

T. D.  
M/148

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

## VALORACION DE LOS HALLAZGOS CITOLOGICOS E INMUNOLOGICOS EN EL FLUIDO DE LAVADO BRONCOALVEOLAR EN PATOLOGIA INTERSTICIAL PULMONAR NO NEOPLASICA

LIBRO DE REGISTRO DE TESIS  
N.º de expediente: 152  
N.º de folios: 239  
Fecha de inscripción: 2 ABR. 1993

*Alvarado Affre*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de

de la Universidad desde el día

de

de 19

EL DIRECTOR DE

José Martín Juan

1 9 9 3

R. 19207

# IMPRESO DE PRESENTACION DE LA TESIS DOCTORAL

APPELLIDOS MARTIN JUAN ..... NOMBRE JOSE .....

PROGRAMA DE DOCTORADO (Plan de estudios 1973) .....

DEPARTAMENTO EN QUE HA REALIZADO LA TESIS MEDICINA .....

TITULO DE LA TESIS Valoración de los hallazgos citológicos e inmunológicos en el fluido de lavado broncoalveolar en patología intersticial pulmonar no neoplásica.  
D. DÑA JOSE CASTILLO GOMEZ .....

Profesor asociado ..... del Departamento de MEDICINA .....

....., como Director de la Tesis de referencia autoriza su presentación.

Firma:

Sevilla 23 de 9 de 1992

D. DÑA ANTONIO NUÑEZ ROLDAN .....

Profesor asociado ..... del Departamento de MEDICINA .....

....., como Director de la Tesis Tutor (2) del alumno de referencia autoriza su presentación.

Firma:

Sevilla 23 de 9 de 1992

El Departamento de MEDICINA .....

con fecha 05-03-93 ..... autoriza la presentación de la Tesis de referencia.



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
Departamento de Medicina  
**DIRECCION**

Firma: Prof. Dr. Ramón Pérez Cano

Sevilla 5 de Febrero de 19 93

(1) Catedrático, Profesor Titular, Catedrático E U., etc.

(2) Táchese lo que no proceda. Este apartado se rellenará sólo en el caso de ser dos los Directores de Tesis, o de que el Director de la Tesis no sea Profesor del Departamento responsable.

Quiero dar las gracias a los Profesores Dr. José Castillo Gomez y Dr. Antonio Nuñez Roldan por la dirección y estímulo tanto al inicio como a lo largo de este estudio.

Agradezco a los miembros de mi servicio de Respiratorio el apoyo recibido, en especial a los que me iniciaron en la broncofibroscopia y a todos los que en la actualidad colaboran de una u otra forma en el mantenimiento de la línea de estudio emprendida.

Doy las gracias también a los miembros del Servicio de Inmunología por el interés, la enseñanza y el ánimo recibidos durante el periodo inicial del estudio, durante el cual, por lo general, todo resulta tan dificultoso.

**A Manuela, por su tolerancia  
y comprensión**

# INDICE

	<u>Página</u>
<b>INTRODUCCION</b> . . . . .	1
<b>1.- LAVADO BRONCOALVEOLAR. PERSPECTIVA HISTORICA DE SU DESARROLLO Y APLICACION CLINICA</b> . . . . .	2
<b>2.- METODO DE REALIZACION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS</b> . . . . .	7
<b>3.- EL LBA COMO TECNICA ESENCIAL EN EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA A NIVEL PULMONAR</b> . . . . .	9
<b>3.1.- Componentes celulares del fluido obtenido por LBA</b> . . . . .	10
<b>3.2.- Métodos de procesamiento e identificación celular</b> . . . . .	13
<b>3.3.- Características y función de las células obtenidas mediante LBA</b> . . . . .	15
<b>3.4.- Interacciones entre poblaciones celulares</b> . . . . .	22
<b>4.- FACTORES LIMITANTES EN LA ESTANDARIZACION E INTERPRETACION DE RESULTADOS</b> . . . . .	37
<b>4.1.- Correlación entre celularidad del LBA e histología</b> . . . . .	37
<b>4.2.- Dificultad para determinar concentración celular y de material soluble en el fluido de LBA</b> . . . . .	40
<b>4.3.- Influencia de la celularidad de la vía aérea proximal en los recuentos celulares diferenciales</b> . . . . .	42
<b>4.4.- Homogeneidad de recuentos celulares diferenciales en patología intersticial difusa</b> . . . . .	44
<b>4.5.- Variabilidad y reproductibilidad de recuentos celulares en sujetos normales</b> . . . . .	46
<b>4.6.- Falta de homogeneidad en la aplicación de criterios de adecuación de muestras para estudio</b> . . . . .	47
<b>4.7.- Variabilidad de resultados dependiente del procesamiento y análisis de muestras</b> . . . . .	48
<b>4.8.- Complejidad del estudio inmunológico</b> . . . . .	48
<b>OBJETIVOS DEL ESTUDIO</b> . . . . .	51

	<u>Página</u>
<b><u>MATERIAL Y METODOS</u></b> . . . . .	56
1.- CRITERIOS DE SELECCION DE PACIENTES Y MUESTRAS . . . . .	56
2.- CRITERIOS DIAGNOSTICOS . . . . .	61
3.- METODOLOGIA DE OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS . . . . .	68
3.1.- Broncofibroscopia y LBA . . . . .	68
3.2.- Procesamiento de muestras . . . . .	71
3.3.- Número total de células y concentración celular . . . . .	72
3.4.- Estudio de distribución celular porcentual . . . . .	73
3.5.- Tinciones y estudios especiales . . . . .	74
3.6.- Estudio inmunológico mediante técnica de IFI . . . . .	75
4.- ANALISIS ESTADISTICO . . . . .	80
<b><u>RESULTADOS</u></b> . . . . .	82
<b><u>DISCUSION</u></b> . . . . .	156
<b><u>RESUMEN</u></b> . . . . .	199
<b><u>CONCLUSIONES</u></b> . . . . .	206
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b> . . . . .	210

## ABREVIATURAS

AcMo= Anticuerpo/s monoclonal/es  
Ag= Antígeno  
BF= Broncofibroscopia  
BPA= Biopsia pulmonar abierta  
CD= "Clusters" de diferenciación  
Cels.tot= Número total de células  
Cels/ml= Número de células por ml de fluido recuperado  
CONTRL= G. Control  
CPA= Célula/s presentadora/s de antígeno  
EMTC= Enfermedad mixta del tejido conectivo  
EOSINF= Eosinófilo  
ESCLERD= Esclerodermia  
FPI= Fibrosis pulmonar idiopática  
FRE= Fluido de revestimiento epitelial  
IF= Intensidad de fluorescencia  
IFI= Inmunofluorescencia indirecta  
Igs= Inmunoglobulinas  
IL-1= Interleuquina 1  
IL-2= Interleuquina 2  
IL-2R= Receptor para interleuquina 2  
IO= Infección oportunista  
LBA= Lavado broncoalveolar  
LES= Lupus eritematoso sistémico  
LINF= Linfocito/s  
M ± ES= Media ± error standard  
MAC= Macrófago/s  
MHC= Complejo mayor de histocompatibilidad  
MoMAC= Monocito-macrofágica (línea)  
MSP= Monocitos de sangre periférica  
NEUTR= Neutrófilos  
NH= Neumonitis por hipersensibilidad  
NI-EC= N. intersticial asociada a enfermedades del colágeno  
NID= Neumonía intersticial difusa  
NID-EC= N. intersticial difusa asociada a enf. del colágeno  
NII= Neumonía intersticial idiopática  
NK= "Natural killer"  
PMN= Polimorfonucleares  
Rtr= Receptor para transferrina  
SARC= Sarcoidosis  
SHAD= Síndrome de hemorragia alveolar difusa  
SIDA= Síndrome de inmunodeficiencia adquirida  
TNF= "Tumor necrosis factor"  
VIH= Virus de la inmunodeficiencia humana



# INTRODUCCION

## 1.-LAVADO BRONCOALVEOLAR . PERSPECTIVA HISTORICA DE SU DESARROLLO Y APLICACION CLINICA

Antes de la introducción del broncofibroscopio como instrumento esencial en el diagnóstico neumológico , el broncoscopio rígido, diseñado por Jackson en 1904 (1) fue utilizado durante muchos años para eliminar secreciones purulentas de vías aéreas en pacientes con bronquiectasias.

En 1949 Carlens (2) describió un método para aislar un bronquio principal mediante un tubo de doble luz, que permitía la instilación de grandes cantidades de líquido en un árbol bronquial sin impedir la ventilación del pulmón contralateral. Este método fue empleado con éxito en pacientes con proteinosis alveolar, microlitiasis alveolar, asma refractario , inhalación de partículas o gases nocivos y fibrosis quística.

Métras (3) en 1953 ideó un cateter con punta radioopaca, fácil de colocar con control fluoroscópico y que facilitaba el aislamiento de un segmento pulmonar. Este sistema fue empleado para la obtención de células del tracto respiratorio inferior en los primeros estudios inmunológicos realizados en sujetos normales (4,5).

Cuando Ikeda introdujo la broncoscopia mediante fibra óptica (BF) a inicios de 1970, causó gran impacto. La aplicación más inmediata fue la biopsia directa y cepillado de la mucosa bronquial para el diagnóstico de neoplasias y ciertas enfermedades pulmonares intersticiales. Posteriormente se iniciaron múltiples estudios mediante lavado broncoalveolar (LBA) en voluntarios normales, tanto fumadores como no fumadores, con el objetivo de investigar la hasta entonces inaccesible vía aérea distal, obteniéndose datos importantes acerca de la composición celular y componentes solubles a este nivel (5-11).

Desde entonces hasta la actualidad se ha obtenido una amplísima información sobre los mecanismos inmunes e inflamatorios implicados en las enfermedades pulmonares intersticiales, distress respiratorio, asma, proteinosis alveolar, fibrosis quística, cáncer pulmonar, enfermedad pulmonar ocupacional, toxicidad pulmonar por drogas y efectos de la inhalación de tabaco y del desbalance proteasa-antiproteasa a nivel alveolar.

En la literatura existen excelentes revisiones donde se realiza una visión global y unificadora de todos estos aspectos (12-17).

El LBA, además, es un procedimiento esencial en el estudio de infiltrados pulmonares en pacientes inmunocom-

prometidos. La utilidad en el diagnóstico de infecciones por Pn. carinii en estos pacientes fue reconocida inicialmente por Drew (1974) (19) y Kelley (1978) (20). Posteriormente, desde la descripción en 1981 de los primeros casos de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) hasta la actualidad, el LBA ha contribuido no sólo a un diagnóstico más seguro de las infecciones pulmonares oportunistas asociadas sino que además, ha permitido esclarecer importantes aspectos sobre la inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (21-34).

A pesar de todas estas aportaciones, la utilidad de este procedimiento en el diagnóstico de la patología intersticial de origen no infeccioso, está limitada a un grupo reducido de enfermedades que incluye: histiocitosis X, síndrome de hemorragia pulmonar, proteinosis alveolar, exposición a asbesto, carcinoma bronquioloalveolar y linfomas.

En el resto de la patología intersticial han sido descritos determinados patrones de predominio celular que se han utilizado para diferenciar aquellos trastornos en los que existe un predominio linfocitario (p.e. sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, tuberculosis diseminada) de los que muestran un predominio neutrofílico (p.e. fibrosis pulmonar idiopática y asociada a enfermedades del colágeno,

histiocitosis X, etc).

Algunos de estos resultados preliminares , como por ejemplo el grado de alveolitis linfocitaria y subpoblaciones linfocitarias en el fluido de LBA en sarcoidosis (35-38), o la evidencia de alveolitis neutrofílica en fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (35,41-44) fueron utilizados de forma extensa para monitorizar la evolución de la enfermedad o separar subgrupos de pacientes con potencial beneficio terapéutico. En posteriores estudios se concluye que los recuentos celulares en el fluido del LBA no deberían ser usados en pacientes individuales para monitorizar o predecir respuesta al tratamiento en sarcoidosis (15,39-40) o FPI (45,46).

No obstante, los perfiles celulares que caracterizan las enfermedades antes señaladas pueden llegar a constituir una guía importante en el diagnóstico y manejo de la enfermedad pulmonar intersticial.

Las opiniones sobre utilidad del LBA en el diagnóstico de la enfermedad pulmonar intersticial son muy variadas. Los autores con opinión más favorable (15,18) piensan que el LBA puede modificar el planteamiento diagnóstico , aumentar el grado de confianza en un determinado diagnóstico o bien ayudar a seleccionar otros estudios necesarios.

En los últimos años, las aportaciones del LBA al estudio de la patogenia de las enfermedades intersticiales han sido muy numerosas. De forma progresiva se van sentando las indicaciones para utilización del LBA (47-48) y se añaden nuevos valores standard de referencia (49) a otros ya existentes (7-11). Todo ello contribuirá a afianzar su posición en el diagnóstico de la patología respiratoria.

## 2.- METODO DE REALIZACION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El LBA es un procedimiento endoscópico concebido con la finalidad de obtener muestras celulares, material soluble y agentes infecciosos presentes en alvéolos y vías aéreas terminales.

En la sección de METODOLOGIA de este trabajo se describen con detalle los pasos secuenciales de nuestra técnica de obtención y procesamiento de muestras. En esencia, añade a la BF normal la instilación de una cantidad de suero fisiológico en un segmentario del lóbulo medio o llingula. El volumen de líquido instilado oscila ente 100 y 250 cc según los distintos autores .

El líquido recuperado es una mezcla de suero fisiológico y fluido de revestimiento epitelial en proporciones aún no bien conocidas. Su procesamiento en laboratorio permite conocer número total de células disponibles, distribución porcentual de cada tipo celular y estudio funcional mediante uso de anticuerpos monoclonales (AcMo). Su estudio completo incluye además, si lo requiere, estudio citopatológico, ultraestructural y microbiológico.

En el sobrenadante acelular , una vez concentrado, es posible determinar componentes solubles del fluido del revestimiento epitelial (7,9-11,49,50) (albúmina, transferrina,  $\alpha_2$ -macroglobulina, inmunoglobulinas, complemento, an-

tiproteasas, enzimas, urea).

El procedimiento generalmente es seguro, con escasa morbilidad y los efectos secundarios son más o menos comparables con los de la BF de rutina con anestesia tópica (51-54).

Desde que la técnica fue descrita por Reynolds y Newball en 1974 (7) hasta la actualidad se han incluido numerosas variables y se han publicado cientos de estudios en relación con la metodología de obtención y procesamiento de muestras. El método, por lo tanto, no está aún estandarizado y por ello los resultados son tan variables entre distintos laboratorios que es difícil comparar y obtener conclusiones.

Además de la metodología existen otros factores que inducen variabilidad en los recuentos celulares y limitan su utilidad diagnóstica. Algunos de ellos serán revisados y otros estudiados en otras secciones de este trabajo.



### 3.- EL LBA COMO TECNICA ESENCIAL EN EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA A NIVEL PULMONAR

El tracto respiratorio está expuesto continuamente a microorganismos y partículas presentes en el aire inhalado, por lo cual es necesario que existan mecanismos de defensa para prevenir el proceso infeccioso y daño pulmonar.

En vías respiratorias altas, la tos, estornudo y el aclaramiento mucociliar contribuyen al aclaramiento de partículas.

La vía aérea distal, bronquiolos y alvéolos, está desprovista de estos mecanismos y los agentes infecciosos o partículas que alcanzan este nivel son eliminadas por el sistema mononuclear fagocítico. Estos mecanismos de inmunovigilancia se complementan por la presencia de inmunoglobulinas (Igs) producidas localmente (IgA secretora) y otras Igs (IgG, IgM, IgE), transferrina, componentes de la vía alternativa de activación del complemento y surfactante (26).

La respuesta inmune, tanto celular como humoral, tiene una acción multiplicativa ya que inicia la generación de una respuesta inflamatoria mediante el reclutamiento de células efectoras (polimorfonucleares y linfocitos), con alteración de la vía aérea y aumento de permeabilidad capilar, lo que permite, además, el aflujo hacia el alvéolo de

cantidad de componentes solubles que mantienen el proceso inflamatorio.

Además de su función defensiva, tanto los PMN como los macrófagos han sido implicados tanto en el inicio como en el mantenimiento del daño alveolar, característico de diversas enfermedades tanto agudas como crónicas.

La comprensión de todos estos mecanismos es debida en gran parte a las aportaciones del LBA.

El líquido recuperado mediante este procedimiento (aproximadamente entre el 40-70% del volumen instilado) contiene una cantidad de fluido de revestimiento epitelial alveolar y de vía aérea que se estima en 1% del volumen recuperado ( $1.0 \pm 0.1$  ml/100 ml de fluido) (55), determinada mediante el método de la urea como marcador de dilución. No se ha descrito aún el método ideal para determinar el grado de dilución de este fluido y por lo tanto es difícil la cuantificación de proteínas y otros componentes solubles (7,9,10,41,50,56).

### 3.1 .- Componentes celulares del fluido obtenido por LBA

Numerosos centros han publicado cifras de celularidad total y recuentos celulares diferenciales en individuos normales. Estas cifras difieren considerablemente ya que

tanto el volumen instilado y recuperado en los distintos estudios muestran grandes diferencias y además varían los métodos de cuantificación celular.

Por otra parte, los valores publicados corresponden a un pequeño número de sujetos y los criterios de selección no están claramente definidos o varían considerablemente.

Recientemente se han dado a conocer los resultados de un macroestudio cooperativo iniciado en E.E.U.U en 1984 y diseñado con la finalidad, entre otras, de caracterizar, en un grupo amplio de 191 pacientes normales, los constituyentes celulares y solubles en el fluido del LBA y valorar la influencia en éstos de factores demográficos y la historia de tabaquismo (49).

Los resultados de este estudio quedan contrastados con los estudios previos en las TABLAS 1 y 2 siguientes.

**TABLA 1**  
**CELULAS EN EL FLUIDO DEL LBA EN SUJETOS NORMALES NO FUMADORES**

Autores	Ref.	Año	n	V.inst	% rec	Cels.tot	Cels/ml	NAC(x)	LINFC(x)	PMN(x)
Reynolds	(7)	1974	5	150	66	12.8	NR	74	15	0
Daniele	(8)	1975	12	100-200	50	9.5	12.7	78	17	NR
Reynolds	(41)	1977	11	100	50	22.2	13.9	79	17	NR
Low	(10)	1978	14	240	73	11.2	6.4	95	3	2
Merrill	(50)	1980	24	200	63	15.8	NR	88	9	2
Baughman	(57)	1986	16	150	NR	NR	NR	92	7	1
Costabel	(59)	1986	11	100	54	7	NR	92	7	1
Wallaert	(61)	1988	10	250	NR	NR	9.8	91	8	1
Barbers	(60)	1987	19	300	70	23.9	11.6	91	8	1
Ettenshon	(58)	1988	78	120	63	7.3	9.3	95	4	1
Semenzato	(62)	1986	10	100-150	59	12.0	9.3	91	8	1
NHLBI	(49)	1990	77	240	64	18.1	12.9	85	12	2

TABLA 2  
CELULAS EN EL FLUIDO DEL LBA EN SUJETOS NORMALES FUMADORES

Autores	Ref.	Año	n	Vol.inst	% rec	Cels.tot	Cels/ml	MAC(x)	LINFC(x)	PMN(x)
Reynolds	(7)	1974	5	150	66	39.8	NR	96	6	NR
Reynolds	(41)	1977	21	100	48	14.4	33.5	85	8	3
Low	(10)	1978	12	240	69	76.2	45.9	94	5	1
Haslam	(63)	1980	15	300-550	27	72.0	50.0	87	5	8
Merrill	(50)	1980	32	200	61	78.0	NR	94	3	3
Costabel	(59)	1986	12	100	52	23.0	NR	96	3	1
Barbers	(60)	1987	13	300	62	59.2	35.8	93	6	<1
NHLBI	(49)	1990	64	240	59	59.9	41.8	93	5	2

Ref.= Referencia bibliográfica; n= n° de pacientes; Vol. inst= Volumen instilado; % rec= porcentaje recuperado; Cels.tot= Células totales ( $n \times 10^4$ ); Cels/ml= Células por ml fluido recuperado ( $n \times 10^4$ ).

A pesar de la amplia variabilidad de los resultados referidos por los distintos autores, tanto en celularidad total como distribución celular porcentual, parece aceptado que la celularidad presente en el tracto respiratorio inferior normal consiste, en su mayor parte de macrófagos (MAC), seguido por los linfocitos (LINFC) y en escaso porcentaje los polimorfonucleares (PMN).

El hábito tabáquico aumenta entre tres y cuatro veces la celularidad total y modifica la distribución porcentual al incrementar el porcentaje de neutrófilos y descender el de linfocitos (7,10,49,59,60). Se han descrito también alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias con un marcado descenso en el cociente CD4/CD8 por expansión de la subpoblación con fenotipo supresor-citotóxico (59).

### 3.2.- Métodos de procesamiento e identificación celular

La adecuada interpretación de los resultados del LBA depende de la correcta identificación celular.

Los dos métodos normalmente usados para examen citológico son la citocentrifugación y tinción con Wright-Giemsa (o Diff-Quick) o Papanicolaou o bien el empleo de filtros Millipore (filtros de nitrocelulosa de 25 mm de diámetro con poros de 5  $\mu$ ) y tinción con Papanicolaou o hematoxilina eosina.

Ambas técnicas tienen inconvenientes. Saltini y cols (1984) (64) estudiaron determinados factores del procesamiento que pueden influir en los resultados finales. Tras realización de "lavados" secuenciales y centrifugaciones para concentrar la muestra apreciaron una pérdida variable de células que valoraron en un 22% sobre el número original.

Observaron además que la población de LINFc estaba menos representada en las preparaciones obtenidas mediante empleo de citocentrífuga que en las obtenidas con técnica de filtros. Esta aparente pérdida de LINFc, según sus resultados, era muy variable pero oscilaba alrededor del 30%.

Alteraciones en el tiempo o velocidad de centrifugación o volumen de fluido en el cual se suspenden las células no parecían influir en los resultados finales.

La pérdida selectiva de LINFc durante la citocentrifu-

gación ha sido confirmada posteriormente por Fleury-Feith y cols (1987) (65) y la atribuyen tanto a una mayor susceptibilidad de éstas células a la lisis y a una menor capacidad de adherencia al cristal, lo que facilita que se pierdan durante los procedimientos de tinción.

La velocidad de citocentrifugación parece modificar también los recuentos celulares. Mordélet-Dambrine y cols (1984) demostraron que con altas velocidades de citocentrifugación desciende el porcentaje de MAC y se incrementa el de LINFC en relación con bajas velocidades (66).

Las preparaciones obtenidas mediante filtros Millipore muestran un excelente detalle morfológico y aunque no se observa pérdida de LINFC, sí que se ha mostrado un menor porcentaje de neutrófilos en comparación con la citocentrifugación, quizás por destrucción al pasar a través del filtro (67).

En definitiva, el procesamiento de las muestras influye de forma importante en los recuentos celulares diferenciales y por ello, los resultados han de ser interpretados teniendo en cuenta las limitaciones de cada método empleado.

### 3.3.- Características y función de las células obtenidas mediante LBA

#### 3.3.1.- Macrófagos (MAC)

A nivel pulmonar , los más investigados han sido los MAC alveolares, que representan el 90-95% de las células obtenidas mediante LBA.

Es debatido todavía si estas células son representativas de la población celular alveolar, ya que en el LBA se arrastran MAC de vía aérea y además , es posible que las células recuperadas sean células senescentes con poca capacidad de adherencia.

Los MAC obtenidos son heterogéneos tanto morfológica como funcionalmente. Reynolds y Newball (1974) (7) y Cohen y Cline (1977) (6) realizaron los primeros estudios de caracterización y describen al menos tres tipos de células en base al tamaño : los más numerosos ( $\approx 70\%$ ) son MAC de tamaño intermedio (14-19  $\mu\text{m}$ ), el 20% tienen el tamaño de las células mononucleares fagocíticas de sangre periférica y el  $\approx 7\%$  son células multinucleadas gigantes con diámetro de 20-40  $\mu\text{m}$ .

La exposición prolongada al humo de tabaco se asocia con inflamación crónica del tracto respiratorio inferior. El LBA en sujetos fumadores evidencia MAC más numerosos, de mayor tamaño y con más inclusiones intracitoplásmicas pig-

mentadas. Se ha demostrado (68) un incremento en la cantidad de Fe y ferritina en MAC alveolares de pacientes fumadores comparativamente con los no fumadores. Del balance Fe libre-Fe unido a ferritina puede depender la generación de agentes oxidantes potencialmente lesivos implicados en la patogenia de enfermedades como el enfisema pulmonar.

Desde este punto de vista, es desconocido aún si el metabolismo del Fe por los MAC alveolares de pacientes fumadores es protector o problemático en el pulmón (69).

El origen de los MAC alveolares ha sido muy debatido.

En estudios realizados en animales y humanos se ha demostrado que la mayoría de los MAC alveolares derivan de los monocitos de sangre periférica. En el realizado por Thomas y cols (1976), se mostró el origen en médula ósea del MAC alveolar al observar en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea una repoblación gradual de sus alvéolos con MAC originados en el donante (70).

No obstante, en estado normal, ha sido demostrado que una mínima porción de esta población deriva de la replicación "in situ" del pool de MAC intraalveolar (71-73).

Se considera que el primer mecanismo puede estar implicado en el reclutamiento de monocitos periféricos en los estados de inflamación aguda. En los procesos inflamatorios crónicos, aunque se incrementa el grado de reclutamiento



(72), parece ganar más importancia la replicación local intraalveolar (71-73).

Otra población de MAC, no recuperada con el LBA, es la existente a nivel intersticial e intravascular, probablemente diferentes funcionalmente a los MAC alveolares.

Los MAC interactúan con otras células mediante la unión de ligandos a receptores específicos localizados en su superficie.

El empleo de AcMo ha permitido la descripción de una amplia variedad de moléculas implicadas en una gran diversidad de funciones celulares. Muchas de estas moléculas están presentes en otras líneas celulares y pueden ser evidenciadas sin gran complejidad en los estudios rutinarios de la celularidad del LBA. No obstante, aunque su análisis ha permitido acceder al estudio de funciones sofisticadas del MAC, su utilidad en el diagnóstico de procesos inflamatorios o inmunes pulmonares está aún por investigar.

Aunque es dificultosa su ordenación, un sistema útil de clasificación puede basarse en agrupaciones según función celular como se resume en la TABLA 3 siguiente.

Algunas de estas moléculas ejercen funciones distintas.

Así por ejemplo, las moléculas de membrana implicadas en la adherencia leucocitaria (LFA-1, CR3, CR4) son esenciales en el proceso de fagocitosis.

En el caso del CR3, su unión con C3bi lleva a la endo-

TABLA 3

---

ANTIGENOS DE SUPERFICIE PRESENTES EN MACROFAGOS ALVEOLARES

---

- \* En relación con la adherencia leucocitaria (integrinas):
  - Receptores para componentes del sistema del complemento (LFA-1, CR3, CR4) [73,74]
  - Otros
- \* En relación con la quimiotaxis
- \* En relación con la fagocitosis:
  - Receptor para la fracción Fc de Igs.
  - " para componentes del sistema del complemento:
    - .LFA-1 (leucocyte function antigen-1) (CD11a/CD18).
    - .CR3 (receptores para el C3bi) (CD11b/CD18) [73]
    - .CR4 (receptores para el C3bi) (CD11c/CD18) [74]
- \* En relación con la presentación antigénica:
  - Ags. de histocompatibilidad de clase II [75-79]
- \* En relación con la actividad macrofágica:
  - Receptor para gamma-interferón
  - " " transferrina (CD71)
  - " " IL-2 (CD25)
- \* Sin clara relación con una función determinada:
  - CD14
  - CD4
  - Otros

=====

citosis del complejo formado e induce modificaciones en el metabolismo celular (incremento de la capacidad para liberar radicales libres de oxígeno, aumento en la expresión de moléculas de clase II y disminución de la fagocitosis mediada por CR3). Su expresión y afinidad puede guardar relación con el estadio madurativo ya que se ha comprobado menor expresión en el MAC alveolar que en el monocito sanguíneo (73, 74).

La expresión de CR4 (CD11c/CD18), molécula que actúa también como receptor para el C3bi, se ha observado que es mayor en MAC hísticos que en monocitos de sangre periférica (MSP)(75,76), lo que sugiere una compartimentalización de la expresión de moléculas encargadas de la fagocitosis y adherencia según distintas fases de maduración.

En humanos, los MAC presentan, además, receptores de unión en su superficie para IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> ( subclases conocidas de IgG que fijan complemento ) esenciales en el proceso de opsonización . Un pequeño porcentaje de éstos presentan también receptores para la IgE e IgA.

Los MAC alveolares expresan en porcentaje muy variable Ags HLA-DR (Ia) (71,77-80). Tal expresión es importante para la interacción entre estas células y los linfocitos T (LT), especialmente durante la presentación antigénica. Su función

primordial es actuar como elementos de restricción para los LT helper.

Estos Ags son expresados también por las células B y células T activadas y en mayor nivel por otras células presentadoras de Ag (células dendríticas y de Langerhans).

La expresión HLA-DR en situación basal es transitoria, ocurre cuando los fagocitos inmaduros dejan de proliferar y comienzan a madurar. En los macrófagos en situación ya estable, tal expresión se hace negativa y con ello se pierde buena parte de la capacidad de presentación antigénica a otras células (88).

En distintas neumopatías se han descrito variaciones en la expresión de estos Ags pero con datos muy discordantes (81-87) probablemente por ser muy diferentes los inmunomoduladores que regulan su expresión tanto en sentido positivo como negativo.

Los MAC poseen además receptores para la transferrina (CD71), glicoproteína que está presente en el fluido del LBA e implicada en la captación/liberación del Fe por los MAC en el pulmón inflamado crónicamente (68). Es un factor de crecimiento celular necesario, como se ha demostrado en cultivo de tejidos, donde las células en proliferación expresan receptores para transferrina (RTr) y hay correlación entre la densidad de RTr y crecimiento celular. Además

es esencial en el metabolismo celular (89,90).

Una función adicional que se ha asignado a RTr es el de estructura de reconocimiento por las células NK (natural Killer) (91). Estas células constituyen una subpoblación linfoide con capacidad para eliminar células tumorales, células infectadas por virus o células hematopoyéticas. Es posible que su identificación se base en la gran densidad de RTr en su membrana.

La expresión de receptores para IL-2 (CD25) no es exclusiva de la población de LT activados como se ha comprobado en recientes estudios. Aunque no esten presentes basalmente en la membrana del MAC, es posible inducir su aparición tratando estas células con linfoquinas (92).

Otra de las moléculas, CD14 (uno de los marcadores más específicos de la serie mononuclear fagocítica que se expresa más intensamente en monocitos), no es conocida funcionalmente en su totalidad (79,80,93)

El Ag CD4 (receptor para el VIH) no se expresa sólo en LT helper sino en MAC alveolares que actúan como reservorio y vía de propagación del virus a otras células que expresen este Ag (32,94).

### 3.4.- Interacciones entre poblaciones celulares

Como se ha comentado anteriormente, la región alveolar está sometida a la inhalación continua de inmunógenos y sustancias irritantes capaces de producir daño parenquimatoso, sin embargo, a pesar de esta continua agresión, la inflamación a nivel alveolar es rara. Debe existir, por lo tanto, un mecanismo que regule la respuesta inmune celular a este nivel.

En este apartado intentaré resumir algunos aspectos de la inmunidad mediada por células y la regulación de la respuesta inmunitaria que considero esenciales para la comprensión de los resultados obtenidos mediante esta técnica.

#### 3.4.1.-Inmunidad mediada por células

Hay un hecho clave : un mismo tipo de células, los linfocitos T, realizan varias funciones distintas. Existen por un lado células T efectoras (CD8+) de dos tipos:

a) Células T citotóxicas que lisan células que poseen un Ag determinado en su membrana . En respuesta al Ag liberan linfoquinas (IL-2) (CD28+). Son células que reconocen el Ag en asociación con moléculas de clase I.

b) Otras células no reconocen Ag ni liberan IL-2 (CD11b+).

Por otro lado, existen células T reguladoras (CD4+) de dos tipos:

a) Cooperadoras (CD<sub>w</sub>29+) que influyen positivamente sobre la función de las células T efectoras y las células B.

b) Supresoras/citotóxicas, que controlan el funcionamiento de las células CD8+ (CD45R+) y que son inductoras de supresión.

Algunas de estas células CD4+ expresan marcadores propios de células agresoras naturales (NK), producen IL-2 y no proliferan en respuesta a mitógenos y Ags (102).

El Ag es presentado a las células T cooperadoras y a las células B por las células presentadoras de Ag (CPA). Las células cooperadoras ayudan a las células B para producir Ac y las células T supresoras son estimuladas también por el Ag y regulan tanto a las células B como a las células T cooperadoras.

Hay además una regulación no específica de Ag basada en la acción de mediadores tales como la interleuquina-1 (IL-1) y la interleuquina-2 (IL-2), ésta última con efecto inespecífico amplificador de proliferación de células T (cooperadoras o citotóxicas) ya activadas previamente de forma selectiva por el Ag.

**\* Reconocimiento del Ag por las células T**

Las células T cooperadoras y citotóxicas no se unen al Ag libre, sino que parece ser reconocido sólo cuando está asociado con productos del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) expresados en la membrana celular (88).

No todas las células T utilizan los mismos productos del MHC. Las células citotóxicas reconocen el Ag asociado con productos de clase I presentes en todas las células de todos los tejidos, mientras que las células colaboradoras lo reconocen asociado a moléculas de clase II expresadas en las CPA y en algunos linfocitos (103).

Los receptores a nivel de membrana linfocitaria de estas moléculas de clase I y II son unas glucoproteínas de 76 kilodaltons (T8) y 62 KD (T4) respectivamente. Su identificación mediante AcMo específicos permite definir dos subpoblaciones de linfocitos T diferentes funcionalmente, las células T4<sup>+</sup> (helper-cooperadoras) y células T8<sup>+</sup> (supresoras-citotóxicas).

Los AcMo frente a CD4 bloquean la activación de células T con restricción de clase II, mientras que los anti-CD8 bloquean la destrucción por parte de las células con restricción de clase I aunque no afecta a la proliferación celular inducida mediante Ag o IL-2. Esta correlación ha llevado a sugerir que CD4 y CD8 son los receptores para las moléculas de clase II y I respectivamente.



Las células T maduras poseen , además, una proteína de 20 KD (T3) asociada con el receptor para el Ag en las células T (TCR), que constituye el marcador definitivo de las células T. La unión con el AcMo anti-CD3 conlleva un bloqueo de las funciones que requieren estimulación celular por Ag (citotoxicidad y proliferación celular).

#### **\* Células presentadoras de antígeno**

El reconocimiento del Ag por las células T cooperadoras requiere que éste sea presentado junto con moléculas del MHC por parte de las CPA. Previamente al reconocimiento por parte del receptor antigénico de células T, las CPA degradan parcialmente el Ag antes de la asociación a moléculas de clase II.

A nivel pulmonar esta función es realizada por algunos monocitos/MAC, células dendríticas y células de Langerhans.

Los monocitos/MAC, como ya ha sido señalado, presentan receptores para inmunoglobulinas y fragmentos del complemento, expresan glucoproteínas de clase II (HLA-DR) y pueden actuar como CPA para las células T y B.

La mayor parte de los estudios indican que la expresión de moléculas HLA-DR (Ia) en estas células se encuentra bajo regulación (88,102).

A nivel tisular, la expresión basal ocurre cuando la

célula deja de proliferar e inicia su maduración, por lo tanto esta expresión es transitoria y no se muestra en la célula macrofágica estable (88).

Las células dendríticas y de Langerhans pertenecen al sistema mononuclear fagocítico. Son células accesorias con un importante papel en la iniciación de reacciones inmunes en el pulmón. Al igual que los MAC, tienen receptores Fc y C3 y en su membrana presentan Ags de clase II. Aunque su número es escaso en el pulmón normal, en la inflamación crónica del pulmón asociada a tabaquismo y en enfermedades granulomatosas como la histiocitosis X hay una marcada acumulación en el tracto respiratorio inferior.

#### **\* Activación de células T por CPA**

La iniciación de la proliferación de las células T implica no sólo el reconocimiento del Ag y determinantes del MHC sino también de mediadores liberados por las CPA; uno de éstos, la IL-1, junto con la estimulación del propio Ag, es capaz de inducir la aparición de receptores para la IL-2 en la superficie del linfocito T y estimular a estas células para la liberación de IL-2, cuyo efecto es promover la proliferación de células T específicas de Ag. Otros cambios son un incremento del número de receptores para IL-1 y la adquisición de Ags HLA clase II en la superficie del linfocito.

**\* Citotoxicidad mediada por células**

Ciertas subpoblaciones de células linfoides pueden unirse a células diana y lizarlas. En unos casos esta función es realizada por células T citotóxicas, frecuentemente T8+ y con función restringida por el MHC de clase I.

Otra población celular con misión semejante es la de células agresoras naturales (NK). Constituyen un grupo heterogéneo de células, pero la mayor parte de ellas son linfocitos granulares grandes. El fenotipo de superficie, ampliamente estudiado mediante citometría de flujo (96,97), también es heterogéneo. Pueden expresar Ags HLA-DR, receptores para Fc de inmunoglobulinas, C3 del complemento, IL-2, gamma-IFN y comparte el receptor T8 con la subpoblación de LT supresores.

La mayoría de estas células tras una breve incubación con estimulantes incrementan la expresión de CD11b y CD11c (integrinas que constituyen un marcador de monocitos/MAC y PMN), Ags implicados en funciones esenciales como adhesión, fagocitosis e interacción entre células) (104).

No ha sido aún definida aún la/s estructura/s que reconocen las células NK, aunque no parece tratarse de Ags de superficie celular bien definidos. En estudios recientes se valora la importancia del receptor para la transferrina,

presente en todas las células en división (91), aunque probablemente intervengan otras estructuras.

A nivel pulmonar, en el sujeto normal, el porcentaje de células en el fluido de LBA con morfología linfocitaria que expresan Ags propios de células NK es escaso en relación con el porcentaje de células T3+, no obstante se incrementa ostensiblemente en patologías tales como infección por VIH (29-31) y en la neumonitis por hipersensibilidad (100).

No se ha comprobado aún una clara correlación entre función inmune e inmunofenotipo en esta población celular (102).

#### \* Papel de los MAC en la inmunidad celular

Los MAC desempeñan un papel central en la inmunidad mediada por células al ser capaces de iniciar una respuesta como CPA y de efectuarla como células inflamatorias, tumoricidas o microbicidas, además de ser responsables del daño hístico y participar en el proceso reparativo de tejidos.

Tras ser presentado el Ag a las células T, éstas liberan linfoquinas que actúan sobre los MAC e inducen su activación, la cual no es Ag-específica.

A nivel pulmonar, en el fluido de revestimiento epitelial, la población monocito/MAC constituye la inmensa

mayoría de las células en el estado normal. La activación de esta población es un hecho complejo que aún está en vía de estudio.

Hay dos hechos que explican dicha complejidad: por un lado , la heterogeneidad de esta población en cuanto a estado madurativo y exposición de Ags en su superficie (77-80) y por otro lado, la gran diversidad de estímulos (inflamatorios y/o linfoquinas) a los cuales está expuesta.

A nivel tisular, cuando el material antigénico no puede ser degradado, las células T se acumulan y liberan linfoquinas. Esto conduce a la proliferación y activación de MAC, con el aspecto de una masa nodular (granuloma) constituido esencialmente de células gigantes multinucleadas, células epitelioides y MAC activados. El estudio del fenotipo de LT presentes en el foco granulomatoso indica que los linfocitos T4<sup>+</sup> (helper) están localizados en el centro y alrededor de la lesión , mientras que las T8<sup>+</sup> (supresoras/citotóxicas) están distribuidas en anillos discontinuos alrededor del granuloma. Esta distribución es típica de los granulomas tuberculosos y sarcoideos (105).

### 3.3.2.- Linfocitos (LINFC)

Son vistos infrecuentemente en los estudios de tejido pulmonar normal (95) y en las muestras de fluido de LBA de sujetos no fumadores representan menos del 15% de las células obtenidas (7,10,49,50,57-62).

Probablemente el LBA tan sólo muestrea la población de LINFC que residen a nivel alveolar. Otra población se encuentra a nivel del tejido linfoide asociado a bronquios y otra en intersticio. Es posible que ésta última guarde un equilibrio con la existente a nivel alveolar (17).

Los LINFC obtenidos mediante LBA tienen actividades diversas, incluyendo tanto síntesis de Igs, secreción de linfoquinas, citotoxicidad, función NK y expresión de moléculas implicadas en activación /interacción celular.

La tinción de Wright Giemsa es una técnica simple, reproducible y barata para caracterizar las distintas poblaciones celulares en el fluido del LBA. Los grandes LINFC activados pueden semejar pequeños macrófagos como sucede en procesos inflamatorios como sarcoidosis. Esta dificultad de identificación puede minimizarse cuando se aplican criterios morfológicos estrictos.

Los LINFEC pequeños se caracterizan por presentar un núcleo redondo y denso con cromatina condensada y situación céntrica dentro del citoplasma. Los grandes linfocitos suelen presentar núcleos excéntricos de morfología variable, redondo o lobulado y la cromatina es menos densa que los anteriores. El citoplasma es aparentemente transparente, aunque puede contener granulaciones.

La tecnología de hibridomas para obtención de AcMo reconocedores de marcadores de membrana, junto con las técnicas de fluorescencia y últimamente la citometría de flujo (96,97), están revolucionando los estudios sobre actividad funcional de las poblaciones de células linfoides recuperadas en el fluido del LBA y han ampliado la utilidad del LBA en el diagnóstico.

Los AcMo reaccionan específicamente con determinados Ags existentes en la membrana celular. Actualmente se emplean dos tipos de técnicas para visualizar o identificar esta reacción Ag/AcMo:

\* Inmunofluorescencia (IF)

El método habitual es la tinción y estudio de células en suspensión. Las células son incubadas, o bien con AcMo marcado con un fluorocromo (IF directa) o con un AcMo no marcado al que se fija, en segunda incubación, Ac anti-Ig

marcado con fluorocromo frente al primero (IF indirecta).

En muchos laboratorios se estudia esta reacción mediante microscopio de fluorescencia , sin embargo , una de las ventajas de la técnica de IF es la posibilidad de incorporar el estudio automatizado de las células mediante citometría de flujo (96,97). Esta técnica permite el análisis y correlación de múltiples parámetros de un gran número de células en suspensión, incluyendo tamaño, granularidad, identificación de fenotipo inmune , cuantificación de expresión de Ags y separación de distintas subpoblaciones.

Otras posibilidades incluyen el estudio de estado de activación y/o diferenciación celular.

