

1/2428

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

ASPECTOS CLINICO-DIAGNOSTICOS E INMUNOLOGICOS DE LA ENFERMEDAD
PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA ASOCIADA A ARTRITIS REUMATOIDE:
APORTACION DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR

TESIS DOCTORAL

Reg. F.M. 12.556

JULIO ANCOCHEA BERMUDEZ

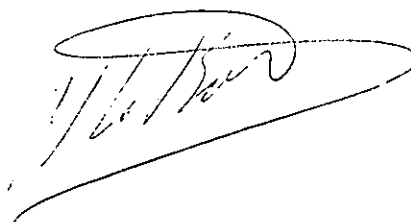
MADRID, 1993

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D. JOSE MIGUEL LOPEZ-BOTET ARBONA, Doctor en Medicina y Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

INFORMA: Que durante los últimos cinco años, el Dr. Julio Ancochea Bermúdez ha trabajado en el tema "ASPECTOS CLINICO-DIAGNOSTICOS E INMUNOLOGICOS DE LA ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA ASOCIADA A ARTRITIS REUMATOIDE: APORTACION DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR". Este trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y directa supervisión. Los resultados de su labor investigadora se recogen en la presente Tesis Doctoral, la cual considero concluida para su presentación y defensa ante el Tribunal.

Y a los efectos oportunos firmo la presente en Madrid a uno de Septiembre de mil novecientos noventa y tres.



Fdo: Dr. J.M. López-Botet Arbona

D.N.I. 22519051

A mis padres, Marga y mi hijo Julio.

Financiado parcialmente con las becas SEPAR-Abelló 1987
y FIS (89/0066 y 89/0069).

AGRADECIMIENTOS

A mi tío, el Dr. Julio Montero Moreno, que con cariño y vehemencia despertó en mí la ilusión por la Medicina.

Al Dr. Angel González González, mi maestro, Jefe del Servicio de Neumología del Hospital de la Princesa, por sus extraordinarias cualidades personales y científicas, con toda mi admiración y profundo respeto.

Al Dr. J. Miguel López-Botet por su amistad, dedicación y ejemplo.

Al Hospital de la Princesa, del que me siento orgulloso de formar parte y, en particular, a los miembros de los Servicios de Neumología, Reumatología e Inmunología, por su abierta colaboración para que este trabajo pudiera ser llevado a cabo. Al ser todos ellos excelentes profesionales y amigos, no es necesario citarlos por sus nombres.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

AR: artritis reumatoíde

BAL: lavado broncoalveolar

EPI: enfermedad pulmonar intersticial

EPID: enfermedad pulmonar intersticial difusa

FP: fibrosis pulmonar

FPI: fibrosis pulmonar idiopática

FR: factor reumatoide

ANA: anticuerpos antinucleares

VSG: velocidad de sedimentación globular

RT: radiografía de tórax

ECG: electrocardiograma

PFR: pruebas funcionales respiratorias

TAC: tomografía axial computadorizada

HRTAC: TAC de alta resolución

RNM: resonancia nuclear magnética

FVC: capacidad vital forzada

FEV₁: volumen espiratoria máximo en el primer segundo

VEMS: FEV₁

TLC: capacidad pulmonar total

DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono

pO₂: presión parcial de oxígeno en sangre arterial

pCO₂: presión parcial de anhídrido carbónico en sangre arterial

AaPO₂: gradiente alveoloarterial de O₂

V/Q: ventilación/perfusión

PEF: pico de flujo espiratorio

Ga 67: gammagrafía pulmonar con citrato de galio 67.

LT: linfocitos T

Tc: linfocitos T citotóxicos

Th: linfocitos T cooperadores

LB: linfocitos B

Ig: inmunoglobulina

MA: macrófago/s alveolar/es

NK: del inglés, "natural killer"

FB: fibrobroncoscopia

BTB: biopsia transbronquial

BPA: biopsia pulmonar a cielo abierto

Ag: antígeno/s

AcM: anticuerpo/s monoclonal/es

CD: grupo de diferenciación (AcM que reconocen idénticos o distintos epítopos en la misma estructura molecular)

CPH: complejo principal de histocompatibilidad

IL: interleuquina

CQ: citoquina/s

TNF: factor de necrosis tumoral

IFD: inmunofluorescencia directa

IFI: inmunofluorescencia indirecta

LSP: linfocitos en sangre periférica

PBL: LSP

SP: sangre periférica

r-IL: receptor de interleuquina

r-Tr: receptor de transferrina

TcR: receptor de células T
AIM: del inglés, "activation inducer molecule"
VLA: del inglés, "very late antigen"
IF- γ : interferón gamma
Kd: kilodaltons
Ca⁺⁺: ion calcio
Na⁺: ion sodio
HX: histiocitosis X
BOOP: bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa
NEC: neumonía eosinofílica crónica
AAE: alveolitis alérgica extrínseca
NH: neumonitis por hipersensibilidad
CVD: enfermedades vasculares del colágeno
ECA: enzima conversora de angiotensina
PCP: péptido del procolágeno
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
FQN: factor quimiotáctico para neutrófilos
PGE₂: prostaglandina E₂
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
RIA: radioinmunoensayo
ELISA: enzimoinmunoensayo (enzyme-linked immunosorbent assay)

<u>INTRODUCCION</u>	1
1. LA NEUMOPATIA INTERSTICIAL EN LA ARTRITIS REUMATOIDE	
1.1. Epidemiología y factores de riesgo	6
1.2. Papel de los fármacos	9
1.3. Clínica	14
1.4. Estudio Radiológico	18
1.5 Pruebas funcionales respiratorias	22
1.6 Gammagrafía pulmonar con Galio-67	28
1.7 Lavado broncoalveolar	
1.7.1 Consideraciones generales	33
1.7.2 Valor del lavado broncoalveolar en el diagnóstico y seguimiento de la neumopatía intersticial no infecciosa	40
1.7.3. Lavado broncoalveolar en la Artritis Reumatoide	51
1.8. Hallazgos histológicos	54
1.9. Tratamiento	58
2. PATOGENIA	
2.1. Mecanismos patogénicos que conducen al desarrollo de fibrosis pulmonar	61
2.2. Mecanismos de activación de los linfocitos T. Marcadores de activación	67
2.3. Citoquinas del pulmón	73
<u>OBJETIVOS</u>	79

<u>MATERIAL Y METODOS</u>	81
1. CONSIDERACIONES GENERALES	
1.1. Pacientes estudiados	82
1.2. Datos analíticos	83
1.3. Radiografía de tórax	83
1.4. Pruebas funcionales respiratorias	84
1.5. Lavado broncoalveolar	84
1.6. Grupo control	86
1.7. Clasificación de la población estudiada	86
2. ESTUDIO COMPARATIVO DE ANTIGENOS DE DIFERENCIACION LEUCOCITARIA EN LINFOCITOS DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR Y SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA	
2.1. Grupo de estudio	90
2.2. Separación de las células y análisis por inmunofluorescencia	90
3. ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-α (TNF-α) E INTERLEUQUINA-6 (IL-6) POR LOS MACROFAGOS ALVEOLARES DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA, Y CONTROLES SANOS	
3.1. Grupo de estudio	93
3.2. Metodología	93
3.3. Ensayo de TNF- α	94
3.4. Ensayo para IL-6	95
4. ANALISIS ESTADISTICO	96

<u>RESULTADOS</u>	97
<u>DISCUSION</u>	117
<u>CONCLUSIONES</u>	132
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	134

INTRODUCCION

Las enfermedades del tejido conectivo son un grupo heterogéneo de trastornos inflamatorios, de origen multifactorial y etiopatogenia en gran parte desconocida, mediados inmunológicamente. Los pulmones se afectan frecuentemente en estas enfermedades, dada la abundancia de tejido conectivo y riego sanguíneo pulmonar, y ello compromete en diferente grado y combinaciones a todas las áreas del pulmón (vías aéreas, alvéolos, sistema vascular, pleura). La asociación entre las enfermedades del tejido conectivo y enfermedad pulmonar intersticial (EPI) es frecuente y está bien establecida (1-5).

