

Efecto antiinflamatorio del líquido amniótico en el pulmón de ratas inoculadas intratraquealmente con sílice

Verónica Carvajal de la Fuente*
Alfonso López Mayagoitia**
Julio Martínez Burnes*
Carlos Barrón Vargas*
J. Concepción Loredo Osti*

Abstract

“Meconium aspiration syndrome” is an important clinic-pathologic condition in human medicine, but its significance in veterinary medicine remains unknown. A recent study in calves with aspiration of keratin and amniotic fluid showed that inflammation in the lungs was only mild, in spite of the fact, that keratin is a highly pro-inflammatory substance. Based on the results of this study, the authors speculated that an anti-inflammatory substance may be present in the amniotic fluid. The purpose of this study was to determine whether the amniotic fluid has an anti-inflammatory effect in lungs of rats. Thirty eight Wistar rats with a mean weight of 177 g were divided into five groups. The rats were intratracheally inoculated with a constant volume of 0.5 ml of fluid containing 2.5 mg of silica, but with variable concentrations of amniotic fluid and saline solutions (0, 0.125, 0.25, 0.375 or 0.5 ml). Rats were euthanised at 72 hours postinoculation under halothane anesthesia. The number of bronchoalveolar cells per ml and percentage of neutrophils and alveolar macrophages determined by bronchoalveolar lavage was used as a measurable indicator of pulmonary inflammation. Inoculation with amniotic fluid and silica induced a significant influx of nucleated cells and neutrophils ($P < 0.01$) in bronchoalveolar lavage fluid of inoculated animals *versus* the control. The increase of nucleated cells and neutrophils was related with the volume of amniotic fluid inoculated. It was concluded that the amniotic fluid did not induce any anti-inflammatory effect in the lungs of rats inoculated with silica.

Key words: AMNIOTIC FLUID, ALVEOLAR MACROPHAGES, BRONCOALVEOLAR LAVAGE, INFLAMMATION, INTRATRACHEAL INSTILLATION, LUNG, MECONIUM ASPIRATION, NEUTROPHILS, SILICA, WISTAR RATS.

Resumen

El síndrome de aspiración de meconio representa un estado patológico de gran importancia para la medicina humana; sin embargo, es poco conocido en medicina veterinaria. En los últimos años se han realizado varias investigaciones con el fin de esclarecer la importancia y patogénesis de este síndrome en los animales domésticos. Estudios recientes han sugerido un posible efecto antiinflamatorio del líquido amniótico debido a que la aspiración de este líquido contaminado con queratina, la cual es un factor proinflamatorio, sólo induce una respuesta inflamatoria leve en el pulmón de becerros. El objetivo de

Recibido el 3 de junio de 1997 y aceptado el 7 de noviembre de 1997.

* Laboratorio de Diagnóstico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas, km 5, Carretera Victoria-Mante, 87000, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México.

** Department of Pathology and Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, Charlottetown, Prince Edward Island, Canadá, C14 4p3.

esta investigación fue determinar si el líquido amniótico produce un efecto antiinflamatorio en los pulmones de ratas inoculadas intratraquealmente con sílice. Treinta y ocho ratas Wistar de 177 g en promedio se dividieron en cinco grupos. Cada grupo recibió vía intratraqueal diferentes dosis de líquido amniótico y solución salina fisiológica (0, 0.125, 0.250, 0.375 y 0.5 ml, respectivamente) y cantidades constantes de sílice (5 mg/ml). Los animales inoculados se sacrificaron a las 72 horas posinoculación y se realizaron lavados broncoalveolares. Se realizó la cuenta total de células nucleadas por ml de lavado, así como el porcentaje y cuenta absoluta de neutrófilos y macrófagos. La inoculación con sílice y líquido amniótico indujo un marcado incremento en la cuenta total de células nucleadas y en el número de neutrófilos ($P < 0.01$) en los grupos tratados respecto del testigo. El incremento se mostró como una función directa del volumen de líquido amniótico inoculado. Sin embargo, se concluyó que el líquido amniótico no tuvo un efecto antiinflamatorio en el pulmón de ratas inoculadas intratraquealmente con sílice.

