroendocrine changes produced by competition stress on the thoroughbred race horse. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1988; 91 (3): 599-602.
- Mason, DK y Kwok, HW. Some haematological and biochemical parameters in race horses in Hong Kong. *Equine Vet. J.*, 1977; 9 (2): 96-99.
- Mason, DK.; Watkins, K.; Mcnie, J y Luck, M. Hematological changes in two thoroughbred horses in training with confirmed equine herpes virus I infections.

Vet. Rec., 1989; 124 (19): 503-504.

Mason, DK.; Watkins, K; McNie, J y Luck, M. Haematological measurements as an aid to early diagnosis and prognosis of respiratory viral infections in thoroughbred horses. *Vet. Rec.* 1990; 126 (15): 359-363.

Massoco, C y Palermo-Neto, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2003; 95 (1-2): 11-19.

Masuzawa, T.; Miyaura, C.; Onoe, Y.; Kusano, K.; Ohta, H. y Nozawa, S. Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J. Clin. Invest.*, 1994; 94 (3): 1090-1097.

Mathy, NL; Walker, J, y Lee, RP. Characterization of cytokine profiles and double-positive lymphocyte subpopulations in normal bovine lungs. *Am. J. Vet. Res.*, 1997; 58 (9): 969-975.

Matsumura, G; Sasaki, K y Ito, T. Quantitative observation of megakaryocytes in the spleen and bone marrow of the mouse: effects of sex, sex hormones, pregnancy and lactation. *Arch. Histol. Jpn.*, 1984; 47 (3): 251-258.

Matthews, JH; Benjamin, S; Gill, DS y Smith, NA. Pregnancy associated thrombocytopenia: Definition, incidence, and natural history. *Acta Haematol.*, 1990; 84: 24.

Matthews, JH; Clark, DM; y Abrahamson, GM. Effect of therapy with vitamin B12 and folic acid on elderly patients with low concentrations of serum vitamin B12 or erythrocyte folate but normal blood counts. *Acta Haematol.*, 1988; 79: 84-87.

May, JA y Heptinstall, S. Effects of anticoagulants used during blood collection on human platelet function. *Methods Mol. Biol.*, 2004; 272: 3-11.

Mbassa, GK y Poulsen, JS. Influence of pregnancy, lactation and environment on haematological profiles in Danish landrace dairy goats (*Capra hircus*) of different parity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1991; 100 (2): 403-412.

McClure, JT; Young, KM; Fiste, M; Sharkey, LC, y Lunn, DP. Immunophenotypic classifications of leukemia in three horses. *J. Vet. Intern. Med.*, 2001; 15 (2): 144-152.

McCullough, KC y Summerfield, A. Basic concepts of immune response and defense development. *ILAR*. 2005; 46 (3): 230-240.

McDevitt, HO. Discovering the role of the Major Histocompatibility Complex in the Immune Response. *Ann. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 1-17.

McDonald, TT. Suppressor T cells, rebranded as regulatory T cells, emerge from the wilderness bearing surface markers. *Gut*, 2002; 51 (3): 311-312.

McDonough, SP y Moore, PF. Clinical, hematologic, and immunophenotypic characterization of canine large granular lymphocytosis. *Vet. Pathol.*, 2000; 37 (6): 637-646.

McFarlane, D; Sellon, DC, y Gaffney, D. Hematologic and serum biochemical variables and plasma corticotropin concentration in healthy aged horses. *Am J. Vet. Res.*, 1998; 59 (9): 1247-1251.

McFarlane, D; Sellon, DC, y Gibbs, SA. Age related quantitative alterations in lymphocyte subsets and immunoglobulin isotypes in healthy horses. *Am. J. Vet. Res.*, 2001; 62 (9): 1413-1417.

- McGuire, TC y Crawford, TB. Passive immunity in the foal: measurement of immunoglobulin classes and specific antibody. *Am J Vet Res.*, 1973; 34 (10): 1299-1303.
- McGuire, TC; Banks, KL; Evans, DR, y Poppie, MJ. Agammaglobulinemia in a horse with evidence of functional T lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.*, 1976; 37 (1): 41-46.
- McGurrin, MKJ; Arroyo, LG, y Bienzle, D. Flow Cytometric detection of platelet-bound antibody in three horses with immune-mediated thrombocytopenia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2004; 224 (2): 83-88.
- McKay, R. Inflammation in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 2000; 16 (1): 15-27.
- McKeever, K; Scali, R; Geiser, S y Kearns CF. Plasma aldosterone concentration and renal sodium excretion are altered during the first days of training. *Equine Vet. J. Suppl.*, 2002; 34 (9): 524-531.
- McKeever, KH. Overtraining syndrome in standardbred horses: new insights into the role of red blood cell hypervolaemia. *Vet. J.*, 2003; 165 (3): 190-192.
- McKeever, KH. The endocrine system and the challenge of exercise. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 2002; 18 (2): 321-353.
- McKeever, KH; Hinchcliff, KW; Reed, SM, y Robertin, JT. Role of decreased plasma volume in haematocrit alterations during incremental treadmill exercise in horses. *Am. J. Physiol.*, 1993; 265 (2): 404-408.
- McKoy, JP Jr. Basic principles in clinical flow cytometry. En: *Flow cytometry and clinical diagnosis*. Keren, DF; Hanson, CA, y Hartubise, PE (eds.). American Society of Clinical Pathologists; Chicago, EE.UU.; 1994 pp. 26.
- McLeod, J y Ponder, E. The blood picture of the thoroughbred horse. *Science*. 1946; 103 (73).
- Medina, K.L. y Kincade, P.W. Pregnancy related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91 (12): 5382-5386.
- Medina, K.L.; Garrett, K.P.; Thompson, L.F.; Rossi, M.I.; Payne, K.J. y Kincade, P.W. Identification of very early lymphoid precursors in the bone marrow and their regulation by estrogen. *Nat. Immunol.*, 2001; 2 (8): 718-724.
- Medina, K.L.; Smithson, G. y Kincade, P.W. Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J. Exp. Med.*, 1993; 178 (5): 1507-1515.
- Medzhitov, R y Janeway, CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 1997; 91 (3): 295-298.
- Meier-Kriesche, HU; Ojo, AO; Cibrik, DM; Hanson, JA; Leichtman, AB y Magee, JC. Relationship of recipient age and development of chronic allograft failure. *Transplantation*. 2000; 70 (2): 306-310.
- Mendonça, SC; De Luca, PM; Mayrink, W; Restom, TG; Conceicao-Silva, F; Da-Cruz, AM; Bertho, AL; Da Costa, CA; Genaro, O y Toledo VP. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995; 53 (2): 195-201.
- Messer, NT. The use of laboratory tests in equine practice. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 1995; 11 (3): 345-350.
- Meuret, G. y Hoffman, G. Monocyte kinetic studies in normal and disease states. *Br. J. Haematol.*, 1973; 24

(3): 275-285.