La Artritis Reumatoide (AR) es una artropatía inflamatoria simétrica, de predominio en el sexo femenino y curso clínico variable, con frecuentes manifestaciones extraarticulares (especialmente en pacientes con enfermedad erosiva activa, altos títulos de factor reumatoide (FR) e inmunocomplejos circulantes). Las lesiones extraarticulares incluyen nódulos subcutáneos, inflamación ocular, pericarditis, linfadenopatía, esplenomegalia, síndrome de Felty, ulceraciones cutáneas y una amplia variedad de lesiones pleuropulmonares (6-9).

La AR fué descrita por Landre-Beauvais en 1800 y posiblemente identificada por Sydenham en 1676 (10). No obstante, son probablemente Ellman y Ball en 1948 los primeros autores que aluden al pulmón como órgano diana dentro del espectro extraarticular de la AR (11). Desde entonces, otros investigadores han ido describiendo diferentes patologías pulmonares que pueden acontecer en el curso de la AR. Quizás, las más significativas históricamente han sido dos aportaciones: la de Caplan en 1953, que describe la asociación entre la exposición al polvo en mineros del carbón con AR y la existencia de nódulos pulmonares reumatoides (12,13), y la de Tomasi et al. en 1960, que observan la existencia de correlación entre títulos altos de factor reumatoide (FR) y hallazgos radiológicos de

fibrosis pulmonar (FP) (12). Sin embargo, hasta la década de los 70 no se empieza a considerar la FP como posible complicación de la AR.

Hoy en día se sabe que la AR, enfermedad inflamatoria crónica de causa desconocida, puede asociarse con una amplia variedad de anomalías pulmonares (tabla 1) (14,15). De todas ellas, la más frecuente e interesante es la neumopatía intersticial. Esta, manifestada radiológicamente, ocurre en un escaso porcentaje de enfermos. Sin embargo, utilizando parámetros sensibles de función pulmonar y muestras de biopsias pulmonares se ha establecido una alta incidencia de EPI en pacientes con AR (15-19).

Distintos estudios han tratado de encontrar el posible factor o factores que predisponen a que se produzca este hecho, tales como el hábito de fumar, la exposición a polvos minerales, la mayor prevalencia de los fenotipos HLA DR3 y DR4, defectos cualitativos y cuantitativos en la producción de α -1 antitripsina, la mayor prevalencia en enfermos con síndrome de Sjögren secundario y por último, y muy importante, los diferentes medicamentos empleados en el tratamiento de la AR (20).

Las lesiones pulmonares inducidas por fármacos son a menudo difíciles de establecer y su desarrollo está condicionado por la susceptibilidad del huésped, la dosis del fármaco empleado y la coexistencia de otros factores como enfermedad pulmonar previa (21). Algunos de los fármacos en los que está documentado un potencial papel fibrogenético se utilizan comúnmente en el tratamiento de la AR.

Asumiendo el papel de todos estos factores, hoy en día se acepta que la AR forma parte de un grupo heterogéneo de enfermedades de etiología desconocida que pueden converger, como vía final común, en el desarrollo de fibrosis pulmonar. Su importancia radica en su naturaleza crónica, su comienzo generalmente silente, y que en su progresión puede conducir a incapacidad funcional mayor que la derivada de la afectación articular (22).

Dentro de este contexto, se ha sugerido que el lavado broncoalveolar (BAL) es un útil instrumento para la detección precoz de la neumopatía intersticial en la AR y puede contribuir al estudio y comprensión de los cambios fisiopatológicos que ocurren en el espacio alvéolo-intersticial de estos enfermos, lo que puede permitir establecer criterios pronósticos y estrategias terapéuticas.

TABLA 1

MANIFESTACIONES PLEUROPULMONARES DE LA AR

- Enfermedad pulmonar intersticial
- Enfermedad pleural
- Nódulos reumatoides (necrobióticos); nódulos neumoconióticos (síndrome de Caplan)
- Infecciones del tracto respiratorio
- Bronquiolitis obliterante con o sin neumonía organizativa
- Lesiones vasculares pulmonares e hipertensión pulmonar
- Enfermedad fibrobullosa apical
- Inmovilidad de la caja torácica
- Disfunción de la vía aérea superior secundaria a artritis cricoaritenoidea

1. LA NEUMOPATIA INTERSTICIAL EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.

1.1. EPIDEMIOLOGIA Y FACTORES DE RIESGO

La enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) se desarrolla a menudo en pacientes con AR, si bien la frecuencia y prevalencia de esta asociación varía ampliamente en las diferentes series publicadas y ello depende de los métodos empleados para su detección (clínico-radiológicos, funcionales, patológicos) y de la población seleccionada para el estudio.

La radiografía convencional de tórax (RT) es insensible e imprecisa. Walker y Wright encuentran 8 pacientes con fibrosis intersticial difusa por criterios radiológicos en 516 AR, lo que refleja una incidencia del 1'6% (23). En otras series de pacientes con AR existe evidencia radiográfica de EPID en como mucho un 20% de los enfermos (24-28). Los pacientes con alto título de FR tienen mayor probabilidad de presentar una RT patológica.

Por el contrario, Frank et al. describen alteraciones de la difusión en el 41% de 41 pacientes con AR vistos consecutivamente. Sólo el 18% de los enfermos con difusión alterada tenían evidencia radiológica de afectación intersticial (27). Este y otros estudios (17-19,29) señalan que el screening fisiológico demuestra una alta incidencia de EPID en la AR.

La AR tiene predilección por el sexo femenino (rango, 2:1 a 4:1). Sin embargo, la enfermedad pulmonar asociada a AR es más frecuente en varones (relación, 3:1) y se da más a menudo en pacientes con AR de comienzo tardío. Aunque puede presentarse en niños, la EPID en la AR suele aparecer entre la cuarta y octava décadas de la vida, manifestándose la mayoría de los casos entre los 50 y 60 años (15).

Algunos autores sugieren que la AR representa una respuesta inmunológica persistente frente a un antígeno aún no identificado en un huésped genéticamente susceptible. La

comunicación de una asociación familiar de AR y EPID, y de un aumento en el fenotipo MZ de α -1 antitripsina en individuos con alveolitis fibrosante con y sin AR, avalan la posibilidad de una predisposición genética en el desarrollo de EPID (15).