Palabras clave: ASPIRACIÓN DE MECONIO, INFLAMACIÓN, INOCULACIÓN INTRATRAQUEAL, LAVADOS BRONCOALVEOLARES, LÍQUIDO AMNIÓTICO, MACRÓFAGOS ALVEOLARES, NEUTRÓFILOS, PULMÓN, RATAS WISTAR, SÍLICE.

Introducción

El síndrome de aspiración de meconio (SAM) constituye un importante estado clínico patológico, causa "disfunción respiratoria" y ocasionalmente muerte en niños recién nacidos. Informes de hospitales en Estados Unidos indican que en 10% a 15% de los partos normales, el líquido amniótico se contamina con meconio y, por lo menos, 3% de los infantes nacidos vivos presentan meconio en las vías aéreas. Sin una intervención obstétrica adecuada, 28% de los niños nacidos con SAM mueren en las primeras horas de vida.^{1,2,3,4}

En los animales domésticos, las enfermedades perinatales son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, éstas representan importantes pérdidas económicas para la ganadería en todo el mundo. Informes recientes indican que la aspiración intrauterina de meconio y queratina al momento del parto parece ser un factor que contribuye en la aparición de enfermedades en becerros recién nacidos.⁵ Los becerros nacidos con meconio y queratina en las vías aéreas muestran lesiones pulmonares similares a las descritas en niños recién nacidos con SAM. La importancia del SAM en los animales domésticos es todavía desconocida.

La mayoría de los investigadores concuerdan que en casos de abortos, la aspiración de meconio y líquido amniótico es un evento terminal asociado con hipoxia intrauterina severa y prolongada.⁶ En el SAM la aspiración de meconio tiene una patogénesis similar a la aspiración que ocurre en abortos, en la cual la hipoxia y la relajación del esfínter anal permiten la salida de meconio al líquido amniótico. En este síndrome, el meconio acompañado generalmente por células epiteliales escamosas de la piel, boca o faringe, entran a las vías aéreas bajas mediante dos posibles mecanismos. En el primero, la hipoxia induce inspiración prenatal con la glotis abierta. En el segundo, el meconio y células epiteliales se localizan en la hipofaringe, la aspiración

hacia los pulmones ocurre cuando el neonato inspira aire por primera vez.^{4,7,8} El líquido amniótico actúa como vehículo para que el meconio y células lleguen al pulmón causando neumonía por cuerpo extraño. Inyecciones intratraqueales de células escamosas, queratina y meconio suspendidas en líquido amniótico provocan una neumonía similar en animales de laboratorio a la encontrada en humanos con SAM.^{1,7,8,9}

Recientemente se llevó a cabo un estudio retrospectivo en 52 becerros enviados a un laboratorio de diagnóstico para su examen *post mortem*.⁵ Los animales habían muerto de enfermedades infecciosas y no infecciosas dentro de las dos primeras semanas de vida. El examen histológico de los pulmones reveló que 42.5% de los becerros tenían evidencias de aspiración de meconio, caracterizado por la presencia de células epiteliales escamosas o queratina en los espacios broncoalveolares. Estos cambios en los pulmones se asociaban a una alveolitis difusa leve con exudación de macrófagos, neutrófilos y ocasionalmente células gigantes. Con base en esos hallazgos se concluyó que los cambios morfológicos en los pulmones de los becerros eran compatibles con los descritos en bebés con SAM.⁵ Dicho estudio también reveló que la probabilidad de encontrar inflamación pulmonar era aproximadamente 1.5 veces mayor en animales con aspiración de meconio que en becerros sin aspiración.