Meuret, G; Bammert, J, y Hoffmann, G. Kinetics of human monocytopoiesis. *Blood*, 1974; 44 (6): 801-816.

Michelson, AD; Barnard, MR; Krueger, LA; Frelinger, AL 3rd, y Furman, MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods*, 2000; 21 (3): 259-270.

Miller, JF. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol.*, 2002; 185: 7-14.

Miller, RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science*, 1996; 273 (5271): 70-73.

Miniscalco, B; Guglielmino, R; Morello, E; Tarducci, A, y Geuna, M. Clinical usefulness of peripheral blood lymphocyte subsets in canine lymphoma. *Vet. Res. Comm.*, 2003; 27: 407-409.

Miranda, S; Martorell, S; Costa, M; Ferrer, L, y Ramis A. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. *Vet. Parasitol.*, 2007; 144 (3-4): 251-260.

Miyasaka, M y Tanaka, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: Dogmas and enigma. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4 (5): 360-370.

Miyaura, C. Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function : similarity to estrogen deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997; 94: 9360-9365.

Mondiano, JF; Breen, M; Burnett, RC; Parker, HC; Inusah, S; Thomas, R; Avery, PR; Lindblad, K; Ostrander, EA; Cutter, GC, y Avery, AC. Distinct B-Cell and T-Cell Lymphoproliferative Disease Prevalence

among Dog Breeds Indicates Heritable Risk. *Cancer Res.*, 2005; 65(1): 5654-5661.

Monke, DR; Kociba, GJ; DeJarnette, M; Anderson, DE y Ayars, WH. Reference values for selected hematologic and biochemical variables in Holstein bulls of various ages. *Am. J. Vet. Res.*, 1998; 59 (11): 1386-1391.

Montecino-Rodríguez, E y Dorskind, K. New perspectivas in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol.*, 2006; 27 (9): 428-433.

Montoro, F.J. Influencia de la estabulación y situación fisiológica sobre algunos parámetros relacionados con el metabolismo de la cabra murciana-granadina. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba, 1995.

Moore, PF; Rossitto, PV; Danilenke, DM; Wielenga, JJ; Raff, RF y Severns, E. monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T lymphocyte subsets and high density expression of CD4 by canine neutrophils. *Tissue Antigens*, 1992; 40: 75-85.

Morell, V. Zeroing in how hormones affect the immune system. *Science*, 1995; 269: 773-774.

Morris, DD y Large, SM. Alterations in blood proteins. 1990. En: Large animal internal medicine. Smith BP (Ed). St. Louis, EE.UU.: The C.V. Mosby Company; 1990, c; pp. 489-498.

Morris, DD y Large, SM. Alterations in the erythron. En: Large Animal Internal Medicine Smith, BP (ed.). St. Louis. EE.UU. The C.V. Mosby Company; 1990, a; pp. 418-424.

Morris, DD y Large, SM. Alterations in the leukogram. 1990. En: Large Animal Internal Medicine. Smith BP

(ed.). St. Louis, EE.UU.: The C.V. Mosby Company; 1990, b; pp. 425-434.

Morris, DD. Diseases of the hemolymphatic system. En: Equine internal medicine. Reed, SM, y Bayly, WM. (Eds). WB Saunders Co, 1998; pp. 558-601

Morris, DD. Doenças do sistema hemolinfático. En: Medicina Interna Equina. Reed, SM y Bayly, WM (eds.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. pp. 481-518.

Mosier, J. Effect of aging on body systems of the dog. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 1989; 19 (1): 1-12.

Muir, WW; Hubbell, JAE. Standing chemical restraint in horses. En: Equine anaesthesia Muir, WW y Hubbell, JAE. (eds.). Monitoring and emergency therapy. Mosby Year Book Inc; 1991; pp. 248-266.

Mullen, PA; Hopes, R, y Sewell, J. The biochemistry, haematology, nutrition and racing performance of two-year-old thoroughbreds throughout their training and racing season. *Vet. Rec.*, 1979; 104: 90-95.

Müller I; Kropf, P; Louis, JA y Milon G. Expansion of gamma interferon-producing CD8⁺ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect. Immunol.*, 1994; 62 (6): 2575-2581.

Müller, I; Kropf, P; Etges, RJ, y Louis, JA. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8⁺ T cells. *Infect. Immunol.*, 1993; 61 (9): 3730-3738.

Mund, E; Christensson, B; Larsson, K, y Gronneberg, R. Sex dependent differences in physiological ageing in the immune system of lower airways in healthy non-smoking volunteers: study of lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid and blood. *Thorax*, 2001;

56 (6): 450-455.

Muñoz, A. Evaluación de la capacidad de rendimiento físico en caballos de diversas razas mediante índices de funcionalidad. Respuesta a un tratamiento programado. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba; 1997.

Muñoz, A.; Trigo, P.; Satué, K. Perfiles hematológicos y bioquímicos aplicados al caballo de deporte: cambios con el ejercicio y el entrenamiento. *Equinus*, 2006; 14: 39-51.

Muñoz, A; Lucas, R; Benito, M; Palacio, J; López, MM; Satué, K y Castejón, F. Evaluación del entrenamiento mediante el análisis hematológico y bioquímico plasmático en caballos angloárabes de carrera. *Med. Vet.*, 2001; 18 (7-8): 491-499.

Muñoz, A; Riber, C; Santisteban, R; Rubio, MD; Agüera, EI y Castejón, FM. Cardiovascular and metabolic adaptations in horses competing in cross-country events. *J. Vet. Med. Sci.*, 1999; 6 (1): 13-20.

Murakami, M y Honjo, T. Involvement of B1 cells in mucosal immunity and autoimmunity. *Immunol Today*, 1995; 16 (11): 534-539.

Murdoch, JM y Smith, CC. Haematologic aspects of systemic disease. *Infect. Clin. Haematol.*, 1972; 1: 619-644.

Nagata, S; Takeda, F; Kurosawa, M; Mima, K; Hiraga, A; Kai, M y Taya, K. Plasma adrenocorticotropin, cortisol, and catecholamines response to various exercises. *Equine Vet. J. Suppl.* 1999; 30: 570-574.

Nakage, APM; Santana, AE, y Capua, MLB. Flow cytometry methodology and application in the veterinary hematology. *Ciencia Rural*, 2005; 35 (4): 966-973.