El estudio de muestras mediante IF , sobre todo si se emplea citometría de flujo, es una técnica muy rápida, sin embargo, los inconvenientes son claros, la preparación no se puede mantener mucho tiempo y por supuesto no permite observar detalles morfológicos. El estudio mediante microscopio de fluorescencia es una técnica mucho mas lenta, no obstante permite estudiar simultaneamente morfología celular.

Los pasos secuenciales de esta técnica serán descritos más detalladamente en la sección de MATERIAL Y METODO de este trabajo.



\* Inmunocitoquímica.

De estas técnicas , las más sensibles son las técnicas de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) y fosfatasa alcalina-anti fosfatasa alcalina (FAAFA), donde un inmunocomplejo de inmunoenzima se une al AcMo primario mediante otro Ac que actua como puente. Esta reacción se visualiza mediante microscopía óptica convencional y permite visualizar la morfología celular y estudiar simultáneamente dos poblaciones linfocitarias y macrófagos en la misma preparación, con lo cual se requiere menor número de células.

La técnica es mucho más laboriosa que la de IF, sin embargo, la sensibilidad es mayor y las muestras obtenidas pueden ser conservadas para estudios posteriores. Ambas han mostrado una excelente correlación al comparar sus resultados (98). Al igual que las técnicas de IF, las técnicas de inunocitoquímica han sido aplicadas fundamentalmente en el estudio de subpoblaciones linfocitarias.

La función linfocitaria puede ser determinada estudiando los Ags de diferenciación expresados en la superficie celular. Estos Ags de superficie estan categorizados según una nomenclatura internacional basada en "clusters de diferenciación" (CD) (93).

Los fenotipos funcionales incluyen , entre otros, todas las células T maduras, células T helper/inducer, células T



supresoras/citotóxicas , células B y células NK.

Las subpoblaciones de LINF C han sido bien definidas en sangre y su estudio ha demostrado ser útil, sobre todo, en el manejo de la patología ligada a la infección por el VIH (97).

Las mismas técnicas han sido aplicadas al estudio de las subpoblaciones linfocitarias en el fluido del LBA con la intención de conocer los mecanismos que operan en el reclutamiento de estas células al pulmón y su papel en la patogénesis de enfermedades como sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, rechazo de injerto o fibrosis pulmonar idiopática, sin embargo, la utilidad diagnóstica de estos hallazgos está aún por determinar.

Por de pronto, los estudios realizados en sujetos sanos no fumadores muestran resultados dispares sobre distribución porcentual de las distintas subpoblaciones, quizás por ser diferente el número y tipo de pacientes estudiados así como el método de estudio empleado. Algunos de estos estudios se muestran en la TABLA 4 siguiente.

El porcentaje medio de linfocitos en estos estudio osciló entre el 7% y 16%, de los cuales, 59% a 73% eran células T y de éstas, 39%-54% son CD4+ y 20%-33% son CD8+.

El cociente CD4/CD8 osciló entre 1.8 y 2.7.

El porcentaje de linfocitos B osciló entre <1% y 3.3% en los dos únicos trabajos que lo refieren entre los mostrados en la tabla adjunta.

TABLA 4  
FENOTIPOS LINFOCITARIOS EN EL LBA DE SUJETOS SANOS NO FUMADORES

Autores	Ref. Año	Método	n	Linf	LT tot.(%) CD3+	T-helper(%) CD4+	T-supres.(%) CD8+	CD4/CD8	LB(x)
Hunninghake (99)	1981	Mfl	6	7.0	73.0	46.0	25.0	1.8	NR
Leatherman (149)	1984	Mfl	8	16.0	61.0	39.0	24.0	1.8	NR
Costabel (59)	1986	MPAP	11	7.0	72.4	54.1	33.0	1.9	<1
Semenzato (62)	1986	Mfl	12	7.5	67.3	43.2	22.1	2.0	NR
Wallaert (61)	1987	Mfl	12	7.7	66.4	48.4	27.5	1.8	NR
Semenzato (100)	1988	Mfl	10	7.8	NR	NR	NR	2.0	NR
Saltini (101)	1989	Cit.fl	5	16.0	59.0	39.0	21.0	1.8	NR
NHLBI (49)	1990	Cit.fl	56	11.7	72.1	45.6	20.7	2.7	3.3

Definición de abreviaturas: Mfl=microscopio de fluorescencia; MPAP=microscopia convencional y técnica de peroxidasa antiperoxidasa; Cit.fl=citometría de flujo; n= número de pacientes; LT tot(%)=Linfocitos T totales; CD4/CD8 =índice CD4/CD8; LB= linfocitos B .Las subpoblaciones linfocitarias se expresan como porcentajes de linfocitos totales.

En pacientes fumadores es posible que haya un trastorno de la inmunoregulación celular a nivel pulmonar ya que se ha comprobado un descenso del porcentaje de linfocitos CD4+ helper/inductores y un incremento de linfocitos CD8+ supresor/citotóxicos con un marcado descenso del índice CD4/CD8 comparativamente con los no fumadores (59). En este sentido, es posible que el tabaco, además, modifique el curso subclínico de algunas enfermedades intersticiales al deprimirse la función de los linfocitos CD4, esenciales en la respuesta

inmune celular.

### 3.3.3.- Granulocitos polimorfonucleares (PMN)

Representan el 60-70% de los leucocitos intravasculares, pero sólo unos pocos son observados en alvéolos, como ha sido demostrado en estudios de tejido pulmonar. En el fluido del LBA de un sujeto no fumador menos del 2% de las células totales son PMN (7,10,49,50,57-62).

No obstante el lecho capilar de los vasos pulmonares contiene un gran reservorio de PMN, algunos en íntimo contacto con las células endoteliales. La adherencia al endotelio es, probablemente, el paso inicial en la migración de los PMN al alvéolo.

El MAC alveolar juega un papel fundamental en este proceso de migración mediante la liberación de factores promotores e inhibidores de la quimiotaxis. Mediante estos productos secretorios los MAC contribuyen a la modulación de la alveolitis (16).

Aunque los PMN no muestran ninguna especificidad de Ag, desempeñan un papel importante en la inflamación aguda y en la protección frente a microorganismos.

Por otra parte, los PMN han sido implicados en el daño pulmonar, a través de la liberación de radicales oxígeno, proteasas neutras y enzimas lisosomales.

#### 4.- FACTORES LIMITANTES EN LA ESTANDARIZACION E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Aunque el LBA fue introducido como técnica en la investigación de los mecanismos inmunes e inflamatorios en el tracto respiratorio inferior, en los últimos años se está evaluando la utilidad de los datos que aporta en el diagnóstico de las distintas neumopatías intersticiales y hay una tendencia a incluirlo de forma progresiva junto a las técnicas de biopsia. No obstante, hasta llegar a este punto han sido planteadas y resueltas algunas cuestiones básicas, aunque aún quedan otros problemas importantes por solucionar:

##### 4.1.- Correlación entre celularidad del LBA e histología

Recientemente se ha demostrado que volúmenes de líquido instilado de al menos 100-120 mls perfunden de forma efectiva la vía aérea distal y luz alveolar (106). No obstante, el mayor problema que se planteó inicialmente y que aún se discute, es si la celularidad del LBA refleja los cambios histológicos acaecidos en el pulmón, sobre todo la acumulación de células inflamatorias en las estructuras alveolares.

Son pocos los estudios en los que se realice un análi-

sis comparativo entre la celularidad en el fluido del LBA y la existente en las muestras de biopsia pulmonar.

Davis y cols (1978) (95) compararon el porcentaje de células linfocitarias en el espacio alveolar con el existente a nivel intersticial en muestras de biopsia de 28 pacientes con una variedad de enfermedades intersticiales y en 7 sujetos normales. Aunque encontraron un intenso infiltrado intersticial a base de células mononucleadas en muchas de las muestras, no existía una correlación directa con el porcentaje de LINFEC del espacio aéreo en casos individuales.

En los 7 sujetos normales se encontraron relativamente pocas células libres en los espacios aéreos, en su mayoría MAC alveolares (media 96%) y LINFEC.

Estos autores no realizaron LBA previo a la biopsia.

Haslam y cols (1980) (63) realizaron estudios de correlación entre celularidad en el LBA, muestras de biopsia pulmonar y células obtenidas tras fragmentación y tratamiento de las muestras de biopsia en 21 pacientes con fibrosis pulmonar.

No encontraron una correlación entre recuentos celulares observados en los espacios alveolares o a nivel de pared alveolar y número de células totales o su distribución porcentual observada mediante LBA o técnicas de extracción. Si que comprobaron una correspondencia entre los recuentos ce-

lulares diferenciales en el LBA y los observados con técnicas de extracción, lo que sugiere que el LBA refleja la celularidad de la parte más distal del pulmón.

Hunninghake y cols (1981) (35) encontraron una buena correlación entre la celularidad del LBA y la extraída de piezas de biopsia pulmonar de 9 pacientes con fibrosis pulmonar, 6 con sarcoidosis y 3 de pulmón normal.

Semenzato y cols (1985) (107) compararon las células recuperadas mediante LBA con las observadas en las muestras de biopsia pulmonar transbronquial en 26 pacientes con sarcoidosis y 7 con neumonitis por hipersensibilidad.

Concluyen que el fluido obtenido mediante LBA en estas enfermedades es representativo del grado de alveolitis.

En la actualidad se conoce gran parte de los mecanismos inmunológicos que regulan la afluencia de células desde el compartimento intersticial al espacio alveolar, sin embargo, falta aún una razón que justifique la amplia diversidad de los recuentos celulares en el fluido del LBA en una misma población de pacientes. Esta es una de las mayores limitaciones del uso del LBA en el diagnóstico de las neumopatías intersticiales.

#### 4.2.- Dificultad para determinar concentración celular y de material soluble en el fluido de LBA

La base sobre la que se fundamenta la técnica del LBA, como ya se ha comentado anteriormente, es la posibilidad de arrastrar componentes celulares y moleculares existentes en el fluido de revestimiento epitelial (FRE) que tapiza la luz alveolar.

El fluido recuperado mediante LBA es una mezcla de solución salina instilada y FRE en proporciones difíciles de estimar debido a la gran dilución de éste último; esto limita la determinación de la concentración real de estos componentes y por tanto, la exacta interpretación de los resultados.

Se ha tratado de obviar este problema mediante la utilización de distintos marcadores, uno de ellos exógeno como el azul de metileno y otros endógenos como la albúmina (7,9-11,41,50,56) y más recientemente la urea (55). Dado que estos dos últimos marcadores se encuentran en plasma en concentración conocida y difunden libremente hacia la luz alveolar, pueden servir como elementos de referencia para el cálculo de volumen y concentración de componentes solubles y celulares en el FRE.



La utilización de la albúmina ha permitido la determinación de muchos componentes en el FRE de pulmones normales, sin embargo, en los procesos que cursan con alveolitis y aumento de permeabilidad vascular puede existir un incremento de esta proteína con lo cual se infraestiman otros componentes.

La urea también difunde libremente hacia la luz alveolar con lo cual el volumen de FRE puede ser medido por ecuaciones de dilución (55). Usando este procedimiento se ha estimado que el FRE recuperado de un sujeto normal no fumador es  $1.0 \pm 0.1$  ml/100 ml de volumen recuperado y la densidad de células inflamatorias en la superficie epitelial del tracto inflamatorio inferior es de  $21000 \pm 3000$  cél/ $\mu$ l, un valor que es aproximadamente el doble de la existente en sangre periférica. No obstante, este método también tiene limitaciones ya que se ha comprobado que el contenido de urea y otros componentes del FRE aumenta a medida que se alarga el tiempo de permanencia del líquido instilado antes de ser recuperado, con lo cual, los valores resultantes constituyen probablemente una sobreestimación de dicho volumen (55).

La imposibilidad de realizar, por ahora, una valoración directa de estos componentes, supone otra limitación importante en la estandarización del procedimiento.

#### 4.3.- Influencia de la celularidad de la vía aérea proximal en los recuentos celulares diferenciales

Se ha estimado que con la instilación de 100 mls de suero fisiológico en un bronquio segmentario se obtiene una muestra celular que corresponde a la superficie de unos  $10^6$  alvéolos (108) y que la superficie de la vía aérea lavada representa menos del 5% de la superficie total lavada. Resulta pues tentativo suponer que la celularidad residente en vía aérea contribuye mínimamente al recuento de células totales obtenidas.

Varios autores han descrito alteraciones en muestras de LBA de pacientes con varias enfermedades de vía aérea, incluyendo las causadas por tabaquismo, asma y bronquiolitis obliterante. Sin embargo, dado que el material procedente de la superficie alveolar representa la mayoría del recuperado mediante LBA, es difícil detectar cambios sutiles causados por enfermedad de la vía aérea.

Tan sólo en los últimos años se han diseñado algunos estudios dirigidos al estudio de las primeras alíquotas obtenidas, que rutinariamente se tipifican como "muestra bronquial", y la repercusión de éstas sobre los recuentos celulares diferenciales.

Robinson y cols (1988) (109) estudiaron secuencialmente las alíquotas recuperadas durante el LBA en 23 pacientes con diversas enfermedades intersticiales difusas.

Según los datos de este estudio, la acumulación de PMN no se restringe al alvéolo , ya que se evidencian también en la vía aérea en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y secundaria a artritis reumatoide. En pacientes con sarcoidosis, sin embargo, la proporción de LINFEC en vía aérea es mucho menor que la existente a nivel alveolar.

Rennard y cols (1990) (110) aplicaron en 127 pacientes con una diversidad de procesos un protocolo de lavado secuencial mediante instilación de 5 alíquotas de 20 ml en cada uno de tres bronquios segmentarios de diferentes lóbulos, l.medio, l.ingula y lóbulo inferior. El volumen de las tres primeras alíquotas recuperadas, denominada muestra bronquial, tenía una composición claramente diferente del resto de las alíquotas, con mayor número de células epiteliales ciliadas , mayor porcentaje de NEUTR y menor porcentaje de LINFEC.

La influencia de la celularidad de la muestra bronquial sobre la alveolar puede minimizarse eliminando la primera alíquota recuperada o procesándola separadamente. No obstante, en los procesos que cursan con inflamación intensa del

compartimento bronquial puede haber un inevitable "enriquecimiento" alveolar con material bronquial difícil de cuantificar (109-111,112).

#### 4.4.- Homogeneidad de recuentos celulares diferenciales en patología intersticial difusa

Aunque la enfermedad intersticial pulmonar típicamente produce una afectación difusa y bilateral, es posible encontrar en la radiografía de torax, gammagrafía con galio y biopsia pulmonar una falta de homogeneidad en la afectación pulmonar.

En la mayor parte de los estudios de patología intersticial se realiza LBA en un sólo lóbulo asumiendo que los hallazgos en éste son representativos del resto del pulmón.

García y cols (1986) (113) diseñaron un estudio de correlación de recuentos celulares diferenciales en 53 LBA bilobares realizados en 20 pacientes con sarcoidosis, 9 con fibrosis pulmonar idiopática o asociada a enfermedad del tejido conectivo y 5 con diversas enfermedades intersticiales difusas (silicosis, neumonitis por hipersensibilidad, neumonitis inducida por drogas). Según los datos aportados, el grupo de pacientes con sarcoidosis mostró una excelente correlación interlobar ya que sólo el 17% de los pacientes di-

ferían en los recuentos >10% en el porcentaje de LINF.C.

En el grupo de pacientes con fibrosis pulmonar con neutrofilia predominante en el LBA, había una buena correlación interlobar, aunque el 35% tenía una diferencia interlobar >10%.

En el resto de enfermedades intersticiales había peor correlación interlobar. Las diferencias encontradas en determinados pacientes no se explicaron ni por cambios en el volumen instilado o recuperado, número total de células recuperadas o historia de tabaquismo. La radiografía de torax, además, fué insensible a estas variaciones.

Peterson y cols (1988)(115) realizaron 82 LBA bilaterales en 64 pacientes con sarcoidosis en distintos estadios radiológicos y encontraron también una buena correlación entre ambos lados en los recuentos celulares diferenciales, aunque en algunos de los pacientes había diferencias significativas.

En definitiva, cuando se valore la utilidad de los recuentos celulares diferenciales en el diagnóstico, pronóstico o evaluación de necesidad terapéutica en patología intersticial pulmonar, debe tenerse en cuenta la falta de homogeneidad interlobar, sobre todo en los casos que no son sarcoidosis.

Por otra parte, la variabilidad interlobar de los recuentos diferenciales en patología intersticial pulmonar, no parece atribuible a determinados cambios en la técnica de realización, por ejemplo, en el volumen de líquido instilado. Este parámetro modifica de forma directamente proporcional la cantidad de células totales recuperadas mediante LBA en un mismo paciente, sin embargo, no influye significativamente ni en los recuentos diferenciales ni en la determinación de concentración celular ( $n^{\circ}$ cél/ml fluido recuperado). (115).

#### 4.5.- Variabilidad y reproductibilidad de recuentos celulares en sujetos normales

Otra de las grandes limitaciones del empleo del LBA en el diagnóstico clínico es la gran variabilidad de resultados atribuible a varios factores. Aunque algunos de éstos ya han sido analizados en diversos trabajos, otros como variabilidad y reproductibilidad de los recuentos celulares en sujetos normales no han sido suficientemente evaluados.

Ettenhson y cols (1988) (58) analizaron los resultados del LBA de 78 sujetos voluntarios sanos no fumadores de edad homogénea (20-36 años). A pesar de la uniformidad en la aplicación del protocolo de LBA, se observó una variabili-



dad considerable tanto en el porcentaje de líquido recuperado como en el número total de células, sin embargo, había cierta constancia en los recuentos celulares diferenciales.

Estos mismos autores estudian la reproductibilidad de los hallazgos del LBA en 16 sujetos normales (116). En cada paciente, el porcentaje recuperado fue similar en ambos procedimientos, pero había gran variabilidad en el número de células obtenidas comparando tanto los LBA en un mismo sujeto como entre sujetos. El recuento celular diferencial fué el parámetro más constante de lavado a lavado, sin embargo, un pequeño porcentaje de estos pacientes sanos tenían elevaciones "anormales" de algún tipo de célula (LINF o NEUTR) no atribuibles a una causa clara.

#### 4.6.- Falta de homogeneidad en la aplicación de criterios de adecuación de muestras para estudio

La muestra ideal para estudio es aquella que contiene células mayoritariamente procedentes del espacio alveolar y en mucha menor cantidad del tracto respiratorio inferior hasta bronquiolo terminal. Dado que no es posible determinar el grado de "contaminación" con células de origen bronquial, es necesario establecer criterios aplicables al proceso de selección de muestras (117,118). La no aplicación de éstos puede originar gran variabilidad de resultados no atribui-

bles al proceso patológico y dificultar la comparación de resultados entre series.

#### 4.7.- Variabilidad de resultados dependiente del procesamiento y análisis de muestras

Pequeños cambios o modificaciones en la realización de la técnica, procesamiento o análisis de muestras inducen grandes variaciones en los resultados obtenidos (64-66), por lo cual es necesario ajustarse a un protocolo de realización que contemple todos estos aspectos.

Así pues, los resultados han de ser valorados teniendo en cuenta las posibles variaciones inducidas por el método.

#### 4.8.- Complejidad del estudio inmunológico

El estudio inmunológico de las muestras obtenidas por este procedimiento es muy complejo, no obstante, es esencial para obtener información sobre función inmune e inflamatoria de las células a nivel del pulmón profundo.

Los factores que dificultan este tipo de análisis son varios:



**1°) Gran diversidad de Ags de diferenciación leucocitaria**

Tras el IV Taller de Trabajo Internacional sobre Ags de Diferenciación de Leucocitos Humanos (Viena, 1989), quedaron establecidos 78 "clusters" de diferenciación (CD) o Grupos de Diferenciación Antigénicos y se ha estudiado la especificidad celular e histórica de unos mil AcMo (93).

2°) En el caso de algunos AcMo es desconocida la significación funcional y/o especificidad de reacción con un determinado CD, lo que dificulta la interpretación de resultados.

3°) Falta por estandarizar el método de estudio inmunológico de muestras obtenidas mediante LBA, lo que impide la comparación de resultados entre laboratorios. Las técnicas existentes en la actualidad (inmunofluorescencia con evaluación mediante microscopio de fluorescencia o citometría de flujo y las técnicas de inmunocitoquímica) tienen cada una de ellas ventajas e inconvenientes en el estudio de cada una de las poblaciones celulares y las indicaciones de cada una están aún por determinar.

4°) No existe aún ningún patrón específico de normalidad aplicable al diagnóstico de las distintas neumopatías.



## OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El LBA ha extendido ampliamente las posibilidades de la BF de desarrollo habitual al aportar importantes datos acerca de los mecanismos patogénicos de un amplio abanico de enfermedades pulmonares intersticiales.

Aunque en esencia la técnica de obtención de muestras es simple, la selección de éstas, el procesamiento y posterior análisis citológico e inmunológico requieren el diseño y aplicación estricta de un protocolo que contemple todos estos aspectos y que se adapte a las necesidades particulares del proyecto de trabajo.

El estudio de distribución celular porcentual, particularmente de macrófagos alveolares, linfocitos y polimorfonucleares ha mostrado la existencia de distintos perfiles celulares sobre todo en sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis pulmonar y en la afectación pulmonar asociada a infección por el VIH.

Estos perfiles celulares pueden ayudar al diagnóstico de una enfermedad pulmonar intersticial en pacientes en los cuales no es posible la confirmación histológica mediante técnicas de biopsia y pueden reorientar al clínico hacia distintas posibilidades diagnósticas o influir en la decisión sobre empleo de otras técnicas complementarias.

El estudio de la serie linfoide y sus subpoblaciones ha sido esencial para establecer modelos de respuesta inmunológica en determinados procesos patológicos pulmonares como granulomatosis, fibrosis y patología pulmonar en la inmunodeficiencia asociada al VIH. Algunos de estos modelos de respuesta, como los descritos en sarcoidosis o neumonitis por hipersensibilidad tienen un reconocido valor predictivo diagnóstico en un contexto clínico determinado cuando el estudio de tejido no es concluyente.

Una información complementaria al derivado del estudio de las subpoblaciones linfocitarias puede obtenerse del estudio de otras poblaciones celulares como la de macrófagos alveolares. Estas células, aún siendo las más numerosas en la gran mayoría de las enfermedades intersticiales, no han sido estudiadas en toda su complejidad hasta fecha relativamente reciente y los últimos estudios les asignan un papel central como inmunoreguladores, tanto en las enfermedades granulomatosas como fibróticas. Su disfunción es también clave en la etiopatogenia de las complicaciones pulmonares asociadas a inmunodeficiencia celular por el VIH.

Por el momento, el estudio de inmunofenotipo en las células obtenidas mediante LBA no está estandarizado como en sangre periférica y falta aún por determinar muchos

aspectos de la expresión /coexpresión de Ag de superficie en células inmunes e inflamatorias de procedencia pulmonar y su modificación en las distintas neumopatías.

Tras analizar estos planteamientos se inició en 1989, en nuestro Servicio de Neumología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, un estudio prospectivo con la finalidad de valorar los hallazgos celulares e inmunológicos en el fluido del LBA en pacientes con neumopatía intersticial difusa de origen no neoplásico.

Con este fin, se diseñó un protocolo de trabajo que establecía la metodología de realización de la técnica de obtención de muestras celulares, procesamiento y estudio citológico e inmunológico de éstas.

Los objetivos genéricos del estudio fueron los siguientes:

- 1.- Optimizar la técnica de LBA en todos sus aspectos (obtención, procesamiento y estudio de muestras) y adecuarla a las necesidades del estudio y disponibilidad de medios.

2.- Evaluar los hallazgos citológicos y la utilidad de determinados "patrones de alveolitis" en el diagnóstico de las distintas neumopatías intersticiales.

3.- Estudiar la expresión de Ags en superficie de células (linfocitos y macrófagos) en los distintos tipos de patología intersticial difusa más frecuentemente encontrados en nuestro medio (granulomatosis, fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial asociada a conectivopatías y patología pulmonar difusa asociada a inmunosupresión por infección VIH). Dentro de este apartado los objetivos concretos fueron:

3.1.- En pacientes con neumopatía intersticial crónica, establecer las posibles diferencias en expresión de determinados Ags de superficie presentes habitualmente en la serie linfoide y línea monocito-macrofágica que puedan resultar útiles para discriminar entre los distintos procesos y por tanto de posible utilidad en el diagnóstico de éstos.

3.2.- En pacientes con infección por VIH y sospecha de neumopatía, determinar las diferencias en expresión de los mismos Ags en relación con la propia infección de base y la evidencia de infecciones oportunistas asociadas.

# MATERIAL y METODOS

## **1.- CRITERIOS DE SELECCION DE PACIENTES Y MUESTRAS**

Desde finales de 1988 hasta inicios de 1992 han sido realizadas 92 BF en pacientes inmunocomprometidos y 73 a pacientes con sospecha de neumopatía intersticial difusa de distintos orígenes.

La inclusión de un determinado paciente en protocolo de estudio de LBA se basó en los siguientes criterios:

### **1.1.- Criterios clínicos de inclusión:**

- A) Pacientes con inmunosupresión asociada a infección por VIH con infiltrado pulmonar de predominio difuso (intersticial o alveolo-intersticial) o con escasos hallazgos radiológicos, a los que se les realizó BF por sospecha de infección oportunista (IO).
  
- B) Pacientes con síntomas, signos, datos radiográficos, exploración funcional respiratoria, datos biológicos y evolución compatibles con neumopatía intersticial difusa:



- \* Enfermedad granulomatosa intersticial ( neumonitis por hipersensibilidad ,sarcoidosis)
- \* Neumonía intersticial idiopática/FPI
- \* Neumonía intersticial asociada a conectivopatía.
- \* Síndrome de hemorragia alveolar difusa asociado o no a enfermedad sistémica.

#### 1.2.- Criterios endoscópicos de exclusión:

Se rechazaron las muestras obtenidas de pacientes en los cuales se evidenció:

- \* Presencia de claros signos inflamatorios en la luz bronquial (enrojecimiento importante y secreción mucosa o mucopurulenta).
- \* Sufusión hemorrágica visible con la aspiración mantenida.

La selección de muestras adecuadas para estudio se realizó según los siguientes criterios:

#### 2.1.- Aspecto macroscópico del fluido recuperado

Fueron excluidas del estudio:

- \* Muestras con aspecto muy hemorrágico ( lo que implica contaminación con sangre periférica).
- \* Aspecto grumoso por excesivo moco en suspensión.

## 2.2.- Aspecto microscópico del fluido obtenido

La selección se basó en los criterios establecidos por Chamberlain y cols (1987) (117).

Así, fueron rechazadas las muestras en las que se evidenció:

- \* Excesivo número de células epiteliales (escamosas o bronquiales), sobre todo cuando supera el de MAC.
- \* Conglomerados de exudado mucopurulento con acúmulo de gran cantidad de células PMN.
- \* Artefactos inducidos por el propio procesamiento de laboratorio que dificultan la identificación celular.
- \* Número excesivo de hematíes junto con uno o más de los anteriores criterios.
- \* Escaso número de MAC por campo en combinación con excesivo número de células epiteliales o exudado mucopurulento.

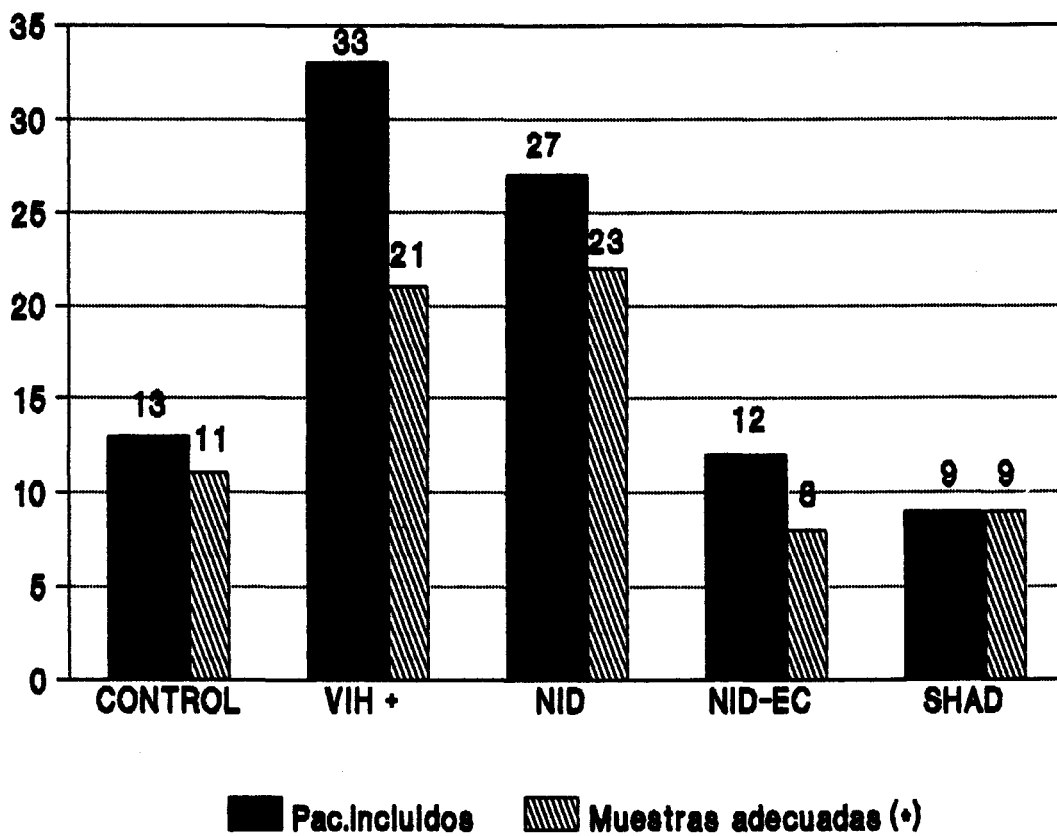
En la TABLA 5 adjunta y Figura 1 se muestran los pacientes incluidos en protocolo de estudio y las muestras seleccionadas según los criterios previamente establecidos.

TABLA 5

PACIENTES INCLUIDOS EN ESTUDIO Y PORCENTAJE DE MUESTRAS EXCLUIDAS SEGUN CRITERIOS ESTABLECIDOS

Indicación del LBA	Pacientes incluidos	M.excluidas
=====		
* Inmunosupresión VIH	33	12 (36%)
* Neumop.interst.difusa (NID)	27	4 (15%)
* Neumop.interst.difusa asociada a enf.colágeno (NID-EC)	12	4 (33%)
* Sínd. hem. alveolar difusa (SHAD)	9	-
* Grupo control	13	2 (15%)

**Figura 1**  
**PACIENTES INCLUIDOS EN ESTUDIO Y**  
**MUESTRAS DE LBA OBTENIDAS ADECUADAS PARA ESTUDIO**



(\*) Selección según criterios de Chamberlain (1987)

## **2.- CRITERIOS DIAGNOSTICOS.**

### **PACIENTES INCLUIDOS EN CADA GRUPO DE ESTUDIO**

2.1.- Infección por VIH fue determinada mediante test de ELISA y confirmado mediante técnica de Western blot. El estadio clínico de cada paciente se basó en los criterios establecidos por el CDC (Centers for Disease Control) en 1987 (119).

La evidencia de infección por gérmenes oportunistas se obtuvo mediante hallazgo de éstos en muestras de fluido de LBA, BTB, CTO o necropsia. Fueron incluidas en estudio las muestras de LBA obtenidas de 21 pacientes que cumplían criterios de adecuación de muestras para estudio previamente establecidos.

2.2- El diagnóstico de sarcoidosis (SARC) fue confirmado con el hallazgo de granulomas no caseificantes en muestras de tejido obtenidas por biopsia transbronquial o a través de minitoracotomía, en las cuales se descartó infección por micobacterias o parásitos. En este grupo se incluyeron 5 pacientes. Ninguno de ellos tenía historia de exposición a partículas orgánicas o inorgánicas capaces de inducir reacción granulomatosa.

2.3- El diagnóstico de neumonitis por hipersensibilidad (NH) se estableció según los siguientes criterios: 1) exposición ambiental a Ags específicos revelada por historia clínica o determinación de anticuerpos IgG específicos de Ag (precipitinas), 2) síntomas relacionados con la exposición, 3) hallazgos radiográficos compatibles, 4) espirometría con patrón restrictivo, 5) cambios histológicos compatibles con la enfermedad en muestras de biopsia pulmonar, 6) test de provocación positivo.

Se confirmó el diagnóstico si se cumplían los tres primeros criterios y dos de los otros tres.

Se estableció este diagnóstico en 7 pacientes y se confirmó en 5 de ellos.

En dos casos la exposición era profesional, uno de ellos trabajador en la construcción con manipulación de esparto (*Stipa tenocíssima*) y otro, carpintero con exposición a polvo de madera de Iroko (*Chlorofora excelsa*). En tres casos había evidencia de exposición a heces de palomas y en un caso a heces de aves de corral. Las precipitinas resultaron positivas a neuroalergenos contenidos en estos productos.

2.4.- El diagnóstico de neumonía intersticial asociada a conectivopatía fue realizado ante un patrón radiológico compatible, una afectación funcional respiratoria y la existencia de datos clínicos-biológicos propios de enfermedad del colágeno. Cumplían estos criterios 8 pacientes (5 LES, 1 con ESCLERD y 2 con EMTC).

En el paciente diagnosticado de esclerodermia, la participación pulmonar consistió en una bronquiolitis obliterante con neumonía parcheada demostrada en la biopsia pulmonar abierta (BPA).

2.5.- En ausencia de datos serológicos de enfermedad del colágeno, el diagnóstico de neumonía intersticial idiopática con sus variantes de neumonía intersticial usual (NIU), neumonía intersticial descamativa (NID) y neumonía intersticial en fase de apanalamiento se planteó según criterios clínicos, radiológicos y funcionales y se confirmó en base a BPA en 5 pacientes.

En 2 casos aislados, el número y tamaño de las muestras de BTB permitió al patólogo sugerir el diagnóstico de UIP y DIP sin que se llegara a su confirmación por BPA.

En 4 pacientes, la Rx de torax mostró patrón intersticial con evidente reducción de volumen de ambos pulmones y patrón de apanalamiento en diversos grados y el estudio funcional respiratorio un patrón restrictivo con reducción de

volúmenes pulmonares. El estudio de difusión no pudo determinarse homogéneamente en todos los pacientes por insuficiente capacidad vital. El TAC torácico evidenció, como hallazgo común, opacidades reticulares localizadas preferentemente en región subpleural y ambas bases junto a la presencia de quistes en parenquima de diferente tamaño.

En este grupo no se realizó BPA (FPI no confirmada) y los hallazgos en la BTB se limitaron a datos inespecíficos como inflamación crónica, fibrosis intersticial, engrosamiento septal o bronquiolitis focal.

De la historia clínica en éstos pacientes se obtuvieron además datos sobre: ingesta de fármacos (tan sólo un paciente tomó amiodarona a dosis habituales durante tiempo prolongado), síntomas compatibles con reflujo gastroesfágico (presentes en tres enfermos en los cuales se evidenció hernia de hiato, uno de los cuales requirió corrección quirúrgica en los primeros meses de vida) o antecedentes de exposición profesional a sustancias inorgánicas (evidentes en tres pacientes, uno de ellos trabajador metalúrgico en horno de zinc y expuesto a humo y partículas de aluminio, otro trabajador en contacto con material de aislamientos y otro era pintor que utilizaba pintura en polvo).



2.6.- Los 9 pacientes incluidos en el grupo denominado síndrome de hemorragia alveolar difusa presentaron al menos dos de los siguientes datos: infiltrados pulmonares, anemia y hemoptísis.

Las circunstancias clínicas asociadas fueron las siguientes: hemosiderosis pulmonar idiopática (2), LES (2), vasculitis sistémica tipo panarteritis nodosa (1), glomerulonefritis de evolución rápidamente progresiva (4), en dos de los casos secundarias a enfermedad de Wegener.

Se excluyeron los casos en los cuales se identificaron macrófagos cargados con hemosiderina en el fluido del LBA en el contexto de infección o éstasis pulmonares.

2.7.-El grupo control se formó con 11 pacientes, 8 fumadores y 3 no fumadores, que acudieron para estudio FB de rutina por hemoptisis (8) o por estudio radiográfico con imagen nodular o agrandamiento hilar. En el estudio funcional respiratorio, los no fumadores mostraron valores normales y los fumadores, valores normales o distintos grados de obstrucción al flujo aéreo. El estudio microbiológico y citopatológico de las muestras obtenidas no evidenciaron hallazgos.

En la TABLA 6 siguiente se muestra el perfil clínico y funcional de los pacientes incluidos en estudio y en la Figura 2 la distribución de pacientes por grupos.

TABLA 6

**DATOS CLINICOS Y EXPLORACION FUNCIONAL  
RESPIRATORIA DE LOS PACIENTES SELECCIONADOS**

	GRUPOS DE ESTUDIO <sup>a</sup>						
	CNTRL	VIH+	SARC	NH	NII	NI-EC	SHAD
Número (n)	11	21	5	7	11	8	9
Edad	51±5	36±2	42±5	38±7	58±5	35±3	53±9
Sexo (V/H)	7/4	21/0	2/3	2/5	7/4	1/7	4/5
Tabaq (F/NF)	8/3	15/6	2/3	0/7	3/8	1/7	1/8
* Hist.tabaq. †	45±10	23±3	23	0	30±4	30	0
* VC ‡	85±6	ND	76±9	65±8	58±5	67±16	ND
* FEV1 ‡	74±8	ND	77±11	63±8	60±4	64±15	ND
* FEV1% ‡	72±5	ND	86±3	88±6	93±7	87±3	ND
* MMEF ‡	59±9	ND	75±6	54±6	73±12	56±16	ND
* FRC ‡	120±14	ND	97±10	87±12	66±10	ND	ND
* RV ‡	141±18	ND	127±22	120±18	74±10	ND	ND
* TLC ‡	108±11	ND	91±6	77±11	60±7	ND	ND

<sup>a</sup> CNTRL, grupo control; VIH+, inmunodeficiencia asociada a VIH; SARC, sarcoidosis; NH, neumonitis por hipersensibilidad; NII, neumonía intersticial idiopática; NI-EC, neumonía intersticial asociada a enf. del colágeno; SHAD, síndrome de hemorragia alveolar difusa; ND, no determinada.

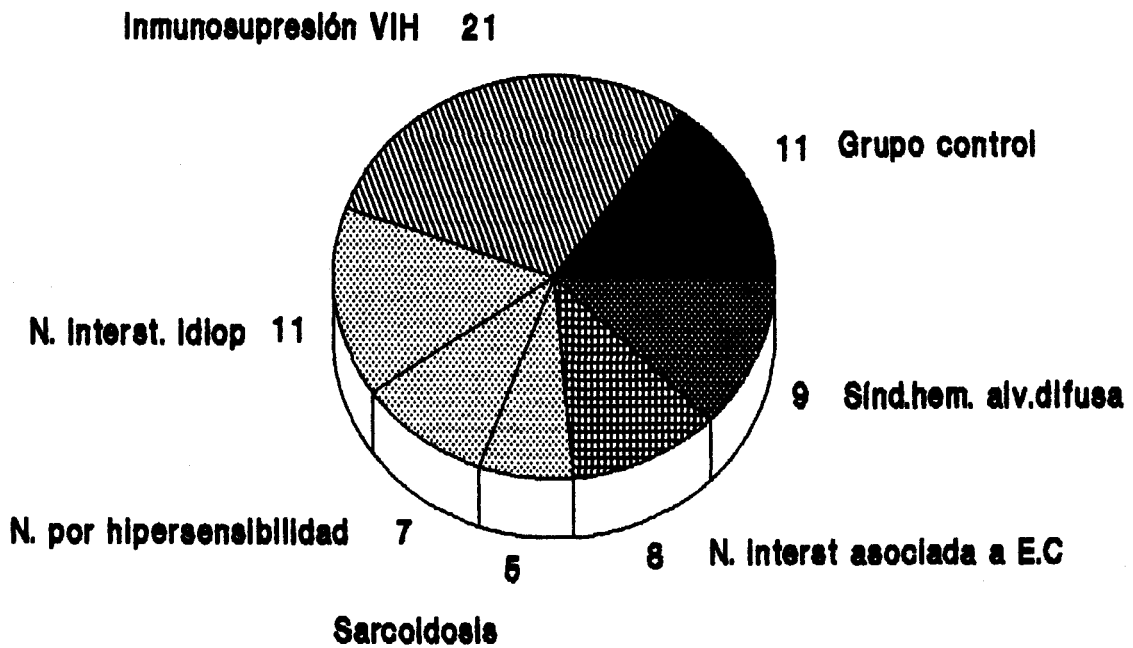
\* Datos expresados como media ± error estándar del porcentaje del valor teórico.

‡ Diferencia significativa (p<0.05) entre el grupo CNTRL y NII.

■ Diferencia significativa (p<0.05) entre NII y SARC.

† Historia de tabaquismo expresada en paq.año (n° paq.día x años.tabaquismo).

**Figura 2**  
**PACIENTES INCLUIDOS EN CADA GRUPO DE ESTUDIO**



### 3.- METODOLOGIA DE OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

#### 3.1.- Broncofibroscopia y LBA.

Fue realizada en todos los casos en posición de decúbito supino. Como premedicación se utilizó sistemáticamente atropina por vía intramuscular seguida a los 30 minutos de aplicación de anestesia en región nasofaríngea en forma de nebulización e inyección intratraqueal de 5 cc de lidocaina al 2%. Ocasionalmente se usaron benzodiazepinas como medicación sedante.

Habitualmente el broncoscopio (modelos Olympus BF10 / 1T20D) se introdujo por vía nasal, aunque en algunos pacientes se recurrió a la vía oral cuando la anterior era imposible.

Antes del inicio de cualquier procedimiento, se revisaron ambos árboles bronquiales para descartar existencia de patología endoluminal neoplasia o signos de inflamación bronquial (abundante secreción acuosa-mucosa o mucopurulenta, sufusión hemorrágica o hipertrofia y edema de mucosa).

Se procuró realizar el LBA antes de otra técnica endoscópica, bien sea cepillado o biopsia transbronquial, con la finalidad de reducir al máximo la posibilidad de contaminación del fluido del LBA con sangre periférica.

Se introdujo cuidadosamente el extremo del broncoscopio en el bronquio lobar correspondiente hasta alcanzar una posición "en cuña" evitando dañar la mucosa bronquial. Normalmente fue introducido en un bronquio segmentario del lóbulo medio o llingula, por ser éstos los que mejor drenan en posición de decúbito, aunque en enfermedades más localizadas o de distribución más heterogénea, el LBA se realizó en el territorio con mayor afectación radiológica.

La técnica empleada, en su esencia, varió poco de la descrita originalmente por Reynolds y Newball en 1974 (7).

El LBA se realizó mediante instilación de suero fisiológico estéril a temperatura ambiente con una jeringa de 50 cc de capacidad. La cantidad utilizada osciló entre 100 y 200 ml repartida en alíquotas de 50 mls. Habitualmente cada alíquota fue instilada en 10 seg (flujo aproximado de 5 ml/segundo). El volumen empleado varió dependiendo de la tolerancia por parte del paciente y volumen de muestra necesaria para los distintos objetivos del procedimiento.