Otros investigadores han realizado estudios para determinar si la aspiración de líquido amniótico se asocia con efectos negativos en la absorción de las inmunoglobulinas del calostro o sobre los gases sanguíneos y equilibrio ácido-base de los becerros sanos recién nacidos.^{10,11} Se desarrolló un estudio con 14 becerros inmediatamente después de que nacieron y se alimentaron con calostro con concentraciones conocidas de inmunoglobulinas. Once de los becerros presentaban evidencia de broncoaspiración de líquido amniótico, meconio, células epiteliales escamosas o queratina en cortes de pulmón o en análisis citológico en líquido de

lavados broncoalveolares. La aspiración de líquido amniótico no pudo ser relacionada con cambios específicos en la tensión de gases sanguíneos de la condición ácido base, o en la absorción de inmunoglobulinas del calostro. La presencia de queratina y meconio en el pulmón frecuentemente se acompañó con una alveolitis exudativa leve y atelectasia focal. Con base en los hallazgos se concluyó que la aspiración de pequeñas cantidades de líquido amniótico con o sin meconio, es común en becerros y no se asocia con hipoxemia, acidosis respiratoria o falla en la transferencia pasiva. Este estudio también indicó que el líquido amniótico aspirado se asoció con alveolitis leve con exudación de neutrófilos en el lumen alveolar.¹¹ Sin embargo, la magnitud de la respuesta inflamatoria de los becerros con aspiración de líquido amniótico era relativamente leve, comparada con otros estudios con animales de laboratorio inoculados intratraquealmente con queratina y meconio, a pesar de que es bien sabido que la queratina es una sustancia altamente proinflamatoria. Con base en lo anterior, se especuló la presencia de un factor desconocido en el líquido amniótico que sirve como vehículo para llevar a la queratina y el meconio a los pulmones que pudiera regular la intensidad de la respuesta inflamatoria del pulmón.¹¹

En los últimos años se han desarrollado diferentes modelos experimentales que permiten estudiar la respuesta inflamatoria del pulmón en animales de laboratorio.^{12,13,14,15,16} Uno de aquellos modelos es el de inoculaciones intratraqueales de sílice en ratas. En este modelo es posible determinar la magnitud de la respuesta inflamatoria mediante el uso de lavados broncoalveolares a diferentes tiempos después de la inoculación con sílice. Estos lavados permiten cuantificar la magnitud de la respuesta inflamatoria a partir de los cambios que se llevan a cabo en el tipo y número de células inflamatorias en el pulmón; es decir, alteraciones en el número y proporción de neutrófilos y macrófagos alveolares.^{12,17}

Los objetivos de este trabajo fueron investigar si la presencia de líquido amniótico en los pulmones tiene un efecto inhibitorio en la respuesta inflamatoria causada por la inoculación intratraqueal de sílice en ratas.

Material y métodos

Estudio piloto

Inicialmente se realizó un estudio piloto con el fin de probar y estandarizar las técnicas de inoculación, anestesia, sacrificio y lavados broncoalveolares (LBA).

Animales

Se utilizaron 38 ratas Wistar hembras, con un peso promedio de 177.2 g \pm 16.3 g obtenidas de un bioterio de la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México, y se alojaron en jaulas individuales en un local con una temperatura promedio de 27°C y una humedad relativa del 50%; se les proporcionó alimento sin antibiótico *ad libitum*. Los animales se sometieron a un periodo de observación y adaptación de cinco días antes del inicio del experimento.

Líquido amniótico

El líquido amniótico se obtuvo en condiciones asépticas mediante la punción del saco amniótico de un bovino en el tercer tercio de gestación. Este líquido se mantuvo en refrigeración a una temperatura de 4 a 6°C antes de la preparación del inóculo.

Inoculación

Las ratas se dividieron en 5 grupos asignando en forma aleatoria de 7 a 8 animales por grupo. Cada grupo recibió cantidades constantes de sílice (5 mg/ml) y diferentes dosis de líquido amniótico y solución salina, como lo muestra el Cuadro 1.