- Nakai, N; Nawa, K; Maekawa, M y Nagasawa, H. Age-related changes in hematological and serum biochemical values in cats. *Jikken Dobutsu*, 1992; 41 (3): 287-294.
- Nakaya, M; Tachibana, H y Yamada, K. Effect of estrogens on the interferon-gamma producing cell population of mouse splenocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006; 70 (1): 47-53.
- Negoro, S. The characteristic changes of immune function with aging. Analysis of the cells. *Nihon Kyobu Shikkan Zasshi*, 1992; 30 (2): 187-194.
- Newball, HH; Meier, HL y Lichtenstein, LM. Basophil mediators and their release, with emphasis on BK-A. *J. Invest. Dermatol.*, 1980; 74 (5): 344-348.
- Nikolich-Zugich, J. T-cell aging: naive but not young. *J. Exp. Med.*, 2005; 201 (6): 837-840.
- Norris, JW; Pratt, SM; Auh, JH; Wilson, SJ; Clutter, D; Magdesian, KG; Ferraro, GL y Tablin F. Investigation of a novel, heritable bleeding diathesis of Thoroughbred horses and development of a screening assay. *J. Vet. Intern. Med.*, 2006; 20 (6): 1450-1456.
- Nunez, R; Gomes-Keller, MA; Schwarzwald, C, y Feige, K. Assessment of Equine Autoimmune thrombocytopenia by flow cytometry. *BMC Blood Disorders*, 2001; 1 (1): 1-13.
- O'Gorman, MR y Gelman, R. Inter- and intrainstitutional evaluation of automated volumetric capillary cytometry for the quantitation of CD4- and CD8-positive T lymphocytes in the peripheral blood of persons infected with human immunodeficiency virus. Site Investigators and the NIAID New CD4 Technologies Focus Group. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1997; 4 (2): 173-179.
- Oguz, K; Baskurt, R; Farley, R y Herbert JM. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 1997; 273: 2604-2612.
- Orozco, C; Martins, C; de Angelins, F; de Olivera, A y de Lacerda-Neto, JC. Hematological values and total protein of Brasileiro de Hipismo and Breton mares during pregnancy. *Cienc. Rural*, 2007; 37 (6): 1695-1700.
- Ouyang, Q; Wagner, WM; Zheng, W; Wikby, A; Remarque, EJ y Pawelec, G. Dysfunctional CMV-specific CD8(+) T cells accumulate in the elderly. *Exp Gerontol.* 2004; 39 (4): 607-613.
- Owen, RA; Fullerton, J y Barnum, DA. Effects of transportation, surgery, and antibiotic therapy in ponies infected with Salmonella. *Am. J. Vet. Res.*, 1983; 44 (1): 46-50.
- Owens, MA y Loken, MR. Components of flow cytometric immunophenotyping. En: *Flow Cytometry principles for clinical laboratory practice*. Owens, MA y Loken, MR (Eds) New York, EE.UU.: Wiley-Liss.; 1995; pp. 17-43.
- Paganelli, R; Quinti, I; Fagiolo, U; Cossarizza, A; Ortolani, C Guerra E Sansoni P Pucillo LP, Scala, E y Cozzi E. Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population. *Clin. Exp. Immunol.*, 1992; 90 (2): 351-354.
- Page ST; Plymate SR; Bremner WJ; Matsumoto AM; Hess DL; Lin DW; Amory JK; Nelson PS y Wu JD. Effect of medical castration on CD4+ CD25+ T cells, CD8+ T cell IFN-gamma expression, and NK cells: a physiological role for testosterone and/or its metabolites. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.*, 2006; 290 (5): 856-863.

- Pappalardo, BL; Brown, TT; Tompkins, M, y Breitschwerdt, EB. Immunopathology of Bartonella vinsonii (berkhoffii) in experimentally infected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2001; 83 (3-4): 125-147.
- Paradis, MR. Demographics of health and disease in the geriatric horse. *Vet. Clin. Equine*, 2001; 18 (3): 391-401.
- Park, CS y Choi, YS. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre?. *Immunology*, 2005; 114 (1): 2-10.
- Park, J y Rikihisa, Y. L-arginine-dependent killing of intracellular Ehrlichia risticii by macrophages treated with gamma interferon. *Infect. Immunol.*, 1992; 60 (9): 3504-3508.
- Parks, ED. y Chisari, FV. Production and distribution of lymphocytes and plasma cells. En: Hematology. 3ª ed. Williams, W.J. (ed.). New York: McGraw-Hill, 1983; pp. 923-933.
- Parry, BW y Brobst, DF. Normal clinical pathological data. En: Current therapy in equine medicine. Philadelphia, Robinson, NW (Ed). EE.UU. Saunders Company; 1997; pp. 761-772.
- Pass, DA y Bolton, JR. Chronic eosinophilic gastroenteritis in the horse. *Vet. Pathol.*, 1982; 19 (5): 486-496.
- Pastor, J; Cuenca R, Velarde R, Marco I, Viñas L, Lavín S. Evaluation of a haematological analyser (Sysmex F-800) with equine blood. *Zentralbl Veterinärmed. A*, 1998; 45 (2): 119-126.
- Pastor, J; Cuenca, R; Velarde, G; Viñas, L y Lavín, S. Hematología animal: revisión de técnicas analíticas. *Med. Vet.* 1995; 12 (11): 658-672.
- Pawelec, G. Immunosenescence: impact in the young as well as the old? *Mech. Ageing Dev.*, 1999; 108 (1): 1-7.
- Pawelec, G; Adibzadeth, M; Solana, R y Beckman, I. The T cell in the ageing individual. *Mech. Ageing Dev.*, 1997; 93 (1-3): 35-45.
- Pellegrini-Masini, A; Bentz AI; Johns IC Parsons, CS; Beech, J; Whitlock, RH y Flaminio, MJ. Common variable immunodeficiency in three horses with presumptive bacterial meningitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2005; 227 (1): 114-122.
- Pendergast, BJ; Yellon, SM; Tran, LT y Nelson, RJ. Photoperiod modulates the inhibitory effect of in vitro melatonin on lymphocyte proliferation in female Siberian hamsters. *J. Biol. Rythms*, 2001; 16 (3): 224-233.
- Pereira, JL; Orden, MA; Fernández, MJ; Barreiro, A; Díez, I, y Gonzalo, JM. Variaciones hematológicas en relación con la gestación y la edad de la raza bovina autóctona blanca cacereña. *Ann. Vet. Murcia*, 1987; 3: 93-97.
- Perk, K y Lobi, K. Chemical and paper electrophoretic analysis of normal sheep serum proteins and lipoproteins. *Br. Vet. J.*, 1960; 116: 167-172.
- Perkins, PC; Grindem, CB y Cullins, LD. Flow cytometric analysis of punctate and aggregate reticulocyte responses in phlebotomized cats. *Am. J. Vet. Res.*, 1995; 56 (12): 1564-1569.
- Perry, M.J.; Samuels, A.; Bird, D. y Tobias, J.H. Effects of high-dose estrogen on murine hematopoietic bone marrow precede those on osteogenesis. *Am. J. Endocrinol. Metab.*, 2000; 279 (5): 1159-1165.
- Perryman LE y McGuire TC. Mixed lymphocyte culture responses in combined immunodeficiency of horses.

Transplantation, 1978; 25 (2): 50-52.

Perryman, LE y McGuire, TC. Evaluation for immune system failures in horses and ponies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1980; 176 (12): 1374-1377.