Se han reconocido también otros factores que pueden predisponer al enfermo con AR a desarrollar EPID, o de padecer ésta, agravarla. Se han implicado la exposición a polvos minerales y el hábito tabáquico. También parece existir una mayor frecuencia de EPID en los pacientes con fenotipo HLA DR3 y DR4 (12).

Así como en otras formas de enfermedad extraarticular, la enfermedad intersticial en la AR se ha asociado con la positividad del FR (23,25,30,31).

Asimismo, se ha puesto de manifiesto el papel del déficit de inhibidores de proteasas en la patogenia de la FP en general y en la asociada a AR en particular. En un estudio sobre estos inhibidores se ha encontrado que los fenotipos no MM para α -1 antitripsina alcanzaban el 50% en pacientes con AR y FP, frente al 12 y 14% en la población general y AR sin afectación pulmonar, respectivamente (32). Investigaciones más recientes indican un 47% de FP por criterios radiológicos en pacientes con AR y fenotipo M1M2, mientras que sólo aparecía FP en el 3% de las AR con fenotipo M1M1 (33). La AR, considerada globalmente, presenta un aumento del fenotipo M1M2 (34). Todos estos trabajos señalan que en pacientes con AR y FP pueden existir defectos cualitativos y cuantitativos en la producción de α -1 antitripsina.

Con respecto a las características clínicas de la AR, en la literatura se señala que parece ser más frecuente la afectación intersticial en enfermos que padecen síndrome de Felty y síndrome de Sjögren secundario. Incluso, ha sido sugerida una aparente asociación de AR y sarcoidosis (35,36), más concretamente en pacientes con AR y síndrome de Sjögren con fenotipo HLA DR4 (35).

Referente a los datos serológicos de rutina, la principal diferencia encontrada en las distintas series es un mayor porcentaje de seropositividad para el FR. El 95% de los enfermos tienen tendencia a presentar títulos más altos de FR y velocidad de sedimentación más elevada (22). Otros estudios encuentran una mayor frecuencia de positividad para anticuerpos antinucleares (ANA), inmunocomplejos circulantes y crioglobulinas, aunque estos tres últimos datos son más controvertidos (12).

Por último, existen una serie de fármacos potencialmente fibrogénicos. Por su importancia y porque muchos de ellos se utilizan de forma generalizada en el tratamiento de la AR, se hará una consideración más amplia a continuación.

1.2. PAPEL DE LOS FARMACOS

Numerosos fármacos pueden producir efectos adversos sobre el parénquima pulmonar, la pleura y las vías aéreas. Esta toxicidad parece ser el resultado de la combinación de un efecto tóxico directo del fármaco o sus metabolitos y de un efecto indirecto que desencadena procesos inflamatorios. La mayor parte de estas complicaciones pueden ser prevenidas o minimizadas por el clínico, conociendo la eventual toxicidad de los medicamentos que prescribe. De hecho, la mayoría de las enfermedades pulmonares inducidas por fármacos son reversibles si se reconocen tempranamente y se suspende el agente responsable (37). No obstante, probablemente menos del 5% de toda la patología pulmonar secundaria a fármacos es reconocida o documentada, subestimándose la incidencia de este problema (38,39). Parece, pues, necesario profundizar en los mecanismos que conducen al establecimiento de daño pulmonar y utilizar criterios diagnósticos uniformes (40-44).

En la tabla 2 se relacionan los principales agentes que pueden inducir enfermedad intersticial pulmonar. Dentro de esta relación se encuentran fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de la AR, cuya potencial toxicidad pulmonar ha sido destacada en la literatura (tabla 3). Tal es el caso de las sales de oro (12,45-51) y la D-penicilamina (12,44,47,52), de algunos inmunosupresores como el metotrexate (44,53,54), ciclofosfamida (12,44,55), azatioprina (45,46), algunos antiinflamatorios no esteroideos como la fenilbutazona (12,56), y la salazopirina (57-61).

En general, se reconocen cinco síndromes clínicos mayores de afectación pulmonar secundaria a agentes antirreumáticos (62):

- 1- Neumonitis crónica/fibrosis pulmonar (penicilamina, oro, metotrexate, ciclofosfamida, azatioprina, antiinflamatorios no esteroideos).

- 2- Neumonitis por hipersensibilidad (metotrexate, oro, antiinflamatorios no esteroideos, penicilamina).
- 3- Síndrome pulmón-riñón, con muchas similitudes con el síndrome de Goodpasture (penicilamina).
- 4- Bronquiolitis obliterante (penicilamina, oro).
- 5- Edema pulmonar no cardiogénico (salicilatos, antiinflamatorios no esteroideos, colchicina).

De todos ellos, la alveolitis crónica/FP es el más frecuente. Se sabe que las lesiones pulmonares inducidas por fármacos pueden interesar al intersticio pulmonar, pared alveolar, pared vascular y bronquiolos terminales con diferente intensidad y, a veces, existen lesiones similares inducidas por fármacos con muy distinta farmacocinética y estructura molecular. Esto nos lleva a pensar que el mecanismo íntimo de acción de estas drogas es muy similar al que acontece en aquellos estados patológicos en los que intervienen células inflamatorias e inmunes, es decir, que al reclutamiento de células efectoras en el foco inflamatorio se puede llegar por diferentes vías y que, a partir de este foco, sea cual fuere su causa desencadenante, puede establecerse la EPID/FP. En este último paso intervendrían probablemente el sistema oxidante-antioxidante, sistemas reguladores de la matriz extracelular y determinadas citoquinas (63). La ciclofosfamida (55,64), metotrexate (65), sales de oro (66) y D-penicilamina (67) son fármacos en los que se ha demostrado "in vitro" su intervención en alguno o varios de los mecanismos citados.

En los pacientes con AR, la toxicidad pulmonar por fármacos debe ser diferenciada de la afectación por la propia enfermedad de base, lo que a menudo supone un problema complejo. En este contexto, Hakala revisa 57 pacientes con AR ingresados por patología intersticial pulmonar, determinando en 8 una relación de causalidad con drogas en base a los

siguientes criterios: (a) comienzo relativamente agudo; (b) infiltrados pulmonares bilaterales difusos simultáneos a la toma del medicamento; (c) mejoría tras la retirada del fármaco; y (d) sólo moderados signos radiológicos residuales de afectación intersticial tras la supresión del mismo. De los 8 pacientes, 5 habían sido tratados con oro, 1 con penicilamina y 2 con nitrofurantoína (68).