Para la inoculación intratraqueal, se anestesió a las ratas con 5% de halotano y oxígeno utilizando una cámara de acrílico. Con la ayuda de un laringoscopio especialmente diseñado para ratas, se abrió la boca, se localizó la laringe y se introdujo en la tráquea un catéter de plástico conectado a una jeringa insulínica con el inóculo.¹⁸

Cuadro 1
DISEÑO EXPERIMENTAL

Grupos	SSF + Sílice (5 mg/ml)	Líquido amniótico + Sílice (5 mg/ml)
1 (Testigo)	0.5 ml	0
2	0.375 ml	0.125 ml
3	0.25 ml	0.25 ml
4	0.25 ml	0.375 ml
5	0	0.5 ml

Sacrificio y lavados broncoalveolares (LBA)

A las 72 horas posinoculación, las ratas fueron sacrificadas mediante desangrado bajo anestesia general siguiendo métodos previamente descritos.¹³ En resumen, se anestesió a las ratas a un plano quirúrgico profundo con halotano al 5% y se fijaron en decúbito dorsal sobre una superficie con los cuatro miembros distendidos, se utilizaron pinzas de cangrejo con retractores elásticos. Se hizo una incisión por la línea media cortando piel y músculos hasta exponer la cavidad abdominal. Se seccionó la arteria aorta posterior con tijeras para obtener un buen desangrado y disminuir el número de eritrocitos en los LBA. Mediante cistotomía bilateral se abrió la cavidad torácica y se cortaron los músculos cervicales y glándulas salivales para exponer la tráquea.

Una vez que se expuso la tráquea, se hizo una incisión transversal en los primeros anillos traqueales. A través de la incisión se pasó un catéter de plástico (número 17) conectado a una jeringa desechable de 10 ml. Se inyectaron lentamente 5 ml de solución salina fisiológica (SSF) al 0.9%, y posteriormente se dio un ligero masaje al pulmón para facilitar el desprendimiento de las células broncoalveolares. La aspiración del volumen inyectado se hizo lentamente. Los pulmones se lavaron tres veces consecutivas con un volumen total de 15 ml. El líquido del LBA se depositó en tubos de plástico de 15 ml con anticoagulante (EDTA) y se homogeneizó con un agitador de tubos durante 3 minutos. La suspensión celular se mantuvo en refrigeración (4°C a 5°C) mientras se colectaban los LBA de las demás ratas. El conteo diferencial de células broncoalveolares se determinó directamente en 0.5 ml del LBA; de manera simultánea el remanente del líquido se centrifugó a 300 g durante 10 minutos a una temperatura de 5°C. El sobrenadante fue decantado y se restituyó el sedimento en 1 ml del mismo lavado, posteriormente se homogeneizó. Utilizando un tubo capilar se tomaron 0.05 ml para la cuenta de células nucleadas en cámara.

Cuenta de células nucleadas

Para la cuenta de células nucleadas se utilizó una cámara de Neubauer* y la tinción de azul de Cresilo brillante.** Las células fueron teñidas en el mismo capilar con el que se tomó la muestra y se depositó 0.01 ml de la suspensión homogeneizada dentro de la cámara. El número de células nucleadas se determinó con un

* Boeckel, Co. Scient. Equip. B. Hamburg, Germany.

** Sigma Diagnostics, St. Louis Mo.

*** Cytospin, Shandon Inc. Pittsburgh, PA.

microscopio y una cámara de Neubauer siguiendo la metodología descrita en trabajos anteriores.¹⁹

Cuenta diferencial de macrófagos y neutrófilos

De la suspensión celular se tomaron 0.5 ml para centrifugarse a 300 g durante 10 minutos utilizando una citocentrífuga.*** El paquete celular fue concentrado en un portaobjetos secándolo al medio ambiente para después teñirlo con Wright; se montaron con cubreobjetos y se identificaron.