Perryman, LE y Torbeck, RL. Combined immunodeficiency of Arabian horses: Confirmation of an autosomal recessive mode of inheritance. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1980; 176 (11): 1250-1251.

Perryman, LE. Molecular Pathology of Severe Combined Immunodeficiency in Mice, Horses, and Dog. *Vet. Pathol.*, 2004; 41 (2): 95-100.

Perryman, LE. Primary immunodeficiencies of horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 2000; 16 (1): 106-116.

Persson S. Heart rate and blood lactate responses to submaximal treadmill exercise in the normally performing Standardbred trotter. Age and sex variations and predictability from the total red blood cell volume. *Zentralbl. Veterinarmed. A*, 1997; 44 (3): 125-132.

Persson, SBG; Ekman, L; y Lydin, G. Circulatory effects of splenectomy in the horse. I. Effect on the red cell distribution and variability of haematocrit in the peripheral blood. *Zentralbl. Vet. Med. A.*, 1973; 20(6): 441-455.

Persson, SGB y Ullberg, L. Blood volume in relation to exercise tolerance in trotters. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 1974; 45 (4): 293-299.

Persson, SGB. Blood Volume, state of training and working capacity of racehorses. *Equine Vet. J.*, 1968; 1: 52-62.

Persson, SGB. Evaluation of exercise tolerance tolerance and fitness in the performance horse. En: *Equine exercise physiology*. Snow, DH; Persson, SGB, y Rose, RJ (Eds). Cambridge, Reino Unido: Granta Editions; 1983; pp. 441-447.

Persson, SGB. On blood volume and working capacity in horses. *Acta Physiol. Scand., Suppl.*, 1967, 19: 1-189.

Persson, SGB. The circulatory significance of the splenic red cell pool. En: *Proc International Symposium on Equine Hematology*; 1975. pp. 303.

Phair, J; Munoz, A; Detels, R; Kaslow, R; Rinaldo, C, y Saah, A. The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 1990; 322 (3): 161-165.

Piccione, G; Caola, G y Refinetti, R. Feeble weekly rhythmicity in hematological, cardiovascular, and thermal parameters in the horse. *Chronobiol. Int.*, 2004; 21 (4-5): 571-589.

Plaschka, S. Parámetros hematológicos, bioquímicos y hormonales durante la gestación de la yegua de raza española. *Med. Vet.*, 1996; 13 (2): 647-652.

Plaschka, S; García, P; Rivera, L; Martín, J; Lema, L y García, A. Parámetros hematológicos y bioquímicos durante el parto. *Med. Vet.*, 1997; 14: 203-208.

Plasenzotti, R; Stoiber, B; Posch, M y Windberger, U. Red blood cell deformability and aggregation behaviour in different animal species. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2004; 31 (2): 105-111.

Plotka, ED; Eagle, TC; Gaulke, SJ; Tester, JR y Siniff, DB. Hematologic and blood chemical characteristics of feral horses from three management areas. *J. Wildl Dis.*, 1988; 24 (2): 231-239.

- Plotsky, PM; Cunningham, ET y Widmaier, EP. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocrinol. Rev.*, 1989; 10 (4): 437-458.
- Ponce, J; Ponce, M y Candela, J. Alteraciones del hemograma del caballo Pura Sangre Inglés después del esfuerzo. *Hygia Pecoris*, 1979; 1: 20-25.
- Quigley, KA; Chelack; BJ, Haines DM, y Jackson, ML. Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2001; 13 (4): 297-300.
- Racklyeft, DJ; Raidal, S y Love, DN. Towards an understanding of equine pleuropneumonia: factors relevant for control. *Austr. Vet. J.*, 2000; 78: 334-338.
- Radin, MJ; Eubank, MC y Weiser, MG. Electronic measurement of erythrocyte volume and volume heterogeneity in horses during erythrocyte regeneration associated with experimental anemias. *Vet. Pathol.*, 1986; 23 (6): 565-660.
- Raidal, SL; Bailey, GD, y Love, DN. Effect of transportation on lower respiratory tract contamination and peripheral blood neutrophil function. *Aust. Vet. J.*, 1997; 75 (6): 433-438.
- Raidal, SL; Love, DN; Bailey, GD, y Rose, RJ. Effect of single bouts of moderate and high intensity exercise and training on equine peripheral blood neutrophil function. *Res. Vet. Sci.*, 2000; 68 (2): 141-146.
- Ralston, SL; Nockels, CF, y Squires, EL. Differences in diagnostic test results and haematologic data between aged and young horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1988; 49 (8): 1387-1392.
- Ramos, JJ; Marca, MC, y Fernández, A. Parámetros hematológicos sanguíneos en ovejas y corderos de raza Rasa Aragonesa: valores de referencia y modificaciones fisiológicas. *Med. Vet.*, 1992; 9 (1):34-45.
- Ratnassooriya, WD; Caldera, HS; Premakumara, GAS; Liyanage, GK; Manatunga, AMVR y Fernando, SBU. Some haematological values during normal pregnancy in the Sri Lankan elephant (*Elephas maximus maximus*). *Med. Sci. Res.*, 1993; 21 (4): 153-156.
- Raymond, SL; Smith, TK y Swamy, HV. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.*, 2003; 81 (9): 2123-2130.
- Regueiro, JR; López, C; González, S, y Martínez, E. Células y tejidos del sistema inmune. Señalización. En: *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune*. Regueiro González (ed.). 2ª ed. Madrid, España: Interamericana; 2004; pp. 9-20.
- Reichert T; DeBruyere M; Deneys V; Totterman T; Lydyard P; Yuksel F; Chapel H; Jewell D; Van Hove L y Linden J. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1991; 2 (60): 190-208.
- Reimann, KA; O'Gorman, MR; Spritzler, J; Wilkening, CL; Sabath, DE; Helm, K y Campbell, DE. Multisite comparison of CD4 and CD8 T lymphocyte counting by single- versus multiple-platform methodologies: evaluation of Beckman Coulter flow-count fluorospheres and the tetra ONE system. The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000; 7 (3): 344-351.
- Remarque, EJ. Influenza vaccination in elderly people.

Experimental Gerontology, 1999; 34 (3): 445-452.

Rendle, DI; Durham, AE; Thompson, JC; Archer, J; Mitchell, M; Saunders, K; Millere, J; Paillot, R; Smith, KC y Kydd, JH. Clinical, immunophenotypic and functional characterisation of T-cell leukaemia in six horses. *Equine Vet. J.* 2007; 39 (6): 522-528.

Revington, M. Haematology of the racing Thoroughbred in Australia 1: reference values and the effect of excitement. *Equine Vet. J.*, 1983; 15 (2): 141-144.

Riber, C; Rubio, MD; Marquez, F; Pinedo, M; Muñoz, A, y Castejon, F. Hematological changes observed in Andalusian horses with laminitis. *J. Vet. Med. Sci.*, 1995; 57 (5): 981-984.

Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech. Imm. Dev.*, 1998; 102: 199-209.

Roberts, MC. Serum and red cell folate and serum vitamin B12 levels in horses. *Austr. Vet. J.*, 1983; 60 (4): 106-111.

Robinson, CE; Kottapalli, V; D'Astice, M; Fields, JZ; Winship, D, y Keshavarzian, A. Regulation of neutrophils in ulcerative colitis by colonic factors: a possible mechanism of neutrophil activation and tissue damage. *J. Lab. Clin. Med.*, 1997; 130 (6): 590-602.

Rocha B, Dautigny N y Pereira P. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 1989; 19 (5): 905-911.

Roden, AC; Moser, MT; Tri, SM; Mercader, M; Kuntz, SM; Dong, H; Hurwitz, AA; McKean, DJ; Celis, E y Leibovich. BC. Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *J.*

Immunol., 2004; 173 (10): 6098-6108.

Roi, MC; Muñoz, F, y Rodon, J. Interpretación de las respuestas leucocitarias. *Anál. Clín. Peq. Anim.*, 1997; 6: 5-12.

Roitt, I. el reconocimiento de los antígenos. Anticuerpos y receptores de membrana. En: *Inmunología Fundamentos*. Ivan Roitt (ed.). Editorial Medica Panamericana. 1998, b; pp. 39-42.

Roitt, I. La base de la inmunología. Inmunidad innata e inmunidad adquirida específica. En: *Inmunología Fundamentos*. Ivan Roitt (ed.). Editorial Medica Panamericana. 1998, a; pp. 3-39.

Rose, RJ y Hodgson, DR. Hematology and biochemistry. En: *The athletic horse: Principles and practice of equine sports medicine*. Hodgson, DR y Rose, RJ (eds.). WB Saunders; 1994; pp. 63-76.

Rose, RJ; Hodgson, DR, y Sampson, D. Changes in plasma biochemistry in horses competing in a 160 km endurance ride. *Austr. Vet. J.*, 1983; 60 (4): 101-105.

Rosell, AI. Análisis de la expresión de moléculas de adhesión celular en la leucemia linfática crónica y otros síndromes linfoproliferativos crónicos con expresión leucémica. Tesis Doctoral Universidad de Valencia. 2002; pp. 64-65

Rossdale, PD; Burguez, PN y Cash, RS. Changes in blood neutrophil-lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse. *Equine Vet. J.*, 1982; 14 (4): 293-298.

Rowlands, GJ; Little, W; Stark, AJ y Manston, R. The blood composition of cows in commercial dairy herds and its relationships with season and lactation. *Br. Vet. J.*, 1979; 135 (1): 64-74.

- Rubio MD, Agüera S, Escribano B y Castejón, FM. Efecto de una prueba de ejercicio de intensidad creciente en parámetros bioquímicos sanguíneos en potros Pura Raza Española. *Arch. Zootecn.*, 1994, b; 34: 153-164.
- Rubio, D; Riber C; Santistebasn, R; Tovar P, y Castejón, FM. Haematological alterations as an index of exercise intolerance in different breed of horses (Andalusian, Arab and Anglo-Arab). *Equine Athletics*, 1994, a; 7: 10-12.
- Rubio, MD; Muñoz, A; Santisteban, R; Tovar, P, y Castejón, FM. Comparative hematological study of two breeds of foals (Andalusian and Arab) subjected to exercise of progressive intensity. *J. Vet. Med. Sci.*, 1995; 57 (2): 311-315.
- Rudy, BJ; Wilson, CM; Durako, S; Moscicki, AB; Muenz, L, y Douglas, SD. Peripheral blood lymphocyte subsets in adolescents: a longitudinal analysis from the REACH project. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2002; 9 (5): 959-965.
- Rumbaugh, GE; Smith, BP, y Carlson, GP. Internal abdominal abscesses in the horse: a study of 25 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1978; 172 (3): 304-309.
- Russell KE; Walter, KM; Miller, RT; y Sellon DC. Hyperglobulinemia and lymphocyte subset changes in naturally infected, inapparent carriers of equine infectious anemia virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1998; 59 (98): 1009-1015.
- Russell, KE y Grindem, CB. Secondary thrombocytopenia. En: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman, BF; Zinkl, JG y Jain, NC. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp. 487-495.
- Russell, KE; Perkins, PC, y Grindem, CB. Flow cytometric method for detecting thiazole orange-positive (reticulated) platelets in thrombocytopenic horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1997; (58): 1092-1096.
- Saigo, K; Sakota, Y y Masuda, Y. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: clinical aspects and laboratory tests. *Rinsho Byori.*, 2005; 53 (7): 646-653.
- Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.*, 2005; 6 (4): 345-352.
- Sakurai, N; Senta, T, y Amada, A. Effect of venopuncture on the heart rate and blood picture in the horse. *Tokyo. Exp. Rep. Eq. Health Lab.*, 1967; 4: 1-6.
- Sansoni, P; Cossarizza A y Brianti V. Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood*, 1993; 82 (9): 2767-2773.
- Satué K. Hematología en la yegua Pura Raza Española de Estirpe Cartujana. Tesis Doctoral. Valencia: Departamento de Medicina y cirugía animal. Universidad Cardenal Herrera-CEU; 2004.
- Schalm, OW y Carlson GP. The blood and the blood forming organs. En: *Equine Medicine and Surgery*. 3^a ed. Vol 1 American Veterinary Publications; 1982; 1 pp. 377-414.
- Schalm, OW. Lymphosarcoma in the horse. *Equine Pract.*, 1981; 3 (2): 23-27.
- Schalm, OW. Valores normales de la morfología sanguínea. En: *Hematología Veterinaria*. Unión tipográfica: editorial Hispano-Americana. México, 1964. pp 175-183.
- Schalm, OW; Jain, NC y Carroll, EJ. Veterinary