Una vez finalizada la instilación de cada alíquota, se inició de forma inmediata la recuperación mediante aspiración mecánica con presión negativa constante, procurando evitar el excesivo colapso de la pared bronquial y la consiguiente sufusión hemorrágica, efecto no deseable por la alteración de la composición celular del fluido recuperado.

De interés para posterior valoración de la metodología del procedimiento y evaluación de resultados finales se anotaron rutinariamente los siguientes datos:

- 1) Lóbulo o segmento pulmonar muestreado.
- 2) Grado de tolerancia de la técnica (buena/mala).
- 3) Volumen total de líquido instilado.
- 4) Porcentaje de líquido recuperado.
- 5) Aspecto macroscópico del líquido recuperado.

Se consideró como mala tolerancia cuando el paciente presentaba tos continua o sensación de disnea y ante la necesidad de limitar el volumen el volumen instilado por falta de colaboración del paciente o la evidencia de caída de saturación importante por pulsioximetría.

La buena tolerancia se reflejó en general en una excelente colaboración, ausencia de tos y posibilidad de realización de la técnica de forma adecuada ,según se ha descrito anteriormente.

El fluido recuperado fue filtrado de forma rutinaria a través de una gasa esteril de 2-3 capas para evitar el moco y se vertió secuencialmente en tubos de 50 mls de material plástico siliconado con la finalidad de retardar la adherencia de las células.

Una vez valorado el porcentaje de líquido recuperado , se suspendió cada alícuota recuperada en solución buffer (PBS) con EDTA (dilución final EDTA 0.05%) sin Ca ni Mg para mantener la estabilidad del medio y evitar la agregación celular. El tiempo que transcurrió desde la obtención hasta su procesamiento en el laboratorio (que en ninguno de los casos fué mayor de dos horas) se procuró el mantenimiento de las muestras en hielo o cámara frigorífica.

La alícuota inicial recuperada , designada "muestra bronquial", fué procesada separadamente y aprovechada para estudio citopatológico y/o microbiológico . El conjunto de muestras restantes , denominado "muestra alveolar", fue el utilizado para estudio.

### 3.2.- Procesamiento de muestras

Si en la suspensión de células existía moco visible se añadió a cada tubo 50  $\mu$ l de solución de ditioneitol y se incubaron los tubos durante 5 minutos a 37 grados en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> . Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos para separar las células del sobrenadante. Los pellets fueron resuspendidos con vortex y mediante aspiración suave con pipeta fueron mezclados en un solo tubo y nuevamente llevados hasta 50 ml con PBS+EDTA. Las muestras fueron centrifugadas de nuevo a la misma velocidad y durante el mismo tiempo. Este proceso

fue repetido un total de tres veces y las células fueron entonces resuspendidas en 3-5 mls de PBS+EDTA.

### 3.3.- Número total de células y concentración celular

Para recuento de células totales y viabilidad celular se tomaron 45  $\mu$ l de azul trypan y se mezclaron con 5  $\mu$ ls de suspensión celular. Con esta dilución la décima parte de la cantidad de células contadas en el hemocitómetro (cámara de Neubauer) corresponde al n° de células por ml de suspensión.

El n° total se obtuvo al multiplicar este número por el n° de mls de suspensión celular final.

Dado que el n° total de células guarda una relación con el volumen instilado y el porcentaje de éste que se recupera, se determinó la concentración celular en la suspensión celular original dividiendo el n° total de células entre el volumen de fluido recuperado.

Tras determinar el número de células se ajustó la concentración celular a 10 millones de cél/ml, para lo cual fue necesario volver a centrifugar si la concentración celular era inferior a la cantidad referida. Si era superior se añadió la cantidad de PBS+EDTA necesaria.



### 3.4.- Estudio de distribución celular porcentual

Una muestra de la suspensión obtenida tras la primera centrifugación fue utilizada para recuento celular diferencial tras fijación y tinción con Wright-Giemsa modificado.

Los criterios citológicos establecidos para la identificación de cada tipo de célula fueron los siguientes (64):

\* Macrófagos alveolares : reconocidos fácilmente como células con una amplia variedad de tamaño, oscilando desde pequeñas células semejantes a monocitos hasta grandes células maduras que generalmente tienen un núcleo indentado o convoluto o núcleos separados. El citoplasma contiene gránulos y vacuolas de diferentes tamaños.

\* Linfocitos: generalmente pleomórficos y variables en tamaño desde pequeñas células de una o dos veces el tamaño de un eritrocito hasta grandes linfocitos con diámetro aproximado al de los monocitos sanguíneos. Los pequeños linfocitos muestran una cromatina muy condensada. El núcleo tiene una colocación excéntrica y el citoplasma adopta una forma en media luna. Los grandes linfocitos tienen un núcleo de tamaño variable de morfología redondeada o lobulada y la cromatina es menos condensada. Ocasionalmente estos linfocitos presentan gránulos en el citoplasma.

\* Neutrófilos: generalmente reconocidos por la característica lobulación de los núcleos. El citoplasma habitualmente es poco abundante pero contiene gránulos.

\* Eosinófilos: identificados por la intensa eosinofilia de sus gránulos citoplasmáticos. Los núcleos pueden ser bilobulados y tener cromatina muy condensada.

\* Células plasmáticas: fueron identificadas por la situación excéntrica del núcleo, la distribución de la cromatina en forma de rueda de carro y la intensa acidofilia de su citoplasma.

Fue aceptado el término "alveolitis" para definir un incremento en el número total de células, tanto si existe un incremento selectivo de un tipo celular determinado como si se mantiene la distribución celular porcentual normal.

### 3.5.- Tinciones y estudios especiales

Según el contexto clínico se solicitaron:

\* Tinción de Perls para identificación de macrófagos alveolares cargados con hemosiderina.

\* Tinción de plata para la identificación de determinados agentes infecciosos tales como *Pneumocystis carinii*, *Asper-*

*gillus fumigatus* u otros hongos o levaduras.

\* Tinción de Ziehl-Nielsen para identificación de bacilos ácido alcohol resistentes.

\* Inmunofluorescencia directa frente a *Legionella pneumophila*.

\* Los estudios en microscopia electrónica fueron solicitados cuando existía sospecha de histiocitosis X, proteinosis alveolar o afectación pulmonar por fármacos.

### 3.6.- Estudio inmunológico mediante técnica de IFI

Las células del fluido de revestimiento epitelial obtenidas por LBA en la muestra alveolar fueron procesadas para estudio de subpoblaciones linfocitarias y de la población mononuclear fagocítica. Se empleó de forma sistemática en el estudio de las muestras la técnica de IFI y examen de las células con microscopio de epifluorescencia (Leitz).

Para este análisis se excluyeron las muestras con bajo número total de células ( $<4 \times 10^6$  céls), ya que no es posible la realización adecuada de un estudio protocolizado.

Brevemente descritos, los pasos secuenciales en su realización fueron los siguientes:

- Tras la elección de los AcMo (ver TABLA 7), se dispensó la cantidad adecuada de cada uno de ellos en tubos de 5 ml de polipropileno.

- Se añadió a cada tubo 100  $\mu$ ls de la suspensión celular ajustada previamente a una concentración de  $10 \times 10^6$  cél/ml (la concentración de células es de  $1 \times 10^6$  céls por cada tubo) y se incubaron en frío durante 30 minutos.

- Posteriormente se lavó cada tubo con 3 ml de PBS+EDTA se centrifugaron, se resuspendieron las células y se añadió a cada 5  $\mu$ ls del segundo anticuerpo, IgG F(ab')<sub>2</sub> goat antimouse conjugado a isotiocianato de fluoresceína.

- Tras 30 minutos de incubación en frío y oscuridad, las células se lavaron dos veces con PBS+EDTA, se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron con vortex.

- Si no fue posible realizar el estudio el mismo día que las células fueron procesadas, se añadió a cada tubo 1 ml de solución de paraformaldehído al 1% en suero fisiológico y se guardaron en frigorífico a temperatura de 4°C.

- El día del estudio se lavaron las células con PBS+EDTA se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante procurando que la cantidad de líquido sobrante fuera el mínimo posible. Se añadió a cada tubo 50  $\mu$ l de glicerol + PBS al 50% e inmediatamente se estudió una pequeña cantidad de esta suspensión celular en microscopio de epifluorescencia.

Fue estudiado un mínimo de 50 células para cada Ag estudiado.

La intensidad de fluorescencia fue puntuada como -, +, ++ o +++.

Dado que las células de la línea monocito-MAC muestran autofluorescencia que dificulta la observación de la fluorescencia específica, se determinó que sólo las células que presentaran claramente un anillo de fluorescencia verde fueron consideradas positivas. Utilizando este criterio, menos del 1% de células fueron positivas en los estudios con anticuerpos control.

La identificación de fluorescencia específica en linfocitos es más sencilla porque generalmente no muestran autofluorescencia. No obstante, el estudio cuantitativo no siempre es posible por el escaso número de linfocitos existente en el fluido del LBA de determinados pacientes.

Como norma, se ha establecido que en estudios de IF es necesario al menos un número de  $10^6$  células y un porcentaje mínimo de linfocitos del 15%, por debajo del cual los datos resultantes no son adecuados, lo que obliga a "enriquecer" la muestra de linfocitos.

En éste estudio, las muestras que contenían menos del 15% de linfocitos fueron resuspendidas en medio RPMI 1640

suplementado con 20% de suero fetal bovino (FCS) y pasadas dos veces a través de pajas corrientes de beber flexibles que contienen 100 µg de fibra de nylon (Leukopak, Fenwall) cerradas en el extremo inferior, dejándose sólo un orificio de unos 2 mm. Las fibras habían sido saturadas previamente del mismo medio de cultivo e incubadas durante 30 minutos a 37°C.

Una vez añadida la suspensión celular, las columnas fueron incubadas a 37° durante 45 minutos. Tras este tiempo se deja caer gota a gota, 10 ml de medio de cultivo, de manera que las células no adherentes son arrastradas y se depositan en tubos de centrifuga. A continuación, las columnas fueron lavadas con unos 20 ml de medio de cultivo, arrastrándose las células adherentes tras retorcer y "escurrir" las columnas. En los casos en los que el porcentaje de células no macrofágicas era inferior al 15%, este método permitió obtener una pureza de linfocitos entre 40-70%.

En la tabla siguiente se describen los fenotipos funcionales discutidos en este estudio. Estos son agrupados según nomenclatura basada en "clusters de diferenciación"(CD).

TABLA 7

ANTIGENOS DE DIFERENCIACION LEUCOCITARIOS VALORADOS EN ESTE ESTUDIO				
CD	Anticuerpo	Reactividad	Co-expresión	Antígeno
CD1a	OKT6, Leu-6	Timocitos inmaduros Cél. de Langerhans		Subunidad $\beta$ -2 microglobulina (CD8)
CD3	OKT3, Leu-4	Timocitos y linfocitos-T		Receptor de células T
CD4	OKT4, Leu-3	Células T helper-inductoras	Monocitos y macrófagos	Receptor Clase II del MCH/receptor VIH
CD8	OKT8, Leu-2	Células T supresoras-citotóxicas	Subpobl. NK	Receptor Clase I del MHC
CD11b	OKM1, Leu-15 Mo1	Más del 90% de monocitos y neutrófilos	Subpobl. NK	Cadena $\alpha$ -2 de Mac-1 (receptor C3bi)
CD11c		Monocitos, granulocitos y macr. tisulares		Cadena $\alpha$ -3
CD14	My4, Leu-M3 Mo2, UCHM1	Serie monocito/macrófago exclusivamente		
CD45		Panleucocitario		Antígeno común leucocitario (control positivo)
CD20	Leu-16	Todas las células B		
CD25	IL-2 recep.	Células T activadas, monocitos, macrófagos	Células B y NK	Receptor para la IL-2
CD57	Leu-7	Células NK	Subp. céls T	Carbohidrato
CD71	T9	Células T activadas Células en estadio de proliferación		Receptor transferrina
CD69		Células T activadas		Ag inicial de activación
HLA-DR		Monocitos, células B y células T activadas.		Ag Clase II del MHC

#### 4.- ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados son expresados como media  $\pm$  error standard de la media ( $M \pm ES$ ).

Las diferencias entre medias obtenidas de muestras no pareadas fueron obtenidas mediante el test t de Student.

Cuando la intención fue analizar diferencias entre datos obtenidos de pequeños grupos con distribución no normal se empleó la prueba U de Mann-Wihtney.

Para determinar la asociación entre dos variables cualitativas se clasificaron las distintas observaciones en tablas de contingencia de  $2 \times 2$  de acuerdo con dos características, teniendo cada una de ellas dos niveles de clasificación. Cuando el total de datos de la tabla era mayor de 20 se empleó el test de Chi-cuadrado. Para un total menor de 20 o bien entre 20 y 40 y el valor más pequeño menor de 5, se empleó la prueba exacta de probabilidad de Fisher.

La correlación entre dos variables se determinó mediante el test de correlación de Pearson.

Para todas las evaluaciones estadísticas se consideró como significativa un valor de  $p < 0.05$ .



## RESULTADOS

## 1. ASPECTOS RELACIONADOS CON LA TECNICA DE REALIZACION

### 1.1.- Tolerancia y porcentaje de fluido recuperado

La mala tolerancia del LBA se manifestó fundamentalmente por la aparición de tos continua o sensación de disnea y ante la necesidad de limitar el volumen instilado por falta de colaboración o evidencia de caída importante de saturación por pulsioximetría.

En el grupo control (n=11), la técnica de LBA fue bien tolerada por 9 pacientes (81%) y se recuperó el  $50\pm 4\%$  del líquido instilado.

La tolerancia del procedimiento en la población VIH+ (n=21) fue buena en el 66% (14/21) de los pacientes y mala en el 34% restante (7/21). El porcentaje de líquido recuperado fue significativamente mayor en el primer grupo ( $53\pm 3.3\%$ ) que en el segundo ( $37\pm 4.5\%$ ) ( $p=0.01$ ).

En el grupo de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa (n=31), el LBA fue bien tolerado por el 63% de ellos. El porcentaje de líquido recuperado en éstos ( $50\pm 2.4\%$ ) no mostró diferencia significativa con el obtenido en el resto de pacientes de este grupo ( $45\pm 3.5\%$ ).

Aunque la intolerancia del procedimiento se observó con más frecuencia entre los pacientes fumadores, la asociación de ambas variables, tolerancia del LBA y hábito tabáquico, no pudo ser probada debido a la heterogeneidad de grupos.

Se evaluó la influencia de la situación funcional respiratoria previa a la exploración en el grado de tolerancia de ésta en el grupo de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa.

Los que mejor toleraron la técnica fueron los pacientes con sarcoidosis y neumonitis por hipersensibilidad, mientras que los diagnosticados de fibrosis pulmonar idiopática o asociada a enfermedades del colágeno fueron los que mostraron mayor intolerancia.

No obstante, no se observaron diferencias significativas entre las bien toleradas y mal toleradas en los valores de VC ( $66 \pm 4.2$  vs  $58 \pm 6.7$ ), FEV1 ( $62 \pm 3.4$  vs  $62 \pm 6.5$ ) e índice de Tiffenau ( $85 \pm 5.7$  vs  $89 \pm 2.4$ ).

#### 1.2.- Factores determinantes del porcentaje de fluido recuperado

En este estudio, como se ha mostrado anteriormente, el grado de tolerancia del procedimiento no influyó sobre el porcentaje de recuperación, salvo en el grupo de pacientes con patología pulmonar asociada a infección VIH. En este

grupo, algunos pacientes, por lo general los que mostraron mayor intolerancia, partían de un importante deterioro de su situación clínica y gasométrica. En éstos fue más difícil la realización de la técnica o bien requirieron limitar el volumen instilado, con lo cual el volumen y porcentaje de fluido recuperado fueron menores.

En el grupo control se observó una tendencia a un menor porcentaje de recuperación en los pacientes fumadores que en los no fumadores ( $45.1 \pm 4.5$  vs  $63.6 \pm 4.4$ ), aunque sin significación debido al número reducido de pacientes en ambos subgrupos.

El FEV1 e índice de Tiffenau mostraron una escasa pero significativa correlación de promedio con el porcentaje de fluido recuperado ( $r=0.44$   $p=0.01$  y  $r=0.37$   $p=0.03$  respectivamente).

En la siguiente tabla se resumen los factores evaluados como POSIBLES determinantes del porcentaje de fluido recuperado durante la realización del LBA.

TABLA 8

PORCENTAJE DE FLUIDO RECUPERADO  
FACTORES VALORADOS COMO POSIBLES CONDICIONANTES

1. <u>TOLERANCIA DEL LBA</u> .....	<u>INMUNOSUPRESION POR VIH</u>	Buena		Mala
		53±3.3 %	p=0.01	37±4 %
2. <u>FUNCION RESP. PREVIA</u> .....	<u>NEUMOP. INTERST. DIFUSA</u>	Buena		Mala
		50±2.4 %	NS	45±3.5 %
	<u>GRUPO CONTROL</u>	Buena		Mala
		50±3.9 %		32±7 %
	<u>Correlación VC y % Recup.</u>		NS	
			r=0.25	
	<u>Correlación FEV1 y % Recup.</u>		p=0.01	
			r=0.44	
	<u>Correlac.FEV1/FVC y % Recup</u>		p=0.03	
			r=0.37	

## 2.- EVALUACION DE LA ADECUACION DE MUESTRAS PARA ESTUDIO

### 2.1.- Contaminación con hematíes y células epiteliales

De entre las muestras destinadas a estudio citoinmuno-  
lógico, en el 32% se evidenció "contaminación" con hematíes  
y células epiteliales ciliadas en diversos grados mientras  
que el 68% de ellas eran adecuadas. Se encontró una asocia-  
ción significativa entre presencia de hematíes y/o células  
de epitelio bronquial y mala tolerancia de la técnica  
( $p=0.01$ ).

No hubo diferencia significativa en el porcentaje de  
líquido recuperado entre aquellas muestras con y sin eviden-  
cia de hematíes y/o células epiteliales en número importan-  
te ( $44\pm 2.3$  vs  $45\pm 1.8$ ). Cuando es evidente este hallazgo en  
muestras con poco volumen recuperado, puede ser indicativo de  
dificultad en la realización técnica y/o traumatismo local  
en el punto de inserción del FB.

Su aparición ocasional en muestras con gran volumen de  
líquido recuperado y buena tolerancia puede ser debido al  
efecto de la succión mantenida en vía aérea proximal ya que  
generalmente, se observa en las últimas alíquotas recupera-  
das.

En el grupo utilizado como control, compuesto por 8  
pacientes fumadores y 3 no fumadores, se estudió separada-

mente primera alícuota recuperada y resto de alíquotas en "pool" y se observó que las células epiteliales ciliadas contaminaban sobre todo la primera alícuota (muestra bronquial) y ,en menor porcentaje, las alíquotas siguientes (muestra alveolar). Es posible que la detección de estas células en el resto de pacientes, una vez que se ha separado la muestra bronquial, sean células de primera alícuota enviadas distalmente y recuperadas posteriormente.

En el grupo de pacientes con neumopatía intersticial difusa las muestras más adecuadas para estudio fueron las obtenidas de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad y sarcoidosis y las más contaminadas con células epiteliales y/o hematies las del grupo con fibrosis pulmonar idiopática ( generalmente los que peor toleraron el procedimiento).

## 2.2.- Viabilidad celular

Todas las muestras fueron procesadas con centrifugación y posterior resuspensión en solución buffer en un plazo no superior a 2 horas. A pesar de ello se observó que la viabilidad celular determinada con azul Trypan fue variable de paciente a paciente. No se encontró diferencia significativa en la viabilidad (expresada en % de células que no se tiñen con este colorante) determinada en los tres grupos de pacientes: control ( $76 \pm 6.2$ ), infectados por el VIH ( $78.5 \pm 2.8$ ) y

patología intersticial difusa ( $81 \pm 2.0$ ).

La viabilidad de las muestras obtenidas en condiciones de buena tolerancia fue mejor que la determinada en las muestras obtenidas con peor tolerancia ( $83 \pm 1.9$  vs  $71.3 \pm 2.4$ ,  $p=0.001$ ). La viabilidad de las células obtenidas no se correlacionó con el porcentaje recuperado.

### 2.3.- Muestras incluidas en estudio según criterios de selección

En la TABLA 5, en la sección MATERIAL Y METODOS, se expresan los resultados del proceso de selección de muestras según criterios previamente establecidos.

El mayor porcentaje de muestras excluidas de estudio fueron las obtenidas de pacientes con patología pulmonar asociada a infección por VIH y de aquellos en los cuales se realizó el LBA por sospecha de neumopatía asociada a enfermedad del colágeno (36% y 33% respectivamente).

Las causas más frecuentes de exclusión fueron : 1) aspecto claramente serohemorrágico o mucopurulento a la inspección , 2) presencia de un alto porcentaje de células epiteliales o acúmulo de moco y células inflamatorias.



### 3.- CELULARIDAD EN EL FLUIDO DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE ESTUDIO

#### 3.1.- Celularidad total y concentración celular

La celularidad total fue calculado con un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y es expresada como n°.cels x 10<sup>6</sup>. La concentración celular fue obtenida dividiendo el número total de células entre el volumen de fluido recuperado y se ha expresado como n°.cels/ml. fluido LBA x 10<sup>3</sup>.

En el grupo control (n=11, edad 51±5.1 años) 8 eran fumadores .El número total de células mostró gran variabilidad entre sujetos ya que así lo fue el porcentaje de fluido recuperado. En el fluido de LBA de pacientes fumadores había mayor cantidad de células totales (casi 4 veces más) que en el de no fumadores (68±28.6 vs 18±1.3) aunque la diferencia no fue significativa por ser una muestra reducida.

La celularidad, expresada en términos de concentración, también mostró gran variabilidad interindividual, sobre todo entre los pacientes fumadores, y fue muy superior a la obtenida de pacientes no fumadores (724±227.4 vs 143±11.6). Por haber distintas varianzas , la diferencia no fue significativa. No se observó correlación significativa entre concentración celular e historia acumulada de tabaquismo (paq.día x años tabaquismo) (r=0.25, NS).

En el grupo de pacientes con infección VIH (n=21, edad  $36 \pm 2.2$  años), 15 eran fumadores (71%) con una historia de tabaquismo de  $23 \pm 3.4$  paq/año. Aunque esta población fue homogénea en cuanto a edad, era heterogénea en cuanto a situación de inmunosupresión como ha sido descrito en el apartado de PACIENTES Y METODOS. Del total, en 14 se documentó infección oportunista (IO) (estadios IV C1 y IV C2 del CDC) y en 7 no se había demostrado previamente IO ni se evidenció en el estudio de muestras obtenidas por FB.

El número total de células, considerando la población globalmente, fue muy variable ( $53 \pm 11 \times 10^6$  cels), así como la concentración celular ( $696 \pm 162.5 \times 10^3$  cels/ml).

No hubo diferencia significativa en la celularidad total o concentración celular cuando se comparó la población con IO y sin IO. Tampoco hubo diferencia significativa en estos parámetros con el grupo control.

En el resto de patologías, como se comentará en posteriores apartados, el número total y concentración celular mostraron gran variabilidad entre pacientes y por ello no se observaron diferencias significativas con el grupo control.

### 3.2.- Morfología celular en las muestras obtenidas

Se emplearon volúmenes relativamente amplios que se sometieron a sedimentación del componente celular por centrifugación (normalmente 500 g durante 10 minutos) y las



muestras fueron preparadas del pellet, tras extensión en portas y secado al aire o bien fijados. La tinción con Wright Giemsa de las muestras seleccionadas mostró una buena morfología celular.

Habitualmente se empleó para estudio de distribución celular porcentual parte de la muestra obtenida tras primera centrifugación, previamente filtrada a través de una gasa esteril de 2-3 capas. El estudio evidenció:

#### A) Células epiteliales

En preparaciones de rutina, aún eliminando la primera alícuota aspirada (muestra bronquial), se observaron, en mayor o menor cantidad, grupos de grandes células de aspecto escamoso con núcleo pequeño y gran citoplasma sin granulaciones visibles. La procedencia de estas células escamosas suele ser la cavidad oral, epiglotis y porciones de laringe arrastradas con el paso del broncofibroscopio.

Otras células observadas mostraron morfología alargada, con núcleos de localización basal y citoplasma que se extiende en columna vertical; la superficie apical muestra un penacho de cilios. Son células epiteliales ciliadas y su procedencia es tráquea o bronquios. No fue infrecuente observar grupos de células de epitelio columnar compactadas que representan fragmentos de mucosa bronquial intacta.

Las muestras en las que se evidenciaron células epiteliales, también mostraron cierto grado de contaminación con

hematíes. Como ha sido comentado previamente, este hallazgo se asoció más con el grado de tolerancia y dificultad en la realización técnica que con el volumen de fluido recuperado.

Cuando se observó gran cantidad de células epiteliales (>10% de la cantidad de MAC) durante el recuento celular total en hemocitómetro se consideró la muestra como no adecuada para posteriores estudios.

#### B) Contaminantes no celulares

A pesar de ser filtradas las muestras de fluido a través de gasa esteril de 2-3 capas, con frecuencia se observaron grumos de moco en suspensión. En algunos pacientes se añadió ditioneitol a la dosis de 50 µl a cada tubo con la muestra recuperada, incubando a 37° durante 5 minutos antes de la primera centrifugación. Con este procedimiento mejoró el aspecto del fluido recuperado en los casos en los que se empleó. A pesar de ello, en algunas preparaciones se vieron acúmulos de moco que aglomera gran cantidad de células, generalmente MAC y PMN, que dificulta los recuentos celulares porcentuales. Este hallazgo fue otro de los parámetros considerados en la selección de muestras para estudio.

#### C) Células no epiteliales

Las células no epiteliales encontradas fueron células inflamatorias ( MAC, LINF, PMN y EOSIN).

Su distinción se basó en criterios ya establecidos (ver sección METODOS).

1) Los MAC variaron en tamaño, forma, inclusiones citoplasmáticas y forma del núcleo, el cual puede ser redondo, oval o indentado. El citoplasma puede contener una amplia variedad de sustancias ingeridas (sobre todo pigmento antracótico y otras que forman parte de la fase particulada del humo del tabaco). El aspecto de estos acúmulos puede ser similar a los de hemosiderina (Fe en forma insoluble) observados en procesos en los cuales hay extravasación de sangre al intersticio pulmonar y alvéolo.

2) La morfología de los LINF C fue más uniforme en las preparaciones estudiadas, variando sobre todo en tamaño.

Ocasionalmente, fue difícil distinguir grandes LINF C de MAC inmaduros con tamaño similar al monocito, lo cual obliga a aplicar criterios morfológicos estrictos. Este dato es de gran importancia porque puede constituir una causa de error no sólo en los recuentos diferenciales sino en los estudios de inmunofenotipo cuando se estudian las células en suspensión sin tinción.

3) Tanto los PMN como EOSINF, cuando se evidenciaron, se ajustaron en morfología a los criterios ya establecidos.

#### 4.- DISTRIBUCION CELULAR PORCENTUAL EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE ESTUDIO

##### 4.1. Grupo control

En la tabla siguiente se expresa el porcentaje de fluido recuperado , n° total de células, concentración celular y distribución celular porcentual en cada paciente.

El grupo control, en conjunto, mostró una celularidad total media de  $54.6 \pm 21.6$  y una concentración celular media de  $565.7 \pm 181.7 \times 10^3$  cél/ml. de LBA. La distribución celular porcentual mostró un promedio de 88% MAC, 5.9% LINFC y 5.5% de NEUTR.

Se observó una gran variabilidad interindividual tanto en el número de células totales como en la concentración celular, sobre todo entre los pacientes fumadores .

A pesar del escaso número de pacientes no fumadores incluidos en este grupo, se pudo observar en éstos una tendencia a un menor número total de células y sobre todo a una menor concentración expresada en n°de células por ml de fluido recuperado (ver TABLA 9).

La mayoría de células recuperadas fueron MAC con un porcentaje medio de 87.7 % (rango 69-95) en fumadores y 90 % (rango 83-95) en no fumadores.

El porcentaje medio de LINFC fue 5.1 % (rango,0-12) en fumadores y 8.6 % (rango 4-15) en no fumadores.

TABLA 9

GRUPO CONTROL							
CELULARIDAD TOTAL Y DISTRIBUCION CELULAR PORCENTUAL							
Pac.	P.recup	C.total	Cel/ml	MAC	LINFC	NEUTR	EOSINF
<b>FUMADORES</b>							
1	25	4.7	118.4	93	5	2	-
2	71	258.7	2192.3	95	0	5	-
3	45	52.0	577.0	92	0	8	-
4	39	64.5	826.9	69	3	28	-
5	43	28.3	566.0	94	5	0.9	-
6	48	45.0	500.0	85	5	10	-
7	40	13.8	212.3	88	11	0.9	-
8	50	80.0	800.0	86	12	2	-
=====							
M ±	#45.1±	68.3±	724.1±	87.7±	5.1±	7.1±	-
ES	4.5	28.6	227.4	2.9	1.5	3.2	
<b>NO FUMADORES</b>							
9 *	66	16.1	121.2	92	7	1	-
10*	70	20.7	147.9	83	15	2	-
11*	55	17.7	160.9	95	4	0.9	-
=====							
M ±	#63.6±	18.1±	143.3±	90.0±	8.6±	1.3±	-
ES	4.4	1.3	11.6	3.6	3.2	0.3	
<b>POBLACION TOTAL</b>							
M ±	50.2±	54.6±	565.7±	88.1±	5.9±	5.5±	
ES	4.3	21.6	181.7	2.3	1.6	2.4	

Pac,paciente; P.recup,porcentaje recuperado; C.total,n'total de células expresado en millones ( $n \times 10^6$ ); Cel/ml, concentración celular expresada en n'células/ml de fluido recuperado ( $n \times 10^3$ ); MAC,macrófagos, LINFC,linfocitos,NEUTR,neutrófilos, EOSINF,eosinófilos, expresados en porcentajes. M ± ES, media ± error standard.

\* Pacientes no fumadores.

# Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre porcentaje de recuperación en fumadores y no fumadores.

La media de porcentajes de NEUTR en fumadores fue 7.1% (rango 0.9-28) ; en 6 de 8 fumadores el porcentaje de NEUTR fue  $\geq 2\%$ . En los no fumadores la media de porcentajes fue 1.3%.

El porcentaje de EOSINF fue  $< 1\%$  en las preparaciones habituales.

**4.2 .- Pacientes con inmunosupresión por infección VIH**

Al tiempo de realización del LBA se evidenció infección oportunista (IO) en 14 de 21 pacientes. En los restantes 7, o no se aisló ningún patógeno o fueron gérmenes habituales (ver TABLA 10 adjunta).

En la TABLA 11 se muestra el n° total de células, concentración y distribución celular porcentual en ambos grupos de pacientes distribuidos según existencia o no de IO.

**TABLA 10**

<b>AISLAMIENTOS EN LA POBLACION VIH+ ESTUDIADA</b>	
<b>* POBLACION ESTUDIADA .....</b>	<b>21 pacientes</b>
<b>* AISLAMIENTO DE PATOGENOS OPORTUNISTAS.....</b>	<b>14 "</b>
- Pn.carinii.....	10 "
- Citomegalovirus (CMV).....	1 "
- CMV + Pn.carinii.....	1 "
- Mycobacterias.....	2 "
<b>* AISLAMIENTO DE PATOGENOS HABITUALES.....</b>	<b>2 "</b>
<b>* NO AISLAMIENTO .....</b>	<b>5 "</b>



TABLA 11

PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS POR INFECCION VIH CELULARIDAD TOTAL Y DISTRIBUCION CELULAR PORCENTUAL							
Pac.	P.recup	C.total	Cel/ml	MAC	LINFC	NEUTR	EOSINF
<b>INF. OPORTUNISTA</b>							
1	30	192.0	3200.0	86	14	-	-
2*	30	18.0	400.0	76	17	7	-
3	44	26.5	473.2	61	39	0	-
4*	50	50.3	503.0	82	18	-	-
5	60	25.9	385.0	52	34	14	-
6	27	16.5	300.0	67	32	1	-
7	48	148.0	1541.0	86	5	9	-
8	25	83.4	1853.3	73	22	5	-
9	56	82.5	617.6	54	28	18	-
10	58	11.2	97.1	78	21	1	-
11*	54	24.2	290.0	56	26	18	-
12*	72	27.0	216.0	68	30	2	-
13	40	10.4	139.0	26	73	1	-
14	53	9.0	113.0	56	44	0	-
=====							
M ±	46.0±	51.7±	723.3±	#65.8±	■28.7±	5.6±	-
ES	3.7	15.0	236	4.3	4.3	1.7	-
<b>NO INF. OPORTUNISTA</b>							
15	52	38.5	366.6	83	11	6	-
16*	80	41.0	342.0	88	9	3	-
17	59	36.5	410.1	65	25	10	-
18	51	65.4	855.0	72	11	17	-
19*	34	32.0	457.6	92	8	-	-
20	40	37.5	625.0	87	13	-	-
21	47	143.6	1430.0	77	15	8	-
=====							
M ±	41.2±	56.3±	640.8±	#80.6±	■13.1±	6.2±	-
ES	2.2	15.1	148.0	3.6	2.1	2.2	-
<b>POBLACION TOTAL</b>							
M ±	48.1±	53.2±	695.9±	70.7±	■23.5±	6.1±	-
ES	3.1	11.0	162.5	3.4	3.3	1.3	-

Nota: Para descripción de las distintas abreviaturas ver pie de TABLA 11 en pág. precedente.

M ± ES, media ± error standard.

\* Pacientes no fumadores.

# Diferencia significativa entre porcentaje de MAC en pacientes con y sin IO (p=0.03) y entre pacientes con IO y grupo control (p=0.0003)

■ Diferencia significativa (p=0.005) entre porcentaje de linfocitos en pacientes con y sin IO.

■ Diferencia significativa (p=0.0002) entre porcentaje de linfocitos en población VIH+ y grupo control.

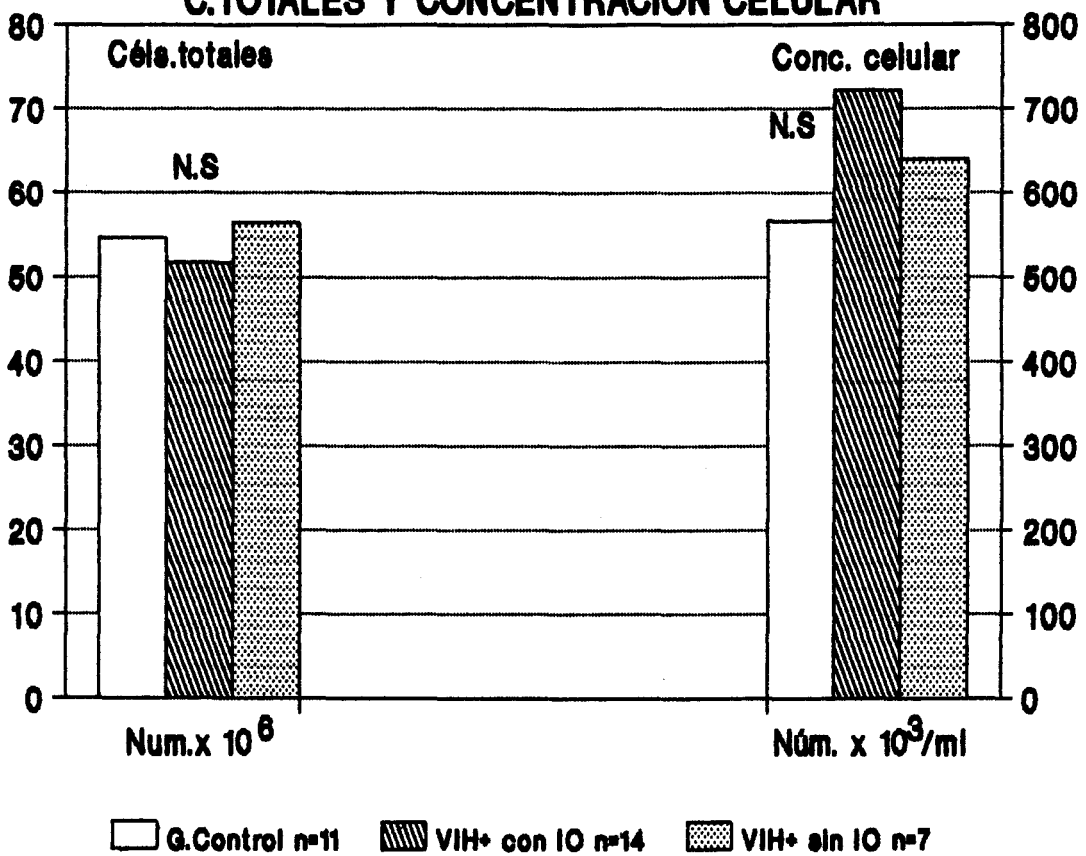
No se evidenció diferencia significativa en el n° de células totales ni en la concentración celular entre ambos grupos (ver también FIGURA 3).

Una alveolitis linfocitaria (porcentaje de LINFC >15%) se evidenció en el 66% del total de la población VIH+ (12 de 14 con IO y 2 de 7 sin IO). El porcentaje de LINFC en los 14 pacientes con IO al tiempo del LBA fue significativamente superior al de los pacientes sin IO ( $28.7 \pm 4.3\%$  vs  $13 \pm 2.1\%$ ,  $p=0.005$ ). Considerada la población globalmente, se encontró diferencia significativa con el grupo control en cuanto a porcentaje de LINFC ( $23.5 \pm 3.4\%$  vs  $5.9 \pm 1.6\%$ ,  $p=0.0002$ ).

No existió diferencia significativa en cuanto al porcentaje de NEUTR entre ambas poblaciones, ni entre éstas y el grupo control.

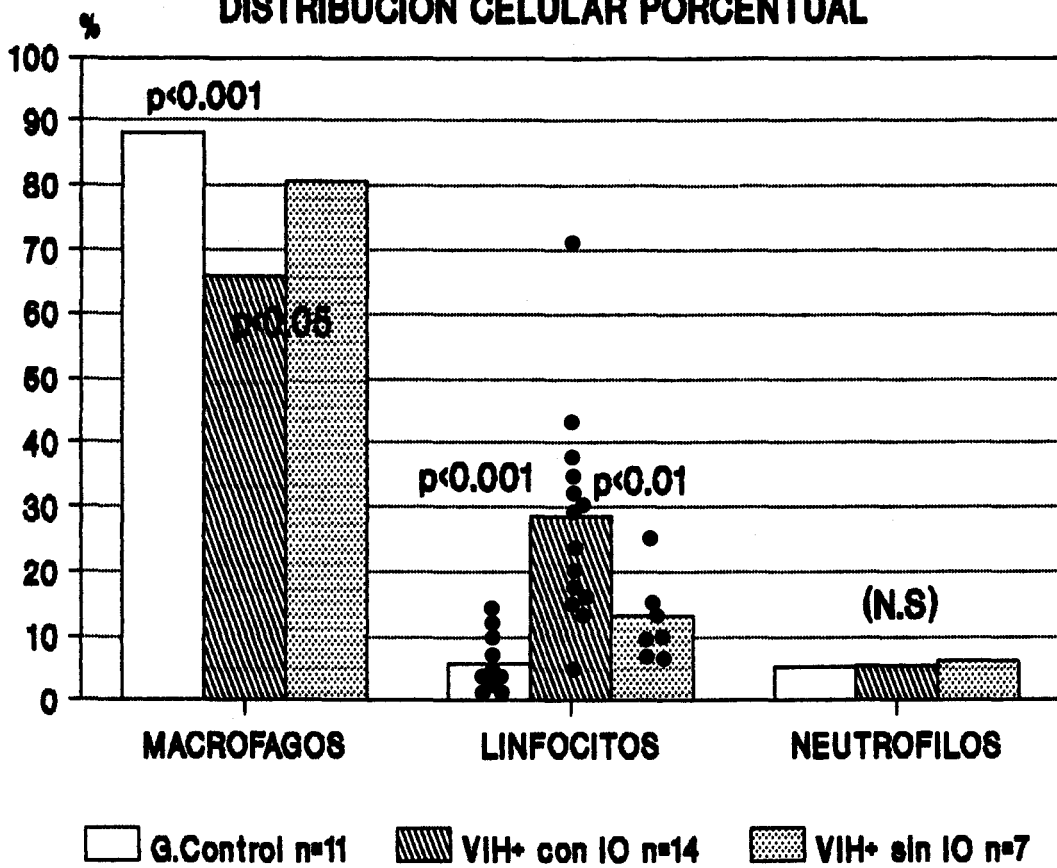
En los pacientes VIH+ con IO, el porcentaje de MAC fue significativamente inferior al de los pacientes sin IO ( $60.8 \pm 4.3$  vs  $80.6 \pm 3.6$ ,  $p=0.03$ ) y al del grupo control ( $88.1 \pm 2.3$ ,  $p=0.0003$ ) (estos resultados se ilustran en la FIGURA 4).

**Figura 3**  
**LBA EN PATOLOGIA PULMONAR ASOCIADA A INFECCION VIH**  
**C.TOTALES Y CONCENTRACION CELULAR**



**IO= Infección oportunista**

**Figura 4**  
**LBA EN PATOLOGIA PULMONAR ASOCIADA A INFECCION VIH**  
**DISTRIBUCION CELULAR PORCENTUAL**



IO = Infección oportunista

#### 4.3 .-Pacientes con sarcoidosis

El diagnóstico de sarcoidosis (SARC) fue establecido en 5 pacientes . En la TABLA 12 se expresan los datos correspondientes al n° total de células, concentración celular y distribución celular porcentual y se comparan con el grupo control. En las FIGURAS 5 y 6 se representan gráficamente estos datos junto a los obtenidos en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad.

Se observó diferencia significativa entre el porcentaje de MAC en este grupo de pacientes y el grupo control ( $p=0.002$ ) y entre el porcentaje de LINFc en ambos grupos ( $44.6\pm 2.7\%$  vs  $8.6\pm 3.2$ ,  $p=0.0007$ ).

El porcentaje de LINFc en este grupo de pacientes con SARC osciló entre 36% y 52%.

Los NEUTR o no se observaron o se vieron en un porcentaje  $\leq 5\%$ . El porcentaje de EOSINF fue en todos los casos 1%.

Aunque el n° total de células y concentración celular fueron mayores en los pacientes con SARC no había diferencia significativa con el grupo control por ser reducido el número de pacientes y la dispersión de datos.