A los frotis se les asignó por una tercera persona, un número al azar para evitar una observación prejuiciosa.²⁰ Con el propósito de determinar el porcentaje de macrófagos y neutrófilos de las CBA, se observaron 200 células nucleadas (no epiteliales) por gota.

Cuenta absoluta de macrófagos y neutrófilos

A partir de las cuentas de células nucleadas en la cámara de Neubauer y de las cuentas diferenciales, se determinaron las cuentas absolutas de macrófagos y neutrófilos utilizando la metodología descrita en estudios previos.¹⁹

Los resultados se analizaron utilizando técnicas de modelos lineales generalizados.²¹ El análisis se realizó de dos maneras: como un diseño completamente al azar para comparar tratamientos *versus* testigos y el modelo de regresión con líquido amniótico como variable explicativa. Se utilizaron transformaciones logarítmicas y raíz cuadrada. Adicionalmente se utilizó para cuenta total de células nucleadas la prueba condicional para comparar dos variables Poisson y su extensión a más de dos variables Poisson vía la desigualdad de Bonferroni.²²

Resultados

El volumen de líquido recuperado en los LBA, considerándolo como la diferencia entre el volumen inoculado contra el recuperado en los 3 lavados, fue en promedio de $91.1\% \pm 5.71\%$.

El número de células nucleadas por ml de los lavados broncoalveolares de ratas inoculadas mostró una elevación progresiva en los diferentes grupos tratados respecto al testigo ($P < 0.01$) (Cuadro 2, Figura 1). En conjunto, el análisis estadístico indicó que hubo diferencia significativa ($P < 0.01$) de los grupos de ratas tratadas con respecto al testigo. El incremento de células nucleadas se mostró como una función directa del volumen de líquido amniótico inoculado.

Cuadro 2
RELACIÓN DE CÉLULAS NUCLEADAS TOTALES EN
LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES EN RATAS
INOCULADAS CON SÍLICE Y LÍQUIDO AMNIÓTICO A
LAS 72 HORAS POSINOCULACIÓN

Grupo	Número de animales	Promedio cel / ml	D.E.
1	8	480 000	± 396 375
2	7	557 619	± 428 760
3	7	722 857	± 456 218
4	7	738 095	± 483 410
5	8	782 500	± 693 447

La proporción promedio de neutrófilos encontrada en los diferentes grupos de animales inoculados fue de $67.5\% \pm 16.5\%$. La proporción promedio de macrófagos fue de $33.09\% \pm 17.1\%$ (Cuadro 3). No se detectaron diferencias significativas en la proporción de neutrófilos y macrófagos en los grupos inoculados respecto al testigo ($P > 0.05$).

Se observaron diferencias significativas ($P < 0.01$) en el número de neutrófilos por ml de LBA en los grupos inoculados respecto al testigo a las 72 horas posinoculación (Cuadro 4).

En la cuenta absoluta de macrófagos no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) de los grupos tratados respecto al testigo (Cuadro 5).

Cuadro 3
PROPORCIÓN DE NEUTRÓFILOS Y MACRÓFAGOS
ALVEOLARES, OBTENIDOS DE LBA DE RATAS INOCULADAS
INTRATRAQUEALMENTE CON SÍLICE Y
LÍQUIDO AMNIÓTICO A LAS 72 HORAS
POSINOCULACIÓN

Grupo	Proporción de neutrófilos	Proporción de macrófagos
1	0.64 ± 0.18	0.35 ± 0.18
2	0.56 ± 0.16	0.43 ± 0.16
3	0.68 ± 0.10	0.35 ± 0.15
4	0.75 ± 0.11	0.24 ± 0.11
5	0.68 ± 0.14	0.31 ± 0.14