- haematology. 3^a ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1975.
- Scholes, SF; Holliman, A; May, PD, y Holmes, MA. A syndrome of anaemia, immunodeficiency and peripheral ganglionopathy in Fell pony foals. *Vet Record*. 1998; 142(6):128-34.
- Schott, HC; Ewart, SL.; Walker, RD.; Dwyer, RM; Dietrich, S; Eberhart, SW; Kusey, J; Stick, JA y Derksen, FJ. An outbreak of salmonellosis among horses at a veterinary teaching hospital. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2001; 218 (7): 1152-1159.
- Schrezenmeier, H; Muller, H; Gunsilius, E; Heimpel, H y Seifried, E. Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Thromb. Haemost.*, 1995; 73 (3): 506-513.
- Schuurs, AH y Verheul, HA. Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J. Steroid Biochem.*, 1990; 35 (2): 157-172.
- Scott, CS y Richards, SJ. Classification of large granular lymphocyte (LGL) and NK-associated (NKa) disorders. *Blood Rev.*, 1992; 6 (4): 220-233.
- Scott, M. y Stockham, S. Basophils and mast cells. En: Schalm's Veterinary Hematology. 5^a ed. Feldman, BF.; Zinkl, JG., y Jain, NC. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, 2000; pp. 308-317.
- Segal, AB; Bruno, S, y Forte, WC. Immune function in acute stress. *Allergol. Immunopathol.*, 2006; 34 (4): 136-140.
- Seghatchian, J. A new platelet storage lesion index based on paired samples, without and with EDTA and cell counting: comparison of three types of leukoreduced preparations. *Transfus. Apher. Sci.*, 2006; 35 (3): 283-292.
- Segura, D; Monreal, L; Perez-Pujol, S; Pino, M; Ordinas, A; Brugues, R; White, JG, y Escolar, G. Assessment of platelet function in horses: ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. *J. Vet. Intern. Med.*, 2006; 20 (3): 581-588.
- Sellon, DC. Thrombocytopenia in horses. *Equine Vet. Educ.*, 1998; 10 (3): 133-139.
- Sellon, DC; Levine, J; Millikin, E; Palmer, K; Grindem, C, y Covington, P. Thrombocytopenia in horses: 35 cases (1989-1994). *J. Vet. Intern. Med.*, 1996; 10 (3): 127-132.
- Shanahan, T. Application of flow cytometry in transplantation medicine. *Immunol. Invest.*, 1997; 26 (1-2): 91-101.
- Shevach, EM. Fatal Attraction: Tumors Beckon Regulatory T Cells. *Nat. Med.*, 2004; 10: 900-901.
- Shevach, EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18, 423-449.
- Siciliano, PD. Nutrition and feeding of the geriatric horse. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 2002; 18 (3): 491-508.
- Siess, W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol. Rev.*, 1989; 69 (1): 58-178.
- Sill, PR; Lind, T y Walker, W. Platelet values during normal pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1985; 92(5): 480-3.
- Silver, M; Ousey, JC y Dudan, FE. Studies on equine prematurity 2: post natal adrenocortical activity in relation to plasma adrenocorticotrophic hormone and

catecholamine levels in terms and premature foals. *Equine Vet. J.*, 1984; 16: 278-286.

Singh, CA. y Rattan, PJS. Seasonal variations in the contents of haemoglobin and the packed cell volume in the blood of Corriedale rams. *J. Res. Agricult. Univ.*, 1981; 18(3):341-344.

Slater; H y Hannant, D. Equine immunity to viruses. *Vet Clin. N Am. Equine Pract.*, 2000; 16 (1): 49-68.

Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, MM. The role of metabolic profiles in the sports horses. *World Equine Vet. Rev.*, 1999; 4: 3-21.

Smith, BP. Equine salmonellosis: a contemporary view. *Equine Vet. J.*, 1981; 13 (3): 147-151.

Smith, GS. Neutrophils. En: Feldman, B.; Zinkl, J. y Jain, N.(Eds) Schalm's veterinary hematology. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2000; pp. 281-298.

Smith, J; Erickson, H y Debowes, R. Changes in circulating equine erythrocytes induced by brief, high speed exercise. *Equine Vet. J.*, 1989; 21: 444-446.

Smith, R III y Thomas, JS. Quantitation of reticulated platelets in healthy dogs and in nonthrombocytopenic dogs with clinical disease. *Vet. Clin. Pathol.*, 2002; 31 (1): 26-32.

Smith, R III; Chaffin, K; Cohen, N, y Martens, RJ. Age-related changes in lymphocyte subset in Quarter Horse foals. *Am. J. Vet. Res.*, 2002; 63 (4): 531-536.

Smithson, G.; Medina, K.; Ponting, I. y Kincade, P.W. Estrogen suppresses stromal cell-dependent lymphopoiesis in culture. *J. Immunol.*, 1995; 155: 3409-3417.

Smits, E; Burvenich, C, y Heyneman, R. Simultaneous

flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1997; 56 (3-4): 259-69.

Smyth, MJ y Trapani, JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today*, 1995; 16 (4): 202-206.

Snow, D; Ricketts, SW, y Douglas, TA. Post-race biochemistry in thoroughbreds. En: Equine exercise physiology. Snow, DH; Persson, SGB, y Rose, RJ. (Eds) Cambridge, Reino Unido: Granta Editions; 1983; pp. 389-399.

Snow, DH y Mackenzie, G. Some metabolic effects of maximal exercise in the horse and adaptation with training. *Equine Vet. J.*, 1977; 9: 134-140.

Snow, DH; Kerr, MG; Nimmo, MA y Abbott, EM. Alterations in blood, sweat, urine and muscle composition during prolonged exercise in the horse. *Vet. Rec.*, 1982; 110: 377-384.

Souza SS; Castro FA; Mendonça HC; Palma PV y Morais FR; Influence of menstrual cycle on NK activity. *J. Reprod. Immunol.*, 2001; 50 (2): 151-159.

Spickett, GP; Misbah, SA, y Chapel, HM. Primary antibody deficiency in adults. *Lancet*, 1991; 337 (8736): 281-284.

Steel J.D. y Whitlock, L. E. Observations on the haematology of thoroughbred and standardbred horses in training and racing. *Austr. Vet. J.*, 1960; 36: 136-142.

Steinhardt, M; Thielscher, HH; von Horn, T; von Horn, R; Ermgassen, K; Ladewig, J y Smidt, D. The hemoglobin concentration in the blood of dairy cattle of different breeds and their offspring during the