TABLA 12

**PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE SARCOIDOSIS  
CELULARIDAD TOTAL Y DISTRIBUCION CELULAR PORCENTUAL**

Pac.	P.recup	C.total	Cel/ml	MAC	LINFC	NEUTR	EOSINF
<b>SARCOIDOSIS</b>							
1	72	58.4	402.7	49	48	3	<1
2*	40	45.5	758.3	58	42	-	<1
3*	55	11.6	133.3	64	36	-	<1
4*	57	23.8	417.5	50	45	5	<1
5	41	50.0	700.0	45	52	3	<1
=====							
M ±	53.1±	34.8±	482.3±	#53.2±	■44.6±	2.5±	<1
ES	5.9	8.1	113.1	3.4	2.7	0.7	
<b>GRUPO CONTROL (no fumadores)</b>							
M ±	63.6±	18.1±	143.3±	#90.0±	■8.6±	1.3±	-
ES	4.4	1.3	11.6	3.6	3.2	0.3	

Pac, paciente; P.recup, porcentaje recuperado; C.total, n° de células expresado en millones ( $n \times 10^6$ ); Cels/ml, concentración celular expresada en n° de células/ml de fluido recuperado ( $n \times 10^3$ ); MAC, macrófagos; LINFC, linfocitos; NEUTR, neutrófilos; EOSINF, eosinófilos, expresados en porcentajes. M ± ES, media ± error standard.

\* Pacientes no fumadores

# Diferencia significativa ( $p=0.002$ ) entre porcentaje de MAC en SARC y grupo control.

■ Diferencia significativa ( $p=0.0007$ ) entre porcentaje de LINFC en ambos grupos.

#### 4.4.- Pacientes con neumonitis por hipersensibilidad

En la TABLA 13 adjunta se muestran los datos de celularidad y distribución celular porcentual en el grupo de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad (NH) y los del grupo control y se ilustran en las FIGURAS 5 y 6.

El porcentaje de fluido recuperado no mostró diferencia significativa con el obtenido en el grupo control ( $54.5 \pm 5.2\%$  vs  $63.6 \pm 4.4\%$ ).

Se evidenció una diferencia significativa en la concentración celular que fue superior en el grupo de pacientes con NH que en el control ( $409.3 \times 10^3$  vs  $143.3 \times 10^3$ ,  $p=0.03$ )).

Este grupo presentó un menor porcentaje de MAC ( $52.5 \pm 7.6$  vs  $90 \pm 3.6$ ,  $p=0.01$ ) y un incremento significativo en el porcentaje de LINF (  $44.7 \pm 6.6$  vs  $8.6 \pm 3.2$ ,  $p=0.01$ ), que oscilaron entre 26% y 73%.

Los porcentajes de NEUTR en ambos grupos fueron similares. Tan sólo se observó incremento significativo en el porcentaje de EOSINF (6%) en un paciente; en el resto los porcentajes de estas células fueron despreciables.

TABLA 13

**PACIENTES CON NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD  
CELULARIDAD TOTAL Y DISTRIBUCION CELULAR PORCENTUAL**

Pac	P.recup	C.total	Cel/ml	MAC	LINFC	NEUTR	EOSINF
-----	---------	---------	--------	-----	-------	-------	--------

**NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**

1	60	42.0	350.0	55	42	3	<1
2	45	17.2	191.0	57	42	0.9	<1
3	42	40.5	476.4	58	38	4	<1
4	40	32.0	385.0	67	28	5	<1
5	50	52.8	644.5	44	64	2	<1
6	70	ND	ND	74	26	0.9	<1
7	75	ND	ND	13	73	8	6

=====

M ±	54.5±	36.9±	#409.4±	■52.5±	▨44.7±	3.4±	-
ES	5.2	5.9	74.7	7.6	6.6	0.9	

**GRUPO CONTROL (no fumadores)**

M ±	63.6±	18.1±	#143.3±	■90.0±	▨8.6±	1.3±	-
ES	4.4	1.3	11.6	3.6	3.2	0.3	

Nota.- Para descripción de las distintas abreviaturas ver pie de TABLA 11 (grupo control).

M ± ES, media ± error standard.

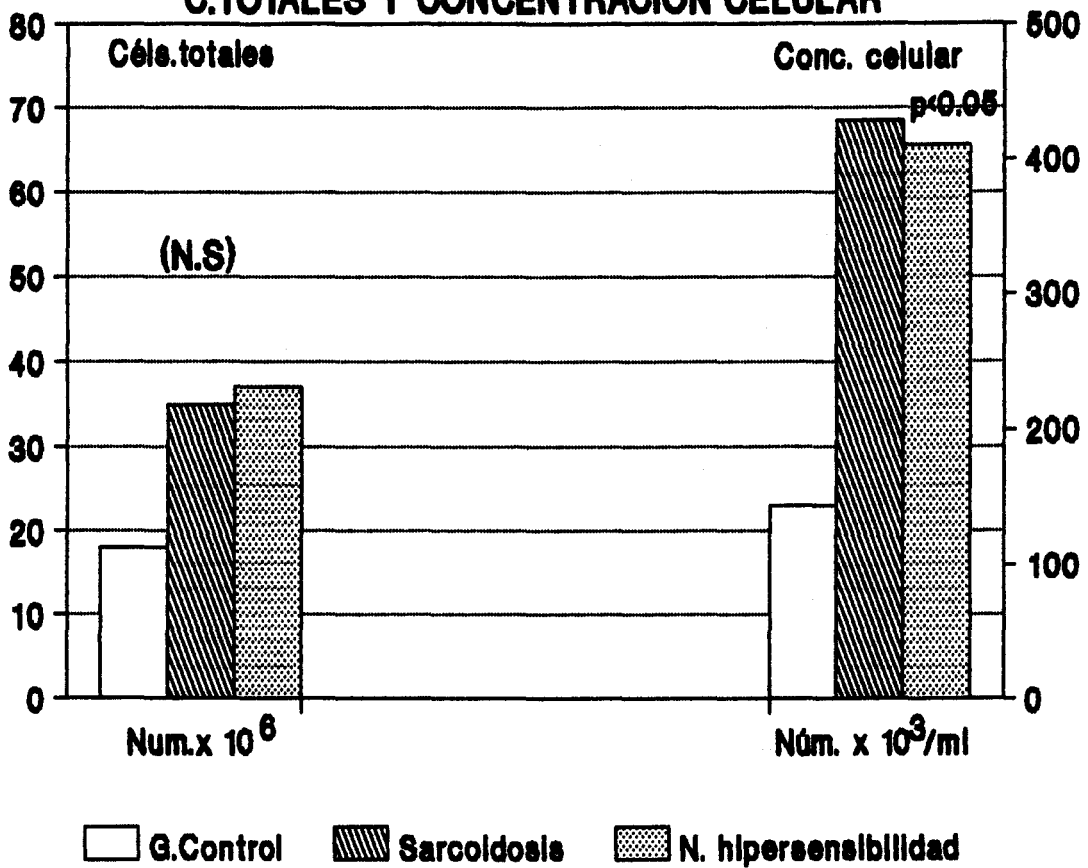
# Diferencia significativa (p=0.03) entre concentraciones celulares en ambos grupos.

■ Diferencia significativa (p=0.01) entre porcentajes de MAC en ambos grupos.

▨ Diferencia significativa (p=0.01) entre porcentajes de LINFC en ambos grupos.

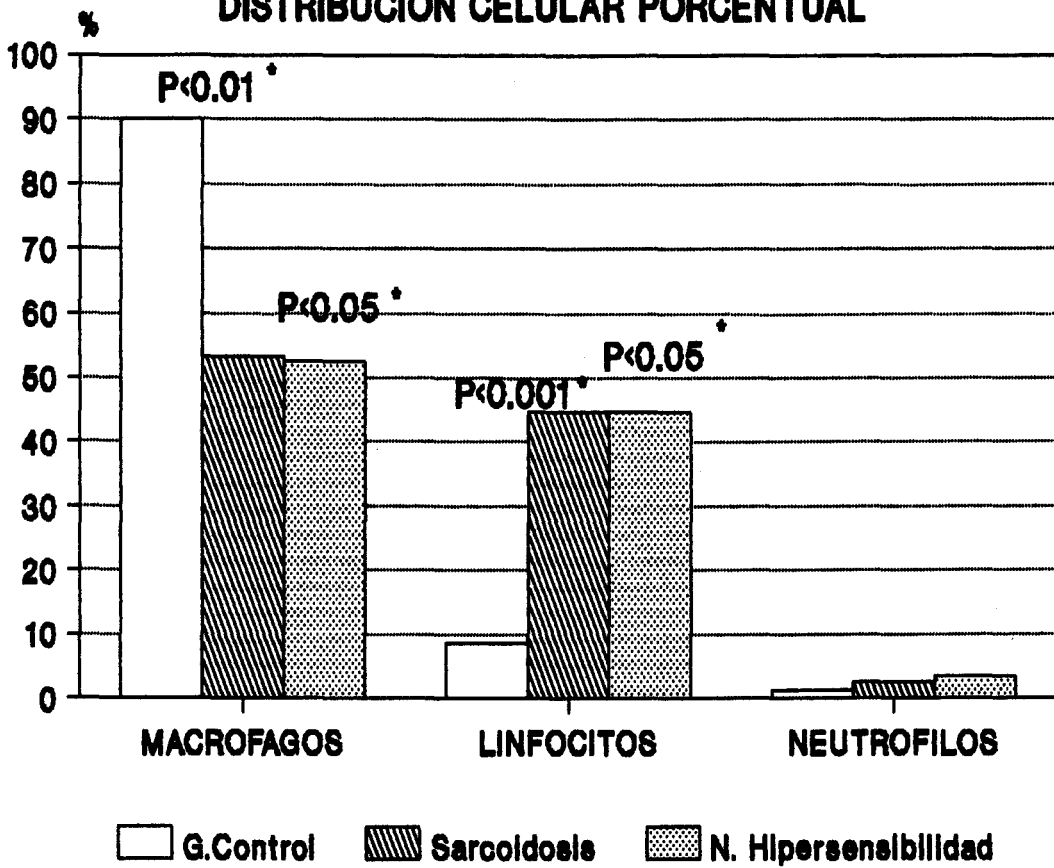


**Figura 5**  
**LBA EN SARCOIDOSIS Y NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**  
**C.TOTALES Y CONCENTRACION CELULAR**



$p < 0.05$ . Diferencia significativa con el grupo control.

**Figura 6**  
**LBA EN SARCOIDOSIS Y NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**  
**DISTRIBUCION CELULAR PORCENTUAL**



(\*) Diferencias significativas con respecto al grupo control

#### 4.5.- Pacientes con neumonía intersticial idiopática

Los datos derivados del recuento celular total y distribución celular porcentual se muestran en la TABLA 14 siguiente y en las FIGURAS 7 y 8.

Este grupo de pacientes fue heterogéneo tanto en edad, hábitos tóxicos, antecedentes de exposición ambiental profesional, repercusión funcional y estadio de enfermedad al tiempo del estudio.

Aunque fue menor el porcentaje de fluido recuperado en este grupo con respecto al grupo control (45.7% vs 50.2%), la diferencia no alcanzó significación probablemente por la gran dispersión de datos (rango 30%-70%).

También se observó dispersión amplia en el n° total de células y concentración celular.

El porcentaje de MAC fue menor en este grupo que en el grupo control debido a un aumento significativo tanto en el porcentaje de NEUTR como de LINFC.

El porcentaje de NEUTR fue significativamente superior al detectado en el grupo control (17.8% vs 5.5%,  $p=0.008$ ) a pesar de estar integrado éste último por una mayoría de pacientes fumadores (8/11).

Tan sólo en un paciente se evidenció un elevado porcentaje de EOSINF en el fluido del LBA (10%) y el estudio de biopsia por toracotomía mostró una neumonía intersticial

TABLA 14

PACIENTES CON NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA (NII) CELULARIDAD TOTAL Y DISTRIBUCION CELULAR PORCENTUAL							
Pac.	P.recup	C.total	Cel/ml	MAC	LINFC	NEUTR	EOSINF
<b>NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA</b>							
<b>Grupo 1 (FPI con confirmación histológica por BPA) n=5</b>							
1	32	48.5	932.6	74	10	16	<1
2	41	43.0	524.0	65	9	26	<1
3*	30	6.2	113.5	80	5	15	<1
4*	53	26.6	302.2	65	23	12	<1
5	55	ND	ND	50	1	39	10
=====							
M ±	42.2±	31.0±	468.0±	66.8±	9.6±	#21.6±	-
ES	5.1	9.5	176.1	5.0	3.7	4.9	
<b>NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA</b>							
<b>Grupo 2 (FPI sin confirmación histológica) n=6</b>							
6*	47	22.8	325.7	97	2	1	<1
7*	46	20.4	291.4	77	17	6	<1
8*	45	50.8	807.1	47	30	23	<1
9*	60	14.0	150.0	57	12	31	<1
10*	49	38.5	447.6	70	22	8	<1
11*	70	ND	ND	52	28	19	<1
=====							
M ±	49.5±	29.3±	404.3±	66.6±	■18.5±	14.6±	-
ES	2.8	6.7	111.2	7.6	4.2	4.6	
<b>POBLACION TOTAL NII (n=11)</b>							
M ±	45.7±	30.0±	432.5±	66.7±	■14.4±	#17.8±	-
ES	3.2	5.2	93.4	4.5	3.0	3.4	
<b>GRUPO CONTROL (n=11)</b>							
M ±	50.2±	54.6±	565.7±	88.1±	■5.9±	# 5.5±	
ES	2.3	21.6	181.7	2.3	1.6	2.4	

Nota.- Para descripción de las distintas abreviaturas ver pie TABLA 11 (grupo control) en pág.95.

M ± ES, media ± error standard.

\* Pacientes no fumadores.

# Diferencia significativa en el porcentaje de NEUTR al comparar grupo control con el de FPI comprobada histológicamente (p=0.005) y con la población total de pacientes con NII (p=0.008).

■ Diferencia significativa en el porcentaje de LINFC al comparar grupo control con el de FPI no comprobada histológicamente (p=0.02) y con la población total de pacientes con NII (p=0.03).

descamativa.

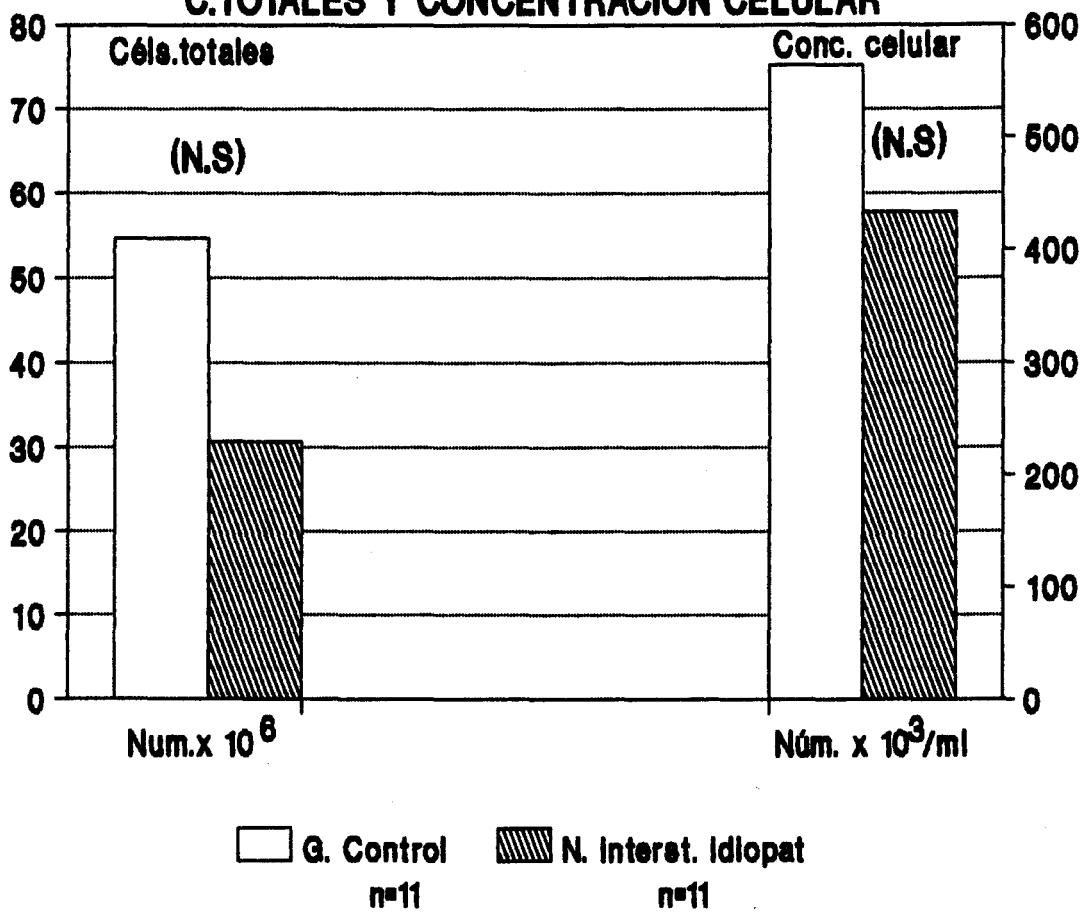
El diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática (FPI) se confirmó mediante biopsia pulmonar abierta (BPA) en 5 pacientes (grupo 1). Los restantes 6 pacientes cumplían criterios clínicos, radiológicos y funcionales propios de esta enfermedad y en la biopsia transbronquial los hallazgos, a pesar de ser inespecíficos, sugerían un proceso fibrótico.

No se encontró diferencia significativa en celularidad total, concentración celular y distribución celular porcentual entre ambos grupos (FPI confirmada histológicamente y FPI no confirmada). Los porcentajes de NEUTR mostraron gran variabilidad interindividual (12%-39% en el primer grupo y 1%-31% en el segundo).

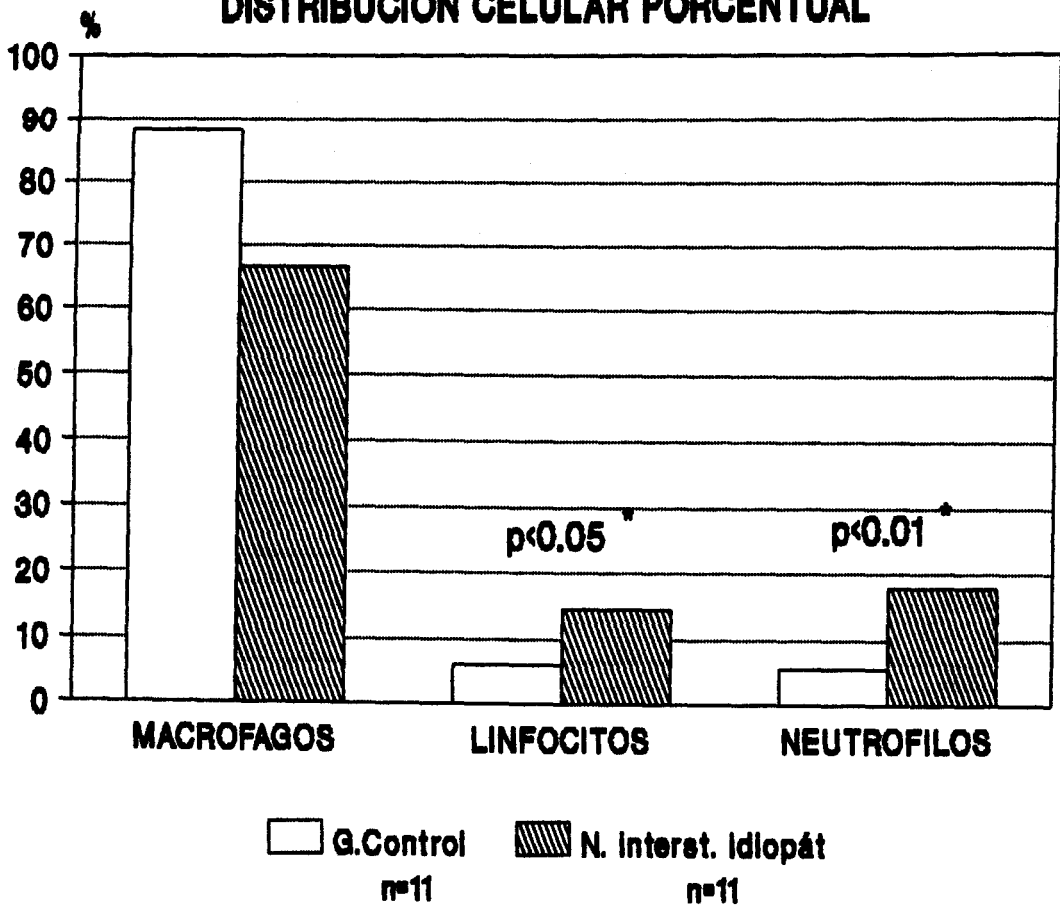
Los porcentajes de LINFc también mostraron valores muy dispersos (1%-23% en el primer grupo y 2%-30% en el segundo). Los más bajos se observaron en los tres pacientes fumadores (pac. 1, 2 y 5).

Por ser reducida la población estudiada no pudo determinarse de forma adecuada la posible correlación entre celularidad y deterioro funcional. Tan sólo pudo evidenciarse que los pacientes con  $VC \leq 50\%$  tenían mayor porcentaje de LINFc en el fluido del LBA que aquellos con  $VC > 50\%$  ( $22.2 \pm 4.7$  vs  $12.6 \pm 3.5$ ) aunque esta diferencia no fue significativa. No

**Figura 7**  
**LBA EN NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA**  
**C.TOTALES Y CONCENTRACION CELULAR**



**Figura 8**  
**LBA EN NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA**  
**DISTRIBUCION CELULAR PORCENTUAL**



(\*) Diferencias significativas con respecto al grupo control

hubo diferencia significativa tampoco entre ambos grupos de pacientes en cuanto al porcentaje de NEUTR que fue similar en ambos grupos (16.5 vs 15.2).

#### 4.6.- Pacientes con neumonía intersticial asociada a enfermedades del colágeno

Este grupo resultó ser homogéneo en edad (edad media 35 años, rango 28-45) no obstante era heterogéneo en cuanto a tipo de conectivopatía. De los 8 pacientes, uno fue diagnosticado de esclerodermia (ESCLERD), 2 de enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) y 5 padecían lupus eritematoso sistémico (LES). Al tiempo del estudio todos los pacientes salvo uno (el diagnosticado de esclerodermia) tomaban corticoides en distintas dosis.

La exploración funcional respiratoria evidenció, en los casos en los que se realizó, un patrón restrictivo puro.

Se realizó estudio de tejido mediante BPA en un paciente (el diagnosticado de esclerodermia), evidenciándose una bronquiolitis obliterante con neumonía parcheada. Una de las pacientes diagnosticadas de LES falleció al poco tiempo de realización del LBA evidenciándose en el estudio necrópsico una neumonía necrotizante por M.tuberculosis.

En la TABLA 15 siguiente se expresan los resultados de celularidad y distribución celular porcentual.



TABLA 15

**PACIENTES CON NEUMONIA INTERSTICIAL  
ASOCIADA A ENFERMEDADES DEL COLAGENO (NI-EC)  
CELULARIDAD TOTAL Y DISTRIBUCION CELULAR PORCENTUAL**

Pac.	P.recup	C.total	Cel/ml	MAC	LINFC	NEUTR	EOSINF
<b>ESCLERD n=1</b>							
1	50	40.5	405.0	51	27	22	<1
<b>EMTC n=2</b>							
2	50	35.7	476.0	83	8	9	<1
3	55	-	-	71	21	8	<1
<b>LES n=5</b>							
4	37	33.5	452.7	76	22	2	<1
5	51	48.2	460.0	96	4	-	<1
6	50	ND	ND	74	25	1	<1
7	31	ND	ND	84	16	-	<1
8	50	ND	ND	83	14	2	<1
=====							
M ±	#43.8±	40.8±	#456.3±	*82.6±	15.6±	Σ 1.3±	-
ES	4.1	7.3	3.6	3.8	3.7	0.2	
<b>TOTAL DE PACIENTES CON NI-EC n=8</b>							
M ±	#45.6±	#39.4±	#448.2±	78.1±	16.1±	Σ 5.3±	-
ES	3.0	3.2	15.2	5.2	3.3	3.0	
<b>GRUPO DE PACIENTES CON NII n=11</b>							
M ±	45.7±	30.0±	432.5±	*66.7±	14.4±	Σ17.8±	-
ES	3.2	5.2	93.4	4.5	3.0	3.4	
<b>GRUPO CONTROL (no fumadores)</b>							
M ±	#63.6±	#18.1±	#143.3±	90.0±	8.6±	1.3±	-
ES	4.4	1.3	11.6	3.6	3.2	0.3	

Nota.- Para ver significado de abreviaturas empleadas ver pie de TABLA 11 (grupo control) en pág. 95.  
M ± ES, media ± error standard.

# Diferencia significativa (DS) en porcentaje recuperado al comparar grupo control con el grupo de pacientes con LES (p=0.02) y con el grupo total de NI-EC (p=0.01).

■ DS en el n° total de células al comparar grupo control y pacientes con NI-EC (p=0.003).

■ DS en la conc. celular al comparar grupo control con los pacientes con LES (p=0.0002) y con el grupo total de NI-EC (p=0.003).

\* DS en el porcentaje de MAC al comparar grupo de pacientes con NII y LES (p=0.04).

Σ DS en el porcentaje de NEUTR al comparar pacientes con NII con el grupo total de NI-EC (p=0.02) y el grupo con LES (p=0.009).

El porcentaje de fluido recuperado fue significativamente inferior en el grupo de pacientes con NI-EC, sobre todo entre los pacientes con LES, en comparación con el grupo control (43.8% vs 63.6%,  $p=0.02$ ). A pesar de ello, tanto el número total de células como la concentración celular fueron mayores tanto en el subgrupo de pacientes con LES como en el grupo total de pacientes con NI-EC al compararlos con el grupo control (ver tabla precedente) sin que pueda atribuirse al hábito tabáquico.

Comparativamente con el grupo de pacientes con NII, el conjunto de pacientes con NI-EC mostró menor porcentaje de NEUTR en el fluido del LBA (5.3% vs 17.8%,  $p=0.02$ ) y menor aún el grupo que incluye sólo los diagnosticados de LES (1.3% vs 17.8%,  $p=0.009$ ).

No se observó diferencia significativa en el porcentaje de LINFC en los distintos subgrupos, no obstante, dado que la concentración de células en el grupo total de NI-EC y particularmente en el grupo con LES era 2-3 veces superior al control, el número absoluto de LINFC/ml de fluido recuperado debe estar incrementado.

El único paciente diagnosticado de esclerodermia en el cual se evidenció una bronquiolitis obliterante con neumonía parcheada en el estudio de biopsia pulmonar, mostró en el fluido del LBA una linfocitosis (27%) con neutrofilia (22%).

#### 4.7.- Pacientes con síndrome de hemorragia alveolar difusa

Cuando se sospechó este diagnóstico en el contexto de un cuadro clínico compatible (infiltrados radiográficos difusos, disnea, anemia y hemoptisis) se evidenció en todos los casos el hallazgo de MAC cargados con hemosiderina.

Ocasionalmente han sido identificadas estas células fuera de este contexto clínico, en pacientes fumadores del grupo control (2/11), en patología pulmonar asociada a infección por VIH (4/21), en patología intersticial difusa (2/26) y en neumonía intersticial asociada a conectivopatía (1/12).

En 3 de los 9 pacientes incluidos en este grupo el aspecto del fluido de LBA fue serohemorrágico con un cierto tinte herrumbroso de predominio en las últimas alíquotas recuperadas.

Dado que la intención del LBA en estos pacientes era descartar un agente infeccioso e identificar MAC cargados con hemosiderina no se realizó estudio de distribución celular porcentual.

**5.- ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO EN LA SERIE LINFOIDE Y LINEA MONOCITO-MACROFAGICA (MoMAC)**

**5.1.- Grupo control**

A pesar del empleo de técnicas de enriquecimiento de LINFc, tan sólo fue posible determinar con seguridad los porcentajes de las distintas subpoblaciones linfocitarias en tres pacientes. Los valores se muestran en la TABLA 16.

**TABLA 16**

GRUPO CONTROL									
ANTIGENOS DE SUPERFICIE EN LINFOCITOS DEL FLUIDO DE LBA									
Pac.	LINFc	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD20	CD57	CD25	CD71
Porcentaje de células positivas									
1	7	70	45	23	1.95	7	10	4	3
2	15	68	39	24	1.62	5	12	16	6
3	11	54	35	30	1.13	2	7	3	14
=====									
M ±	11±	64±	40±	25.6±	1.5±	4.6±	9.6±	7.6±	7.6±
ES	2.3	5.0	2.9	2.1	0.2	1.4	1.4	4.1	3.2
INTENSIDAD*	2-3+	2-3+	2-3+			1-2+	2-3+	1-2+	1-2+

Pac, paciente; LINFc(%), porcentaje de linfocitos en el estudio de distribución porcentual.  
 Nota.- Para descripción de los distintos CD ver el apartado 3.6 en MATERIAL y METODOS (pág.79).  
 Datos expresados como porcentajes de LINFc que muestran positividad frente a un determinado AcMo.  
 M ± ES, media ± error standard.  
 \*INTENSIDAD: Mediante IFI la intensidad de fluorescencia fue valorada según escala 0 a 3+.

La suma de porcentajes de células T4<sup>+</sup> y T8<sup>+</sup> resultó muy próxima al porcentaje de células T3<sup>+</sup>, sin embargo la linfocitos suma (T+B+NK) resultó ser muy baja (<85%) en un paciente. La expresión de Ags de activación evidenciados por los AcMo frente a CD25 Y CD71 mostró porcentajes muy bajos.

El estudio de expresión de Ags presentes en la línea MoMAC mostró los resultados expuestos en la TABLA 17.

La existencia de fluorescencia inespecífica en el citoplasma de las células (autofluorescencia) fue significativamente superior en los MAC de fumadores que en los no fumadores y más evidente en los MAC de tamaño grande/intermedio que en los pequeños macrófagos. Esto podría originar una dificultad en la lectura de fluorescencia específica en superficie celular, no obstante, aún coincidiendo ambas son fácilmente distinguibles si se emplean criterios estrictos.

Los AcMo CD11b, CD11c y CD14 reaccionaron con un escaso porcentaje de MAC alveolares en los sujetos fumadores y no fumadores incluidos en nuestro grupo control. Las medias de porcentajes de MAC con expresión de Ag en superficie suficiente para ser detectada por IFI fueron variables, oscilando, según hábito tabáquico, entre 25% y 30% (fum/nofum) con AcMo frente a CD11b, entre 14.5% y 31.6% frente a CD11c y entre 23.5% y 24.3% frente a CD14.

TABLA 17

GRUPO CONTROL							
EXPRESION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE LINEA MONOCITO-MACROFAGO EN EL FLUIDO DE LBA							
Pac.	MAC	AUTOFLU	CD11b	CD11c	CD14	HLADR	CD71
Porcentaje de células positivas							
FUMADORES n=8							
1	95	90	12	25	26	55	74
2	88	52	57	23	19	88	82
3	94	85	32	26	44	87	78
4	69	68	18	4	11	58	77
5	86	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	93	80	13	5	19	73	68
7	85	90	18	4	22	54	71
8	92	ND	ND	ND	ND	ND	ND
=====							
M ±	87.7±	#77.5±	25±	14.5±	23.5±	69.1±	75±
ES	3.0	6.0	7	4.5	4.5	6.4	2
INTENSIDAD*			2-3+	1-2+	2-3+	2-3+	2-3+
=====							
NO FUMADORES n=3							
9	95	40	35	20	25	85	80
10	81	54	36	39	6	87	74
11	92	36	19	36	43	76	82
=====							
M ±	89.3±	#43.3±	30±	31.6±	24.6±	82.6±	78.6±
ES	4.2	5.4	5.5	5.8	10.6	3.3	2.4
INTENSIDAD			2-3+	1-2+	2-3+	2-3+	2-3+
=====							
POBLACION TOTAL n=11							
M ±	88.1±	66.1±	26.6±	20.2±	23.7±	73.6±	76.2±
ES	2.3	7.0	4.8	4.4	4.3	4.8	1.6

Pac, paciente;MAC,porcentaje de macrófagos en estudio de distribución celular porcentual;AUTOFLU, porcentaje de MAC que muestran autofluorescencia; CD11b y CD11c son moléculas de adhesión que, entre otras funciones, actúan como receptores para componentes del sistema del complemento (C3bi); CD14,antígeno de diferenciación de presentación exclusiva en la línea MoMAC; HLADR, Ag de clase II del MHC; CD71, receptor para transferrina. Los datos se expresan en porcentajes de MAC observados que muestran positividad frente a un determinado AcMo evidenciada mediante IFI.

M ± ES, media ± error standard.

# Diferencia significativa (p=0.009) en el porcentaje de MAC que muestran autofluorescencia (fluorescencia inespecífica) al comparar MAC del fluido de LBA obtenido de fumadores y no fumadores. terminado AcMo evidenciada mediante IFI.

\* INTENSIDAD.-Mediante técnica de IFI, la intensidad de fluorescencia fue valorada según escala de 0-3+

Los AcMo frente HLADR y receptor de transferrina (CD71) evidenciaron una amplia expresión de estos Ags, variable según la existencia o no de hábito tabáquico.

La expresión de HLADR osciló así entre el 69% y 82% (fum/no fum) y la de CD71 entre 75% y 78% (fum/no fum).

Así como en el estudio de distribución celular tras tinción adecuada se observó una gran diversidad de tamaños y morfología en esta población celular, tras realizar estudio de inmunofenotipo también existía gran disparidad en la expresión de Ags propios de esta serie MoMAC lo que indica también su posible heterogeneidad funcional. Así, los MAC más pequeños mostraban gran intensidad en la expresión de Ags que actúan, entre otras funciones, como receptores para fracciones del complemento (CD11b, CD11c) y de CD14 (expresado intensamente en monocitos de sangre periférica).

Sin embargo los MAC alveolares de aspecto intermedio y grande presentaban mayor expresión HLADR. La intensidad de expresión de CD71 fue más homogénea.

## 5.2.- Grupo de pacientes con inmunosupresión por VIH

De los 21 pacientes incluidos en estudio, en 14 existía una IO y en 7 no se evidenció IO al tiempo del LBA. Como ha sido mostrado en el apartado 4.2 de esta sección de RESULTADOS, se observó una linfocitosis en el fluido del LBA en el 66% de los pacientes con IO y la media del porcentaje de LINFC en estos pacientes fue significativamente superior a la observada en los pacientes sin IO ( $28.7 \pm 4.3\%$  vs  $13 \pm 2.1\%$   $p=0.005$ ). Cada uno de estos subgrupos presentaron una media de porcentajes superior a la del grupo control ( $5.9 \pm 1.6\%$ ).

En la TABLA 18 y FIGURAS 9 y 10 se muestra la distribución de las distintas subpoblaciones linfocitarias.

El porcentaje de células CD3+ en la población VIH+ se conservó e incluso mostró un porcentaje incrementado con respecto al control ( $79 \pm 3\%$  vs  $64 \pm 5\%$ ,  $p=0.05$ ).

No se observó diferencia significativa en el porcentaje de células CD3+ entre pacientes con IO y sin IO.

El porcentaje de células CD4+ en pacientes con IO fue significativamente inferior al determinado en el grupo control ( $14 \pm 2.8\%$  vs  $40 \pm 2.9\%$ ,  $p=0.002$ ). Cinco de los 14 pacientes con IO al tiempo del estudio mostraron porcentajes de células CD4+  $<10\%$ . No se observó diferencia significativa entre los pacientes con IO y sin IO ( $14 \pm 2.8\%$  vs  $16 \pm 7.3\%$ ).



Tras determinar el número absoluto de céls. CD4+/ml de fluido recuperado pudo observarse una concentración similar a la observada en el grupo control (datos no mostrados en tabla).

En el grupo total de pacientes VIH+, el incremento porcentual de LINFc en el fluido del LBA, pudo ser causado por un incremento porcentual y en número absoluto de células CD8+ comparativamente con el grupo control ( $70 \pm 3.6\%$  vs  $25 \pm 2.1\%$ ,  $p=0.007$ ).

No hubo diferencia significativa en el porcentaje de células CD8+ al comparar grupo de pacientes con IO y sin IO, aunque si se observó una mayor cantidad de células CD8+ por ml de fluido recuperado en el grupo de pacientes con IO pero sin significación estadística debido a la dispersión de datos.

El índice CD4/CD8 resultó así significativamente descendido con respecto al control, tanto en pacientes VIH+ con IO ( $0.23 \pm 0.06$  vs  $1.5 \pm 0.2$ ,  $p=0.002$ ) como sin IO ( $0.31 \pm 0.2$  vs  $1.5 \pm 0.2$   $p=0.04$ ), sin embargo, no se encontró diferencia en este parámetro entre ambos subgrupos.

En el subgrupo de pacientes VIH+ con IO se observó también un mayor porcentaje de células CD57+ (uno de los marcadores de células de estirpe NK coexpresado también por las células CD8+) al compararlo con el subgrupo sin IO ( $18 \pm 2.6\%$  vs  $9.4 \pm 3.2\%$ ), aunque esta diferencia sólo mostró

TABLA 18

GRUPO DE PACIENTES CON INMUNOSUPRESION POR VIH  
ANTIGENOS DE SUPERFICIE EN LINFOCITOS DEL FLUIDO DE LBA

Pac.LINFC CD3 CD4 CD8 CD4/CD8 CD57 CD25 CD71 CD69 HLADR  
Porcentaje de células positivas

CON INFECCION OPORTUNISTA (IO)n=14

1	14	65	4	70	0.05	25	ND	ND	ND	ND
2	17	88	11	74	0.14	0.9	ND	ND	ND	ND
3	39	51	11	52	0.21	17	ND	ND	ND	ND
4	18	85	30	60	0.50	10	<1	<1	<1	5
5	34	95	9	87	0.10	6	2	<1	26	11
6	32	86	1	84	0.01	14	4	6	42	15
7	5	82	15	75	0.20	16	<1	2	7	<1
8	22	72	32	62	0.51	18	<1	<1	14	5
9	28	85	25	75	0.33	15	<1	3	19	4
10	21	91	11	76	0.14	36	<1	<1	6	21
11	26	48	26	30	0.86	28	<1	<1	<1	2
12	30	77	0.9	70	0.01	17	<1	<1	<1	12
13	73	70	2	62	0.03	14	5	<1	25	2
14	44	92	13	96	0.13	33	11	26	76	17

=====  
M ± 28± 77± 14± 69± 0.23± 18±  
ES 4.3 3.9 2.8 4.3 0.06 2.6

SIN INFECCION OPORTUNISTA (NO IO) n=7

15	11	93	7	90	0.07	11	ND	ND	ND	ND
16	9	70	2	65	0.03	21	ND	ND	ND	ND
17	25	84	10	76	0.13	<1	<1	<1	<1	8
18	11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	8	93	16	84	0.19	5	<1	<1	11	<1
20	13	88	52	39	1.33	3	<1	<1	<1	9
21	15	77	11	75	0.14	16	<1	<1	<1	2

=====  
M ± 13± 84± 16± 71± 0.31± 9.4±  
ES 2.1 3.7 7.3 7.3 0.2 3.2

POBLACION TOTAL n=21

M ± 24± 79± 14± 70± 0.26± 15±  
ES 3.4 3 2.8 3.6 0.07 2.1  
INTENS. 2+ 2+ 2+

GRUPO CONTROL

M ± 5.9± 64± 40± 25± 1.5 ± 9.6± 7.6± 7.6± - -  
ES 1.6 5.0 2.9 2.1 0.2 1.4 4.1 3.2

Nota: -La significación de las distintas diferencias entre grupos son referias en el texto.