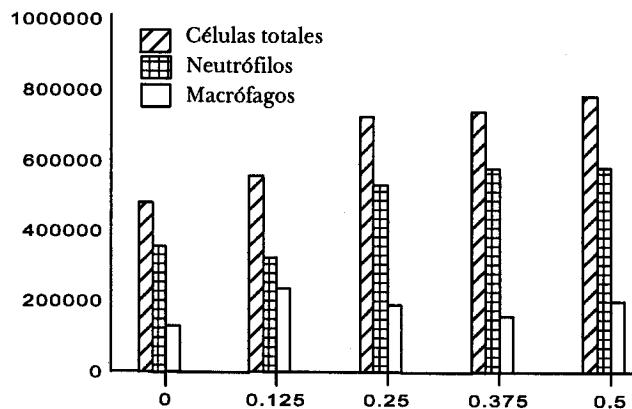


Figura 1. Células totales, neutrófilos y macrófagos en los lavados broncoalveolares de ratas inoculadas con sílice y líquido amniótico a las 72 horas posinoculación.

Se hace notar que una rata del grupo 3 (tratamiento con amniótico 0.250 ml) fue excluida del análisis debido a que sus valores registrados fueron completamente atípicos a los valores obtenidos en las restantes unidades experimentales (ratas). Una posible explicación para estos valores es la presencia de una enfermedad subclínica.

Discusión

La técnica de inoculación intratraqueal utilizando un laringoscopio mostró ser inofensiva, rápida y fácil de realizarse. A pesar de que podría suponerse que el uso de anestésicos inhalados pudiera tener un efecto adverso en los pulmones, estudios experimentales han demostrado que el halotano produce menos alteraciones bioquímicas y celulares que los barbitúricos.²³ El desangrado de las ratas durante el sacrificio reduce notablemente la contaminación accidental de los pulmones y LBA con eritrocitos.¹³ Al igual que lo notificado en la literatura, la utilización de tres lavados pulmonares fue suficiente para recolectar un buen paquete de células broncoalveolares.²³

En los lavados broncoalveolares (LBA) se recuperó en promedio 91.1% del volumen del líquido inicialmente inoculado, estos valores son similares a los descritos para ratas por otros investigadores.²⁴ El volumen recuperado de LBA en ratas es alto en comparación con los volúmenes descritos en otros animales de laboratorio; por ejemplo, 78% en ratones, 88% en gerbiles, hamsters y cobayos y 73% en conejos.²⁵

La inoculación intratraqueal de líquido amniótico y sílice indujo un marcado flujo de células nucleadas,

Cuadro 4
CUENTA ABSOLUTA DE NEUTRÓFILOS EN LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES EN RATAS INOCULADAS CON SÍLICE Y LÍQUIDO AMNIÓTICO A LAS 72 HORAS POSINOCULACIÓN

Grupo	Número de animales	Promedio cel / ml	D.E.
1	8	353 916	± 382 896
2	7	323 373	± 247 792
3	7	530 914	± 373 329
4	7	579 887	± 417 168
5	8	581 433	± 667 330

Cuadro 5
CUENTA ABSOLUTA DE MACRÓFAGOS EN LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES DE RATAS INOCULADAS CON SÍLICE Y LÍQUIDO AMNIÓTICO A LAS 72 HORAS POSINOCULACIÓN

Grupo	Número de animales	Promedio cel / ml	D.E.
1	8	126 083	± 54 256
2	7	234 245	± 198 608
3	7	191 942	± 119 401
4	7	158 207	± 102 352
5	8	201 066	± 194 196

específicamente neutrófilos a los espacios broncoalveolares en forma similar a lo informado en la literatura.^{14,25} Aunque el aumento de neutrófilos es un indicador de la respuesta inflamatoria temprana provocada por el sílice en los pulmones,²⁶ esta respuesta no debe considerarse específica ya que otras partículas neumotóxicas inducen una exudación similar de neutrófilos en los espacios broncoalveolares, como ocurrió en este caso con el líquido amniótico.^{13,27,28} Una de las ventajas de utilizar sílice como inductor experimental de inflamación es que el tamaño de las partículas es conocida y éstas no son digeridas fácilmente por las células fagocíticas.²⁶ Otra ventaja es que las partículas de sílice son fácilmente visibles al microscopio, en especial bajo luz polarizada. Como era de esperarse, los macrófagos alveolares y neutrófilos recolectados de los pulmones de las ratas inoculadas con sílice mostraron numerosas partículas en su citoplasma. Esto demuestra que la inoculación se hizo correctamente a los pulmones y no al esófago como ocurre accidentalmente en algunas ocasiones.