TABLA 2

**CLASIFICACION ABREVIADA DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE DROGAS
QUE PUEDEN INDUCIR ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL**

- Antibióticos
 - Nitrofurantoina
 - Sulfasalacina
- Agentes anti-inflamatorios
 - Aspirina
 - Oro
 - Penicilamina
 - Metotrexate
- Agentes cardiovasculares
 - Amiodarona
 - Tocainida
- Agentes quimioterápicos
 - Antibióticos
 - Bleomicina
 - Mitomicina-C
 - Agentes alcalinizantes
 - Busulfán
 - Ciclofosfamida
 - Clorambucil
 - Melfalán
 - Antimetabolitos
 - Azatioprina
 - Arabinósido de citosina
 - Metotrexate
 - Nitrosureas
 - Otros agentes
 - Procarbacin
 - Zimostatin
 - Vinblastina
- Drogas que inducen Lupus Eritematoso Sistémico
 - Procainamida
 - Isoniacida
 - Hidralacina
 - Hidantoínas
 - Penicilamina
- Drogas no legalizadas
 - Heroína
 - Metadona
 - Dextropropoxifeno
 - Talco
- Miscelánea
 - Oxígeno
 - Drogas que inducen infiltrados pulmonares y eosinofili
 - L-triptófano
 - Hidroclorotiacida
 - Radiación

TABLA 3

AGENTES ANTIRREUMATICOS QUE PUEDEN CAUSAR ENFERMEDAD

PARENQUIMATOSA PULMONAR

Penicilamina

Sales de oro.

Metotrexate

Ciclofosfamida

Azatioprina

Aspirina

Antiinflamatorios no esteroideos (fenilbutazona, azapropazone, benosaprofen, naproxen, piroxicam, oxfenbutazona, diclofenac, ibuprofen, fenbufen y sulindac)

Salazopirina

Colchicina (muy raro)

1.3. CLINICA

Las manifestaciones de la EPID asociada a AR son similares a las de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). En la tabla 4 se comparan las características clínicas entre FPI y FP asociada a AR en una serie de 152 y 39 pacientes, respectivamente (69).

Los pacientes con AR y EPID pueden permanecer asintomáticos incluso en presencia de lesiones radiográficas extensas. Sin embargo, los síntomas pueden preceder a las anomalías radiológicas. Generalmente estos enfermos presentan disnea de reposo o esfuerzo y tos no productiva. La disnea de esfuerzo puede estar enmascarada por la frecuente inmovilidad del paciente artrítico (15).

Reuniendo datos de distintas series, los síntomas respiratorios aparecen en el 90% de los enfermos con AR y FP concomitante. La disnea es el más frecuente, presentándose entre el 55 y el 100% de los casos. La tos, casi siempre no productiva, aparece entre el 61 y el 66% y el dolor torácico entre el 20 y el 30% (22).

Como sucede con los síntomas, los signos físicos de afectación respiratoria pueden ser mínimos, o incluso estar ausentes, a pesar de la existencia de anomalías radiográficas. Son frecuentes la taquipnea y la presencia de crepitantes bibasales en la auscultación pulmonar. Estos crepitantes secos se presentan entre el 65 y el 83% de los enfermos con AR y FP, y la acropaquia entre el 66 y el 72%, si bien esta última es de aparición tardía (15,22). Los estertores crepitantes pueden ser unilaterales o bilaterales, se auscultan habitualmente en los campos pulmonares inferiores al final de la inspiración, muestran una reproductibilidad constante y su origen está posiblemente relacionado con el volumen reducido de los pulmones y el cierre de las pequeñas vías aéreas durante la espiración, que al reabrirse durante la inspiración producen cambios de presión en las mismas. La acropaquia no suele acompañarse

de osteoartropatía hipertrófica, que se caracteriza por periostitis proliferativa de los huesos largos y polisinovitis (70). Además, estos pacientes con AR presentan los signos extrapulmonares propios de la enfermedad de base. En los casos de enfermedad pulmonar avanzada puede aparecer cianosis, edemas, y signos de hipertensión pulmonar.

La relación cronológica entre la enfermedad pulmonar y la articular es variable. Además, la severidad de la afectación pulmonar no se correlaciona necesariamente con la extensión y severidad de la artritis subyacente. Brannan et al., en una interesante revisión, encuentran que la artritis precedió a la afectación pulmonar en el 70% de los casos con un promedio de 37 meses, en el 19% ambas comenzaron a la vez y en el 11% la EPID precedió al comienzo de la artritis con un promedio de veinte meses (71). Pueden existir exacerbaciones repetidas y simultáneas de ambos procesos en un 44% de los casos, y no parece haber relación entre la severidad de la poliartritis y la FP asociada, si bien es más frecuente en estos pacientes la presencia de nódulos subcutáneos (50% frente al 30-35% de la población general de pacientes con AR) (12).

La escasa especificidad de las manifestaciones pulmonares puede contribuir a confundir la EPID inducida por fármacos de la asociada a la propia enfermedad de base (AR). Con respecto a este punto, se deben tener siempre en cuenta las drogas que recibe el paciente, la dosis de las mismas, la existencia de enfermedad pulmonar previa, la edad del enfermo, y la función renal del mismo, ya que la insuficiencia renal prolonga el aclaramiento del fármaco (21,72). Una vez establecidas estas cuestiones, resulta recomendable utilizar de forma estandarizada criterios como los señalados por Markku Hakala (68).

El estudio de la historia natural de la EPID asociada a AR revela un patrón variable. Globalmente, se acepta que este desorden es menos severo que la FPI. En general, la supervivencia de pacientes con AR Y EPID está reducida de 3'5 a 4'9 años (68,73). Algunos

enfermos tienen un curso lentamente progresivo que puede durar más de una década. Por el contrario, casos con deterioro rápidamente progresivo (síndrome de Hamman-Rich) han sido comunicados (11,74). Excepcionalmente, se han descrito remisiones espontáneas (22).

La respuesta al tratamiento es también difícil de determinar, dado el corto número de casos de las distintas series, estudios no controlados, distintas modalidades de tratamiento y diferentes criterios para valorar la respuesta terapéutica (15).

TABLA 4

**CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA FP ASOCIADA A AR
FRENTE A FP IDIOPATICA**

	FP ASOCIADA A AR (n = 39)	FP IDIOPATICA (n = 152)
SEXO		
relación varón/mujer	1.4/1	1.5/1
CLINICA		
PROMEDIO EDAD DE COMIENZO:		
- síntomas pulmonares	56.0 (26-75)	57.5 ± 11.6
- síntomas articulares	52.6 (20-75)	-
RELACION ENTRE COMIENZO DE SINTOMAS ARTICULARES Y PULMONARES (en años)		
- articular antes que pulmonar (n = 30)	5,2 (2'1-30)	-
- pulmonar antes que articular (n = 5)	3.2 (1 - 6)	-
VSG (mm/h)	43.5 ± 28	31.2 ± 24
ACROPAQUIAS	20/39 (51%)	106/152 (70%)
ANTICUERPOS		
- FR > 1/32	23/34 (68%)	14/97 (14%)
- ANA > 1/10	16/36 (44%)	33/97 (34%)
RESPUESTA A ESTEROIDES		
Mejoría a las 4 - 8 semanas	10/23 (43%)	51/95 (54%)
SUPERVIVENCIA		
Número de muertes a los 5 años (%)	12/22 (54%)	79/152 (52%)

1.4. ESTUDIO RADIOLOGICO

La radiografía de tórax convencional (RT) sigue siendo un método insustituible en la evaluación radiológica inicial de pacientes con EPID. La RT póstero-anterior (PA) y lateral (L) debe ser la primera técnica de imagen indicada en estos enfermos, en base a varios argumentos (75): a) su bajo coste y accesibilidad; b) cerca del 90% de los enfermos con FP presentan una RT patológica; c) el reconocimiento de un patrón radiográfico anormal puede tener valor en el diagnóstico diferencial; d) aunque no sea el método ideal, la comparación de RT seriadas puede ser útil en el seguimiento del proceso.