**Figura 9**  
**LBA EN PATOLOGIA PULMONAR ASOCIADA A INFECCION VIH**  
**EXPRESION DE ANTIGENOS DE SERIE LINFOIDE**

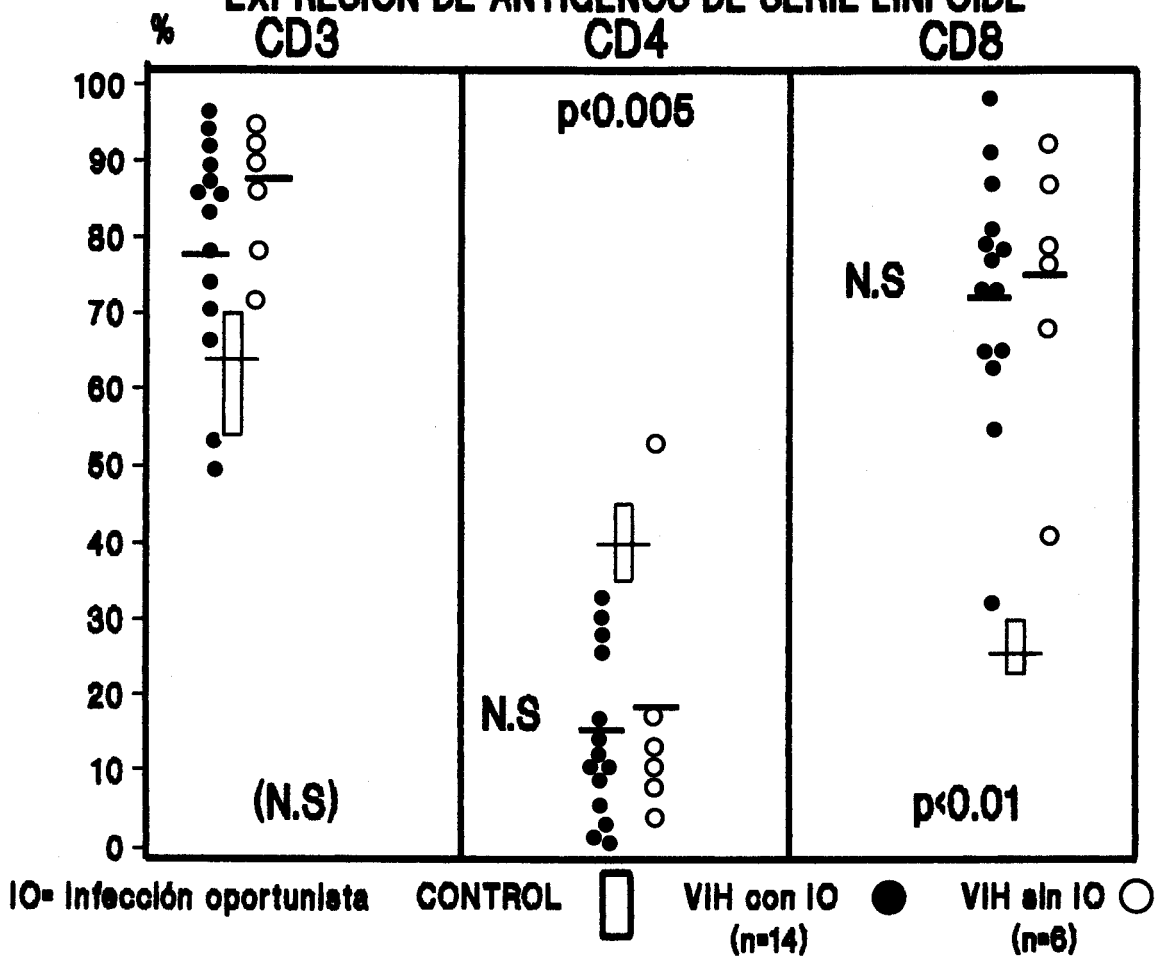
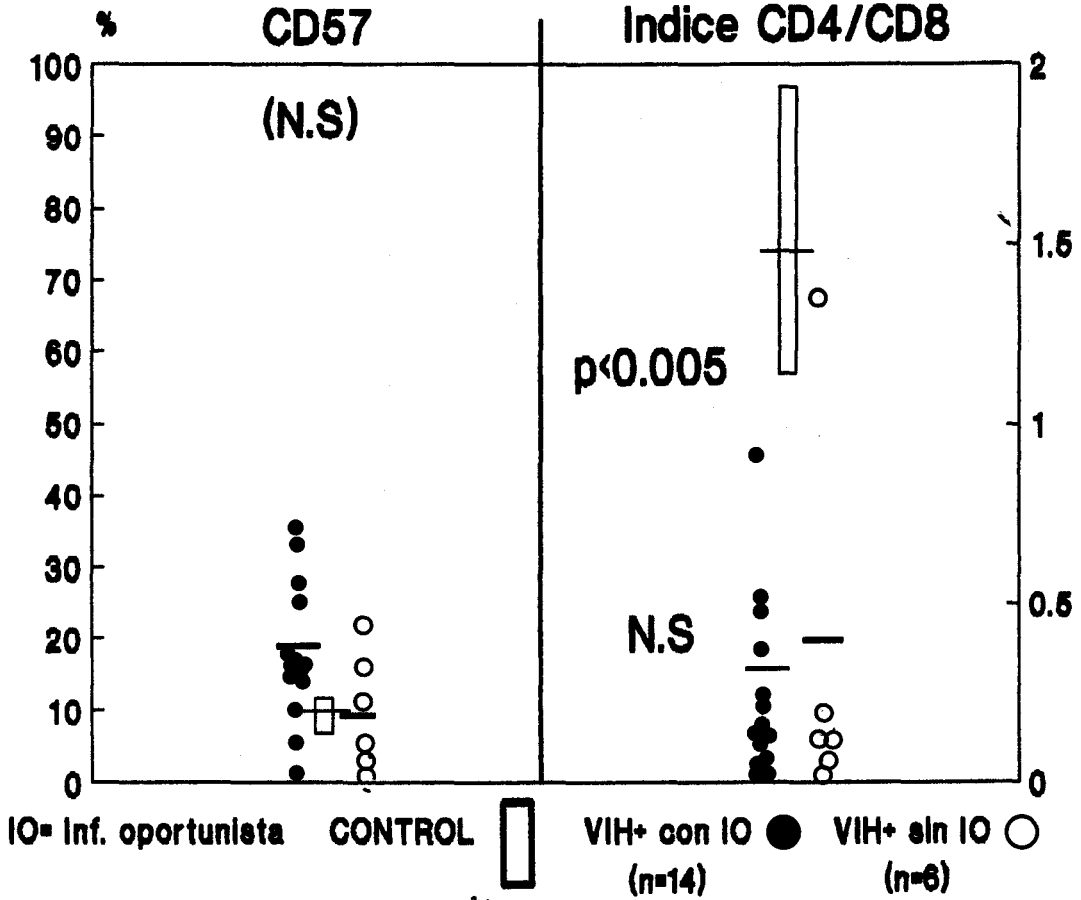


Figura 10

LBA EN PATOLOGIA PULMONAR ASOCIADA A INFECCION VIH

EXPRESION DE ANTIGENOS DE SERIE LINFOIDE



tendencia a la significación ( $p=0.07$ ). En relación con el grupo control, aunque no había diferencia porcentual significativa, sí se evidenció mayor número absoluto de estas células por ml. de fluido recuperado.

El estudio de subpoblaciones linfocitarias mediante IFI con empleo de un sólo fluorocromo (fluoresceína) puede aportar resultados erróneos derivados de la coexpresión de determinados CD por distintas poblaciones celulares. Así, la población NK y linfocitos T supresores-citotóxicos coexpresan tanto CD8 como CD57. La expansión de una de ambas poblaciones conllevaría un incremento paralelo en la expresión de ambos marcadores. En la población VIH+ se ha observado así una correlación importante y significativa en la expresión de ambos ( $r=0.92$ ,  $p<0.0001$ ).

El posible error inducido por expansión más selectiva de la población NK se puso de manifiesto en 7 de 19 pacientes en los cuales la "linfosuma" CD4+CD8 superó ampliamente el porcentaje de células CD3+. En estos pacientes el porcentaje de células CD57+ osciló entre 15 y 33%.

La expresión de Ags propios de estado de activación funcional fue muy heterogénea y no se asoció a evidencia de IO. La expresión de CD25 (receptor para IL-2) y CD71 (receptor para transferrina) fue en ambos casos muy débil y en la mayor parte de las muestras no superó el 5-6% de las células estudiadas. La expresión de CD69 (Ag. inicial de

activación de céls T) fué mas intensa pero con más dispersión oscilando entre <1% y el 76% de las células estudiadas.

La expresión de HLADR (Ag de clase II del MHC) tambien mostró gran variabilidad, oscilando entre <1% y 21% de las células estudiadas. Tanto la de CD69 como HLADR fueron más intensas en los casos de IO.

El estudio de expresión de Ag propios de la linea MoMAC mostró los resultados que se expresan en la TABLA 19 y FIGURAS 11 y 12.

El incremento significativo en el porcentaje y número absoluto de LINFc se acompañó de un descenso significativo en el porcentaje de MAC ( $88\pm 2.3\%$  vs  $70\pm 3.4$ ,  $p=0.001$ ) comparativamente con el grupo control.

No se evidenció ninguna diferencia ni en porcentaje ni en intensidad de expresión de los Ags CD11b, CD11c y CD14 entre el subgrupo con IO y sin IO. Al comparar estos subgrupos con el grupo control tampoco se observaron diferencias en el porcentaje de células positivas para los Ags referidos aunque sí se apreció una diferencia en la intensidad de fluorescencia, mayor en el grupo control. Una de las explicaciones para este hallazgo es la existencia de un menor número de receptores en superficie celular en los pacientes con infección VIH comparativamente con el grupo control.

TABLA 19

**PACIENTES CON INMUNOSUPRESION POR VIH  
EXPRESION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE  
LINEA MONOCITO-MACROFAGO EN EL FLUIDO DEL LBA**

Pac.	MAC	AUTOFLU	CD11b	CD11c	CD14	HLADR	CD71
Porcentaje de células positivas							

**CON INFECCION OPORTUNISTA n=14**

1	86	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	76	45	14	5	8	33	6
3*	61	88	42	12	28	72	25
4*	82	85	27	16	32	75	46
5	52	90	28	3	14	52	9
6	67	70	35	8	21	68	52
7	86	90	30	23	17	63	47
8	73	80	36	42	28	68	72
9	54	90	26	18	7	94	23
10	78	20	30	27	15	10	48
11*	56	76	19	9	15	54	54
12*	68	80	22	2	6	5	5
13	26	40	21	5	3	25	9
14	56	46	11	8	3	58	32

M ±	70.2±	65.7±	26.2±	13.6±	15.9±	52±	33±
ES	6.1	4.3	2.4	3.1	2.6	7.3	6

**SIN INFECCION OPORTUNISTA n=7**

15	83	85	18	5	8	69	37
16*	88	70	18	11	9	38	17
17	65	85	9	4	12	65	15
18	72	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19*	92	35	45	18	30	82	31
20	87	60	38	17	22	68	25
21	77	85	21	11	17	65	38

M ±	72±	80.5±	24.8±	11±	16.3±	64.5±	27.1±
ES	9.8	3.6	5.5	2.3	3.4	5.8	4.0

**POBLACION TOTAL N=21**

M ±	70±	69.4±	25.7±	12.8±	16±	56±	31.1±
ES	3.4	5.2	2.3	2.2	2.0	5.4	4.3
INTENSIDAD			1-2+	1-2+	1-2+	1-2+	1-2+

**G.CONTROL n=11**

M ±	88±	66.1±	26.6±	20.2	23.7±	73.6±	76.2±
ES	2.3	7.0	4.8	4.4	4.3	4.8	1.6
INTENSIDAD			2-3+	1-2+	2-3+	2-3+	2-3+

**Figura 11**  
**LBA EN PATOLOGIA PULMONAR ASOCIADA A INFECCION VIH**  
**EXPRESION DE ANTIGENOS DE LINEA MoMAC**

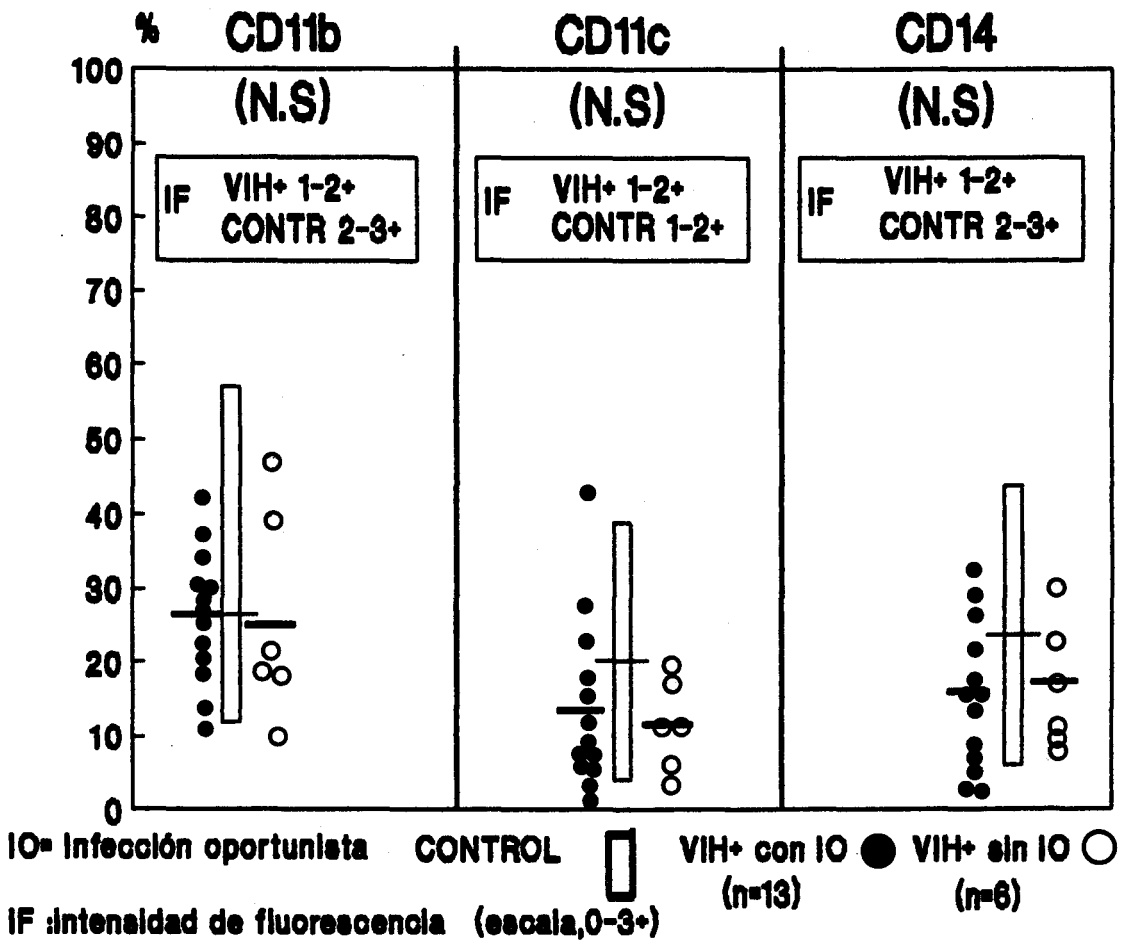
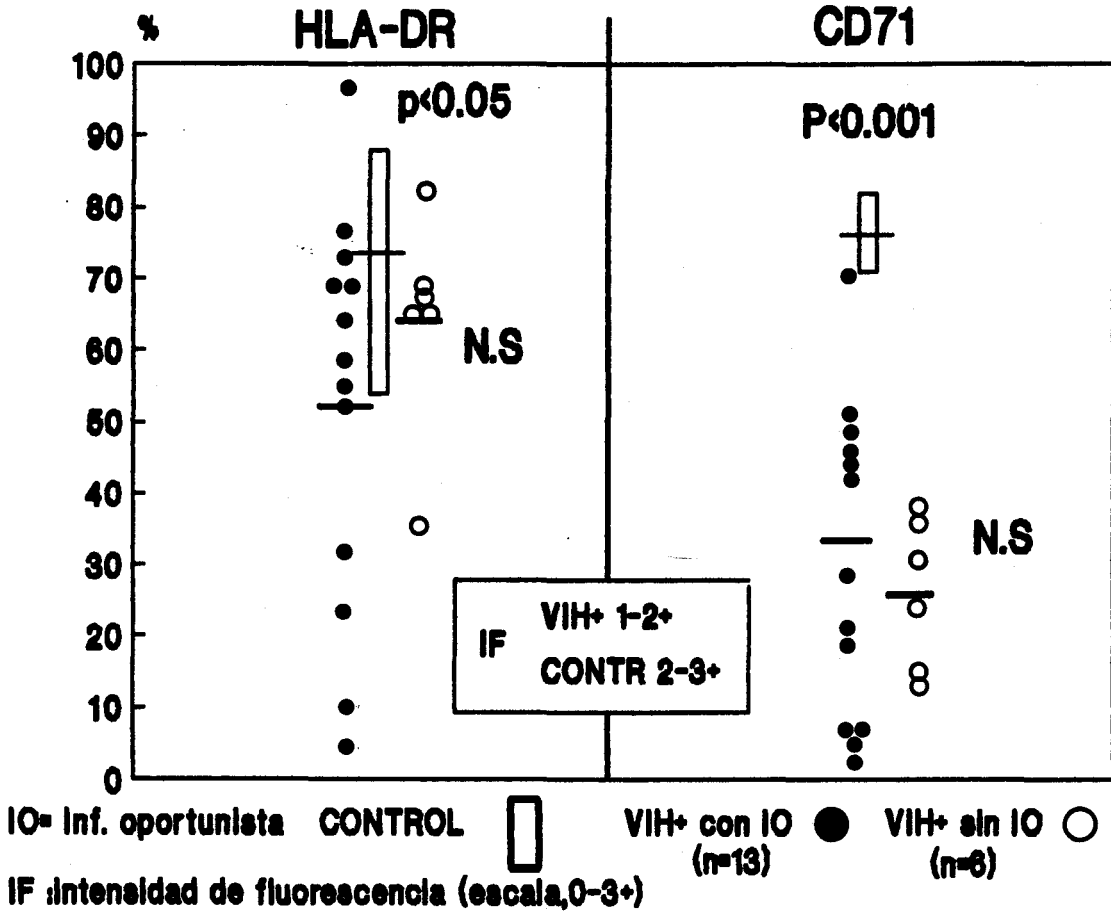




Figura 12

LBA EN PATOLOGIA PULMONAR ASOCIADA A INFECCION VIH  
 EXPRESION DE ANTIGENOS DE LINEA MoMAC



El Ag CD11b parece ser más expresado que CD14 y que CD11c (este último es predominante en MAC de tamaño grande y aspecto maduro). No obstante, se ha podido evidenciar una excelente correlación en la expresión entre estos Ags, CD11b/CD14,  $r=0.70$ ,  $p=0.0008$ ; CD11b/CD11c,  $r=0.53$ ,  $p=0.01$  y CD11c/CD14  $r=0.50$ ,  $p=0.02$ ).

La expresión de HLADR (Ag de clase II del CMH), esencial en la presentación de Ag por parte de la célula macrofágica al linfocito T, fue significativamente inferior al observado en el grupo control, tanto en intensidad como porcentualmente ( $56\pm 5.4\%$  vs  $73.6\pm 4.8\%$ ,  $p=0.05$ ).

El receptor para la transferrina (CD71), cuya expresión se relaciona con un estado de activación metabólica y proliferación celular, se expresó como promedio en el 76.2% de los MAC de pacientes del grupo control, mientras que en el grupo de pacientes VIH+ se evidenció en tan sólo el 31.1% ( $p<0.001$ ), mostrando además una menor intensidad de fluorescencia.

### 5.3 .- Grupo de pacientes con sarcoidosis

El porcentaje de LINFC en este grupo fue significativamente superior al determinado en el grupo control ( $44.6 \pm 2.7$  vs  $8.6 \pm 3.2$ ,  $p=0.0003$ ). La distribución de subpoblaciones linfocitarias y expresión de marcadores de activación se muestran en la TABLA 20 siguiente y en FIGURAS 13 y 14 junto a los datos obtenidos en neumonitis por hipersensibilidad (apartado 5.4 en esta misma sección).

El porcentaje de células CD3+ fue mayor en este grupo que en el grupo control ( $82.2 \pm 5.9$  vs  $64 \pm 5$ ) aunque sin significación estadística. Fue más relevante el incremento en el porcentaje de células CD4+ en este grupo con respecto al control ( $69.2 \pm 3.7\%$  vs  $40 \pm 2.9\%$ ,  $p=0.001$ ); el porcentaje de células CD8+ no mostró diferencia significativa entre ambos grupos ( $19.8 \pm 2.9\%$  vs  $25.6 \pm 2.1\%$ ).

El incremento en el porcentaje de células CD4+ originó un aumento significativo en el índice CD4/CD8 comparativamente con el grupo control ( $3.76 \pm 0.5$  vs  $1.5 \pm 0.2$ ,  $p=0.01$ ; rango 2.57-5.25).

El porcentaje de células CD57+, como media, fue similar al encontrado en el grupo control (11.8% vs 9.6%, NS).

TABLA 20

**PACIENTES CON SARCOIDOSIS  
ANTIGENOS DE SUPERFICIE EN LINFOCITOS DEL FLUIDO DE LBA**

Pac.	LINFC (%)	Porcentaje de células positivas							
		CD3	CD4	CD8	Indice	CD57	CD25	CD71	HLADR
1	48	85	75	14	5.25	5	11	0.9	35
2	42	82	75	22	3.40	12	14	7	20
3	36	94	72	28	2.57	3	30	6	20
4	45	60	55	12	4.58	30	5	6	22
5	52	90	69	23	3.00	9	20	11	45

=====

M ± #	44.6±	82.2±	69.2±	19±	3.7±	11.8±	13±	7.9±	30.2±
ES	2.7	5.9	3.7	2.9	0.5	4.8	2.9	2.3	4.7
INTENSIDAD*	2-3+	2-3+	2-3+			1-2+	1-2+	1-2+	2-3+

**GRUPO CONTROL (no fumadores)**

M ± #	11±	64±	40±	25.6±	1.5±	9.6±	7.6±	7.6±	ND
ES	2.3	5.0	2.9	2.1	0.2	1.4	4.1	3.2	
INTENSIDAD	2-3+	2-3+	2-3+			2-3+	1-2+	1-2+	

M ± ES, media ± error standard. ND, no determinado.

# Diferencia significativa (p=0.0003) entre porcentaje de LINFC en pacientes con SARC y control.

■ Diferencia significativa (p=0.001) entre porcentaje de células CD4+ en pacientes con SARC y control.

▨ Diferencia significativa (p=0.01) entre índice CD4/CD8 en pacientes con SARC y control.

\* INTENSIDAD: mediante IFI la intensidad de fluorescencia fue valorada según escala 0-3+.

Nota.- Para descripción de abreviaturas ver apartado 3.6 en sección MATERIAL Y METODO (pág.79).

La expresión de marcadores de activación fue variable y sin diferencia significativa con respecto al grupo control.

Fue llamativa la discrepancia entre el alto porcentaje de células CD25+ esperado teóricamente y el bajo porcentaje evidenciado de estas células (IL-2R+), sin diferencia con el grupo control (10±2.6% vs 7.6±2.1%). La comparación de núme-

ros absolutos de estas células sí muestra clara diferencia.

La "linfosuma" CD4 + CD8 superó el porcentaje de células CD3+ (Linf T totales) entre el 2-7% en cuatro pacientes y en uno (n°2) en un 15%. La suma CD4+CD8+CD57+ no superó en ninguno de los cinco casos el 100%.

El porcentaje de MAC fue menor en este grupo que en el control al producirse expansión de la población linfocitaria ( $53.2 \pm 3.4\%$  vs  $89.3 \pm 4.2\%$ ,  $p=0.002$ ). El porcentaje de células autofluorescentes no mostró diferencia con respecto al control.

La expresión de Ags de superficie CD11b, CD11c, CD14, CD71 y HLADR se muestra en la TABLA 21 siguiente y FIGURAS 15 y 16 (apartado 5.4 de esta misma sección).

CD11b se expresó con gran intensidad de fluorescencia (3+) y en porcentaje superior al control ( $68.4 \pm 4.7\%$  vs  $26.6 \pm 4.8\%$ ,  $p=0.01$ ). Dicha expresión se observó tanto en MAC con morfología madura como en pequeñas células similares al monocito, aunque la intensidad de fluorescencia predominó en estas últimas.

CD11c también mostró mayor expresión que en el grupo control pero predominó en células con morfología y tamaño propios de MAC maduro.

La expresión de CD14 fue significativamente superior a la observada en el grupo control, tanto porcentualmente

TABLA 21

PACIENTES CON SARCOIDOSIS  
 EXPRESION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE  
 LINEA MONOCITO-MACROFAGO EN EL FLUIDO DE LBA

Pac.	MAC (%)	AUTOFLU	CD11b	CD11c	CD14	CD71	HLADR
Porcentaje de células positivas							
1	49	75	82	45	68	74	89
2	58	35	72	65	67	83	95
3	64	23	53	27	40	77	41
4	50	30	70	55	60	95	95
5	45	42	65	46	78	79	90
=====							
M ± ES	#53.2± 3.4	41± 9.0	■68.4± 4.7	47.6 6.2	*62.6± 6.3	81.6± 3.6	82 ± 10
INTENSIDAD			3+	2+	3+	3+	3+
=====							
GRUPO CONTROL (no fumadores)							
M ± ES	#89.3 4.2	43.3± 5.4	■ 30± 5.5	31.6± 5.8	*24.6± 10.6	78.6± 3.3	82.6± 2.4
INTENSIDAD			2-3+	1-2+	2-3+	2-3+	2-3+

M ± ES, media ± error standard.

# Diferencia significativa (p=0.002) entre % MAC en pacientes con SARC y control.

■ (p=0.01) entre % céls CD11b+ en ambos grupos.

\* (p=0.01) entre % céls CD14 + en ambos grupos.

INTENSIDAD.-Mediante IFI la intensidad de fluorescencia fue valorada según escala de 0-3+.

(62.6±6.3% vs 24.6±10.6, p=0.01) como en intensidad de fluorescencia . Este Ag se expresó predominantemente en células de tamaño similar al monocito.

El porcentaje de células CD71+ en estos pacientes fue similar al observado en el grupo control, aunque la intensidad fue superior.

HLADR no mostró diferente expresión porcentual en relación con el grupo control ( $82 \pm 10\%$  vs  $78.6 \pm 2.4\%$ ), aunque la intensidad de fluorescencia fue superior a la observada en el grupo control.

La mayor intensidad de fluorescencia para Cd11b, CD11c, CD14, CD71 y HLADR es compatible con un incremento de la densidad de estas moléculas en la superficie del MAC.

En este estudio no se ha realizado estudio paralelo de expresión de los Ags referidos en monocitos de sangre periférica (MSP), no obstante, ha sido mostrado previamente (74), con empleo de técnica y criterios de identificación similares, que CD14 y CD11b se expresan en  $>85\%$  de MSP y entre el 11% (CD14) y 25% (CD11b) en MAC alveolares en sujetos sanos. En pacientes con SARC el porcentaje de MSP que expresaban estos Ags no difería del determinado en el grupo control y en el fluido del LBA existía un incremento significativo en la expresión de estos y otros Ags de la línea monocitaria.

Los resultados aquí expuestos son similares a los referidos por estos autores.

La interpretación de estos hallazgos es compleja. Dada la alta frecuencia con que se observan en los estudios de distribución celular en estos pacientes pequeños MAC con ta-

tamaño similar al LINFc, que muestran alta expresión de Ags propios de la línea monocítica podría interpretarse como un incremento en el reclutamiento de monocitos hacia el pulmón como explicación, al menos parcial, del incremento de la población macrofágica.

No obstante, la expresión de estos Ags se observó también en células grandes de aspecto maduro y además la expresión HLADR (moléculas de clase II esenciales en la presentación de Ags, activación y proliferación de linfocitos T) también se observó incrementada, por lo cual es posible que, además, en el medio alveolar en esta enfermedad, los mediadores existentes eviten la pérdida de expresión de estos Ags en la población MoMAC o induzcan su reaparición.

#### 5.4.-Pacientes con neumonitis por hipersensibilidad

En este grupo de pacientes el porcentaje de LINFc fue significativamente superior al determinado en el control de no fumadores ( $44.7 \pm 6.6\%$  vs  $8.6 \pm 3.2$ ,  $p=0.02$ ).

Aunque el porcentaje de células CD3+ fue discretamente superior en este grupo con respecto al control no había significación estadística en esta diferencia ( $73.2 \pm 3.1\%$  vs  $64 \pm 5\%$ , NS). Tampoco se evidenció diferencia en el porcentaje de células CD4+ ( $34 \pm 3.7\%$  vs  $40 \pm 2.9\%$ , NS).



El porcentaje de células CD8+ se incrementó porcentualmente de forma significativa en este grupo ( $57.5 \pm 3.2\%$  vs  $25.6 \pm 2.1\%$ ,  $p=0.001$ ) y en número absoluto (n° de células CD8+/ml de fluido de LBA) ya que la concentración celular fue significativamente superior en este grupo con respecto al control.

También el porcentaje de células CD57+ se incrementó en este grupo tanto porcentualmente ( $34.2 \pm 6.1\%$  vs  $9.6 \pm 1.4\%$ ), como en número absoluto.

El índice CD4/CD8 resultó así ser inferior al obtenido en el grupo control ( $0.58 \pm 0.04$  vs  $1.5 \pm 0.2$ , con tendencia a la significación estadística  $p=0.057$ ), debido a la expansión de la población celular CD8+ y CD57+.

Estos resultados se muestran en la TABLA 22 siguiente y en FIGURAS 13 y 14.

La "linfosuma" CD4 + CD8 superó en todos los pacientes el porcentaje de células CD3+ entre un 10% y un 26%. La suma de células CD3+ y CD57+ superó el 100% en dos pacientes.

La no realización de estudio simultáneo de expresión CD8 y CD57 mediante empleo de dos fluorocromos puede hacer difícil el estudio de subpoblaciones linfocitarias en una patología como la NH en la que se produce expansión tanto de LT supresores/citotóxicos (CD8+) como de células NK (CD57+), ya que ambas poblaciones coexpresan estos Ags.

TABLA 22

PACIENTES CON NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD ANTIGENOS DE SUPERFICIE EN LINFOCITOS EN EL FLUIDO DE LBA									
Pac.	LINFC (%)	CD3	CD4	CD8	Indice	CD57	CD25	CD71	HLADR
Porcentaje de células positivas									
1	42	82	43	64	0.67	24	42	5	13
2	42	72	32	52	0.61	28	0.9	3	10
3	38	67	25	52	0.47	33	3	5	38
4	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	64	72	36	62	0.58	52	15	29	21
6	26	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	73	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
=====									
M ±	*44.7±	73.2±	34±	#57.5±	■0.58±	▨34.2±	15.3±	10.6±	20.5±
ES	6.6	3.1	3.7	3.2	0.04	6.1	9.5	6.1	6.2
INTENSIDAD		2-3+	2-3	2-3+		2-3+	1-2+	2-3+	2-3+
CONTROL									
M ±	* 8.6±	64±	40±	#25.6±	■1.50±	▨ 9.6±	7.6±	7.6±	ND
ES	3.2	5.0	2.9	2.1	0.2	1.4	4.1	3.2	
INTENSIDAD		2-3+	2-3+	2-3+		2-3+	1-2+	1-2+	

M ± ES , media ± error standard.

\* Diferencia significativa (p=0.01) entre porcentaje de linfocitos en pacientes con NH y control.

# (p=0.001) entre porcentajes de células CD8+ en ambos grupos.

■ (p=0.05) entre índice CD4/CD8 en ambos grupos.

▨ (p=0.05) entre porcentaje de células CD57+ en ambos grupos.

INTENSIDAD.- Mediante IFI la intensidad de fluorescencia fue valorada según escala 0-3+.

Los porcentajes de células que exponen marcadores de activación (CD25+ ,CD71+ y HLADR+) mostraron gran dispersión porcentual y no se evidenció diferencia estadística signifi-

**Figura 13**  
**LBA EN SARCOIDOSIS Y NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**  
**EXPRESION DE ANTIGENOS DE SERIE LINFOIDE**

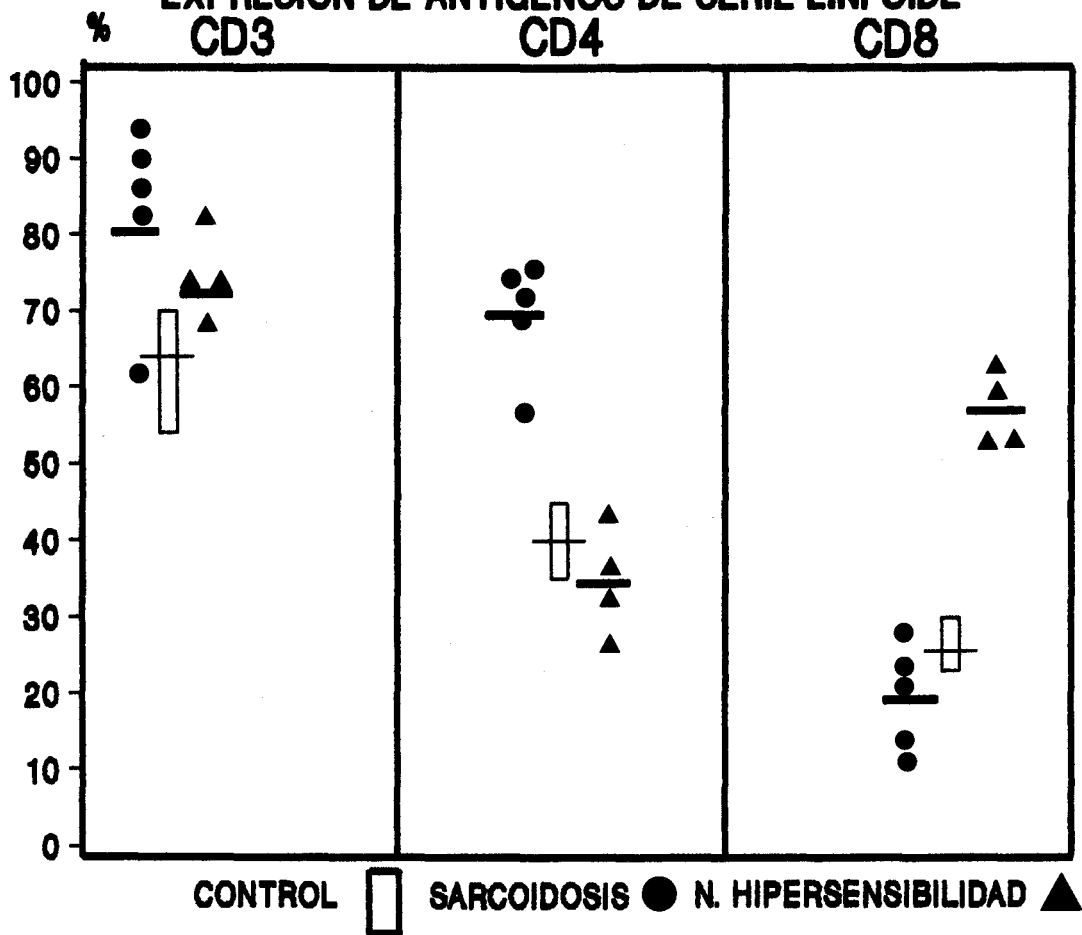
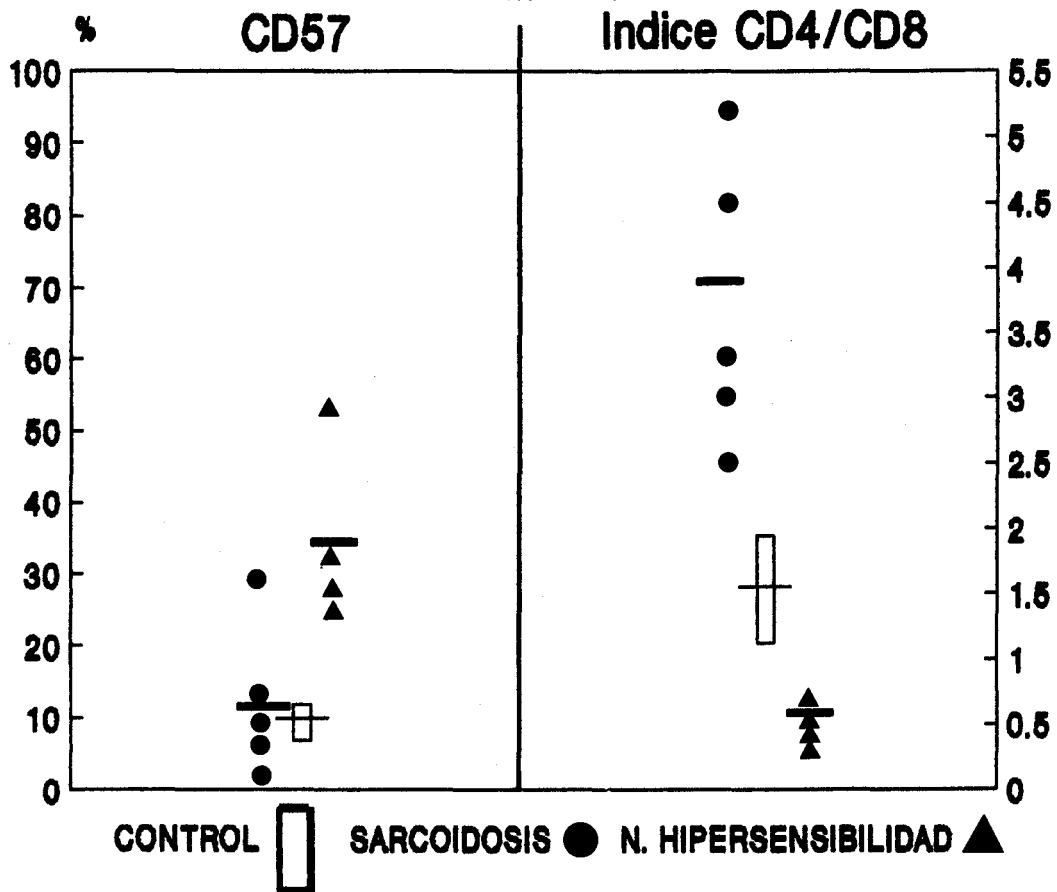


Figura 14

LBA EN SARCOIDOSIS Y NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD

EXPRESION DE ANTIGENOS DE SERIE LINFOIDE



cativa con el grupo control.

Aunque no son mostrados datos sobre celularidad en términos absolutos, es posible inferir que existe un incremento importante en el número de células que expresan estos Ags de activación debido a la superior concentración celular y mayor número absoluto de LINFc/ ml de fluido en este grupo de pacientes.

El porcentaje de MAC en este grupo fue significativamente inferior al determinado en el grupo control ( $50 \pm 8.5\%$  vs  $89.3 \pm 4.2\%$ ,  $p=0.01$ ), aunque no su número absoluto. Ambos grupos mostraron similar porcentaje de células autofluorescentes.

Se observó mayor porcentaje de células CD11b+ ( $71 \pm 3.6\%$  vs  $30 \pm 5.5\%$ ,  $p=0.001$ ) y de células CD14+ ( $55.7 \pm 5\%$  vs  $24.6 \pm 10.6\%$ ,  $p=0.03$ ). Aunque el porcentaje de células CD11c+ fue mayor en este grupo, no se encontró diferencia significativa.

Tampoco se encontró diferencia significativa en el porcentaje de células HLADR+ ( $88 \pm 1.7\%$  vs  $82.6 \pm 3.3\%$ , NS) ni en el de células CD71+ ( $75.5 \pm 5.5\%$  vs  $78.6 \pm 2.4\%$ , NS); no obstante, la intensidad de fluorescencia fue mayor (ver TABLA 23 siguiente y FIGURAS 15 y 16).

TABLA 23

PACIENTES CON NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD  
 EXPRESION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE  
 LINEA MONOCITO-MACROFAGO EN EL FLUIDO DE LBA

Pac.	MAC (%)	AUTOFLU	Porcentaje de células positivas				
			CD11b	CD11c	CD14	HLADR	CD71
1	55	30	61	75	55	87	60
2	58	25	71	58	54	85	82
3	58	42	74	32	45	87	85
4	67	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	44	27	78	54	69	93	75
6	74	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	13	ND	ND	ND	ND	ND	ND
=====							
M ±	#52.5±	31±	■71±	■54.7±	■55.7±	■80±	■75.5±
ES	7.6	3.8	3.6	8.8	4.9	1.7	5.5
INTENSIDAD			3+	2+	3+	3+	3+
=====							
CONTROL (no fumadores)							
M ±	#89.3±	43.3±	■30±	■31.6±	■24.6±	■82.6±	■78.6±
ES	4.2	5.4	5.5	5.8	10.6	3.3	2.4
INTENSIDAD			2-3+	1-2+	2-3+	2-3+	2-3+

M ± ES, media ± error standard.

# Diferencia significativa (p=0.01) entre % MAC en pacientes con NH y control.

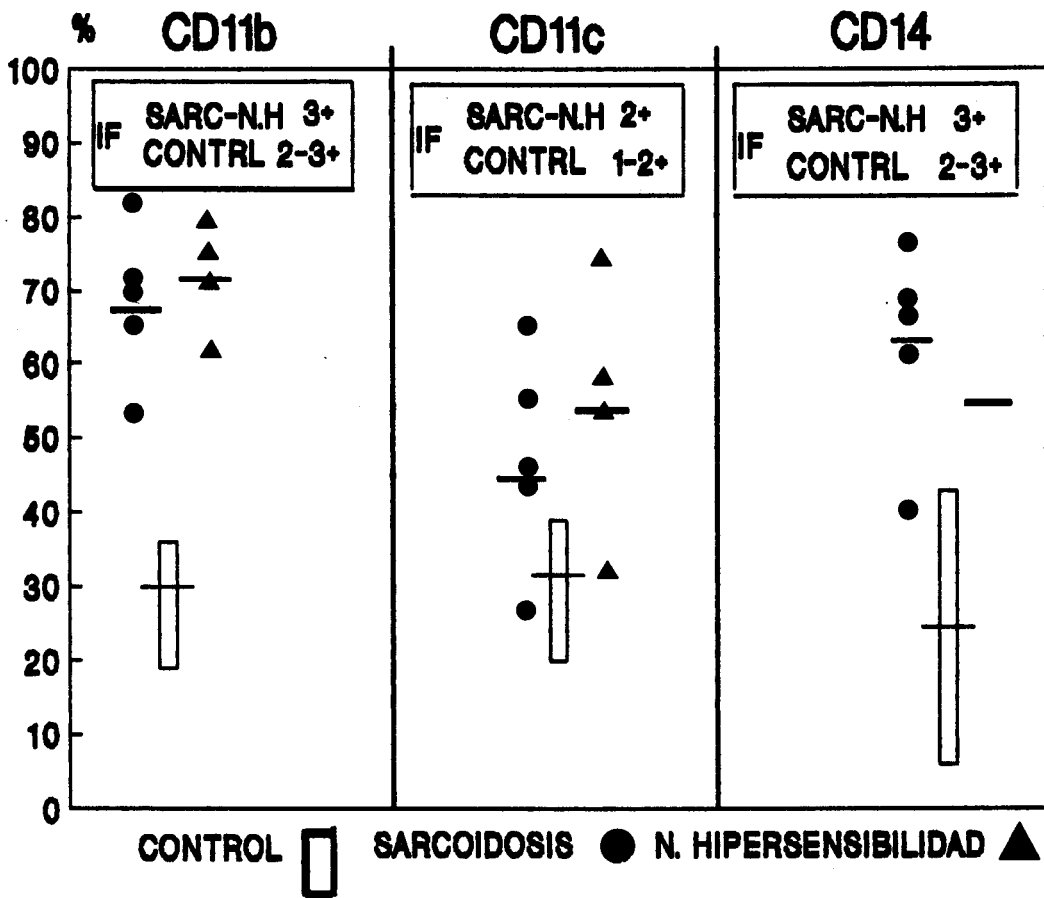
■ (p=0.001) entre % céls. CD11b+ en ambos grupos.

■ (p=0.03) entre % de céls. CD14+ en ambos grupos.

INTENSIDAD.- Mediante IFI la intensidad de fluorescencia fue valorada según escala de 0-3+.