La disminución en el número de macrófagos colectados por LBA en ratas inoculadas con sílice respecto al número de neutrófilos coincidió con lo descrito en otros trabajos.^{14,24} Sin embargo, es importante mencionar que esta reducción paradójica de macrófagos se debe a una disminución en su recuperación y no a una disminución real en el número de células en el pulmón.¹⁴ Esta baja recuperación de macrófagos alveolares se debe a un aumento en la citoadherencia de estos fagocitos a las membranas del aparato respiratorio.²⁴

Las variaciones en el número de macrófagos y neutrófilos dentro de algunos grupos de ratas fueron más altas a las esperadas.¹⁴ Estas variaciones pudieran deberse a enfermedades subclínicas ya que las ratas utilizadas en

este trabajo se obtuvieron de un bioterio convencional no libre de patógenos. Otro factor que pudo influir en el análisis estadístico fue el número reducido de ratas que se utilizaron en cada grupo experimental.

Al comparar los resultados de esta investigación con otros publicados en la literatura es necesario considerar que existen factores de variabilidad que pueden influir en los conteos celulares de lavados broncoalveolares, como velocidad de centrifugación,²⁹ anestésicos utilizados,²³ volumen de LBA recuperado,²⁴ edad y peso de las ratas,²⁴ o factores que afectan la cinética de recuperación celular de vías aéreas.³⁰

Con base en los resultados obtenidos, se concluyó que el líquido amniótico no tuvo un efecto antiinflamatorio en el pulmón de ratas inoculadas intratraquealmente con sílice. Es recomendable en estudios futuros utilizar ratas libres de patógenos para reducir variaciones biológicas además de desarrollar este modelo en otras especies animales.

Agradecimientos

Se expresa un agradecimiento a las TLQ Dora López, Amanda Rodríguez y Albertina Alejos por su valioso apoyo técnico para la realización de este trabajo.

Referencias

1. Brady JP, Goldman S. Management of meconium aspiration syndrome. In: Thibeault DW, Gregory GA, editors. Neonatal pulmonary care. 2nd ed. Norwalk (CO): Appleton-Century-Crofts, 1986:483-498.