Las primeras descripciones de FP en pacientes con AR se realizaron en base a criterios clínicos y fundamentalmente radiológicos. Con la utilización de las pruebas funcionales respiratorias (PFR) se puso de manifiesto la escasa sensibilidad de la RT, particularmente en la detección de estadios precoces de EPID. Además, en su interpretación influyen con frecuencia la subjetividad y factores técnicos que condicionan la realización del estudio. Por lo tanto, una RT normal no descarta en absoluto la existencia de neumopatía intersticial en un enfermo con AR. De las 41 AR vistas consecutivamente por Frank et al., el 41% presentaban alteraciones en las PFR, mientras que tan solo el 18% mostraba datos radiológicos compatibles con EPID (27). Otros autores citan hallazgos radiológicos de enfermedad intersticial tan sólo entre un 2 y un 5% de los pacientes con AR (76).

Actualmente, por tanto, la RT ha perdido valor como técnica diagnóstica "precoz" en la neumopatía intersticial asociada a AR. Esto indudablemente, nos obliga a una interpretación cautelosa, teniendo en cuenta que cuando la enfermedad se traduce radiológicamente, en muchos casos, ya está instaurada la fibrosis y, por tanto, la posible actuación terapéutica es poco eficaz.

Los hallazgos de la RT en la EPID asociada a AR no difieren sustancialmente de los

que se encuentran en la FPI o en la asociada a otras entidades. En las fases iniciales se suele observar un aumento fino de reticulación y un patrón en "vidrio deslustrado" de predominio bibasal, característico de una alveolitis exudativa inflamatoria. Posteriormente, puede aparecer infiltrados algodonosos o un denso patrón reticular o reticulonodular. Con las exacerbaciones, nuevos y blandos infiltrados pueden superponerse sobre áreas fibróticas. En fases avanzadas, puede progresar a un patrón radiológico en panal de abeja (pequeñas áreas quísticas, uniformes, no mayores de 1 cm de diámetro, que corresponden a zonas localizadas de enfisema rodeadas por el intersticio engrosado). La localización más frecuente es en lóbulos inferiores, puede ser asimétrica y asociarse otros hallazgos en el contexto como engrosamiento pleural, nódulos pulmonares reumatoides y derrame pleural (12,45,63). La enfermedad pleural acompaña a la EPID en el 20% de los pacientes (71). Excepcionalmente, se ha descrito en la neumopatía asociada a AR la afectación de los vértices pulmonares (12). Cardiomegalia y signos de hipertensión pulmonar se manifiestan en los enfermos que desarrollan cor pulmonale.

Ante las limitaciones de la RT, aunque sin cuestionar su indicación e indudable valor en muchos casos (en los que sigue siendo la base de la sospecha diagnóstica y eventualmente sugiere una posible etiología), en los últimos años se han introducido nuevas técnicas de imagen en la valoración de las EPID.

La tomografía axial computadorizada (TAC) permite estudiar el parénquima pulmonar con una excelente resolución espacial y de detalles anatómicos, pudiendo demostrar el intersticio normal y anormal, incluyendo las características morfológicas de enfermedades difusas y localizadas del parénquima (70). La TAC convencional es significativamente más sensible que la RT en el diagnóstico de enfisema y en la demostración de la enfermedad intersticial moderada o avanzada (77). Los hallazgos del scanner torácico en la FP asociada

a enfermedades vasculares del colágeno son superponibles a los observados en la FPI (78). Su capacidad de resolución, sin embargo, no permite generalmente la detección de cambios anatómicos sutiles, que caracterizan la EPID precoz (75). Como consecuencia de ello, la TAC convencional es generalmente complementada o sustituida por la TAC de alta resolución (HRTAC) en el estudio de las EPID.

La HRTAC se está convirtiendo en un procedimiento casi imprescindible en el estudio de las lesiones difusas pulmonares, entre las que se incluye la FP. Sus posibles indicaciones se señalan en la tabla 5. El scanning por HRTAC puede teóricamente tener un papel claramente definido en el diagnóstico temprano de la EPID y en el diagnóstico diferencial de la enfermedad intersticial establecida. Puede ser también utilizada para valorar la extensión de la enfermedad pulmonar y, quizás, determinar indirectamente la inflamación pulmonar (75). La HRTAC muestra una seguridad del 90 al 95% en el diagnóstico de bronquiectasias (79) y es útil en el estudio de las enfermedades de las pequeñas vías aéreas como la bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa (BOOP) (80). No obstante, al ser una técnica de reciente introducción, en la que se tiene una experiencia limitada, queda por definir el papel real que la HRTAC desempeñará en el futuro en el manejo de las EPID.

Por último, el valor clínico de las técnicas de resonancia nuclear magnética (RNM), a pesar de las posibilidades que ofrecen en el estudio del pulmón (81-83), no pasa de ser puramente especulativo en la actualidad.

TABLA 5

POSIBLES INDICACIONES CLINICAS DE LA HRTAC EN LA EPID

- . Sospecha de enfermedad intersticial con RT normal.
- . Lesiones inespecíficas en la RT.
- . Disnea no explicada, tos productiva crónica o hemoptisis.
- . Capacidad de difusión baja no explicada, o otras anormalidades de las PFR.
- . Caracterización de la EPID conocida.
- . Guía de selección del tipo (transbronquial o abierta) y sitio de biopsia.
- . Sospecha de EPID y enfisema asociado.
- . Sospecha de enfermedad de las pequeñas vías aéreas.
- . Seguimiento de la EPID (resolución o progresión).

1.5. PRUEBAS FUNCIONALES RESPIRATORIAS

La exploración funcional respiratoria de enfermos con EPID es, junto con la clínica y el estudio radiológico, el pilar fundamental en el que se basa la evaluación y el manejo de estas enfermedades, con la ventaja adicional con respecto a la clínica y la radiología de que las PFR son objetivas y fáciles de cuantificar (70).

En las EPID existe un acúmulo de células inflamatorias y edema en el intersticio, alvéolos y paredes bronquiolares, así como cambios inflamatorios alrededor de los vasos sanguíneos. En la enfermedad evolucionada, existe habitualmente depósito de colágeno y fibrosis en el intersticio. No es sorprendente, por lo tanto, que se produzcan alteraciones características de las propiedades mecánicas del pulmón y deterioro del intercambio de gases en la interfase alvéolo-capilar, particularmente durante el ejercicio (84).

Las anomalías fisiológicas de la EPID reumatoidea no difieren básicamente de las de otras enfermedades pulmonares fibrosantes (24,85,86).