El incremento porcentual de céls. CD11b+ y de la intensidad de fluorescencia es compatible con la existencia de un aumento en la densidad de este receptor en superficie celular implicado en múltiples funciones tales como receptor de

**Figura 15**  
**LBA EN SARCOIDOSIS Y NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**  
**EXPRESION DE ANTIGENOS DE LINEA MoMAC**

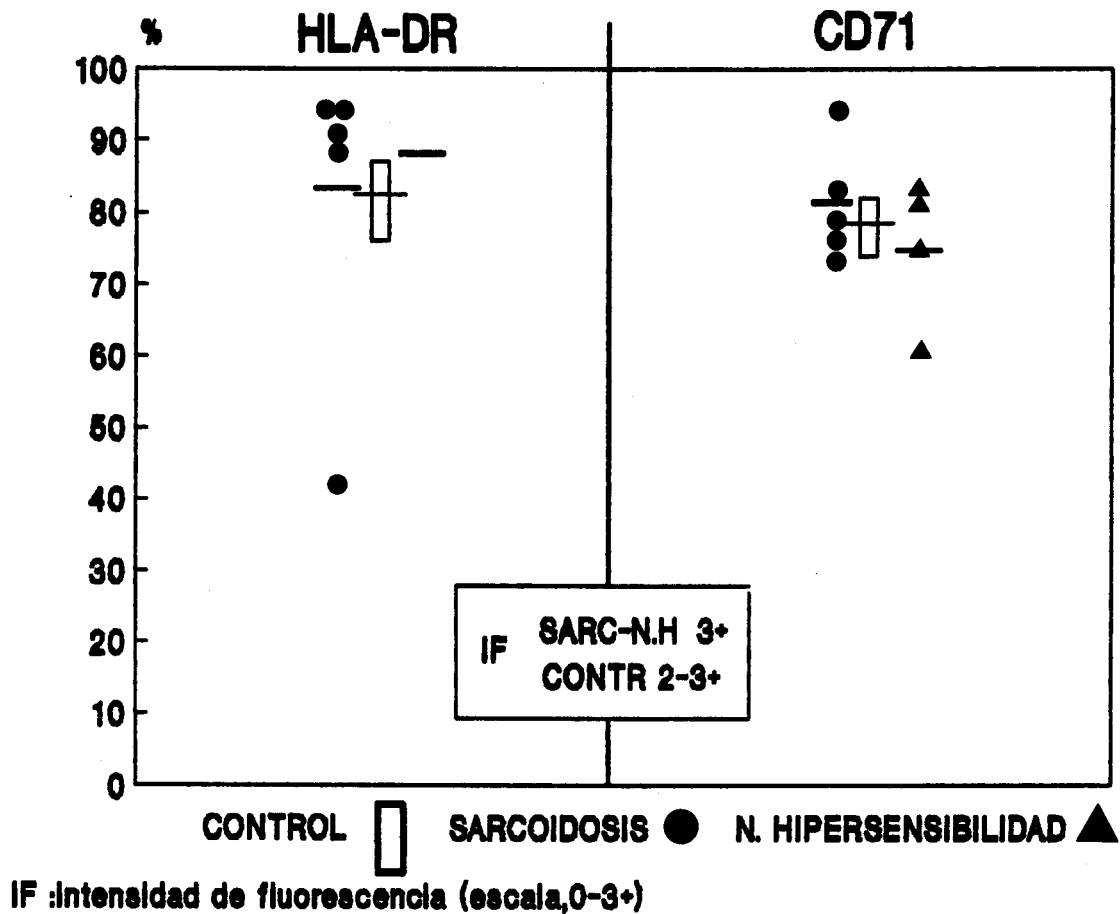


IF :intensidad de fluorescencia (escala,0-3+)

Figura 16

LBA EN SARCOIDOSIS Y NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD

EXPRESION DE ANTIGENOS DE LINEA MoMAC





de fracciones activas del complemento, fagocitosis e interacción célula a célula ,ésta última esencial en la formación del granuloma.

El incremento de células CD14+ (Ag expresado intensamente por monocitos de sangre periférica) sugiere un reclutamiento incrementado de monocitos de sangre periférica al espacio alveolar como mecanismo para interpretar, al menos parcialmente, la expansión de la población macrofágica como se ha observado en los pacientes con sarcoidosis.

#### 5.5.- Pacientes con neumonía intersticial idiopática

El porcentaje de LINFEC en esta población resultó ser significativamente superior al observado en el grupo control ( $14.4 \pm 3\%$  vs  $5.9 \pm 1.6\%$ ,  $p=0.03$ ) , no obstante dicho porcentaje mostró una gran dispersión.

Las distintas subpoblaciones linfocitarias se muestran en la TABLA 24 y FIGURAS 17 y 18.

No se observó diferencia significativa en el porcentaje de células CD3+,CD4+,CD8+,CD57+ ni en el índice CD4/CD8 entre los grupos de pacientes con FPI confirmada y sin confirmación histológica, ni entre éstos y el grupo control.

Un dato importante fue la discordancia observada entre la suma de células CD4+ y CD8+ y el porcentaje de CD3+.

TABLA 24

PACIENTES CON NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA ANTIGENOS DE SUPERFICIE EN LINFOCITOS DEL FLUIDO DE LBA								
Pac.	LINFC (%)	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD57	CD25	HLADR
Porcentajes de células positivas								
Grupo 1 (FPI con confirmación histológica por BPA) n=5								
1	10	74	49	34	1.44	7	ND	ND
2	9	90	57	46	1.23	5	<1	2
3	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	23	57	64	37	1.72	3	3	30
5	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
=====								
M ±	9.5±	73.6±	56.6±	39±	1.46±	5±	-	-
ES	3.7	9.5	4.3	3.6	0.14	1.1		
Grupo 2 (FPI sin confirmación histológica) n=6								
6	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	17	63	26	44	0.69	5	<1	<1
8	30	57	44	16	2.75	7	<1	10
9	12	48	32	26	1.23	5	20	<1
10	22	67	48	32	1.50	9	5	5
11	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
=====								
M ±	18.5±	58.7±	37.5±	29.5±	1.54±	6.5±	-	-
ES	4.2	4.1	5.1	5.8	0.43	0.9		
POBLACION TOTAL NII n=11								
M ±	14.4±	65.0±	45.7±	33.5±	1.50±	5.8±	-	-
ES	3.0	5.1	5.0	3.9	0.23	0.7		
CONTROL n=11								
M ±	5.9±	64±	40±	25.6±	1.5 ±	9.6±	7.6±	-
ES	1.6	5.0	2.9	2.1	0.2	1.4	4.1	

M ± ES, media ± error standard. No diferencia significativa entre grupos.

**Figura 17**  
**LBA EN NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA**  
**EXPRESION DE ANTIGENOS DE SERIE LINFOIDE**

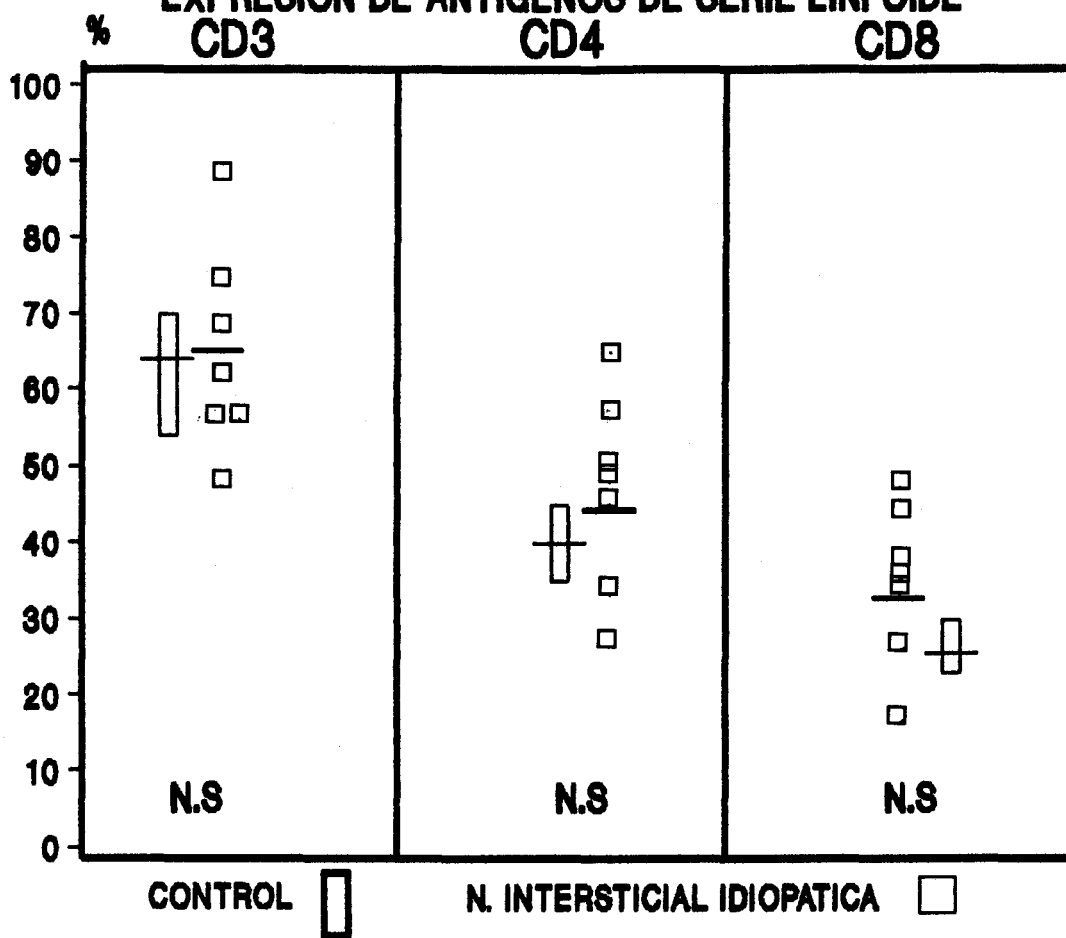
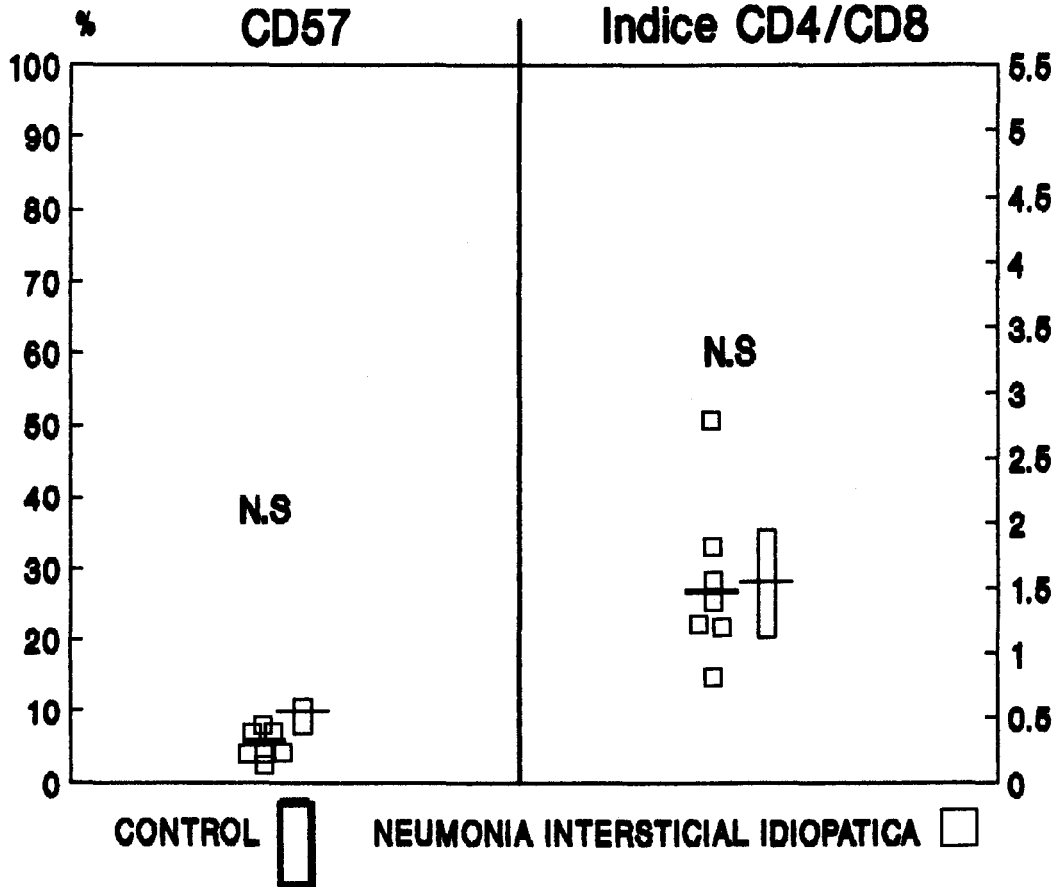


Figura 18

LBA EN NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA  
EXPRESION DE ANTIGENOS DE SERIE LINFOIDE  
CD57                      Indice CD4/CD8



Excepto en un paciente, la "linfosuma" superó en todos los casos, entre un 3% y 44%, el porcentaje de células CD3+.

Dado que las células se estudian en suspensión, es posible que células de tamaño y morfología similares al LINFc sean incluidas en la enumeración (MAC de pequeño tamaño e incluso PMN, población ésta última muy incrementada en los pacientes con NII) o bien que existan otras células que expresen Ags propios de la serie linfoide (monocitos-MAC pueden expresar CD4 en estado de activación). Esta puede ser causas de error en la determinación de subpoblaciones linfocitarias en esta enfermedad.

Los resultados del estudio de expresión de Ags de la línea MoMAC se muestra en la TABLA 25 siguiente y FIGURAS 19 y 20.

No se evidenció diferencia significativa en el porcentaje de MAC entre el grupo con NII y el grupo control.

Se observó, con respecto al grupo control, un incremento porcentual de células CD11b+ ( $59.4 \pm 6.1\%$  vs  $26.6 \pm 4.8\%$ ,  $p=0.0008$ ) y de CD11c ( $46.3 \pm 8.2\%$  vs  $20.2 \pm 4.4\%$ ,  $p=0.01$ ). No se encontró diferencia en expresión de CD14, muy específico de la línea MoMAC. Tanto CD11b como CD11c se expresaron en células, por lo general, de morfología madura.

Dado que la expresión de CD14 no se vió incrementada,

TABLA 25

**PACIENTES CON NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA  
EXPRESION DE ANTIGENOS DE LINEA MONOCITO-MACROFAGO  
EN EL FLUIDO DE LBA**

Pac	MAC (%)	AUTOFLU	CD11b	CD11c	CD14	HLADR	CD71
Porcentaje de células positivas							
<b>Grupo 1 (FPI confirmada histologicamente por BPA) n=5</b>							
1	74	35	60	35	41	22	29
2	65	65	71	62	82	94	50
3	80	20	30	18	12	70	61
4	65	65	80	95	55	70	78
5	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
=====							
M ±	66.8±	46.2±	60.2±	52.5±	47.5±	64±	54.5±
ES	5.0	11.2	10.8	16.8	14.5	15	10.2
<b>Grupo 2 (FPI sin confirmación) n=6</b>							
6	97	20	64	57	78	95	10
7	77	75	40	23	50	95	38
8	47	45	40	58	37	99	53
9	57	35	78	23	11	82	23
10	70	15	72	46	62	97	85
11	52	ND	ND	ND	ND	ND	ND
=====							
M ±	66.6±	38±	58.8±	41.4±	47.6±	93.6±	41.8±
ES	7.6	10.6	7.9	7.8	11.3	2.9	12.9
<b>GRUPO TOTAL n=11</b>							
M ±	66.7±	41.6±	59.4±	46.3±	47.5±	80.4±	47.4±
ES	4.5	7.4	6.1	8.2	8.4	8.21	8.3
<b>CONTROL</b>							
M ±	88.1±	66.1±	26.6±	20.2±	23.7±	73.6±	76.2±
ES	2.3	7.0	4.8	4.4	4.3	4.8	1.6

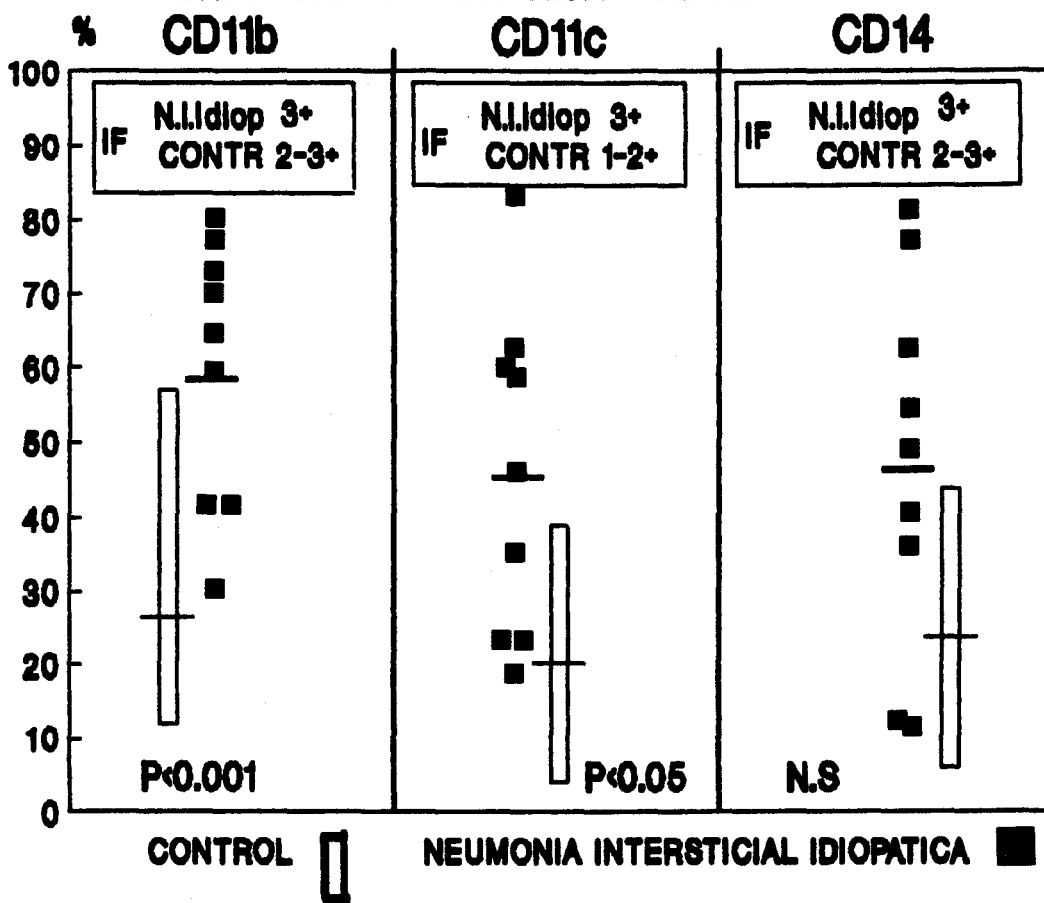
M ± ES, media ± error standard.

# Diferencia significativa (p=0.0008) entre % céls.CD11b+ en grupo total de NII y control.

■ (p=0.01) entre % céls.CD11c+ en ambos grupos.

■ (p=0.01) entre % céls.HLADR+ en FPI no confirmada y control.

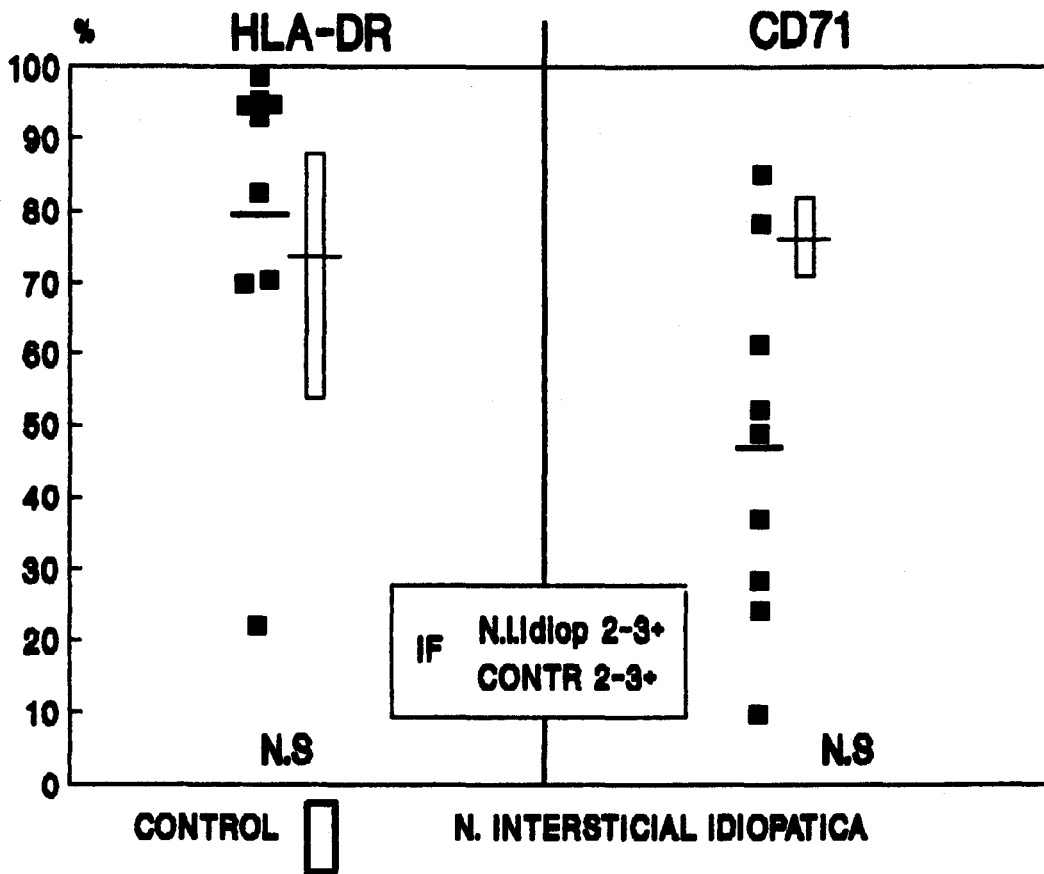
**Figura 19**  
**LBA EN NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA**  
**EXPRESION DE ANTIGENOS DE LINEA MoMAC**



IF :intensidad de fluorescencia (escala,0-3+)

Figura 20

LBA EN NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA  
EXPRESION DE ANTIGENOS DE LINEA MoMAC



IF :intensidad de fluorescencia (escala,0-3+)



es posible que el mecanismo de reclutamiento de monocitos desde sangre periférica al intersticio /alvéolo no sea fundamental en esta patología.

La expresión HLADR mostró un incremento significativo con respecto al grupo control ( $p=0.01$ ).

#### 5.6.-Pacientes con neumonía intersticial asociada a enfermedades del colágeno (EC)

El estudio de subpoblaciones linfocitarias en estos pacientes tan sólo pudo ser realizado con seguridad en 4 pacientes (1 EMTC, 1 ESCLER Y 2 pacientes con LES). Los resultados se muestran en la TABLA 26.

Los datos fueron muy heterogéneos. El único paciente diagnosticado de esclerodermia mostró en el fluido del LBA linfocitosis (27%) y neutrofilia (22%). Los porcentajes de células CD3+, CD4+ y CD8+ así como el índice CD4/CD8 se encontraban dentro de los límites determinados en el grupo control. Se encontró, además, un alto porcentaje de células CD25+ (49%).

La paciente diagnosticada de EMTC tenía antecedentes de exposición profesional a sílice anhidra. El LBA evidenció un predominio de MAC (83%) y discreto aumento de NEUTR (9%).

El porcentaje de LINFC fue reducido (8%) y el índice

TABLA 26

PACIENTES CON NEMONIA INTERSTICIAL ASOCIADA A E.C ANTIGENOS DE SUPERFICIE EN LINFOCITOS EN EL FLUIDO DE LBA								
Pac.	LINFC (%)	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD57	CD25	HLADR
Porcentajes de células positivas								
ESCLERD n=1								
1	27	66	59	35	1.68	19	45	7
EMTC n=2								
2	8	78	38	31	1.21	4	<1	15
3	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LES n=5								
4	22	62	45	34	1.32	15	<1	<1
5	4	61	41	22	1.86	<1	5	<1
6	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	16							
8	11							

CD4/CD8 fue 1.21.

El estudio de expresión de Ags propios de la serie MoMAC mostró los siguientes resultados: CD11b (82%), CD11c (54%), CD14 (62%), HLADR (95%) y CD71 (85%). Al igual que los hallazgos descritos en los pacientes con sarcoidosis, es posible que en este caso con clara exposición a partículas inorgánicas, la expansión de la población macrofagica y el incremento de expresión tanto de las integrinas CD11b y CD11c y del Ag específico de línea MoMAC (CD14) sea debido a un reclutamiento aumentado de MSP.

En los dos pacientes con LES (4 y 5) el estudio de subpoblaciones e índice CD4/CD8 no fue distinto del control.

## DISCUSSION

El LBA es una técnica de fácil realización y ,en general, exenta de complicaciones que requieran una actitud terapéutica si la selección de los pacientes es adecuada.

Su realización en pacientes inmunocomprometidos con el objetivo de aislar un patógeno oportunista no requiere excesivo cuidado en conseguir muestras adecuadas para estudio; sin embargo, en la evaluación de patología intersticial es fundamental la optimización de la técnica en todos sus aspectos, desde la obtención de muestras viables hasta su procesamiento y estudio. Por este motivo , como paso previo a la discusión de los hallazgos obtenidos , parece necesario analizar algunos aspectos de la propia técnica que pueden determinar la obtención de muestras adecuadas.

#### 1.- CONSIDERACIONES METODOLOGICAS GENERALES

La técnica de realización no varió sustancialmente con la descrita por otros autores salvo en el mecanismo de aspiración del fluido. Como ha sido descrito en la sección MATERIAL Y METODOS, la recuperación se inició de forma inmediata tras cada instilación de suero fisiológico mediante conexión a sistema de vacío con presión suave y no mediante jeringa.

Con este sistema se obtuvo un aceptable porcentaje de fluido (50% en el grupo control, 48% en pacientes con pato-

logía pulmonar asociada a inmunosupresión por VIH, 56% en pacientes diagnosticados de sarcoidosis, 54% en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad, 45% en los diagnosticados de neumonía intersticial idiopática y 45% en pacientes con neumonía intersticial asociada a conectivopatías).

El porcentaje de fluido instilado que se recupera es un importante parámetro que, tanto en estudio de población amplia de sujetos sanos como en pacientes de patología intersticial, es determinante del número total de células obtenidas (58, 115). El porcentaje recuperado también se incrementa a medida que aumenta el volumen total instilado (115).

En este estudio, uno de los factores asociados con disminución del porcentaje recuperado fue la intolerancia de la técnica. Esta asociación se comprobó sobre todo en pacientes con patología pulmonar asociada a infección por VIH. En este grupo los que toleraron peor la técnica fueron aquellos que tenían un mayor deterioro de su situación clínica y gasométrica (valores no mostrados en tablas).

La situación funcional respiratoria también puede condicionar el porcentaje de fluido recuperado. De todos los parámetros, el único que mostró una correlación significativa, aunque escasa, fue el FEV1 ( $r=0.44$ ,  $p=0.01$ ).

## 2.- APLICACION DE CRITERIOS DE SELECCION DE MUESTRAS

Aunque se advierte una tendencia a homogenizar la técnica de obtención y procesamiento de muestras para estudio, no se ha valorado suficientemente la necesidad de estandarizar criterios que permitan seleccionar las muestras adecuadas para estudio.

Rankin y cols (1986) (118) consideraron como muestra inadecuada la que contenía menos de  $2 \times 10^6$  células en total. Aplicando este criterio detectan un 5% de muestras no adecuadas entre 175 estudiadas. No obstante, este criterio no es totalmente satisfactorio ya que no contempla aspectos como morfología celular y representatividad de la muestra.

Tan sólo los criterios establecidos por Chamberlain y cols (1987) (117) contemplan no sólo contenido celular sino también grado de contaminación con sangre, inflamación de vía aérea y alteraciones inducidas por el procesamiento.

Basándose en estos criterios estos autores encuentran, entre 1588 muestras, un 30% de ellas no adecuadas para estudio.

La utilización de estos mismos criterios en nuestros pacientes llevó a la exclusión del 24% de un total de 93 muestras obtenidas de otros tantos pacientes inicialmente incluidos en estudio. El mayor parte de las muestras excluidas procedían de pacientes con patología pulmonar asociada a



infección por VIH+ y de los diagnosticados de neumonía intersticial asociada a conectivopatías.

Las principales causas fueron: 1) contaminación con sangre, 2) aspecto mucopurulento del fluido y 3) acúmulos de moco y células inflamatorias en el estudio microscópico.

Los factores que pueden determinar la validez de muestras para estudio son variados y probablemente dependa tanto del grado de dificultad en la realización de la técnica y grado de tolerancia de ésta, como de la patología pulmonar subyacente y su repercusión funcional.

La tolerancia de la técnica por los pacientes fue variable según los distintos grupos de patología sin clara asociación con ningún factor concreto. Probablemente los factores que la determinan no sean muy distintos de los que determinan la tolerancia de una BF de rutina.

En este estudio ,aunque la situación funcional previa no se correlacionó con el grado de tolerancia en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa, fue llamativo observar que los pacientes diagnosticados de sarcoidosis y neumonitis por hipersensibilidad toleraron mejor el procedimiento que el grupo con fibrosis pulmonar idiopática y asociada a conectivopatías, los cuales tenían una función pulmonar menos conservada.

La intolerancia de la técnica por parte de éste último grupo de pacientes con fibrosis pulmonar y pacientes con patología pulmonar asociada a infección por VIH ,se asoció a obtención de muestras con diversos grados de contaminación por hematies y celulas epiteliales ciliadas, quizás por dificultad en la realización técnica, descolocación de la punta del BF y traumatismo local.

La selección de muestras parece así esencial antes de la realización de cualquier otro estudio, no obstante, debe tenerse en cuenta que ésta puede inducir un sesgo en la inclusión de pacientes en grupos de estudio.



### 3.- INFECCION VIH Y REPERCUSION EN LA INMUNOLOGIA PULMONAR

El efecto de la infección por VIH sobre el sistema inmune ha sido estudiado ampliamente en sangre periférica donde se ha descrito una caída progresiva del porcentaje y número absoluto de células CD4+, un incremento paralelo de células CD8+ en estado de activación y un incremento porcentual y absoluto de células con fenotipo propio de células NK (natural killer) aunque con función citotóxica alterada. Ha sido descrita también una hipergammaglobulinemia policlonal en relación con una activación inespecífica de linfocitos B (30-34).

Los monocitos de sangre periférica sufren tempranamente la exposición al VIH presentando una activación prematura con expresión de receptores para IL-2. Es posible que esta expresión contribuya a la deplección de los niveles de IL-2 observada en el suero de pacientes VIH+. En estadios posteriores se evidencia una alteración de su función como células presentadoras de Ag al LT, de la quimiotaxis y capacidad de migración a los tejidos en respuesta a estímulos procedentes del foco inflamatorio y por tanto de generar una respuesta granulomatosa (120-124).

Los pulmones son el objetivo preferente de las infec-

ciones oportunistas asociadas a inmunosupresión por VIH, las cuales representan la causa de muerte más frecuente en estos pacientes (21-25).

El estudio de la celularidad obtenida mediante LBA ha aportado interesantes datos acerca de la inmunidad local en el lugar de la inflamación (26,34).

Los distintos autores coinciden en la observación de una alveolitis linfocitaria compuesta de células CD8+ con función supresora-citotóxica específica de Ag (23,24,29,126, 127) . El mecanismo para la expansión de esta subpoblación es desconocido.

La subpoblación de células CD4+ cae porcentualmente de forma progresiva aunque el número absoluto se conserva hasta fases avanzadas del síndrome.

Como hecho destacable ha sido descrito un incremento porcentual y absoluto de células con fenotipo NK pero con defectuosa actividad citotóxica espontánea ,aunque el mecanismo de esta alteración funcional es desconocido (29,31).

Ocasionalmente se observa incremento de NEUTR en el fluido del LBA; este hallazgo, de asociarse a infección por Pn. carinii, puede tener implicaciones pronósticas (128).

Los MAC alveolares son morfológicamente normales pero

actúan como reservorio de partículas virales con posibilidad de diseminación a otras células que expresen receptor para el VIH (CD4) (32,33).

En relación con su capacidad funcional como célula inmune e inflamatoria, faltan aún por determinar alteraciones que expliquen la tendencia al desarrollo de IO.

El objetivo concreto del estudio de este grupo de pacientes fue determinar en el fluido de LBA el perfil celular y expresión de Ags de diferenciación de serie linfocítica y línea monocito-macrofágica (MoMAC) en relación con la propia infección VIH e IO asociadas.

Se empleó para ello un panel de AcMo frente a Ags de serie linfocítica y línea MoMAC.

De los 21 pacientes que acudieron para estudio de BF por sospecha de IO, se confirmó ésta en 14. En estos casos existían, casi en su totalidad, síntomas respiratorios, hipoxemia e infiltrados bilaterales difusos con patrón intersticial o alveolo-intersticial bilateral. De los 7 pacientes restantes, en los cuales no se evidenció IO, en 2 también existía hipoxemia e infiltrados de distribución bilateral pero en el resto no había hipoxemia ni clara expresión radiográfica.

Una alveolitis linfocitaria a expensas de LINF C CD8+ y CD57+ con expresión variable de Ags propios de estado de

activación (sobre todo CD69 y HLA-DR) se observó en el 83% de los pacientes con IO y en el 28% sin evidencia de IO.

El estudio de subpoblaciones linfocitarias e índice CD4/CD8, aunque mostró diferencias significativas con respecto al grupo control, no las evidenció entre los pacientes con IO y sin IO. Desde el punto de vista clínico, la alveolitis linfocitaria se correlacionó con la existencia de infiltrados difusos bilaterales e hipoxemia.

No obstante, el significado de la alveolitis linfocitaria es incierto. En estudios previos ha sido observada esta anomalía tanto en estadios tempranos de la infección por VIH con ausencia de síntomas, con Rx de torax normal y sin evidencia de IO (126), como en estadios avanzados con desarrollo de SIDA.

En estos estudios, los pacientes con IO presentaron mayor linfocitosis que aquellos con otras infecciones. Entre los pacientes en los cuales no se evidenció IO, los pacientes seropositivos sin enfermedad, aquellos con linfadenopatía generalizada persistente y complejo relacionado con SIDA mostraron los porcentajes de LINFC más elevados.

Por otra parte, también ha sido mostrado, no sólo la existencia de alveolitis linfocitaria en estado de activación como hallazgo asociado a existencia de IO sino también una mayor liberación de TNF (tumor necrosis factor) en estos pacientes, lo que orienta a la posibilidad de una interac-

ción in vivo LINFc-MAC en la producción de esta citoquina por el MAC. Sin embargo, el estímulo real para su liberación es desconocido (efecto directo del virus VIH o respuesta a IO pulmonar). Su hiperproducción se implica actualmente en la patogenia de las complicaciones asociadas al SIDA (129,130).

Las moléculas de adhesión (integrinas) CD11b y CD11c, implicadas en la interacción célula-célula, unión al fragmento C3bi y fagocitosis, entre otras funciones, se expresaron de forma semejante en los pacientes VIH+ con y sin IO, tanto porcentualmente (porcentaje de células positivas) como en términos de intensidad de fluorescencia.

La menor intensidad de expresión de CD11b en esta población con respecto al control puede ser debida , entre otras razones, a una menor densidad de receptores en superficie celular.

La menor intensidad de expresión de CD14 (muy específico de la población de monocitos en sangre periférica) puede considerarse con similar interpretación. Dadas las anomalías funcionales descritas en el monocito sanguíneo, es posible que este último dato represente una evidencia de un trastorno en el proceso de reclutamiento de esta célula al intersticio pulmonar.

La expresión de Ags de activación-proliferación celular

(HLA-DR y CD71) fue significativamente inferior a la observada en el grupo control, tanto porcentualmente como en intensidad de expresión. El primero es esencial en el proceso de reconocimiento y presentación de Ag a los linfocitos T (81-86,88) y el segundo participa en la incorporación del Fe a la célula y parece esencial en el metabolismo y crecimiento de la célula y destrucción intracelular (89-91).

Dado que ambos Ags son inducibles por otras linfoquinas, es posible que la aparente menor expresión se relacione con una falta de "acondicionamiento" por factores que modulan su expresión.

Los hallazgos descritos habrían de ser confirmados por técnicas más sensibles, como la citometría de flujo, que permitan medir con más exactitud la intensidad real de fluorescencia, no obstante, con las limitaciones de la técnica empleada, no hemos encontrado diferencias en el inmunofenotipo celular entre los pacientes que desarrollan IO y aquellos en los que no se evidencia.

En definitiva, el hallazgo de alveolitis linfocitaria en nuestros pacientes, en fase avanzada de infección VIH, ha sido el único dato asociado a evidencia de IO. El resto de alteraciones encontradas en la población de MAC alveolares puede ser un efecto básico de la propia infección VIH sobre esta célula, independientemente de la existencia o no de IO.

#### 4. SARCOIDOSIS

En esta enfermedad existe una acumulación de LINF C T activados con capacidad proliferativa y MAC en los órganos afectados que origina la formación del granuloma y con ello el deterioro funcional (99,108).

El pulmón de los pacientes con sarcoidosis ha sido considerado como un modelo representativo para estudio de los acontecimientos inmunes e inflamatorios que abocan a la formación del granuloma. Tal respuesta inmune parece estar compartimentalizada a nivel de órganos afectos.

Ha sido descrito un incremento considerable de células T helper en estado de activación (12,13,35-38,56), mostrada por expresión de HLA-DR, CD25 (receptor para IL-2) y liberación espontánea de IL-2 (interleuquina que promueve la expansión de LT) (132), gamma-interferón (134) y factor quimiotáctico de monocitos, IL-1 y TNF que promueven la formación del granuloma. Debido a la expansión de la población CD4+, el cociente CD4/CD8 está extremadamente incrementado.

La evaluación de marcadores de activación (cociente CD4/CD8 o expresión de HLA-DR) puede aportar información de utilidad clínica ya que un incremento en el porcentaje de células CD4+/HLADR+ se ha observado en la "fase de actividad clínica" de la enfermedad en relación con fases de menor

actividad y además puede ser útil para categorizar a los pacientes según tipo de alveolitis. Sin embargo, no se ha demostrado correlación entre estos parámetros de inmunofenotipo y estado funcional de estas células (134).

Los MAC alveolares juegan un papel central en la patogenia de la sarcoidosis. La morfología y fenotipo inmune de estas células orientan a un estado de inmadurez, más propio del monocito sanguíneo que del MAC alveolar. La expresión incrementada de Ags propios de línea monocitaria parece ser debida, en su mayor parte, a un incremento en el reclutamiento de Mo desde sangre periférica. Los LT deben jugar un papel primordial en este proceso (74,84,87,92).

Al igual que sucede con el estudio de subpoblaciones linfocitarias, el de la línea MoMAC en esta enfermedad puede guardar correlación con determinados índices clínicos que sugieren actividad (clínica, estudio funcional, extensión Rx) sin embargo, no parece que exista correlación con el pronóstico ni que pueda orientar sobre la necesidad de tratamiento en un paciente individual (87).

Los pacientes incluidos en estudio, estaban clínicamente sintomáticos, con alteraciones en el estudio radiológico (en general en estadio II con adenopatías hiliares/mediasti-



nicas y patrón de predominio intersticial) y deterioro funcional con patrón restrictivo.

A pesar de ser un grupo muy reducido , las alteraciones observadas en la expresión de Ags de serie linfoide fueron suficientemente significativas para poder ser diferenciadas de otras patologías intersticiales, tanto de tipo granulomatoso (neumonitis por hipersensibilidad) como fibróticas.

La expresión de Ags propios de estado de activación fue muy diferente entre pacientes y en todos los casos fue superior el porcentaje de células HLA-DR+ que de CD25+ o CD71+. Estos Ags propios de un estado de reciente activación son expresados de forma transitoria (135), por lo tanto es posible que los LT hayan sido previamente activados pero han perdido la expresión de estos marcadores (136).

De cualquier forma el estudio de expresión de estos Ags de activación mediante técnica de IF con empleo de un sólo fluorocromo tiene escaso valor ya que previamente ha sido demostrada en sujetos normales, mediante empleo de dos fluorocromos, gran variabilidad y amplio rango de expresión y coexpresión de estos Ags en la población de linfocitos T obtenidos mediante LBA (137). La falta de correlación observada en estos estudios entre identificación de estos Ags de proliferación y evidencia de ésta, puede hacerse extensiva a los pacientes con sarcoidosis.

La expresión incrementada de integrinas (moléculas de adhesión) y de CD14, junto a la evidencia de alto porcentaje de células con tamaño similar al monocito inducen a pensar en un incremento en el ya comentado mecanismo de reclutamiento de monocitos al pulmón como explicación, al menos parcial, de la expansión de la población macrofágica.

No obstante, como se comentará en otro apartado, este hallazgo también ha sido detectado en neumonitis por hipersensibilidad y es posible que con significado similar.

Aparte de las moléculas de adhesión CD11b y CD11c, se ha encontrado recientemente un incremento en la expresión de LFA-1 (CD11a) y su ligando ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular) (138).

El estudio de expresión de HLA-DR en los MAC mostró un discreto incremento porcentual y de intensidad de fluorescencia con respecto al grupo control.

Los resultados obtenidos en los distintos estudios son discordantes en este sentido, debido quizás a diferencias en la población estudiada, método de cultivo (81-85), método de tinción empleado (IF vs Inmunocitoquímica), criterios de positividad o diferente especificidad de los AcMo empleados.

Debido a que la expresión de HLA-DR puede decaer a medida que aumenta el tiempo de cultivo, parece que el tiempo al que se realiza el estudio puede ser decisivo (81,83).

En un estudio reciente (86) se ha valorado la expresión de moléculas de Clase II en superficie de MAC alveolares de pacientes con sarcoidosis comparativamente con los de sujetos normales no fumadores. El estudio fue realizado con IFI y citometría de flujo. Estos autores no encuentran diferencias en la proporción de MAC que expresan estas moléculas en superficie, no obstante, si que encuentran un incremento significativo en la densidad de estas moléculas en la superficie de MAC de pacientes con sarcoidosis.

Este hallazgo es consistente con el concepto de que esta expresión es determinante de la habilidad de los MAC alveolares de pacientes con sarcoidosis de presentar Ag a LINF C CD4+ estimulados e inducir la proliferación de éstos (86,139) ; no obstante, es dudoso que la cuantificación de la expresión de HLA-DR sea un parámetro útil en la monitorización de la actividad de la enfermedad por los problemas metodológicos previamente comentados.

En definitiva, en un contexto clínico apropiado, la identificación en el fluido de LBA de una linfocitosis con incremento importante del cociente CD4/CD8 pueden ser datos altamente indicativos de sarcoidosis y discriminativos de otros procesos como NH o procesos fibróticos.

## 5. NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD

Neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una enfermedad pulmonar alérgica de evolución aguda, subaguda o crónica, que resulta de una respuesta inmune frente a una amplia gama de Ags orgánicos inhalados capaces de producir una reacción de hipersensibilidad local mediada por células (140,141).

Su presentación y evolución está matizada por factores epidemiológicos como tipo , duración y frecuencia de exposición (142).

En individuos sensibilizados, tras la exposición al Ag/Ags causales se observa un incremento en el recuento de NEUTR y EOSINF en el fluido del LBA responsables del daño alveolar agudo y síntomas iniciales en estos pacientes (143-147,152).

En los pacientes con enfermedad activa se detecta un incremento del número total de células recuperadas, representadas fundamentalmente por células T CD8+ que expresan marcadores de activación (HLA-DR, CD71, CD25) con la consiguiente caída del índice CD4/CD8 (62,100,107). La cantidad de Ag presente durante la exposición y frecuencia de sensibilización parecen ser determinantes de la intensidad de la alveolitis, lo que explicaría el diferente grado de linfocitosis en el fluido del LBA.

Ha sido demostrada una mayor presencia de Ags coexpresados por células NK y células T supresoras /citotóxicas tanto específicas como inespecíficas (CD56, CD57) y menor expresión de Ags más específicos de estirpe celular NK (CD16) (100,148).

En fases más avanzadas, ha sido descrito por varios autores un descenso en el porcentaje y número absoluto de LINFc en aquellos pacientes aún expuestos al Ag (150,151) y el cociente CD4/CD8 persiste invertido .