2. Dooly SL, Pesavento D, Deep R, Socol M, Tamura R, Wiringa K. Meconium below the vocal cords at delivery: correlation with intrapartum events. *Am J Obstet Gynecol* 1985;153:767-770.
3. Duenhoelter JH, Pritchard J. Fetal respiration: quantitative measurements of amniotic fluid inspired near term by human and Rhesus fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 1976;125:306-309.
4. Gregory GA, Gooding C, Phibbs R, Tooley W. Meconium aspiration in infants—a prospective study. *J Pediatr* 1974;85:848-852.
5. Lopez A, Bildfel R. Pulmonary inflammation associated with aspirated meconium and epithelial cells in calves. *Vet Pathol* 1992;29:104-111.
6. Miller RB. A summary of some of the pathogenetic mechanisms involved in bovine abortion. *Can vet J* 1977; 18:87-95.
7. Dawes GS, Patrick J. Fetal breathing activity. In: Nelson GH, editor. *Pulmonary development: transition of intrauterine to extrauterine life*. New York: Marcel Dekker, 1985:75-97.
8. Vyas H, Milner AD. Pulmonary disease of the newborn. In: Robertson NRC, editor. *Textbook of neonatology*. New York: Churchill Livingstone, 1986:317-318.
9. Tyler DC, Murphy J, Cheney F. Mechanical and chemical damage to lung tissue caused by meconium aspiration. *Pediatrics* 1978;62:454-459.
10. Besser TE, Szenci O, Gay C. Decreased colostral immunoglobulin absorption in calves with postnatal respiratory acidosis. *Am J Vet Med Assoc* 1990;196:1239-1243.
11. Lopez A, Lofstedt J, Bildfell R, Horney B, Burton S. Pulmonary histopathologic findings, acid-base status, and absorption of colostral immunoglobulins in newborn calves. *Am J vet Res* 1994;55:1303-1308.
12. Hunninghake G, Gadek J, Kawanami O, Ferrans V, Crystal R. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease. Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* 1979;97:149-206.
13. Lopez A, Yong S. Injury *versus* inflammatory response in the lungs of rats intratracheally inoculated with bacterial lipopolysaccharide. *Am J Vet Res* 1986; 47:1287-1292.
14. Lopez A, Yong S, Sharma A, Prior M. Effect of vehicular volume on the early pulmonary injury and inflammatory response in rats inoculated intratracheally with silica. *Am J Vet Res* 1987;48:1282-1285.
15. Pritchard JN, Holmes A, Evans J. The distribution of dust in the rat lung following administration by inhalation and by single intratracheal instillation. *Environ Res* 1985; 36:268-297.
16. Witschi HP, Hakkinen P. The role of toxicological interactions in lung injury. *Environ Health Perspect* 1984; 55:139-148.
17. Cohen A, Batra G. Bronchoscopy and lung lavage induced bilateral pulmonary neutrophil influx and blood leukocytosis in dogs and monkeys. *Am Rev Resp Dis* 1980;122:239-247.
18. Nicholson JW, Kinkead E. A simple device for intratracheal injections in rats. *Lab Anim Sci* 1982;32:509-510.
19. Martinez-Burnes J, Lopez A, Merino-Moncada M, Ochoa GP, Mondragon I. Pulmonary recruitment of neutrophils and bacterial clearance in mice inoculated with aerosols of *Pasteurella haemolytica* and *Staphylococcus aureus*. *Can J Comp Med* 1984;49:327-332.
20. Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1992.
21. McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. New York: Chapman and Hall, 1983.
22. Lehmann EL. *Testing statistical hypotheses*. 2nd ed. New York: Springer Verlag, 1997.
23. Henderson R, Lowrey J. Effect of anesthetic agents on lavage fluid parameters used as indicator of pulmonary injury. *Lab Anim Sci* 1983;33:60-62.
24. Lopez A, Yong S, Sharma A, Bailey D. Effect of sex, age, number of bronchoalveolar lavages and quantitation methods on the bronchoalveolar cell counts in rats. *Can J Vet Res* 1986;50:101-105.
25. Mauderly JL. Bronchopulmonary lavaged lung cells. *Am J Vet Res* 1985;46:547-553.
26. Morgan A, Moores SR, Holmes A. The effect of quartz, administered by intratracheal instillation on rat lung. I. The cellular response. *Environ Res* 1980;22:1-12.
27. Beck BD, Brain JD, Bohannon DE. An *in vivo* hamsters bioassay to assess the toxicity of particulates for the lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;66:9-29.
28. Damiano V, Cohen A, Tsang A, Batra G, Petersen R. A morphologic study of the influx of neutrophils into dog lung alveoli after lavage with sterile saline. *Am J Pathol* 1980;100:349-354.
29. Mordelet-Dambrine M, Arnoux A, Stanislas-Lequern G, Sandron D, Chretien J, Huchon G. Processing of lung lavage fluid causes variability in bronchoalveolar cell count. *Am Rev Resp Dis* 1980;130:305-306.
30. Davis G, Giancola M, Constanza M, Low R. Analysis of sequential bronchoalveolar lavage samples from healthy human volunteers. *Am Rev Resp Dis* 1982;126:611-616.