Independientemente de cual sea la causa de EPID/FP, numerosos estudios sugieren que la primera manifestación de la enfermedad, dentro de un grupo de unidades alvéolo-capilares, es una "alveolitis" o acumulación de células efectoras inmunes e inflamatorias en el intersticio o en la superficie de las estructuras alveolares (87). La alveolitis es un proceso crónico que varía dependiendo de cada entidad, de cada individuo y en un mismo paciente, según el curso evolutivo de la enfermedad. En muchos casos esta evolución conduce al desarrollo de FP. En el contexto de la patogénesis de la enfermedad podemos considerar la alveolitis como una lesión potencialmente reversible y la fibrosis un cambio permanente e irreversible, de manera que aquellas unidades alvéolo-capilares que se hayan perdido no podrán ser reemplazadas. Estos conceptos son particularmente importantes para entender la utilidad de las PFR en estos

enfermos (88).

Los hallazgos en la exploración funcional de los pacientes con AR, cuando se establece la FP, no difieren del patrón común de disfunción de las enfermedades intersticiales parenquimatosas difusas y fundamentalmente de la FPI.

Habitualmente disminuyen los volúmenes pulmonares: capacidad vital (FVC) y capacidad pulmonar total (TLC). Los flujos espiratorios son normales: el FEV_1 suele encontrarse bien conservado o disminuído sólo en relación con la FVC ($FEV_1/FVC\%$ conservado o incluso incrementado) (88). Se ha descrito también en estos pacientes una disminución del espacio muerto fisiológico en reposo (89).

La alteración de la difusión alvéolo-capilar, expresada habitualmente por la capacidad de difusión o transferencia del CO (DLCO), es un dato común. La interpretación de este test ha dado lugar a confusión y discusiones. La observación de un trastorno de intercambio gaseoso en presencia de enfermedad parenquimatosa difusa condujo al concepto, acuñado por Austrian, del "bloqueo alvéolo-capilar" como mero problema de obstrucción al paso del gas desde el alvéolo a la sangre por engrosamiento de la membrana (90). Posteriormente se ha enfocado de una manera más fisiopatológica. Este test, (DLCO), se altera cuando hay pérdida de parénquima pulmonar funcionante, ya sea de manera global o selectiva capilar. La alteración puede producirse con un volumen alveolar disminuído (fibrosis), normal (patología vascular) o aumentado (enfisema). Dicho de un modo más fisiológico, la disminución de la difusión, una vez descartado que se deba a una anemia o a disminución del volumen alveolar, implica: (a) una alteración en el factor de difusión de membrana, que refleja el conjunto de resistencias de las diversas capas y membranas que el gas debe atravesar hasta llegar al plasma; (b) una alteración en el volumen capilar pulmonar, o (c) una alteración en ambos, siempre que se efectúe a una PO_2 alveolar estándar (89).

La hipoxemia puede convertirse en una característica prominente al avanzar la evolución, pero en caso de afectación menos severa, sólo existe durante el ejercicio.

Crystal et al., en un estudio detallado sobre la FPI, discuten los mecanismos que conducen a la hipoxemia (87). Las alteraciones en la ventilación-perfusión (\dot{V}/\dot{Q}) son la causa más invocada. Puesto que los parámetros de flujo aéreo (FEV_1 , resistencia de la vía aérea) son generalmente normales, las anormalidades en la distribución de la ventilación han sido atribuidas a alteraciones regionales en la compliance. Cuando se hacen tests de función de la pequeña vía aérea, un número significativo de pacientes presenta resultados anormales (91).

Esta evidencia fisiológica de enfermedad de la pequeña vía aérea se correlaciona bien con las observaciones morfológicas de fibrosis peribronquiolar e inflamación de las pequeñas vías aéreas. Este paralelismo sugiere que, al menos en parte, las alteraciones en la distribución de la \dot{V}/\dot{Q} y, por tanto, la hipoxemia, puedan ser debidas a obstrucción de la pequeña vía aérea.

En cuanto a las propiedades mecánicas del pulmón, la compliance estática y dinámica están característicamente disminuídas; la curva de volumen-presión suele estar desplazada hacia abajo y hacia la derecha respecto a la curva de sujetos sanos (91). Esto supone que, a partir de un punto, se requieren presiones negativas transpulmonares muy altas para inspirar pequeños volúmenes de aire.

Como hemos visto, la hipoxemia arterial en reposo no es común, y como la capacidad ventilatoria está, en general, conservada, la hipercapnia suele aparecer en fases avanzadas o terminales. De hecho, la enfermedad intersticial severa en la AR parece ser rara, y así lo muestra una serie reciente en la cual la incidencia de hospitalización en la AR por enfermedad intersticial pulmonar es de 1 caso por cada 3500 pacientes y año (68).

Sin embargo, alteraciones en la función pulmonar parecen existir en un 40-50% de los

enfermos con AR, en series no seleccionadas. Frecuentemente la anormalidad funcional que predomina en los pacientes con AR es la reducción de la DLCO (27, 92). La evaluación histológica que se realizó en 9 pacientes con AR y alteraciones de la difusión verificó en todos ellos cambios intersticiales compatibles con el descenso de la DLCO (27). En distintos estudios, el patrón espirométrico más referido en estos enfermos es de tipo restrictivo con FVC y TLC disminuídas debido a un aumento en la rigidez pulmonar (72). Otros autores han descrito también el aumento en las resistencias de las grandes vías aéreas en pacientes con AR (92-94). La obstrucción de la pequeña vía aérea asociada con EPID en la AR ha sido también documentada (93), aunque en otros estudios esto no ha sido corroborado(95).

Desde que Davidson en 1974 (92) llamó la atención sobre el posible papel nocivo del tabaquismo en el pulmón de los pacientes con AR, todos los trabajos que describen un patrón obstructivo discuten la contribución etiológica de este factor. La asociación de alteraciones funcionales pulmonares con el hábito de fumar en estos enfermos es suficientemente fuerte para sugerir un papel sinérgico. Esto es aplicable no sólo a la presencia de obstrucción al flujo aéreo (93), sino también a la reducción de la DLCO (92), pero el tabaco por sí mismo no parece una explicación suficiente (27,72,94).

Otros investigadores, en estudios posteriores, han sugerido la asociación de enfermedad obstructiva con la presencia del aloantígeno HLA DR4 en pacientes con AR. El más reciente es un estudio prospectivo en el que los sujetos con AR DR4 positivos mostraban reducciones significativas en el FEV₁ y FVC frente a sujetos con AR DR4 negativos, independientemente del hábito tabáquico. Adicionalmente, describen una correlación entre obstrucción y síndrome de Sjögren secundario, pero parece obligado cuestionar este diagnóstico puesto que utilizan como único criterio un test de Schirmer < 5mm en cada ojo (96).

Por último, las alteraciones de la función pulmonar en la AR han sido, en ocasiones,

atribuidas más a la terapia que a la propia enfermedad, como ya se ha señalado previamente.