La retirada del paciente de la exposición se sigue de un incremento progresivo de células CD4+ con incremento del cociente CD4/CD8 (150).

No sólo se implica la respuesta inmune celular sino también la humoral (incremento de IgG,IgA y ocasionalmente IgM en el fluido del LBA y evidencia de formación local de complejos inmunes) (41,153).

El estudio inmunohistológico realizado en fases iniciales muestra una infiltración mononuclear difusa del parénquima pulmonar por células CD8+ (107,150) que afecta fundamentalmente a bronquiolos terminales, intersticio y alvéolo que precede a la formación del granuloma y con frecuencia evoluciona a la fibrosis (140).

El diagnóstico es fundamentalmente inferencial a partir de antecedentes de exposición ambiental a alérgenos conocidos como potencialmente lesivos y unos síntomas clínicos sugestivos.

El estudio de precipitinas séricas frente a estos Ags tan sólo refleja exposición y a menudo carecen de relevancia clínica (142) aunque generalmente figura entre los criterios diagnósticos. Además, en los estudios realizados no se encuentra correlación entre cambios radiográficos, función respiratoria, hallazgos en el fluido de LBA y niveles de precipitinas en las distintas fases de la enfermedad (151, 153).

Los cambios histológicos identificados habitualmente en muestras de biopsia transbronquial son inespecíficos.

Los hallazgos en el fluido del LBA resultan altamente sensibles como traducción de una reacción de hipersensibilidad frente a determinados neumoalérgenos pero no son suficientemente específicos para el diagnóstico de la enfermedad. La razón es que muchos individuos expuestos profesionalmente a estos Ags en estado asintomático, están sensibilizados y tienen títulos significativos de precipitinas séricas y además, en el fluido del LBA el estudio de inmunofenotipo de LINFc puede mostrar resultados superponibles al de los pacientes con NH (62, 149, 151).

En nuestros pacientes , los hallazgos más característicos pueden resumirse en una mayor concentración celular /ml (tres veces más que en el grupo control), una clara alveolitis linfocitaria con predominio de células CD3+,CD8+ y CD57+ y reducción significativa del índice CD4/CD8. El número absoluto de células con expresión de Ags propios de estado de activación resultó elevado , aunque no porcentualmente.

En cuanto a la población macrofágica, aunque se evidenció un descenso porcentual , el n° absoluto estaba conservado. El incremento de células CD11b+ y CD14+ puede ser atribuido a un incremento en el reclutamiento de monocitos de sangre periférica como lo observado en la sarcoidosis. El incremento de células CD11b+ también puede ser debido al incremento porcentual y absoluto de células NK, las cuales pueden expresar este Ag, sobre todo en estado de activación (104). Estas células, al ser estudiadas en suspensión, pueden ser difíciles de diferenciar de otras células no linfoides.

El porcentaje de células HLADR+ y CD71+ no mostró diferencia significativa con respecto al grupo control; no obstante, la intensidad de fluorescencia fue mayor, dato que es compatible con un incremento de la densidad en superficie de estos Ags.

En los pocos estudios en los cuales se ha estudiado la expresión de estas moléculas, los resultados parecen indicar una expresión incrementada (154) aunque otros no han encontrado cambios significativos (81).

En definitiva, el estudio de expresión de Ags en el MAC alveolar en esta enfermedad muestra hallazgos prácticamente similares a los observados en sarcoidosis y probablemente esten sujetos a gran variabilidad, dado que en esta enfermedad la intensidad de la alveolitis está modulada por el tipo, frecuencia e intensidad de exposición.

Los resultados del estudio de expresión de Ags en LINF, sin embargo, mostraron una clara diferencia significativa comparativamente con el grupo control y otras enfermedades como sarcoidosis y fibrosis pulmonar idiopática.

Estos hallazgos en la celularidad del fluido del LBA, en un contexto clínico compatible, pueden ser útiles para diferenciar esta enfermedad de otros procesos intersticiales y válidos en la evaluación de estos pacientes, aún cuando no ha sido demostrada claramente su relación con enfermedad activa y/o eventual desarrollo de fibrosis.



6.- NEUMONIA INTERSTICIAL IDIOPATICA / FIBROSIS  
PULMONAR IDIOPATICA (FPI)

El término "neumonía intersticial" habitualmente es empleado para referirse a un proceso inflamatorio difuso que ocurre predominantemente a nivel del intersticio pulmonar, incluyendo no sólo el existente a nivel de septos interalveolares sino también alrededor de vía aérea (peribronquiolar) y a nivel perivascular, dependiendo del estadio y cronicidad de la lesión (12,35,108,155-157).

El estadio final en la evolución de la neumonía intersticial es el desarrollo de fibrosis pulmonar irreversible con evidencia de aplanamiento.

Tanto la afectación aguda del intersticio pulmonar (daño alveolar difuso, neumonía intersticial aguda) o crónica (neumonía intersticial usual o descamativa, neumonía intersticial secundaria a conectivopatías, neumonitis por drogas, neumoconiosis, granulomatosis o neumonitis por aspiración secundaria a reflujo gastroesofágico) pueden abocar al desarrollo de estadio final de fibrosis (155,165).

Aunque este hallazgo puede ser sospechado en el estudio radiológico habitual de torax (158) y evaluado con más seguridad en una tomografía axial computarizada de alta



resolución (159), su confirmación requiere realización de biopsia pulmonar abierta (156,157).

La actividad de la enfermedad viene representada por el grado de celularidad presente y así, es aceptado que el pronóstico y respuesta al tratamiento se relacionan con la cantidad relativa de células inflamatorias y grado de fibrosis en el tejido pulmonar (12).

En la práctica rutinaria tan sólo se realiza un estudio cualitativo de la extensión relativa y severidad de los cambios patológicos de forma no sistematizada, lo cual dificulta la correlación de éstos con datos clínicos, fisiopatológicos y grado de respuesta al tratamiento.

Tal vez dicha correlación y estadiaje pueda alcanzarse mediante aplicación de sistemas de cuantificación de lesiones, valorando el tipo, extensión y severidad de los cambios inflamatorios en pared y espacio alveolar y de los cambios fibróticos reparativos afectando pared alveolar y vía aérea terminal (44,49,161,162).

La evaluación de la inflamación en la FPI ha mostrado que usualmente consiste de MAC alveolares y NEUTR con pequeñas cantidades de LINFC y EOSINF (12,13,35,41-44,63, 163,164).

Los NEUTR son las células más incrementadas en la FPI

(35,41,42,43) y en otras enfermedades intersticiales no granulomatosas que evolucionan a fibrosis como esclerodermia (195,196), silicosis y asbestosis.

La combinación neutrofilia-eosinofilia aparece en aproximadamente dos tercios de los pacientes con FPI (42) y en asbestosis (166-168), pero es rara en enfermedades granulomatosas, en las cuales los LINFC son predominantes.

No obstante, el LBA en la FPI puede mostrar datos discordantes incluso en grupos homogéneos de pacientes. Las razones son varias: heterogeneidad de los distintos procesos preexistentes que conducen a fibrosis pulmonar (165-167), falta de homogeneidad de afectación incluso entre distintos territorios del pulmón (113), ausencia de clara correlación entre contenido celular en el LBA y anomalías histopatológicas (35,63) e historia previa de tabaquismo y variabilidad en la repercusión funcional (predominio de restricción o sumación de componente obstructivo por afectación de vía aérea), que determinan el volumen de fluido recuperado (109,110-112).

Una minoría de pacientes responden al tratamiento esteroideo. En el estudio realizado por Watters y cols (1987) (44) sobre un total de 26 pacientes diagnosticados de FPI se valoró la correlación entre celularidad en el fluido del

LBA y grado de lesiones histopatológicas así como respuesta al tratamiento esteroideo.

La linfocitosis en el fluido del LBA se asoció a moderada/severa inflamación alveolar septal con relativa ausencia de panalización y mejoría clínica significativa tras tratamiento esteroideo. La neutrofilia y eosinofilia no se correlacionaron con ningún hallazgo histopatológico ni con respuesta favorable al mismo tratamiento. La evidencia de recuentos altos de eosinófilos se correlacionó con mayor severidad clínica.

Estos datos coinciden en parte con los señalados por Turner-Warwick y Haslam (1987) (43) de un total de 90 LBA realizados a 32 pacientes (26 con FPI y 6 con FP asociada a conectivopatías). Al tiempo de realización del LBA el 97% tenía incrementado al menos un tipo de célula. En el seguimiento, 12 mejoraron los índices de severidad clínica y los recuentos celulares volvieron a la normalidad.

Una caída significativa en el porcentaje de NEUTR y EOSINF se observó en los pacientes respondedores tratados con corticoides y ciclofosfamida respectivamente. Los pacientes con linfocitosis manifiesta también mostraron mejoría tanto subjetiva como objetiva, sin embargo, fue rara entre los pacientes con neutrofilia y eosinofilia.

Por otra parte, O'Donnell y cols (1987) (176) en 28 pacientes que cumplían criterios diagnósticos de FPI demostraron una significativa reducción del componente neutrofílico de la alveolitis en los tratados con ciclofosfamida, sola o asociada a corticoides, que se asoció a estabilización del proceso o mejoría clínica/funcional de la enfermedad mientras que en los no respondedores, los recuentos de NEUTR permanecían elevados.

En otro estudio Watters y cols (1986) observaron que el recuento de NEUTR en el LBA se incrementó después de tres meses de tratamiento con prednisona en pacientes fumadores con FPI pero no en los no fumadores, los cuales mostraron evidente mejoría clínica (177). Es necesario, por lo tanto, tener en cuenta la variabilidad de los recuentos inducidos por el hábito tabáquico.

Es decir, los resultados disponibles evidencian que la linfocitosis en el fluido del LBA discrimina una población de pacientes con FPI en los cuales se encuentra inflamación alveolar septal y por tanto potencial respuesta al tratamiento esteroideo (42-44,163,164). Por el contrario, recuentos elevados de NEUTR y sobre todo de EOSINF, son significativamente incrementados en los que fallan en la respuesta a esteroides/ciclofosfamida y los que tienen mayor deterioro previo al tratamiento (43,44,163,164,176).

Al igual que en otras series, nuestros pacientes mostraron una gran variabilidad en el porcentaje de NEUTR y LINFEC aunque como grupo mostraron diferencias significativas con el grupo control en cuanto a porcentaje medio de ambas células. De los 11 pacientes, tan sólo en 1 la distribución celular porcentual fue similar al grupo control, en 3 había neutrofilia aislada, en 1 linfocitosis aislada, en 5 incremento simultáneo de LINFEC y NEUTR y en 1 neutrofilia y eosinofilia.

El grado de neutrofilia fue suficientemente alto para ser diferenciado del encontrado en pacientes del grupo control integrado en parte por pacientes fumadores.

El grado de linfocitosis, aún siendo muy variable, mostró diferencia significativa con el grupo control. El menor grado se observó en los tres pacientes fumadores.

Este último dato, aún observándose en un reducido grupo de pacientes, va de acuerdo con lo referido por otros autores en pacientes fumadores con obstrucción crónica al flujo aéreo (179) y en FPI (43,44). En estos estudios se valora la importancia del antecedente de tabaquismo en la evaluación del valor pronóstico de los recuentos de NEUTR y LINFEC en el fluido del LBA (43,44,177).

El estudio de subpoblaciones linfocitarias en este

proceso es más complejo que en el caso de la sarcoidosis o NH debido al menor porcentaje de LINF, lo que obliga a realizar en muchos casos procedimientos de adherencia y enriquecimiento de estas células.

En nuestros casos, los resultados no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control. El problema señalado antes se puso de manifiesto por la discordancia en los resultados de la suma de porcentaje de células CD4+ y CD8+ que, por lo general, superaron el de CD3+.

Este hallazgo ha sido descrito por distintos autores (170,171) y puede ser atribuido a una inexactitud en el método de enumeración, bien por existencia de otras células que pueden expresar estos marcadores o por incluir en el cómputo células no linfoides con similar morfología o tamaño cuando son estudiadas en suspensión.

En el estudio realizado por Paradis y cols (1986) (171) se evidenció una gran variabilidad en el valor del cociente CD4/CD8 aunque la tendencia fue a mostrar un valor similar al descrito en el grupo control de individuos sanos.

Kradin y cols (1986) (175), estudiaron muestras de biopsia pulmonar de 13 pacientes con FPI y encontraron que los linfocitos T constituyen la mayoría de células que infiltran la región alveolar septal con un predominio de

células CD8+ en estado de activación, mientras que los NEUTR se encontraron en gran número en la vía aérea terminal.

Se ha valorado también la utilidad del estudio de subpoblaciones linfocitarias para diferenciar la FPI de la FP asociada a EC (169) y se ha encontrado un incremento en el índice CD4/CD8 en FPI y una disminución en FP asociada a EC por expansión de la subpoblación supresora-citotóxica. No obstante, la utilidad de estos estudios es relativa por ser infrecuente y de baja intensidad el incremento de LINFC en estas enfermedades.

Los NEUTR dañan el parénquima pulmonar mediante liberación de radicales oxígeno, proteasas y enzimas lisosomales y contribuyen al inicio y desarrollo de la fibrosis pulmonar (12,108,165,178).

Los MAC alveolares son también responsables de la degradación de los componentes de la matriz intersticial en esta enfermedad al liberar gran cantidad de mediadores y modular estrechamente el grado de reclutamiento de NEUTR al pulmón y su actividad (178,179) y el depósito de fibroblastos en el lugar de lesión (181).

En los casos estudiados, la expresión HLA-DR no se modificó sustancialmente con respecto al grupo control, dato



ya descrito por otros autores (82) aunque no evidenciado por otros (81).

Como grupo total, los pacientes con FPI mostraron mayor porcentaje de células CD11b y CD11c (moléculas de adhesión) aunque no de CD14 (Ag muy específico de población monocitaria de sangre periférica) lo cual puede indicar que el grado de reclutamiento monocitario puede ser bajo.

Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios en pacientes con FPI en los cuales se ha evidenciado un inmunofenotipo propio de MAC tisular maduro (172-174).

En el estudio morfológico de las muestras tras tinción se ha podido observar que, en general, el aspecto es más propio de MAC maduro y con frecuencia multinucleado, a diferencia del aspecto observado en otros procesos como sarcoidosis o neumonitis por hipersensibilidad, procesos en los que ha sido mostrado un incremento en el reclutamiento de monocitos desde sangre periférica con aumento de células de morfología y tamaño similares a éstos.

Este hallazgo es compatible con estudios previos en los cuales se ha demostrado un incremento en el grado de replicación celular "in situ" en patología inflamatoria crónica (hábito tabáquico, sarcoidosis, FPI) (73) y en pacientes expuestos profesionalmente a asbestos (73,190). En este úl-

timo estudio tambien se observó un incremento en la expresión de Ags más propios de estadio precoz de maduración de la línea MoMAC, lo que implica que ambos mecanismos pueden contribuir a la expansión de la población macrofágica.

Hasta la actualidad ningún parámetro, salvo el tipo de celularidad predominante, se ha correlacionado con índices de actividad clínica, deterioro funcional o respuesta al tratamiento (42-44). No obstante, fuera de un contexto clínico compatible con sarcoidosis, NH o FP asociada a EC, los recuentos celulares pueden ser una guía en la orientación diagnóstica de un proceso fibrosante intersiticial (FPI, FP asociada a inhalación de partículas inorgánicas) (166, 167, 180) u organizativo intraluminal (bronquiolitis obliterante con neumonía parcheada) (165, 182-189), bien como estudio complementario en un primer acercamiento al diagnóstico o como información suplementaria a la obtenida de la BPA.

En la actualidad, como ha sido referido previamente, se valora ya su utilidad como indicador pronóstico y en la monitorización de los cambios asociados con respuesta terapéutica.

No obstante, deben tenerse en cuenta las limitaciones de esta técnica ya que aunque el LBA parece reflejar los acontecimientos celulares en el espacio aéreo (63), en deter-

minados pacientes puede no ser capaz de arrastrar muestras de células a nivel intersticial donde hay predominancia de LT (171,175), células plasmáticas, mast cells (191,192) y MAC distintos fenotípicamente (172-174). Quizás sea ésta una de las razones más importantes de la gran variabilidad interindividual observada en el fluido de LBA en esta enfermedad y de su limitación en el diagnóstico o pronóstico en un paciente concreto (45).

## 7.- PARTICIPACION PULMONAR EN EL CONTEXTO DE ENFERMEDADES DEL TEJIDO CONECTIVO

Una gran variedad de anomalías pueden observarse en el pulmón en los pacientes con conectivopatías (193,194). La frecuencia con la que se demuestra implicación del pulmón en cada uno de estos trastornos varía considerablemente según criterios clínicos, radiológicos, funcionales o patológicos utilizados en el diagnóstico.

Los síntomas clínicos y alteraciones radiográficas pueden evidenciarse tardíamente en la enfermedad y estar ausentes en algunos pacientes en los cuales hay evidencia de anomalías en la biopsia pulmonar (158).

Es aceptado que la alveolitis media el trastorno de las estructuras alveolares en las fases iniciales de la enfermedad intersticial y aparece previamente al desarrollo de fibrosis (12,35,36,42).

En pacientes diagnosticados de enfermedad vascular del colágeno en estado asintomático y sin manifestaciones radiográficas, Wallaert y cols (1986) (195) detectaron alveolitis inflamatoria en 29 de 61 pacientes estudiados (48%). Una alveolitis linfocitaria (porc. LINFC  $\geq$ 18%) fue evidenciada sobre todo en los pacientes con síndrome de Sjögren y LES.

Los pacientes con esclerosis sistémica progresiva,

dermatopolimiositis, enfermedad mixta del tejido conectivo y artritis reumatoide mostraron un incremento de NEUTR (>4%) con o sin incremento porcentual de LINFC en el fluido del LBA.

En el seguimiento funcional, 11 de 32 pacientes con LBA normal y 10 con alveolitis linfocitaria no se deterioraron, sin embargo, la presencia de NEUTR se asoció con deterioro funcional progresivo en 6 de 7 pacientes no tratados, mientras que en 4 tratados permanecieron estables.

No obstante, la evaluación secuencial de los hallazgos del LBA en 12 pacientes mostró que la alveolitis puede ser cíclica, con lo cual el papel del LBA en estos pacientes como índice con valor predictivo del daño pulmonar es muy cuestionable (201).

Cuando la EC se asocia a enfermedad pulmonar intersticial con repercusión clínica, radiológica y funcional, la presencia de linfocitosis en el fluido del LBA ha sido asociado con buen pronóstico (42,43,44,163).

Aunque la existencia de alveolitis neutrofílica requiere una interpretación más cuidadosa (efecto concomitante de tabaquismo y/o infección bacteriana), este tipo de alveolitis es frecuentemente encontrado en muchos pacientes con enfermedad pulmonar intersticial asociada a trastornos como esclerodermia con importante repercusión funcional (196-199)

y en pacientes con alveolitis subclínica y enfermedad extrapulmonar importante que requieren tratamiento esteroideo (195), lo que sugiere la posibilidad de una correlación en estos pacientes entre anormalidad en el fluido del LBA y severidad de la afectación extrapulmonar.

No está aún suficientemente aclarada la responsabilidad de un determinado tipo celular en el deterioro funcional posterior que experimentan estos pacientes.

Así, en 32 pacientes con EC sin criterios de enfermedad pulmonar intersticial Wallaert y cols (1987) estudiaron la situación funcional de los MAC alveolares obtenidos mediante LBA comparativamente con los obtenidos de 10 con EC y evidencia de enfermedad pulmonar intersticial. En la práctica totalidad de ambos grupos se encontró alguno de los criterios que definen un estado de activación funcional: liberación de factor quimiotáctico de NEUTR, secreción de fibronectina y aumento en la liberación espontánea de anión superóxido (200).

Los 8 pacientes incluidos en nuestro estudio estaban sintomáticos. En la Rx de torax existía patrón intersticial o alveolointersticial y el estudio de función respiratoria evidenció claro patrón restrictivo.

Previamente a la realización del LBA la práctica tota-

lidad de ellos había iniciado tratamiento empírico antiinflamatorio/inmunosupresor.

Las anormalidades más claras en el fluido del LBA fueron las evidenciadas en el único paciente diagnosticado de esclerodermia. Este paciente era trabajador en la construcción y refería adicción a drogas por vía inhalada.

El cuadro clínico fue un rápido y progresivo deterioro de la función respiratoria con claros signos de insuficiencia cardíaca derecha secundaria a hipertensión pulmonar. La biopsia pulmonar puso en evidencia una bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa y depósito de microcristales no tipificados en mucosa de vía aérea, posiblemente en relación con la inhalación de droga en papel de aluminio o bien con la exposición profesional. La exploración clínica, biopsia de piel y estudio serológico fueron criterios diagnósticos de esclerodermia.

En el fluido del LBA se observó una alta concentración celular con marcada neutrofilia (27%) y linfocitosis (22%).

Este patrón ha sido descrito previamente como distintivo de bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa y utilizable para diferenciar este proceso de la FPI y granulomatosis (182,183).

El estudio de subpoblaciones linfocitarias mostró un índice CD4/CD8 dentro de la normalidad, no obstante la suma CD4+CD8 superó ampliamente la cantidad de linfocitos T totales que atribuimos a la expansión de la población CD57+.

Aunque los síntomas respiratorios son infrecuentes en la esclerodermia, los estudios de necropsia muestran anomalías hasta en el 70 % de los casos estudiados (206). El hallazgo más frecuente consiste en una fibrosis intersticial y sobre todo anomalías en la vascularización pulmonar con hiperplasia de la íntima y media, responsables de los trastornos en la difusión, insuficiencia respiratoria severa e hipertensión pulmonar (207-210).

Por otra parte, tanto el daño alveolar difuso como la bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa han sido descritos entre las lesiones histopatológicas asociadas a la adicción a drogas por vía inhalada (203-205).

La afectación pulmonar en la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) corresponde a la observada en el LES, esclerodermia y dermatopolimiositis. Puede presentarse como neumopatía intersticial e hipertensión pulmonar severa con pobre respuesta al tratamiento con esteroides/ciclofosfamida (211-213).

El LBA en esta enfermedad ha sido estudiado en pequeñas



series en las cuales se ha encontrado un predominio de NEUTR (169,195).

Una de las dos pacientes diagnosticadas de EMTC tenía como antecedente la exposición profesional a sílice anhidra (componente utilizado como abrasivo en la fabricación de detergentes). El motivo de estudio fue la aparición de disnea progresiva, infiltrados pulmonares intersticiales difusos, insuficiencia respiratoria parcial y anemia de procesos crónicos. El estudio serológico en ambas evidenció títulos altos de autoanticuerpos contra nRNP, muy específicos de EMTC.

El estudio del fluido del LBA mostró un incremento discreto de NEUTR (9%) de forma aislada en una de ellas y en la otra incremento de NEUTR (9%) y LINF (21%).

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una de las conectivopatías que más repercusión tiene sobre la pleura y el parénquima pulmonar. Las lesiones pleurales son comunes hasta en el 50-75% en cualquier estadio de la enfermedad (193).

Las lesiones parenquimatosas son también comunes. Una neumonía intersticial crónica ocurre frecuentemente acompañada de algún grado de fibrosis, aunque la fibrosis extensa con apanamiento es infrecuente (214-217) y el predominio de células (generalmente linfocitos y células plasmáticas)

suele ser más evidente que en otras formas de neumonía intersticial (215).

Ha sido descrita en esta enfermedad una alveolitis linfocitaria subclínica en 3 de 11 pacientes con estudio radiológico y funcional normales (195).

En nuestro grupo de pacientes , todos estaban clínicamente sintomáticos con disnea, fiebre, hipoxemia e infiltrados pulmonares difusos.

Del total de 7, fueron excluidas las muestras de 2 pacientes por ser inadecuadas para estudio (aspecto macroscópico serohemorágico intenso o herrumbroso). El estudio citopatológico de las muestras mostró la existencia de alto porcentaje de MAC cargados con hemosiderina y el cuadro fue tipificado como neumonitis lúpica aguda.

Estos hallazgos traducen la existencia de un daño alveolar difuso caracterizado por edema intersticial, exudación intraalveolar , formación de membranas hialinas y diversos grados de hemorragia intraalveolar producida por inflamación capilar necrotizante aguda (215-219). La necesidad de documentación de esta manifestación dramática del LES puede ser una de las indicaciones más justificadas para realización del LBA en estos pacientes.

En el resto ( 5 pacientes), se observó incremento significativo en el porcentaje de LINFC sin incremento de NEUTR en tres de ellos y una distribución celular normal en dos.

Salvo una paciente que falleció al poco tiempo de realización del LBA por infección tuberculosa concomitante, el resto mostró una buena respuesta al tratamiento esteroideo/inmunosupresor, tanto clínica como funcionalmente.

En definitiva, el estudio de distribución celular en el fluido del LBA en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial asociada a colagenosis muestra gran variabilidad entre los distintos pacientes y probablemente esté determinada por el tipo de conectivopatía, tiempo de evolución de la enfermedad intersticial e implantación de tratamiento previo al estudio.

La linfocitosis observada entre los pacientes con LES fue uno de los hallazgos más constantes que en general se asoció a mejoría clínica y de su función respiratoria.

En nuestro medio, el papel del LBA en estos pacientes puede reducirse al diagnóstico de IO asociadas y ser una herramienta útil en el diagnóstico de hemorragia alveolar difusa.

En los pacientes con conectivopatías sin datos de participación del intersticio pulmonar, es difícil definir el papel del LBA en el seguimiento, evaluación del pronóstico y necesidad de tratamiento en cada caso.

## 8.- SINDROME DE HEMORRAGIA ALVEOLAR DIFUSA (SHAD)

Las causas de SDAD son muy diversas (202,220-226,229-231)). El diagnóstico en nuestros pacientes se estableció en base a los criterios de hemoptisis, anemia, infiltrados pulmonares difusos e insuficiencia respiratoria progresiva en un contexto clínico concreto. No obstante, existen otros casos en los cuales existe hemorragia alveolar difusa sin clara apariencia clínica como ocurre en el edema pulmonar y neumonías (21, 235).

El LBA mostró en un tercio de los casos un aspecto hemorrágico o herrumbroso más intenso en las últimas alíquotas recuperadas, como ha sido descrito por otros autores (232). En el resto el aspecto fue traslúcido.

En todos los pacientes se identificaron numerosos MAC cargados con hemosiderina, aunque no se realizó ningún tipo de cuantificación.

Este pigmento requiere al menos dos días para ser formado y de dos a cuatro semanas para ser eliminado del pulmón, aunque en los sangrados crónicos la permanencia en el pulmón puede ser mayor (228).

Los criterios diagnósticos no están estandarizados.

Algunos autores simplemente realizan un contaje porcentual de MAC con pigmento (233) y otros emplean un índice

colorimétrico según escala 0-4 de intensidad de tinción (226,234).

El empleo de esta tinción en muestras de LBA consecutivas ha permitido evidenciar pequeños porcentajes de estas células y su frecuencia e intensidad de tinción se ha correlacionado con tabaquismo y con la presencia de otras partículas en el citoplasma (227).

Según estos hallazgos, parece necesaria la observación de una intensidad de tinción importante para asegurar el diagnóstico de SHAD.

# RESUMEN

Se han valorado los hallazgos citológicos e inmunológicos en muestras de fluido de LBA obtenido de pacientes con neumopatías intersticiales difusas de distintos orígenes en las que se descartó un origen neoplásico.

Las muestras fueron obtenidas y estudiadas según un protocolo previamente establecido.

La tolerancia de la técnica fue variable según los distintos grupos de estudio, oscilando entre el 63% en el grupo de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa y el 81% en el grupo control. Es difícil determinar los factores que la condicionan debido a la heterogeneidad de los distintos grupos.

El porcentaje de fluido instilado que se recupera es aceptado como uno de los parámetros que mejor define el resultado global de la técnica. En este estudio, los factores determinantes han sido el grado de tolerancia de la técnica y el deterioro de la situación funcional previa.

La selección de muestras para estudio según criterios establecidos llevó a la exclusión de un porcentaje importante de muestras, más elevado en los grupos de pacientes con patología pulmonar asociada a infección VIH y enfermedad pulmonar asociada a colagenosis (36% y 33% respectivamente).

Los factores que influyen en la calidad de las muestras obtenidas son también variados. En este estudio, tan sólo se ha encontrado asociación significativa con el grado de tolerancia, no obstante, se ha observado que otros factores como tipo de neumopatía, dificultad en la realización técnica, o la succión mantenida en vía aérea pueden determinar o influir en la obtención de muestras inadecuadas para estudio.

Los datos de celularidad total y concentración celular son esenciales en cada paciente para realizar el estudio inmunológico, sin embargo, carece de utilidad en la valoración individual diagnóstica debido a la gran variabilidad interindividual (sobre todo el número total de células).

La distribución porcentual de cada tipo celular (media y límites superiores e inferiores) observada en el grupo control fue similar a la referida por los distintos autores y por lo tanto utilizable como patrón de referencia para valoración de hallazgos en las distintas neumopatías.

La alveolitis linfocitaria fue un hallazgo común entre pacientes con sarcoidosis y neumonitis por hipersensibilidad. Se evidenció también en el 66% de los pacientes con infección por VIH, en el 45% de los casos con neumonía intersticial idiopática y en más de la mitad de los diagnos-



ticados de conectivopatías (sobre todo LES).

En los pacientes VIH+ incluidos en estudio, la alveolitis linfocitaria se asoció a evidencia de infección oportunista.

Una alveolitis neutrofílica fue encontrada en algunos pacientes con patología pulmonar asociada a infección por VIH y sobre todo entre los pacientes con neumonía intersticial idiopática y asociada a conectivopatías (esclerodermia y enfermedad mixta del tejido conectivo).

El examen de inmunofenotipo en LINFC del fluido de LBA en el grupo control fue muy dificultoso por la escasez de estas células. El estudio de subpoblaciones linfocitarias e índice CD4/CD8 en el resto de procesos mostró datos que permiten establecer diferencias entre patologías y por tanto estrechar las posibilidades diagnósticas que ofrece el simple recuento celular porcentual.

En pacientes VIH+ se observó expansión de la población CD8+ CD57+ e inversión del cociente CD4/CD8, aunque sin claras diferencias significativas en porcentaje y número absoluto de estas células entre los pacientes en los que se aisló y los que no se aisló germen oportunista.

Es difícil determinar el significado de estos hallazgos

en la población estudiada, en estadio avanzado de inmunosupresión, y de discernir si se trata de una respuesta asociada con evidencia de infección oportunista o un efecto de la propia infección VIH.

En pacientes con sarcoidosis se evidenció expansión de población CD4+ e incremento del índice CD4/CD8 y en los diagnosticados de neumonitis por hipersensibilidad expansión de población CD8+ CD57+ con inversión del cociente CD4/CD8.

Estos hallazgos amplían la posibilidad de discriminación de ambas granulomatosis más allá de la simple identificación de una alveolitis linfocitaria.

En los pacientes con neumonía intersticial idiopática (FPI) el reducido porcentaje de LINFC dificultó el estudio de subpoblaciones. En los pacientes en los que se determinó con seguridad no mostró diferencias significativas con el grupo control.

En general, el empleo de técnica de IFI con utilización de un único fluorocromo (fluoresceína) y estudio mediante microscopio de fluorescencia, ha resultado útil para estudio de subpoblaciones linfocitarias en el fluido de LBA.

Las dificultades y errores inducidos en determinados pacientes se mostraron por una "linfosuma" inadecuada. Los

motivos han podido ser: 1) coexpresión de CD8/CD57 por distintas subpoblaciones de la serie linfoide y de CD4 por LINFc y MAC en estado de activación, 2) inclusión en el cómputo de LINFc de otras células con tamaño y morfología similar al LINFc (pequeños MAC y NEUTR) al ser estudiados en suspensión.

El estudio de la población macrofágica en los distintos grupos de pacientes evidenció gran heterogeneidad morfológica y posiblemente funcional como se pone de manifiesto con el estudio de expresión de Ags en superficie.

Comparativamente con el grupo control se apreció en pacientes VIH+, indistintamente de la existencia o no de infección oportunista, una menor intensidad de expresión de Ags CD11b, CD11c (moléculas de adhesión multifuncionales) y de CD14 (Ag muy específico de monocitos de sangre periférica), así como de CD71 (receptor para transferrina) y HLADR (molécula de Clase II implicada en la presentación de Ag a LINFc por parte del MAC).

Estos hallazgos parecen reflejar el efecto múltiple de la infección VIH sobre la expresión de Ags relacionados con diversas funciones del MAC alveolar (adhesión, fagocitosis, interacción célula a célula, proliferación celular y presentación de Ag). No obstante, deberían ser confirmados mediante estudios de función específicos.

En granulomatosis (sarcoidosis y neumonitis por hipersensibilidad) se ha observado un mismo patrón de incremento en expresión de CD11b, CD11c y CD14 coincidiendo con la observación de un aumento de MAC pequeños similares al monocito sanguíneo. La expresión de HLADR y CD71 también se observó incrementada con respecto al grupo control.

En los pacientes con fibrosis pulmonar el estudio de la población macrófágica mostró un incremento en la expresión de CD11b y CD11c (no de CD14), junto a la observación de MAC con aspecto maduro y frecuentemente multinucleados.

El incremento de expresión de estos Ags con respecto al grupo control, puede ser indicativo de recambio celular acelerado con incremento en la afluencia de monocitos al pulmón (granulomatosis) o maduración /proliferación local (proceso fibrótico).

El estudio de expresión de Ags propios de la línea monocito macrófágica, con los AcMo utilizados, no establece claras diferencias en expresión de Ags entre las distintas patologías estudiadas que sean de utilidad diagnóstica.

No obstante, dado que el MAC alveolar sigue siendo el tipo de célula más predominante y más implicada en los diversos trastornos, parece necesario realizar más estudios para comparar los distintos procesos intersticiales y valorar la expresión de otros Ags diferentes.

## CONCLUSIONES

- 1.- El grado de tolerancia de la técnica de LBA y el porcentaje de fluido instilado que se recupera son dos parámetros útiles en la evaluación inmediata del resultado global del procedimiento.
- 2.- Es previsible una reducción del porcentaje de fluido recuperado en los pacientes con neumopatía con importante repercusión funcional y en los que muestran mala tolerancia de la técnica.
- 3.- Los criterios de selección de muestras aplicados han resultado útiles para homogenizar la calidad de las muestras incluidas en estudio como adecuadas y determinar la exclusión de las no adecuadas.
- 4.- La alveolitis linfocitaria, como hallazgo citológico aislado, ha resultado un dato constante en los pacientes con patología granulomatosa (sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad). La alveolitis neutrofílica ha sido evidenciada sobre todo entre los pacientes con neumonía intersticial idiopática y la asociada a conectivopatía.

- 5.- La repercusión de la infección VIH sobre el sistema inmune pulmonar se ha mostrado en nuestros pacientes por una alveolitis linfocitaria asociada a evidencia de infección oportunista, un desbalance de subpoblaciones linfocitarias con incremento de células CD8+ CD57+ e inversión del cociente CD4+/CD8+.
  
- 6.- El estudio de subpoblaciones linfocitarias en el fluido del LBA amplía la posibilidad de discriminación entre sarcoidosis (incremento de células CD4+ y por tanto del cociente CD4/CD8) y neumonitis por hipersensibilidad (expansión de la población CD8+ CD57+ e inversión del cociente CD4/CD8) más allá de la simple identificación de un patrón de alveolitis linfocitaria.
  
- 7.- El estudio de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con neumonía intersticial idiopática ha mostrado resultados muy dispares y con difícil interpretación, lo cual puede ser un reflejo de la dificultad de su realización y sobre todo, de la falta de homogeneidad de esta población de pacientes en cuanto a origen del proceso fibrótico, estadio evolutivo y repercusión funcional.
  
- 8.- El estudio de la población macrofágica en los pacientes con infección VIH+ incluidos ha puesto de manifiesto un

efecto múltiple de ésta sobre diversas funciones del MAC alveolar a juzgar por una menor intensidad de expresión de Ags implicados en funciones como adhesión, fagocitosis, interacción célula a célula, proliferación celular y presentación antigénica, sin diferencia entre los pacientes en los que se evidencia infección oportunista y los que no se demuestra ésta.

9.- En el resto de patología intersticial estudiada (sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, neumonía intersticial idiopática) el estudio de expresión de Ags propios de línea monocito-macrofágica mediante los AcMo utilizados ha mostrado una gran similitud entre las distintas patologías (sobre todo entre sarcoidosis y neumonitis por hipersensibilidad) y por lo tanto ha resultado de menor utilidad en la discriminación entre éstas que los datos derivados del estudio de subpoblaciones linfocitarias.



## B I B L I O G R A F I A

- 1 .-JACKSON C . Bronchoscopy: past, present and future.  
N Engl J Med 1928; 199:759-763.
- 2 .-CARLENS E. A new flexible double-lumen catheter for  
bronchspirometry. J Thorac Surg 1949; 18:742.
- 3 .-MÉTRAS H. In: Le catheterisme bronchique. H.Métras,  
J.Charpin eds, Vigot Frères, Paris,1953; 55-65.
- 4 .-FINLEY T.N, SWENSON E.W, CURRAN W.S, HUBER G.L, LADMAN  
A.J. Bronchopulmonary lavage in normal subjects and pa-  
tients with obstructive lung disease. Ann Intern Med  
1967; 66:651-658.
- 5 .-HARRIS J.O, SWENSON E.W, JOHNSON J.E. Human alveolar  
macrophages: comparison of phagocytic, glucose utili-  
zation, and ultrastructure in smokers and nonsmokers.  
J Clin Invest 1970; 49:2086-2096.
- 6 .-COHEN A.B, CLINE M.J. The human alveolar macrophage:  
isolation, cultivation in vitro and studies of morpho-  
logic and functional characteristics. J Clin Invest  
1971; 50:1390-1398.
- 7 .-REYNOLDS H.Y, NEWBALL H.H. Analysis of proteins and

respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. J Lab Clin Med 1974; 84:559-573.

- 8 .-DANIELE R.P, ALTOSE M.D, ROWLAND D.T Jr. Immunocompetent cells from the lower respiratory tract of normal humans lungs. J Clin Invest 1975; 56:986-995.
- 9 .-WARR G.A, MARTIN R.R, SHARP P.M, ROSSEN R.D. Normal human bronchial immunoglobulins and proteins: effects of cigarette smoking. Am Rev Respir Dis 1977; 116:25-30.
- 10 .-LOW R.B, DAVIS G, GIANCOLA M.S. Biochemical analyses of bronchoalveolar lavage fluids of healthy human volunteers smokers and nonsmokers. Am Rev Respir Dis 1978; 118:863-865.
- 11 .-DAVIS G.S, GIANCOLA M.S, COSTANZA M.C, LOW R.B . Analyses of sequential bronchoalveolar lavage samples from healthy human volunteers. Am Rev Respir Dis 1982; 126: 611-616.
- 12 .-CRYSTAL R.G, BITTERMAN P.B, RENNARD S.I, HANCE A.J, KEOGH B.A. Interstitial lung diseases of unknown cause: disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. N Engl J Med 1984;

310:154-66,235-244.

- 13 .-DANIELE R.P, ELIAS J.A, EPSTEIN P.E, ROSSMAN M.D .Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis and management of interstitial lung disease. Ann Intern Med 1985; 102:93-108.
- 14 .-TURNER-WARWICK M, HASLAM P.L. Clinical applications of bronchoalveolar lavage. Clin Chest Med 1987; 8:15-26.
- 15 .-REYNOLDS H.Y. Bronchoalveolar lavage -state of the art. Am Rev Respir Dis 1987; 135:250-263.
- 16 .-SIBILLE Y, REYNOLDS H.Y .Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury - state of the art. Am Rev Respir Dis 1990; 141:471-501.
- 17 .-BERMAN J.S, BEER D.J, THEODORE A.C, et al. Lymphocyte recruitment to the lung - state of the art. Am Rev Respir Dis 1990; 142:238-257.
- 18 .-STOLLER J.K, RANKIN J.A, REYNOLDS H.Y. The impact of bronchoalveolar lavage cell analysis on clinicians' diagnostic reasoning about interstitial lung diseases. Chest 1987; 92:839-843.

- 19 .-DREW W.L, FINLEY J.N, MINTZ L et al. Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia by bronchopulmonary lavage. J.A.M.A 1974; 230:713-715.
- 20 .-KELLEY J, LANDIS J.N, DAVIS G.S et al. Diagnosis of pneumonia due to Pneumocystis by subsegmental pulmonary lavage via the fiberoptic bronchoscope. Chest 1978; 74:24-28.
- 21 .-STOVER D.E, ZAMAN M.B, HAJDU S.I, et al. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosuppressed host. Ann Intern Med 1984; 101:1-7.
- 22 .-BROADDUS C, DAKE M.D, STULBARG M.S et al. Bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy for the diagnosis of pulmonary infections in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1985; 102:747-752.
- 23 .-WALLACE J.M, BARBERS R.G, OISHI J.S et al. Cellular and T-lymphocyte subpopulation profiles in bronchoalveolar lavage fluid from patients with acquired immunodeficiency syndrome and pneumonitis. Am Rev Respir Dis 1984; 130:786-790.

- 24 .-YOUNG KR Jr, RANKIN J.A, NAEGEL G.P et al. An immunologic analysis of bronchoalveolar lavage cells and proteins in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1985; 103:522-533.
- 25 .-WHITE D.A, GELLENE R.A, GUPTA S et al. Pulmonary cell populations in the immunosuppressed patient. Bronchoalveolar lavage findings during episodes of pneumonitis. Chest, 1985; 88:352-359.
- 26 .-REYNOLDS H.Y. Host defense impairment that may lead to respiratory infections. Clin Chest Med 1987; 8:339-58.
- 27 .-RANKIN J.A, COLLMAN R, DANIELE R.P . Acquired immune deficiency syndrome and the lung. Chest 1988; 94:155-164.
- 28 .-RANKIN J.A . Pulmonary immunology. Clin Chest Med 1988; 9:387-393.
- 29 .-AGOSTINI C, POLETTI V, ZAMBELLO R, et al. Phenotypical and functional analysis of bronchoalveolar lavage lymphocytes in patients with HIV infection. Am Rev Respir Dis 1988; 138:1609-1615.

- 30 .-SEMENZATO G, AGOSTINI C. Human retroviruses and lung involvement. Am Rev Respir Dis 1989; 139:1317-1322.
- 31 .-AGOSTINI C, ZAMBELLO R, TRENTIN I, et al. Cytotoxic events taking place in the lung of patients with HIV-1 infection. Am Rev Respir Dis 1990; 142:516-522.
- 32 .-SALAHUDDIN S.Z, ROSE R.M, GROOPMAN J.E, MARKHAM P.D, GALLO R.C. Human T Lymphotropic virus type III infection of human alveolar macrophages. Blood 1986, 68:281-284.
- 33 .-GARTNER S, MARKOVITS P, MARKOVITZ D.M, et al. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. Science 1986; 223:215-219.
- 34 .-NIH CONFERENCE. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. Ann Intern Med 1991; 114:678-693.
- 35 .-HUNNINGHAKE G.W, KAWANAMI O, FERRANS V.J, et al. Characterization of the inflammatory and immune effector cells in the lung parenchyma of patients with interstitial lung disease. Am Rev Respir Dis 1981; 123:407-412.