- peripartum period. *Tierärztl Prax.*, 1994; 22 (2): 129-135.
- Stern, DA; Hicks, MJ y Martínez, FD. Lymphocyte subpopulation number and function in infancy. *Dev. Immunol.*, 1992; 2 (3): 175-179.
- Stewart C y Steinkamp JA. Quantitation of cell concentration using the flow cytometer. *Cytometry*, 1982; 2 (4): 238-243.
- Stewart CC. Identification and function of host defense cells by flow cytometry. *Immunol. Invest.*, 1997; 26 (1-2): 83-89.
- Stewart, GA y Steel, JD. Haematology of the fit racehorse. *J. S. Afr. Vet. Ass.*, 1974; 45: 287-291.
- Stewart, GA; Clarkson, GT, y Steel, JD. Hematology of the race horse and factors affecting interpretation of the blood count. En: *Procc. of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners*. 1970. pp: 17
- Stillions, MC; Teeter, SM; Nelson, WE. Utilization of dietary vitamin B12 and cobalt by mature horses. *J. Anim. Sci.*, 1971; 32, 252-255.
- Stockham, SL; Harvey, JW y Kinden, DA. Equine glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Vet. Pathol.*, 1994; 31 (5): 518-527.
- Stott, DJ. Lansghorne P y Hendry, A. Prevalence and haemopoietic effect of low serum vitamin B₁₂ levels in geriatric medical patients. *Br. J. Nutr.*, 1997; 78 (1): 57-63.
- Strong, J; Wang, Q y Killeen, N. Impaired survival of T helper cells in the absence of CD4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98 (5): 2566-2571.
- Stull CL. Responses of horses to trailer design, duration, and floor area during commercial transportation to slaughter. *J Anim Sci.*, 1999; 77(11): 2925-2933.
- Stull, CL y Rodiek, AV. Physiological responses of horses to 24 hours of transportation using a commercial van during summer conditions. *J. Anim. Sci.*, 2000; 78 (6): 1458-1466.
- Suárez, CR; Gonzalez, J; Menéndez, C; Fareed, J; Fresco, R y Walenga, J. Neonatal and maternal platelets: Activation at time of birth. *Am. J. Hematol.*, 1988; 29 (1): 18-21.
- Sufit, E; Houpt, KA., y Sweeting, M. Physiological stimuli of thirst and drinking patterns in ponies. *Equine Vet. J.*, 1985; 17(1):12-16.
- Swiderski, CE. Hypersensitivity disorders in horses. *Vet. Clinics North Am. Equine Pract.*, 2000; 16 (1): 131-151.
- Takubo, T y Tatsumi, N. Reference values for hematologic laboratory tests and hematologic disorders in the aged. *Rinsho Byori*, 2000; 48 (3): 207-216.
- Tarr, MJ; Olsen, RG; Krakowka, GS; Cockerell, GL y Gabel, AA. Erythrocyte rosette formation of equine peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.*, 1977; 38 (11): 1775-1779.
- Tarrant, JM. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *Vet. J.*, 2005; 170 (3): 278-288.
- Tavassoli, M. Eosinophil, eosinophilia and eosinophilic disorders. *Crit. Rev. Lab. Sci.*, 1981; 16 (1): 35-83.
- Taylor-Macallister, C; Macallister, CG; Walker, D y Aalseth, D. Haematology and serum biochemistry

evaluation in normal postpartum mares. *Equine Vet. J.*, 1997; 29 (3): 234-235.

Tedla, N; Wang, HW; McNeil, P; Di Girolamo, N Hampartzoumian T; Wakefield, D, y Lloyd, A. Regulation of T Lymphocyte Trafficking into Lymph Nodes During an Immune Response by the Chemokines Macrophage Inflammatory Protein (MIP) 1 alpha and MIP-1 beta. *J. Immunol.*, 1998; 161 (10): 5663-5672.

Tench, CM e Isenberg, DA. The variation in anti-ENA characteristics between different ethnic populations with systemic lupus erythematosus over a 10-year period. *Lupus*, 2000; 9 (5): 374-376.

Teske, E; Van Heerde, P y Gutterman, GR. Prognostic factors in canine non-Hodgkin's lymphomas: a prospective study in 138 dogs. Proceedings Annual Conference Veterinary Cancer Society; 1994. 14:59.

Theilen, GH; Blampied, NL; Harrold, B y Rosenblatt, LS. Hematologic survey of cattle on the Island of Jersey, with reference to the reported incidence of lymphosarcoma (leukemia). *Am. J. Vet. Res.*, 1967; 28 (126): 1313-1318.

Thoman, ML y Weigle, WO. The cellular and subcellular bases of immunosenescence. *Adv. Immunol.*, 1989; 46: 221-261.

Thomas, GW; Bell, SC y Carter, SD. Immunoglobulin and peripheral B-lymphocyte concentrations in Fell pony foal syndrome. *Equine Vet. J.*, 2005; 37 (1): 48-52.

Thomas, JS. Overview of plasma proteins. En: Feldman, BF; Zinkl, JG y Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 5ª ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2000; pp. 891-897.

Tizard, IR. Veterinary Immunology: An Introduction. 7ª ed. Saunders; 2007.

Tollerud, DJ; Brown, LM; Blattner, WA; Mann, DL; Pankiw-Trost, L y Hoover RN. T-cell subsets in healthy black smokers and nonsmokers: evidence for ethnic group as an important response modifier. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1991; 144 (3): 612-616.

Tollerud, DJ; Clark, JW; Brown, LM; Neuland, CY; Pankiw-Trost, LK y Blattner, WA. The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy non-smokers. *J. Clin. Immunol.*, 1989; 9 (3): 214-222.

Toman, M; Faldyna, M; Knotigova, P y Pokorova, D. Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002; 87 (3-4): 321-326.

Tomer, A. Flow cytometry for the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Curr. Hematol. Rep.*, 2006; 5 (1): 64-69.

Torten, M. y Schalm, OW. Influence of the equine spleen on rapid changes in the concentration of erythrocytes in peripheral blood. *Am. J. Vet. Res.*, 1964; 25: 500-504.

Trinchieri, G. Biological properties and therapeutic applications of interleukin-12. *Eur. Cytokine Netw.*, 1997; 8 (3): 305-307.

Trum, BF. Normal variances in horse blood due to breed, age, lactation, pregnancy and altitude. *Am. J. Vet. Res.*, 1951; 13: 514-519.

Tumbleson, ME; Tinsley, OW; Hicklin, KW, y Mulder, JB. Fetal and neonatal development of Sinclair (S-1) miniature piglets affected by maternal dietary protein

deprivation. *Growth*, 1972; 36 (4): 373-387.

Tvedten, H y Weiss, DJ. Classification and laboratory evaluation of anemia. En: Shalm's Veterinary Hematology. Feldman, BF; Zinkl, JG, y Jain, NC (eds.). Baltimore, USA. Lippincott Williams & Wilkins; 2000; pp. 143-150.

Tvedten, H. Advanced haematological analyzers: interpretation of results. *Vet. Clin. Pathol.*, 1993; 22 (3): 72-80.

Tyler, RD; Cowell, RL; Clinkenbeard, KD, y MacAllister, CG. Hematologic values in horses and interpretation of hematologic data. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 1987; 3 (3): 461-484.

Tyler-McGowan, CM; Golland, LC; Evans, DL; Hodgson, DR y Rose, RJ. Haematological and biochemical responses to training and overtraining. *Equine Vet. J. Suppl.*, 1999; 30: 621-625.

Uchiyama, T; Tokoi, K, y Deki, T. Successive changes in the blood composition of experimental normal beagle dogs associated with age. *Jikken Dobutsu.*, 1985; 34 (4): 367-377.

Unanue, ER. Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of Listeria resistance. *Curr. Opinion Immunol.*, 1997; 9 (1): 35-43.

Van Eaden, SF; Klut, ME; Walker, BA, y Hogg, JC. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol. Methods*, 1999; 232 (1-2): 23-43.

Vasto, S; Malavolta, M, y Pawelec G. Age and immunity. *Immun. Ageing*, 2006; 24 (3): 2.

Verdy, E; Bessous, V y Dreyfus, M. Longitudinal analysis of platelets count and volume in normal pregnancy. *Thromb. Haemost.*, 1997; 77(4): 806-807.

Verheyen, K; Price, J; Lanyon, L y Wood, J. Exercise distance and speed affect the risk of fracture in racehorses. *Bone*, 2006; 39 (6): 1322-1330.