De los estudios correlativos estructura-función en EPID/FP llevados a cabo, tanto en humanos como en experimentación animal, Keogh y Crystal (88) extraen varias generalizaciones: (a) los tests de función pulmonar parecen ser un indicador fiable de la presencia de alteraciones histopatológicas; (b) el test más sensible parece ser la monitorización del recambio de gases con el ejercicio, siendo en algunas enfermedades intersticiales la DLCO y las relaciones presión-volumen indicadores sensibles del proceso; (c) un estudio de función pulmonar normal no significa ausencia o inactividad del proceso, y (d) las PFR no pueden ser usadas para evaluar específicamente la alveolitis en las enfermedades intersticiales.

Este último punto atrae nuestra atención sobre un problema crucial para el clínico: establecer la fase y la actividad de la enfermedad en cada momento, de cara a tomar decisiones terapéuticas racionales y, en lo posible, acercarse a una orientación pronóstica.

Volvemos pues, de nuevo, al concepto central de alveolitis como primera manifestación de enfermedad intersticial, independientemente del tipo o etiología del proceso (88,97). El procedimiento más exacto para evaluar la inflamación en el parénquima (alvéolo) es indudablemente la biopsia abierta pulmonar (BPA). Sin embargo, se trata de un procedimiento invasivo, no todos los pacientes son biopsiados en esta fase, la biopsia abierta raramente se realiza más de una vez en el mismo paciente, la intensidad de la inflamación en una región varía con el curso de la enfermedad y la terapéutica y, por último, la cuantificación del número y los tipos de células efectoras en el material de biopsia es tedioso y no siempre disponible de manera rutinaria.

Para integrar el concepto de alveolitis como un parámetro útil en la clínica práctica diaria, necesitamos métodos no invasivos que estimen el grado de inflamación de forma fiable y repetitiva. La introducción hace unos años y posterior desarrollo del BAL y la gammagrafía

pulmonar con galio 67 (Ga 67) ha despertado grandes esperanzas en cuanto a sus aplicaciones en el diagnóstico precoz y seguimiento de pacientes con EPID, en base a su poder discriminativo en la caracterización del componente inflamatorio o alveolitis que precede al establecimiento de FP. Por otra parte, la utilidad del BAL en el estudio de la patogenia de la enfermedad parece incuestionable.

1.6. GAMMAGRAFIA CON GALIO 67

Clásicamente utilizada en el estudio de las enfermedades neoproliferativas, la gammagrafía torácica con citrato de Galio 67 (Ga 67) se ha aplicado posteriormente en la evaluación de procesos inflamatorios. En los últimos años, diferentes estudios han analizado el papel de esta exploración en la valoración de las EPID, particularmente de la sarcoidosis y FPI (75,98-100).

La sensibilidad del scanning de galio en las EPID se incrementa considerablemente obteniendo imágenes diferidas 48 horas después de la inyección endovenosa (IV) de 4 a 6 mCi de Ga 67. Las imágenes del pulmón son generalmente obtenidas a las 6, 24 y 48 horas de la administración del isótopo (75,100). Otros autores realizan el registro gammagráfico a las 48-72 horas de la inyección IV de 1'5-5 mCi (55'5-185 MBq) de citrato de Ga 67 (98).

Se han propuesto varios métodos de interpretación de la captación de Ga 67 (visual, semicuantitativos, cuantitativos). La mayoría de estos índices comparan la captación pulmonar con la que se produce en partes blandas y en el hígado, considerándose a este último como órgano "patrón" (101-106). La captación de Ga 67 en los pulmones es normalmente menor o similar a la de los tejidos blandos que los rodean y considerablemente menor que en el hígado, médula ósea o columna vertebral. De manera que, en individuos normales, el Ga 67 no es captado en cantidad suficiente por las estructuras alveolares para dar positividad, mientras que en pacientes con EPID existe captación patológica en amplias zonas del parénquima en las que existe inflamación (75,98-101).

El mecanismo por el cual el Ga 67 se deposita en las lesiones inflamatorias no es del todo conocido. Tras la administración IV del citrato Ga 67, un 1% se fija a los leucocitos y el 99% restante se une a proteínas plasmáticas, especialmente a proteínas transportadoras de

hierro, como transferrina, lactoferrina y ferritina, alcanzando el parénquima pulmonar. Una vez allí, su captación depende de una serie de factores como son el aumento del flujo sanguíneo pulmonar y de la permeabilidad capilar. El Ga 67 también ha sido detectado incorporado a los leucocitos unido a la lactoferrina intraleucocitaria, así como en los macrófagos alveolares activados (98, 107, 108). Parece, pues, que la acumulación de Ga 67 en el pulmón de pacientes con EPID depende de la captación del isótopo por células efectoras activas dentro de las estructuras alveolares.

Haciendo una revisión crítica de la literatura, la gammagrafía pulmonar con Ga 67 presenta una serie de ventajas e inconvenientes en la valoración de la alveolitis en las EPID (20). Los principales argumentos en favor de su utilización podemos sintetizarlos en los siguientes puntos: (a) es, quizás, la técnica menos invasiva en el estudio de la alveolitis; (b) permite una valoración global de las estructuras afectadas (intra y extratorácicas); (c) es una técnica repetitiva; (d) no comporta dosis altas de irradiación para el paciente; (e) al no comprometer la función pulmonar, puede realizarse en aquellos enfermos que no reúnan criterios de seguridad para someterse a un BAL; y (f) puede realizarse en presencia de inflamación activa de las vías aéreas, no viéndose aparentemente alterada la captación.

A pesar de todas estas ventajas, que hicieron que esta exploración fuese considerada hace unos años uno de los métodos más prometedores en la caracterización de la alveolitis, la gammagrafía pulmonar con Ga 67 presenta importantes limitaciones que restringen su utilidad clínica:

- a) No disponibilidad de la técnica en diversos centros hospitalarios, como por ejemplo en el Hospital de la Princesa de Madrid, lo que supone remitir al paciente a otro centro o centros de referencia que utilizan metodologías y criterios de interpretación no siempre homogéneos.

- b) Falta de especificidad. Un acúmulo anormal de Ga 67 tiene lugar en los pulmones de la mayoría de los pacientes con EPID, siendo esta captación totalmente inespecífica (75). Puede existir captación pulmonar patológica en distintas enfermedades infecciosas (abscesos bacterianos, neumonía por *Pneumocystis Carinii*, infecciones por citomegalovirus, tuberculosis pulmonar activa), neoplasias, toxicidad pulmonar por drogas, lesiones post-radiación, síndrome de distress respiratorio del adulto, neumoconiosis, proteinosis alveolar, sarcoidosis, FPI y otras EPID (99-102, 109-117).
- c) Falta de estandarización de la técnica. Impide establecer comparaciones entre estudios realizados en diferentes centros. Todavía no está bien establecido cuál es la dosis óptima de Ga 67 que se debe emplear y si debe ajustarse al peso del paciente. Además, aunque se han demostrado los beneficios de utilizar una gammacámara, diversos hospitales utilizan todavía un scanner (108).
- d) Problemas y falta de homogeneidad en la interpretación. Inicialmente, la valoración de la captación pulmonar de Ga 67 era puramente visual y subjetiva. Posteriormente, se han desarrollado nuevos métodos de cuantificación como el índice de Ga 67 (índice de medida semicuantitativo descrito por Line et al.) (101) y, más recientemente, métodos cuantitativos (procesamiento computadorizado de los datos obtenidos por gammacámara) (102-106). A pesar de ello, no existe una uniformidad de criterio en cuanto a la interpretación de resultados.