- 36 .-KEOGH B.A, HUNNINGHAKE G.W, LINE B.R, CRYSTAL R.G. The alveolitis of pulmonary sarcoidosis. Evaluation of natural history and alveolitis dependent changes in lung function. Am Rev Respir Dis 1983; 128:256-265.
- 37 .-CEUPPENS J.L, LACQUET L.M, MARIEN G, et al. Alveolar T-cell subsets in pulmonary sarcoidosis. Correlation with disease activity and effect of steroid treatment. Am Rev Respir Dis 1984; 129:563-568.
- 38 .-HOLLINGUER W.M, STATON G.W, FAJMAN W.A, et al. Prediction of therapeutic response in steroid-treated pulmonary sarcoidosis. Evaluation of clinical parameters, bronchoalveolar lavage, galio-67 lung scanning and serum angiotensin-converting enzyme levels. Am Rev Respir Dis 1985; 132:65-69.
- 39 .-TURNER-WARWICK M, McALLISTER W, LAWRENCE R, BRITTEN A, HASLAM P.L. Corticosteroid treatment in pulmonary sarcoidosis: do serial lavage lymphocyte counts, serum angiotensin convertin enzyme measurements, and gallium -67 scans help management?. Thorax 1986; 41: 903-913.
- 40 .-POULTER L.W, ROSSI G.A, BJERMER L, et al. The value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and prognosis



of sarcoidosis. Eur Respir Rev 1992; 2:75-82.

- 41 .-REYNOLDS H.Y, FULMER J.D, KAZMIEROWSKI J.A, et al. Analysis of cellular and protein content of bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. J Clin Invest 1977; 59:165-175.
- 42 .-HASLAM P.L, TURTON C.W.G, LUKOSZEK A, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cell counts in cryptogenic fibrosing alveolitis and their relation to therapy. Thorax 1980; 35:328-339.
- 43 .-TURNER-WARWICK M, HASLAM P.L. The value of serial bronchoalveolar lavages in assesing the clinical progress of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. Am Rev Respir Dis 1987; 135:26-34.
- 44 .-WATTERS L.C, SCHWARZ M.I, CHERNIACK R.M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Pretreatment bronchoalveolar lavage cellular constituents and their relationships with lung histopathology and clinical response to therapy. Am Rev Respir Dis 1987: 135:696-704.
- 45 .-RAGHU G. Idiopathic pulmonary fibrosis. A rational

clinical approach. Chest 1987; 92:148-154.

- 46 .-HASLAM P.L, BAUER W, De ROSE V, et al. The clinical role of BAL in idiopathic pulmonary fibrosis. Eur Respir Rev 1992; 2:58-63.
- 47 .-CRYSTAL RG, REYNOLDS H.Y, KALICA A. International Conference on Bronchoalveolar Lavage . Chest 1986; 89:122-131.
- 48 .-KLECH H, POHL W. European Society of Pneumology Task Group on BAL. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage. Eur Respir J 1989; 2:561-585.
- 49 .-BAL COOPERATIVE GROUP STEERING COMMITTEE. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparisons groups. Am Rev Respir Dis 1990; 141(Suppl.):169-202.
- 50 .-MERILL W.W, GOODEMBERGER D, STROBER W, et al. The secretory component and other proteins in human lung lavage. Am Rev Respir Dis 1980, 122;156-160.
- 51 .-GODARD P, AUBAS P, CALVAYRAC P, et al. Endoscopie et

lavage broncho-alveolaire chez l'asthmatique allergique. *Nouv Press Med* 1981; 10:3141.

52 .-KIRBY J.G, O'BYRNE P.M, HARGREAVE F.E . Bronchoalveolar lavage does not alter airway responsiveness in asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:554-556.

53 .-KELLY C.A, HENDRICK D, WALTERS H. The effect of bronchoalveolar lavage on bronchial responsiveness in patients with airflow obstruction. *Chest* 1988;93:325-328.

54 .-KLECH H, POHL W, HUTTER C. Safety and side-effects of bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Rev* 1992; 2:54-57.

55 .-RENNARD S.I, BASSET G, LECOSSIER D, et al. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol* 1986; 60:532-538.

56 .-HUNNINGHAKE G.W, GADEK J.E, KAWANAMI O, FERRANS J, CRYSTAL R.G. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* 1979; 97:149-206.

- 57 .-BAUGHMAN R, STROHOFER S, KIM C.K. Variation of differential cell counts of bronchoalveolar lavage fluid. Arch Pathol Lab Med 1986; 110:341-343.
- 58 .-ETTENSohn D.B, JANKOWSKI M.J, DUNCAN P.G, LALOR P.A. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject.I. Technical aspects and intersubject variability. Chest 1988; 94:275-280.
- 59 .-COSTABEL U, BROSS K.J, REULER CH. Alterations in immunoregulatory T-cells subsets in cigarette smokers. Phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. Chest 1986; 90:39-44.
- 60 .-BARBERS R.G, GONG H, TASHKIN D.P, OISHI J, WALLACE J.M. Differential examination of bronchoalveolar lavage cells in tobacco cigarette and marijuana smokers. Am Rev Respir Dis 1987; 135:1271-1275.
- 61 .-WALLAERT B, BART F, AERTS C, et al. Activated alveolar macrophages in subclinical pulmonary inflammation in collagen vascular diseases. Thorax 1988; 43:24-30.
- 62 .-SEMENZATO G, AGOSTINI C, ZAMBELLO R, et al. Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis: phenotypic and

functional analyses. *J Immunol* 1986; 137:1164-1172.

- 63 .-HASLAM P.L, TURTON C.W.G, HEARD B, et al. Bronchoalveolar lavage in pulmonary fibrosis: comparison of cells obtained with lung biopsy and clinical features. *Thorax* 1980; 35:9-18.
- 64 .-SALTINI C, HANCE A.J, FERRANS V.J, BASSET F, et al. Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:650-658.
- 65 .-FLEURY-FEITH J, ESCUDIER E, POCHOLLE M.J, CARRE CH, BERNAUDIN J.F. The effects of cytocentrifugation on differential cell counts in samples obtained by bronchoalveolar lavage. *Acta Cytol* 1987; 31:606-610.
- 66 .-MORDELET-DAMBRINE M, ARNOUX A, STANISLAS-LEGUERN G, et al. Processing of lung lavage fluid causes variability in bronchoalveolar cell count. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:305-306.
- 67 .-THOMPSON A.B, ROBBINS R.A, GHAFOURI M.A, LINDER J, RENNARD S.I. Bronchoalveolar lavage fluid processing. Effect of membrane filtration preparation on neutrophil recovery. *Acta Cytol* 1989; 33:544-549.

- 68 .-McGOWAN S.E, HENLEY S.A. Iron and ferritin contents and distribution in human alveolar macrophages. J Lab Clin Med 1988;11:611-617.
- 69 .-RICH E.A. Iron metabolism by smokers' alveolar macrophages : protective or problematic in the lung?. Editorial. J Lab Clin Med 1988; 11:598-599.
- 70 .-THOMAS E.D, RAMBERG R.E, SALE G.E. Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. Science 1976; 192:1016-1017.
- 71 .-Du BOIS R.M . The alveolar macrophage. Editorial. Thorax 1985; 40:321-327.
- 72 .-FELS A.O.S, COHN Z.A. The alveolar macrophage. J Appl Physiol 1986; 60:353-369.
- 73 .-BITTERMAN P.B, SALTZMAN L.E, ADELBERG S, FERRANS V.J, CRYSTAL R.G. Alveolar macrophage replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung. J Clin Invest 1984; 74:460-469.
- 74 .-HANCE A.J, DOUCHES S, WINCHESTER R.J, FERRANS V.J,

CRYSTAL R.G. Characterization of mononuclear phagocyte subpopulations in the human lung by using monoclonal antibodies: changes in alveolar macrophage phenotype associated with pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1985; 134:284-292.

- 75 .-FREYER D.R, MORGANROTH M.L, ROGERS C.E, ARNAOUT MA, TODD R.F. Modulation of surface CD11/CD18 glycoproteins (Mo1,LFA-1,p150,95) by human mononuclear phagocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 46:272-283.
- 76 .-MYONES B, DALZELL J.G, HOGG N, ROSS G.D. Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J Clin Invest* 1988;82:640-651.
- 77 .-DIMITRU-BONA A, BURMESTER G.R, WATERS S.J, WINCHESTER R.J. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983; 130:145-152.
- 78 .-BIONDI A, ROSSING T.H, BENNETT J, TODD III R.F. Surface membrane heterogeneity among human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1984; 132:1237-1243.

- 79 .-HOGG N. Human mononuclear phagocyte molecules and the use of monoclonal antibodies in their detection. Clin Exp Immunol 1987; 69:687-694.
- 80 .-MARWITZ P.A, ARKEL-VIGNA E, RIJKERS G.T, ZEGERS B.J.M. Expression and modulation of cell surface determinants on human adult and neonatal monocytes. Clin Exp Immunol 1988; 72:260-266.
- 81 .-RAZMA A, LYNCH J, WILSON B, WARD P, KUNKEL S. Expression of Ia-like (DR) antigen on human alveolar macrophages isolated by bronchoalveolar lavage. Am Rev Respir Dis 1984; 129:419-424.
- 82 .-COSTABEL U, BROSS K.J, ANDREESEN R, MATTHYS H. HLA-DR antigens on human macrophages from bronchoalveolar lavage fluid. Thorax 1986; 41:261-265.
- 83 .-LIPSCOMB M.F, LYONS CR, NUÑEZ G, et al. Human alveolar macrophages synthesize HLA-DR antigens in culture. Am Rev Respir Dis 1983; 127(Supl.):A59.
- 84 .-CAMPBELL D.A, duBOIS R.M, BUTCHER R.G, POULTER L.W. The density of HLA-DR antigen expresion on alveolar macrophages expresion is increased in pulmonary sarcoido-



sis. Clin Exp Immunol 1986; 65:165-171.

- 85 .-KALTREIDER H.B, BYRD P.K, CURTIS J.L. Expression of Ia by murine alveolar macrophages is up-regulated during the evolution of a specific immune response in pulmonary parenchyma. Am Rev Respir Dis 1988;137:1411-1416.
- 86 .-SPURZEM J.R, SALTINI C, KIRBY M, KONISHI K, CRYSTAL R.G. Expression of HLA clase II genes in alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. Am Rev Respir Dis 1989; 140:89-94.
- 87 .-AINSLIE G, POULTER L.W, duBOIS R. Relation between immunocytological features of bronchoalveolar lavage fluid and clinical indices in sarcoidosis. Thorax 1989 ; 44:501-509.
- 88 .-UNANUE E.R, ALLEN P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. Science 1987; 236:551-557.
- 89 .-HIRATA T.P.B, BITTERMAN J, MORNEX J, CRYSTAL R.G. Expression of the transferrin receptor during the process of mononuclear phagocyte maturation. J Immunol 1986; 136:1339-1345.

- 90 .-PELOSI-TESTA E, SAMOGGIA P, GIANNELLA G, et al. Mechanisms underlying T-lymphocyte activation: mitogen initiates and IL-2 amplifies the expression of transferrin receptors via intracellular iron level. Immunology 1988; 64:273-279.
- 91 .-LOPEZ GUERRERO J.A, REDONDO J.M, ALARCON B, et al. Different functional domains on the transferrin receptor molecule defined by monoclonal antibodies. Immunology 1989; 66:252-257.
- 92 .-HANCOCK W.W, MULLER W.A, COTRAN R.S. Interleukin 2 receptors are expressed by alveolar macrophages during pulmonary sarcoidosis and are inducible by lymphokine treatment of normal human lung macrophages, blood monocytes, and monocyte cell lines. J Immunol 1987; 138:185-191.
- 93 .-SANCHEZ-MADRID F, CEBRIAN M, LANDAZURI M.O de, et al. Report of the IV international workshop on leukocyte differentiation antigens. Inmunología 1989; 8:35-46.
- 94 .-CROCKER P.R, JEFFERIES W.A, CLARK S.J, CHUNG L.P, GORDON S. Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen. J Exp Med 1987; 166:613-618.

- 95 .-DAVIS G.S, BRODY A.R, CRAIGHEAD H.E. Analysis of air-space and interstitial mononuclear cell populations in human diffuse interstitial lung disease. Am Rev Respir Dis 1978; 118:7-15.
- 96 .-BRAY R.A, LANDAY A.L. Identification and functional characterization of mononuclear cells by flow cytometry. Arch Pathol Lab Med 1989; 113:579-590.
- 97 .-LANDAY A, OHLSSON-WILHELM B, GIORGI J.V. Application of flow cytometry to study of HIV infection. AIDS 1990; 4:479-497.
- 98 .-van MAARSSEVEEN C.M.T, MULLINK H, de HAAN M, et al. Simultaneous enumeration of T-cell subset and macrophages in bronchoalveolar lavage fluids by immunoenzyme double staining. Comparison with conventional immunofluorescence. Acta Cytol 1989; 33:550-556.
- 99 .-HUNNINGHAKE G.W, CRYSTAL R.G. Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T- lymphocyte activity at sites of disease activity. N Engl J Med 1981; 305:429-434.
- 100.-SEMENZATO G, TRENTIN L, ZAMBELLO R, et al. Different

types of cytotoxic lymphocytes recovered from the lung of patients with hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:70-74.

- 101.-SALTINI C, WINESTOCK K, KIRBY M, PINKSTON P, CRYSTAL R.G. Maintenance of alveolitis in patients with chronic beryllium disease by beryllium-specific helper T cells. *N Engl J Med* 1989; 320:1103-1109.
- 102.-ROITT I, BROSTOFF J, MALE D (eds). Respuestas inmunitarias mediadas por células. In: *Inmunología*. Segunda edición. Barcelona, Salvat S.A, 1991, pp.9.1-9.13.
- 103.-SCHWARTZ R.H. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1985; 3:237-261.
- 104.-WERFEL T, WITTER W, GÖTZE O. CD11b and CD11c antigens are rapidly increased on human natural killer cells upon activation. *J Immunol* 1991; 147:2423-2427.
- 105.-Van MAARSSEVEN A.C.M.Th, MULLINK H, ALONS C.L, STAM J. Distribution of T-lymphocyte subsets in different portions of sarcoid granulomas: Immunohistologic analysis with monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 1986; 17:493-

500.

- 106.-KELLY C.A, KOTRE C.J, WARD C, et al. Anatomical distribution of bronchoalveolar lavage fluid assessed by digital subtraction radiography. *Thorax* 1987; 42:624-628.
- 107.-SEMENZATO G, CHILOSI M , OSSI E, et al. Bronchoalveolar lavage and lung histology: comparative analysis of inflammatory and immunocompetent cell in patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:400-406.
- 108.-CRYSTAL R.G, GADEK J.E, FERRANS V.J,et al. Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am J Med* 1981; 70:542-568.
- 109.-ROBINSON B.W, JAMES A, ROSE A.H, STERRETT G.F, MUSK A.W. Bronchoalveolar lavage sampling of airway and alveolar cells. *Br J Dis Chest* 1988; 82:45-55.
- 110.-RENNARD S.I, GHAFOURI M, THOMPSON A.B, et al. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage to separate bronchial and alveolar samples. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:208-217.

- 111.-HUNNINGHAKE G.W, CRYSTAL R.G. Cigarette smoking and lung destruction: accumulation of neutrofilos in the lungs of cigarette smokers. Am Rev Respir Dis 1983; 128:833-838.
- 112.-THOMPSON A.B, RENNANRD S.I. Assessment of airways inflammation utilizing bronchoalveolar lavage. Clin Chest Med 1988; 9:635-642.
- 113.-GARCIA J.G.N, WOLVEN R.G, GARCIA P.L, KEOGH B.A. Assessment of interlobar variation of bronchoalveolar lavage cellular differentials in interstitial lung diseases. Am Rev Respir Dis 1986; 133:444-449.
- 114.-PETERSON M.W, NUGENT K.M, JOLLES H, MONICK M, HUNNINGHAKE G.W. Uniformity of bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary sarcoidosis. Am Rev Respir Dis 1988; 137:79-84.
- 115.-HELMERS R.A, DAYTON C.S, FLOERCHINGER C, HUNNINGHAKE G.W. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease: effect of volume of fluid infused. J Appl Physiol 1989; 67:1443-1446.
- 116.-ETTENSHON D.B, JANKOWSKI M.J, REDONDO A.A, DUNCAN P.G.

Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. 2. Safety and results of repeated BAL, and use in the assessment of intrasubject variability. Chest 1988;94:281-285.

117.-CHAMBERLAIN D.W, BRAUDE A.C, REBUCK A.S. A critical evaluation of bronchoalveolar lavage. Criteria for identifying unsatisfactory specimens. Acta Cytol 1987; 31:599-605.

118.-RANKIN J.A, NAEGEL G.P, REYNOLDS H.Y. Use of a central laboratory for analysis of bronchoalveolar lavage fluid. Am Rev Respir Dis 1986; 133:186-190.

119.-CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. MMWR (Suppl.) 1987; 36:3S-15S.

120.-WAHL S.M, ALLEN J.B, GARTNER S, et al. HIV-1 and its envelope glycoprotein down-regulate chemotactic ligand receptors and chemotactic function of peripheral blood monocytes. J Immunol 1989; 142:3553-3559.

121.-ALLEN J.B, McCARTNEY-FRANCIS N, SMITH P.D, et al.  
Expresion of interleukin 2 receptors by monocytes from

patients with acquired immunodeficiency syndrome and induction of monocyte interleukin 2 receptors by human immunodeficiency virus in vitro. J Clin Invest 1990; 85:192-199.

122.-SAO-TAH FAN, EDGINGTON T.S. Coupling of the adhesive receptor CD11b/CD18 to functional enhancement of effector macrophage tissue factor response. J Clin Invest 1991; 87:50-57.

123.-HO D.D, ROTA T.R, HIRSCH M.S. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. J Clin Invest 1986; 77:1712-1715.

124.-PETIT A.J.CH, TERSMETTE M, TERPSTRA F.G, et al.  
Decreased accessory cell function by human monocytic cells after infection with HIV. J Immunol 1988; 140: 1485-1489.

125.-FAUCI A.S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. Science 1988; 239: 617-622.

126.-GUILLON J.M, AUTRAN B, DENIS M, et al. Human immunodeficiency virus-related lymphocytic alveolitis. Chest



1988; 94:1264-1270.

- 127.-JENSEN B.N, LISSE I.M, GERSTOFT J, et al. Cellular profiles in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients with pulmonary symptoms: relation to diagnosis and prognosis. AIDS 1991; 5:527-533.
- 128.-MASON G.R, HASHIMOTO C.H, DICKMAN P.S, FOUTTY L.F, COBB C.J. Prognostic implications of bronchoalveolar lavage neutrophilia in patients with Pneumocystis carinii pneumonia and AIDS. Am Rev Respir Dis 1989; 139:1336-1342.
- 129.-ISRAEL-BIET, CADRANEL J, BELDJORD K, et al. Tumor necrosis factor production in HIV-seropositive subjects. Relationship with lung opportunistic infections and HIV expression in alveolar macrophages. J Immunol 1991; 147:490-494.
- 130.-AGOSTINI C, ZAMBELLO R, TRENTIN L, et al. Alveolar macrophages from patients with AIDS and AIDS-related complex constitutively synthesize and release tumor necrosis factor alpha. Am Rev Respir Dis 1991; 144:195-201.

- 131.-MÜLLER-QUERNHEIM J, KRÖNKE M, STRAUZ J,et al. Interleukin-2 receptor gene expression by bronchoalveolar lavage lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. Am Rev Respir Dis 1989; 140:82-88.
- 132.-PINKSTON P, BITTERMAN P.B, CRYSTAL R.G. Spontaneous release of interleukin-2 by lung T-lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. N Engl J Med 1983; 308:793-800.
- 133.-ROBINSON B.W.S, McLEMORE T, CRYSTAL R.G. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T-lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. J Clin Invest 1985; 75:1488-1495.
- 134.-MÜLLER-QUERNHEIM J,PFEIFER S, STRAUZ J, FERLINZ R. Correlation of clinical and immunologic parameters of the inflammatory activity of pulmonary sarcoidosis. Am Rev Respir Dis 1991; 144:1322-1329.
- 135.-CANTRELL D.A, SMITH K.A. Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. J Exp Med 1983; 158:1895-1911.
- 136.-DOMINIQUE S, BOUCHONNET F, SMIÉJAN J.M, HANCE A.J. Expression of surface antigens distinguishing "naive" and

previously activated lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 1990; 45:391-396.

137.-DAVIDSON B.L, FAUST J, PESSANO S, DANIELE R.P, ROVERA G  
Differentiation and activation phenotypes of lung T lymphocytes differ from those of circulating T lymphocytes. *J Clin Invest* 1985; 76: 60-65.

138.-MELIS M, GJOMARKAJ M, PACE E, MALIZIA G, SPATAFORA M.  
Increased expression of leukocyte function associated antigen-1 (LFA-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by alveolar macrophages of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest* 1991; 100:910-916.

139.-LECOSSIER D, VALEYRE D, LOISEAU A, et al. T-lymphocytes recovered by bronchoalveolar lavage from normal subjects and patients with sarcoidosis are refractory to proliferative signals. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:592-599.

140.-REYES C.N, WENZEL F.J, LAWTON BR, EMANUEL D.A. The pulmonary pathologia of farmer's lung disease. *Chest* 1992 ; 81:142-146.

- 141.-REYNOLDS H.Y. Concepts of pathogenesis and lung reactivity in hypersensitivity pneumonitis. Ann NY Acad Sci 1986; 465:287-303.
- 142.-ROSE C, KING T.E. Controversies in hypersensitivity pneumonitis. Editorial. Am Rev Respir Dis 1992; 145:1-2
- 143.-FORNIER E, TONNEL A.B, GOSSET P, et al. Early neutrophil alveolitis after antigen inhalation in hypersensitivity pneumonitis. Chest 1985; 88:563-566.
- 144.-BERNARDO J, HUNNINGHAKE G.W, GADEK J.E, FERRANS V.J, CRYSTAL R.G. Acute hypersensitivity pneumonitis: serial changes in lung lymphocytes subpopulations after exposure to antigens. Am Rev Respir Dis 1979; 120:985-994.
- 145.-HASLAM P.L. Bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis. Eur J Respir Dis 1987; 71:120-135.
- 146.-SOLER P, NIOCHE S, VALEYRE D, et al. Role of mast cells in the pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. Thorax 1987; 42:565-572.
- 147.-LAVIOLETTE M, CORMIER Y, LOISEAU A, et al. Bronchoalveo-

lar mast cells in normal farmers and subjects with farmer's lung. Diagnostic, prognostic, and physiologic significance. Am Rev Respir Dis 1991; 144:855-860.

148.-COSTABEL U, BROSS K.J, ANDERSEN R, MATTHYS H. Diagnostic usefulness of bronchoalveolar lavage cell populations in hypersensitivity pneumonitis: results of a discriminant analysis. Am Rev Respir Dis 1988; 137:344A.

149.-LEATHERMAN J.W, MICHAEL A.F, SCHWARTZ B.A, HOIDAL JR. Lung T-cells in hypersensitivity pneumonitis. Ann Intern Med 1984; 100:390-392.

150.-TRENTIN L, MARCER G, CHILOSI M, ZAMBELLO R, et al. Longitudinal study of alveolitis in hypersensitivity pneumonitis patients: an immunological evaluation. J Allergy Clin Immunol 1988; 82:577-585.

151.-CORMIER Y, BELANGER J, LAVIOLETTE M. Prognostic significance of bronchoalveolar lymphocytosis farmer's lung. Am Rev Respir Dis 1987; 135:692-695.

152.-HASLAM P.L, DEWAR A, BUTCHERS P, et al. Mast cells, atypical lymphocytes, and neutrophils in bronchoalveo-

lar lavage in extrinsic allergic alveolitis. Comparison with other interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:35-37.

- 153.-HERBERT J, BEAUDOIN J, LAVIOLETTE M, et al. Absence of correlation between the degree of alveolitis and antibody levels of *Micropolyspora faeni*. *Clin Exp Immunol* 1985; 60: 572-578.
- 154.-AGOSTINI C, TRENTIN L, ZAMBELLO R, et al. Pulmonary alveolar macrophages in patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis : characterization by monoclonal antibodies. *J Clin Immunol* 1987; 7:64-70.
- 155.-KATZENSTEIN A.A, ASKIN F.B (eds). Idiopathic interstitial pneumonia - Idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Surgical pathology of non-neoplastic lung diseases*. Second edition. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1990, pp.58-96.
- 156.-GAENSLER E, CARRINGTON C. Open biopsy for chronic diffuse infiltrative lung diseases: clinical, roentgenographic, and physiological correlation in 502 patients. *Ann Thorac Surg* 1980; 30:411-426.

- 157.-FLINT A. The interstitial lung diseases. A pathologist's view. Clin Chest Med 1982; 3:491-502.
- 158.-EPLER GR, McLOUD T.C, GAENSLER E.A, et al. Normal chest roentgenograms in chronic diffuse infiltrative lung disease. N Engl J Med 1978; 298:934-939.
- 159.-MÜLLER N.L, MILLER R.R. Computed tomography of chronic diffuse infiltrative lung disease -state of the art. (Part 1). Am Rev Respir Dis 1990; 142:1206-1215.
- 160.-GAENSLER E, CARRINGTON C. Open biopsy for chronic diffuse infiltrative lung disease: clinical, roentgenographic, and physiological correlation in 502 patients. Ann Thorac Surg 1980; 30:411-426.
- 161.-CHERNIACK R.M, COLBY T.V, FLINT A, et al. Quantitative assessment of lung pathology in idiopathic pulmonary fibrosis. Am Rev Respir Dis 1991; 144:892-900.
- 162.-FULMER J.D, ROBERTS W.C, Von GAL E.R, et al. Morphologic -physiologic correlates of the severity of fibrosis and degree of cellularity in idiopathic pulmonary fibrosis. J Clin Invest 1979; 63:665.

- 163.-RUDD R.M, HASLAM P.L, TURNER-WARWICK M. Cryptogenic fibrosing alveolitis. Relationship of pulmonary physiology and bronchoalveolar lavage to response to treatment and prognosis. Am Rev Respir Dis 1981; 124: 1-8.
- 164.-PANTIN C.F, VALIND S.O, SWEATMAN M, et al. Measures of the inflammatory response in cryptogenic fibrosing alveolitis. Am Rev Respir Dis 1988; 138:1234-1241.
- 165.-KATZENSTEIN A. Pathogenesis of "fibrosis" in interstitial pneumonia: An electron microscopic study. Hum Pathol 1985; 16:1015-1037.
- 166.-GUELLERT A.R, LANGFORD JA, WINTER R.J.D,et al. Asbestosis assessment by bronchoalveolar lavage and measurement of pulmonary epithelial permeability. Thorax 1985; 40:508-514.
- 167.-De VUYST P, JEDWAB J, DUMORTIER P, et al. Asbestos bodies in bronchoalveolar lavage. Am Rev Respir Dis 1982; 126:972-976.
- 168.-SEBASTIEN P, ARMSTRONG B, MONCHAUX G, BIGNON J. Asbestos bodies in bronchoalveolar lavage fluid and in lung parenchyma. Am Rev Respir Dis 1988; 137:75-78.



- 169.-NAGAI S, FUJIMURA N, HIRATA T, IZUMI T. Differentiation between idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases by comparison of the ratio of OKT4+ cells and OKT8+ cells in BALF T-lymphocytes. Eur J Respir Dis, 1985; 67:1-9.
- 170.-BACH M, BACH J.F. The use of monoclonal anti-T cell to study T cell imbalances in human diseases. Clin Exp Immunol 1981; 45:449-456.
- 171.-PARADIS I.L, DAUBER, RABIN B.S. Lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage and lung tissue in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. Am Rev Respir Dis 1986; 133:855-860.
- 172.-CAMPBELL D.A, POULTER L.W, Du BOIS R.M. Phenotypic analysis of alveolar macrophages in normal subjects and in patients with interstitial lung disease. Thorax 1986; 41:429-434.
- 173.-NOBLE B, Du BOIS R.M, POULTER L.W. The distribution of phenotypically distinct macrophage subsets in the lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. Clin Exp Immunol 1989; 76:41-46.

- 174.-CAMPBELL D.A, POULTER L.W, Du BOIS R.M, JANOSSY G.  
Immunohystological analysis of lung tissue from patients with criptogenic fibrosing alveolitis suggesting local expression of immune hypersensitivity. Thorax 1985; 40:405-411.
- 175.-KRADIN R.L, DIVERTIE M.B, COLVIN R.B et al. Usual interstitial pneumonitis is a T- cell alveolitis. Clin Immunol Immunopathol 1986; 40:224-235.
- 176.-O'DONNELL K, KEOGH B, CANTIN A, CRYSTAL R.G. Pharmacologic suppression of the neutrophil component of the alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. Am Rev Respir Dis 1987; 136:288-292.
- 177.-WATTERS L.C, KING T.E, CHERNIACK R.M, et al. Bronchoalveolar lavage fluid neutrophils increase after corticosteroid therapy in smokers with idipathic pulmonary fibrosis. Am Rev Respir Dis 1986; 133:104-109.
- 178.-HUNNINGHAKE G.W, GADEK J.E, LAULEY T.J, CRYSTAL R.G.  
Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. J Clin Invest 1981; 68:259-269.

- 179.-MARTIN T.R, RAGHU G, MAUNDER R.J, SPRINGMEYER S.C. The effects of chronic bronchitis and chronic air flow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage. Am Rev Respir Dis 1985; 132: 254-260.
- 180.-CRYSTAL R.G, FULMER J.D, ROBERTS W.C, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic and biochemical aspects. Ann Intern Med 1976; 85:769-788.
- 181.-RENNARD S.I, HUNNINGHAKE G.W, BITTERMAN P.B, CRYSTAL R.G.. Production of fibronectin by human alveolar macrophage: mechanisms for the recruitment of fibroblast to sites of tissue injury in interstitial lung diseases. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:7147-7151.
- 182.-KING T.E., SHEN A.S, WATTERS L.C, et al. Bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia: clinical presentation and bronchoalveolar lavage constituents differentiates this process from idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis (abstract). Am Rev Respir Dis 1987; 135:348A.
- 183.-CORDIER J.F, LOIRE R, BRUNE J. Idiopathic bronchiolitis

obliterans organizing pneumonia. Definition of characteristic clinical profiles in a series of 16 patients. Chest 1989; 96:999-1004.

- 184.-EPPLER G.R, COLBY T.V, McLOUD T.C, CARRINGTON C.B, GAENSLER E.A. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. N Engl J Med 1985; 312:152-158.
- 185.-KATZENSTEIN A.L.A, MYERS J.L, PROPHET W.D, CORLEY L.S, SHIN M.S. Bronchiolitis obliterans and usual interstitial pneumonia: a comparative clinicopathologic study. Am J Surg Pathol 1986; 10:373-381.
- 186.-GUERRY-FORCE M.L, MULLER N.L, WRIGHT J.L, et al. A comparison of bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia, usual interstitial pneumonia, and small airways disease. Am Rev Respir Dis 1987; 135:705-712.
- 187.-MYERS J.L, KATZENSTEIN A.L.A. Ultrastructural evidence of alveolar of alveolar epithelial injury in idiopathic bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia. Am J Pathol 1988; 132:102-109.
- 188.-MYERS J.L, KATZENSTEIN A.L.A. Epithelial necrosis and alveolar collapse in the pathogenesis of usual inters-

titial pneumonia. Chest 1988; 94:1309-1311.

189.-KATZENSTEIN A.A, ASKIN F.B (eds). Acute lung injury patterns: diffuse alveolar damage, acute interstitial pneumonia, bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia. In: Surgical pathology of non-neoplastic lung diseases. Second edition. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1990, pp.9-57.

190.-SPURZEM J.R, SALTINI C, ROM W, WINCHESTER R.J, CRYSTAL R.G. Mechanisms of macrophage accumulation in the lungs of asbestos-exposed subjects. Am Rev Respir Dis 136:276-280.

191.-HASLAM P.L, CROMWELL O , DEWAR A, TURNER-WARWICK M. Evidence of increased histamine levels in lung lavage fluids from patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. Clin Exp Immunol 1981; 44:587-593.

192.-CASALE T.B, TRAPP S, ZEHR B, HUNNINGHAKE G.W. Bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in interstitial lung diseases. Am Rev Respir 1988; 138:1604-1608.

193.-HUNNINGHAKE G.W, FAUCI A.S. Pulmonary involvement in the collagen vascular diseases. Am Rev Respir Dis

1979; 119:471-503.

194.-WIEDEMANN H.P, MATTHAY R.A. Pulmonary manifestations of the collagen vascular diseases. Clin Chest Med 1989; 10:677-722.

195.-WALLAERT B, HATRON P.Y, GROSBOIS J.M, et al. Subclinical pulmonary involvement in collagen vascular diseases assessed by bronchoalveolar lavage. Am Rev Respir Dis 1986; 133:574-580.

196.-SILVER R.M, METCALF J.F, STANLEY J.H, LEROY E.C. Interstitial lung disease in scleroderma. Analysis by bronchoalveolar lavage. Arthritis Rheum 1984; 27:1254-1262.

197.-KÖNIG G, LUDERSCHMIDT C, HAMMER C, et al. Lung involvement in scleroderma. Chest 1984; 85:318-324.

198.-ROSSI G.A, BITTERMAN P.B, RENNARD S.L, FERRANS V.J, CRYSTAL R.G. Evidence for chronic inflammation as a component of the interstitial lung disease associated with progressive systemic sclerosis. Am Rev Respir Dis 1985; 131:612-617.

- 199.-EDELSON J.D, HYLAND R.H, RAMSOEN M, et al. Lung inflammation in scleroderma: clinical, radiographic, physiologic and cytopathological features. J Reumatol 1985; 12:957-963.
- 200.-WALLAERT B, AERTS C, BART F, et al. Alveolar macrophages dysfunction in systemic lupus erythematosus. Am Rev Respir Dis 1987; 136:293-297.
- 201.-WALLAERT B, DUGAS M, DANSIN E, et al. Subclinical alveolitis in immunological systemic disorders. Transition between health and disease?. Eur Resp J 1990; 3: 1206-1216.
- 202.-LEATHERMAN JW. Immune alveolar hemorrhage. Chest 1987; 91:891-897.
- 203.-PATEL R.C, DUTTA D, SCHOMFELD S.A. Free-base cocaine use associated with bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. Ann Intern Med 1987 107:186-187.
- 204.-HEFFNER J.E, HARLEY R.A, SCHABEL S.I. Pulmonary reactions from illicit substance abuse. Clin Chest Med 1990; 11:151-162.

205.-FORRESTER J.M, STEELE A.W, WALDROM J.A, PARSONS P.E.

Crack lung: an acute pulmonary syndrome with a spectrum of clinical and histopathologic findings. Am Rev Respir Dis 1990; 142:462-467.

206.-OWENS G.R, FOLLANSBEE W.P. Cardiopulmonary manifestations of systemic sclerosis -review. Chest 1987; 91: 118-127.

207.-STEEN V.D, OWENS G.R, FINO G.L.et al. Pulmonary involvement in systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis Rheum 1985; 28:759-767.

208.-YOUNG R.H, MARK G.J. Pulmonary vascular changes in scleroderma. Am J Med 1978; 64:998-1004.

209.-BETTMANN M.A, KANTROWITZ F. Rapid onset of lung involvement in progressive systemic sclerosis. Chest 1979; 75:509-510.

210.-SCHNEIDER P.D, WISE R.A, HOCHBERG M.C, et al. Serial pulmonary function in systemic sclerosis. Am J Med 1982; 73:385-394.

211.-GRAZIANO F.M, FRIEDMAN L.C, GROSSMAN J. Pulmonary hy-



pertension in a patient with mixed connective tissue disease: clinical and pathologic findings, and review of literature. Clin Exp Rheumatol 1983; 1:251-255.

212.-SULLIVAN W.D, HURST D.J, HARMON C.E, et al. A prospective evaluation emphasizing pulmonary involvement in patients with mixed connective tissue disease. Medicine (Baltimore) 1984; 92-107.

213.-WIENER-KRONISH J.P, SOLINGER A.M, WARNOCK M.L, et al. Severe pulmonary involvement in mixed connective tissue disease. Am Rev Respir Dis 1981; 499-503.

214.-HAUPT H.M, MOORE G.W, HUTCHINS G.M. The lung in systemic lupus erythematosus: Analysis of the pathologic changes in 120 patients . Am J Med 1981; 71:791-798.

215.-MATTHAY R.A, SCHWARTZ M.T, PETTY T.L, et al. Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus: review of twelve cases of acute lupus pneumonitis. Medicine (Baltimore) 1975; 54:397-409.

216.-EISEMBERG H, DUBOIS E.L, SHERWING R.P, BALCHUM O. Diffuse interstitial lung disease in systemic lupus erythematosus. Ann Intern Med 1973; 79:37-45.

- 217.-KUHN C. Systemic lupus erythematosus in a patient with ultrastructural lesions of the pulmonary capillaries previously reported in the Review as due to idiopathic pulmonary hemosiderosis. *Am Rev Respir Dis* 1972; 106: 931-932.
- 218.-MYERS J.M, KATZENSTEIN A.A. Microangiitis in lupus-induced pulmonary hemorrhage. *Am J Clin Pathol* 1986; 85:522-556
- 219.-BYRD R, TRUNK G. Systemic lupus erythematosus presenting as pulmonary hemosiderosis. *Chest* 1973; 64:128-129.
- 220.-CHURG A, FRANKLIN W, CHAN K.L, et al. Pulmonary hemorrhage and immune-complex deposition in the lung. *Arch Pathol Lab Med* 1980; 104:388-391.
- 221.-MARINO C.T, PERTSCHUK L.P. Pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* 1981; 141: 201-203.
- 222.-LEATHERMAN J.W, DAVIES S.F, HOIDAL J.R. Alveolar hemorrhage syndromes: Diffuse microvascular lung hemorrhage in immune and idiopathic disorders. *Medicine*

1984; 63:343-361.

223.-BRADLEY J.D. The pulmonary hemorrhage syndromes. Clin Chest Med 1982; 3:593-605.

224.-HAWORTH S.J, SAVAGE C.O.S, CARR D, et al. Pulmonary hemorrhage complicating Wegener's granulomatosis and microscopic polyarteritis. Br Med J 1985; 290:1775-1778.

225.-ABUD-MENDOYA C, DIAZ-JOVANEU E, ALARCON-SEGOVIA D. Fatal pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus: occurrence without hemoptysis. J Rheum 1985; 12:558-561.

226.-DREW W.L, FINLEY T.N, GOLDE D.W. Diagnostic lavage and occult pulmonary hemorrhage in thrombocytopenic immunocompromised patients. Am Rev Respir Dis 1977; 116:215-221.

227.-KIM C.C, SALEBA K, BAUGHMAN R.P, et al. Iron staining on bronchoalveolar lavage smears for detecting occult pulmonary hemorrhage: is it reliable? . Acta Cytol 1989; 33:716.

- 228.-SHERMAN J.M, WINNIE G, THOMASSEN M.J et al. Time course of hemosiderin production and clearance by human pulmonary macrophages. Chest 1984; 86:409-411.
- 229.-MARK E.J, RAMIREZ J.F. Pulmonary capillaritis and hemorrhage in patients with systemic vasculitis. Arch Pathol Lab Med 1985; 109:413-418.
- 230.-FAUCI A.S, HAYNES B.F, KATZ P, WOLFF S.M. Wegener's granulomatosis:prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients over 21 years. Ann Intern Med 1983; 98:76-85.
- 231.-LEAVITT R.Y, FAUCI A.S. Pulmonary vasculitis- state of the art. Am Rev Respir Dis 1986; 134:149-166.
- 232.-ROBBINS R.A, LINDER J, STAHL M.G, et al. Diffuse alveolar hemorrhages in autologous bone marrow transplant recipients. Am J Med 1989;87:511-518.
- 233.-ZIESCHE R, COSTABEL U, GUZMAN J, MATTHYS H. Cytologic and immunocytologic findings in bronchoalveolar lavage as a contribution to the differential diagnosis of chronic lung hemorrhages. Pneumologie 1990;44:299-300.

234.-LINDER J, ROBBINS R, RENNARD S.I. Cytologic criteria for pulmonary hemorrhages. Acta Cytol 1988; 32:763.

235.-KAHN F, JONES J, ENGLAND D. Diagnosis of pulmonary hemorrhage in the immunocompromised host. Am Rev Respir Dis 1987; 136:155-160.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Consejo Universitario por los señores firmantes en el día de la fecha para juzgar la Tesis Doctoral de

JOSÉ MARTÍN JUAN

titulada

VALORACION DE LOS HALLAZGOS CINTOLOGICOS E INFRACINTOLOGICOS EN EL FLUJO DE LA RASA BENICUALVEGUA EN

acordó otorgarle la calificación de

ADOPTO CUM LAUDE

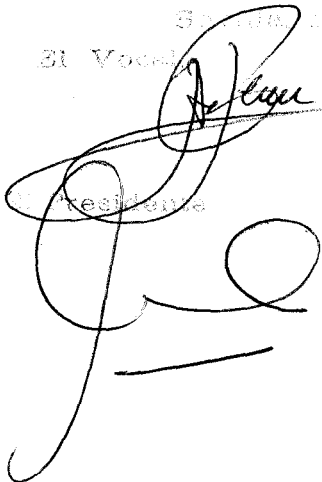
DATOLOGIA INTER  
CIAL NO NEOPLAN

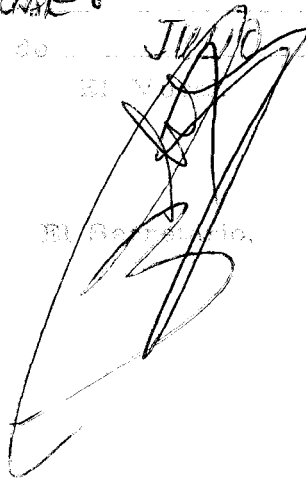
1993

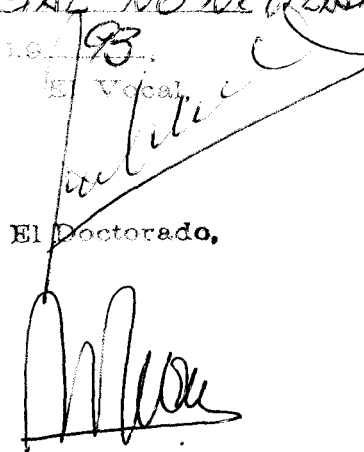
El Vocal

El Vocal

El Vocal







El Doctorado,