Vernau, W y Moore, PF. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1999; 69 (2-4): 145-164.

Viveiros, MM y Antczak, DF. Characterization of equine natural killer and IL-2 stimulated lymphokine activated killer cell populations. *Dev. Comp. Immunol.*, 1999; 23 (6): 521-532.

Wagner, DD y Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003; 23 (12): 2131-2137.

Waldorf, RL. The immunologic theory of ageing. Munksgaard, Copenhagen, Dinamarca; 1969.

Watson, ADJ. Erythrocytosis and polycythemia. En: Shalm's Veterinary Hematology. Feldman, BF; Zinkl, JG, y Jain, NC (eds.). Baltimore, USA. Lippincott Williams & Wilkins; 2000; pp. 216-221.

Webb, AI y Weaver, BM. Body composition of the horse. *Equine Vet. J.*, 1979; 11 (1): 39-47.

Weiss DJ y Miller DC. Bone marrow necrosis associated with pancytopenia in a cow. *Vet Pathol.*, 1985; 22 (1): 90-92.

Weiss, DJ y Townsend, E. Evaluation of reticulated platelets in dogs. *Comp. Haematol. Int.*, 1998; 8 (3): 166-170.

Weiss, DJ, y Moritz, A. Analysis of Platelets by Cytometry. En: proc of the 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), Middleton WI, USA: American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology, 2004. Accedido en: International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2004.

Weiss, DJ. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Vet. Clin. Pathol.*, 2002; 31 (2): 72-82.

Weiss, DJ. Evaluation of myeloproliferative disorders in canine bone marrow by use of flow-cytometric scatter plots and monoclonal antibodies. *Vet. Pathol.*, 2001, a; 38 (5): 512-518.

Weiss, DJ. Flow cytometry and Immunophenotyping evaluation of canine lymphoproliferative disorders. *J. Vet. Intern. Med.*, 2001, b; 15 (6): 589-594.

Weiss, DJ. Platelet production defects.. En: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman, BF; Zinkl, JG y Jain, NC. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp. 469-472.

Weiss, DJ; Geor, RJ y Smith CM. Effects of echinocytosis on hemorrhheologic values and exercise performance in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1994; 55 (2): 210-304.

Weiss, DJ; Geor, RJ; Smith, CM, y McClay, CB. Furosemide induced electrolyte depletion associated with echinocytosis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1992; 53 (10): 1769-1772.

Weller, PF y Goetzl, EJ. The human eosinophil: role in host defense and tissue injury. *Am. J. Pathol.*, 1980; 100: 793-820.

Welles, E. Clinical interpretation of equine leucograms. En: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman, BF; Zinkl, JG, y Jain, NC. (eds.). 5ª ed. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; pp. 405-410.

Wellman. ML; Couto, CC; Starkey, RJ y Rojko, JL. Lymphocytosis of large granular lymphocytes in three dogs. *Vet. Pathol.*, 1989; 26 (2): 158-163.

West, J.B. Bases fisiológicas de la práctica médica. 12ª ed. Best y Taylor (eds.). Panamericana, 1990.

Wickler, SJ y Greene, HM. High altitude acclimatization and athletic performance in horses. *Equine Comp. Exercise Physiol.*, 2004; 1: 167-170

Wickler, SJ, y Anderson, TP. Hematological changes and athletic performance in horses in response to high altitude (3.000 m). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2000; 279 (4): 1176-1181.

Widde, PP; Six, HR; Ambrose, MW y Throop, BJ. Influenza virus infection and bacterial clearance in young adult and aged mice. *J. Gerontol.*, 1989; 44 (5): 118-124.

Wilkerson, MJ; Davis, E; Shuman, W, y Harkin, K. Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune mediated hemolytic anaemia. *J. Vet. Intern. Med.*, 2000; 14 (2): 190-196.

Williams, DL. Studies of canine leucocyte antigens: a significant advance in canine immunology. *Vet J.* 1997; 153 (1): 31-39.

Williams, W. The effect of aging in the blood count. *Compr. Ther.*, 1980; 6 (7): 7-9.

- Williamson, LH; Andrews, FM; Maykuth, PL; White, SL y Green, EM. Biochemical changes in three-day-event horses at the beginning, middle and end of Phase C and after Phase D. *Equine Vet. J. Suppl.*, 1996; 22: 92-98.
- Winnicka, A, Jagielski, D, Hoffmann-Jagielska, M y Lechowski, R. Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 2002; 49 (6): 303-306.
- Winter, H. Stability of red blood cell counts, volume distribution curves, packed cell volumes, and hemoglobin concentrations in stored ovine blood. *Am. J. Vet. Res.*, 1968; 29 (10): 2017-2022.
- Witonsky, S; Gogal, RM; Buechner-Maxwell, V, y Ahmed, SA. Immunological analysis of blood samples obtained from horses and stored for twenty-four hours. *Am. J. Vet. Res.*, 2003; 64 (8): 1003-1009.
- Wizemann, T y Pardue, M. Exploring the Biological Contributions to Human Health: En: Does Sex Matter? Wizemann TM, Pardue M, (Eds.), National Academy Press. Washington DC: 2001.
- Workman, HC y Vernau, W. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: the veterinary perspective. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2003; 33 (6): 1379-1399.
- Yang, J; Ye, Y; Carroll, A; Yang W, y Lee, H. Structural biology of the cell adhesion protein CD2: alternatively folded states and structure-function relation. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2001; 2 (1): 1-17.
- Yashiki, K.; Kusunose, R. y Takagi, S. Diurnal variations of blood constituents in young thoroughbred horses. *J. Equine Sci.*, 1995; 6 (3): 91-97.
- Yoneyama, A y Nakahara, K. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: differentiation from true thrombocytopenia. *Nippon Rinsho.*, 2003; 61 (4):569-574.
- Young, KM. Eosinophils. En: Schalm's Veterinary Hematology. 5ª ed Feldman, BF; Zinkl, JG, y Jain, NC. (Eds.). Lippincott Williams & Wilkins; 2000; pp. 297-307.
- Zekarias, B; Ter Huurne, AA; Landman, WJ; Rebel, JM; Pol, KMA, y Gruys, E. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Vet Res.*, 2002; 33 (2): 109-125.
- Ziemer, EL; Whitlock, RH; Palmer, JE, y Spencer, PA. Clinical and hematologic variables in ponies with experimentally induced equine ehrlichial colitis (*Potomac horse fever*). *Am. J. Vet. Res.*, 1987; 48 (1): 63-67.
- Zinkl, J; Mae, D; Guzmán, P; Farver, T, y Humble, J. Reference ranges and the influence of age and sex on hematological and serum biochemical values in donkeys (*Equus asinus*). *Am. J. Vet. Res.*, 1990; 51 (3): 408-413.
- Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Rev. Immunol.*, 2006; 6 (4): 295-307.