Existen numerosos trabajos que valoran la utilidad de la gammagrafía con citrato de Ga 67 en las EPID, particularmente en la sarcoidosis y FPI.

En la sarcoidosis aguda y subaguda, la gammagrafía es más sensible que la RT al proporcionar una mayor información sobre la extensión y topografía de las lesiones pulmonares y mediastínicas (98,99). El grado de captación pulmonar se ha correlacionado con

el número de linfocitos totales y de linfocitos T (LT) (118). Otros autores señalan que la acumulación pulmonar de citrato de galio dependería básicamente del número y estado de activación de los macrófagos alveolares (MA) (119-121). Estos estudios avalan que la intensidad de la captación en la sarcoidosis se correlaciona con la presencia de alveolitis activa en muestras de biopsia o BAL (75). La existencia de captación patológica puede también tener cierto valor pronóstico. Baughman et al. encuentran que el 61% de los pacientes con sarcoidosis y scan de galio positivo tenían progresión de la enfermedad después de dos años (122).

Para cuantificar el acúmulo del radioisótopo en el parénquima de los pacientes con FPI, se ha desarrollado un índice semicuantitativo de Ga 67. Line et al. comparan hallazgos morfológicos de biopsia pulmonar en 22 enfermos con FPI (en los que incluyen 5 pacientes con conectivopatías) con el índice de Ga 67. Este índice se correlacionó significativamente con el grado de celularidad intersticial y alveolar de las biopsias. En 17 enfermos a los que se realizó BAL, el índice de Ga 67 se correlacionó con el porcentaje de neutrófilos y no con otras poblaciones celulares (101), lo que puede deberse a la conocida avidez que tienen los neutrófilos por este radioisótopo en las regiones donde se dan fenómenos inflamatorios (123).

En pacientes con enfermedad vascular del colágeno un scan de Ga 67 anormal se ha asociado a la presencia de disnea progresiva. En un trabajo reciente, 36 sujetos con diversas enfermedades autoinmunes (incluyendo 18 AR) fueron estudiados con gammagrafía con Ga 67 y BAL, divididos en dos grupos en virtud de la presencia o no de disnea progresiva. Diecisiete de los 20 pacientes con disnea progresiva mostraron captación pulmonar patológica de Ga 67, hecho que no se objetivó en ninguno de los enfermos del otro grupo. El recuento celular del BAL de los sujetos con disnea progresiva mostró un porcentaje de neutrófilos y linfocitos significativamente mayor. De 19 pacientes con disnea progresiva tratados con

prednisona a dosis de 40 mg/día (con un seguimiento de al menos 18 meses), los que presentaban neutrofilia en el BAL fallecieron todos, mientras que la mayoría de los enfermos con linfocitosis se estabilizaron o mejoró significativamente su función pulmonar (124). Estos datos coinciden con los hallazgos publicados por Rudd et al. en FPI (125). A diferencia del BAL, el Ga 67 no fué útil para predecir el pronóstico de los pacientes tratados con corticosteroides. Por lo tanto, en estas series limitadas, el BAL y la gammagrafía parecen tests complementarios en el seguimiento de la enfermedad pulmonar intersticial.

Sin embargo, el scan de Ga 67 puede ser normal en presencia de EPID activa. Por el contrario, la gammagrafía puede seguir siendo patológica en pacientes con enfermedad clínicamente inactiva. El significado de una captación anormal persistente es, pues, difícil de evaluar (75).

En los últimos años, y a pesar de la utilidad de la información que aporta, la gammagrafía con Ga 67 ha ido perdiendo protagonismo en la práctica clínica en el estudio y valoración de la alveolitis de las EPID, fundamentalmente por su falta de especificidad y las discrepancias existentes en la literatura. Nosotros pensamos que, una vez resueltos los problemas de estandarización de la técnica, el Ga 67 puede ser un método complementario del BAL y contribuir a un mejor entendimiento de la patogenia, permitiendo un mejor manejo del paciente a lo largo de la evolución de la enfermedad.

1.7. LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL)

1.7.1. Consideraciones Generales

El BAL es una técnica sencilla y bien tolerada que ha hecho que el pulmón sea "un órgano accesible" al clínico. Como consecuencia de ello, el BAL ha tenido un tremendo impacto en el conocimiento y manejo de las EPID. Su sencillez, tolerancia, mínima morbilidad y fácil repetibilidad explican la amplitud del empleo del BAL como método de estudio del pulmón profundo (bronquiolos, alvéolos, intersticio) y la rapidez con que los conocimientos obtenidos en trabajos de investigación se han intentado aplicar a la práctica clínica (126,127).

La técnica es sencilla, con pequeñas variaciones metodológicas entre los distintos grupos. El fibrobroncoscopio es enclavado en un bronquio segmentario o subsegmentario (del lóbulo medio o língula en las neumopatías difusas y en la zona con mayor afectación radiológica en las enfermedades localizadas), instilándose 100–300 ml de suero salino isotónico en alícuotas de 20–60 ml, mediante una jeringa de plástico. Otros autores sugieren realizar el BAL en 2–3 segmentos/subsegmentos distintos, argumentando una mayor representatividad de la muestra en las enfermedades difusas. Tras la introducción de cada alícuota, se aspira manualmente con la misma jeringa o mediante aspiración continua de poca intensidad. El volumen de líquido recuperado corresponde generalmente al 40–70% del instilado, y es colocado (tras la exclusión o no del obtenido en la primera alícuota, filtrado a través de gasa estéril o no) en frascos de plástico o vidrio siliconado para su rápido procesamiento en el laboratorio (126–130).

En el líquido obtenido es posible analizar las poblaciones celulares y sustancias

solubles (proteínas e inmunoglobulinas, enzimas, tipos de procolágeno, fibronectina, fosfolípidos, histamina, etc) presentes en la superficie epitelial alveolar. La precisa cuantificación de las sustancias solubles recuperadas por BAL es difícil, al no disponerse de una referencia completamente satisfactoria que compense la dilución que se produce en el fluido alveolar por el relativo gran volumen de líquido instilado, y que refleje el origen mucoso selectivamente, evitando la posibilidad de contaminación por el plasma sanguíneo. La albúmina, debido a su bajo peso molecular (67.000 daltons) y su transferencia pasiva, es el denominador de referencia más comúnmente utilizado, pero sin que actualmente se puedan dar recomendaciones al respecto (127-131).

En cuanto al análisis citológico, el número total de células se determina en una cámara de Neubauer y suele expresarse en células/ml. La fórmula celular se realiza en preparaciones obtenidas mediante citocentrifugación, teñidas con May-Grünwald-Giemsa o Diff Quick; el recuento porcentual se hace con microscopio óptico sobre un mínimo de 300-400 células. Pueden realizarse tinciones especiales diversas y procesar preparaciones para microscopía electrónica fijando parte del líquido inicial del BAL en glutaraldehído. Por último, el análisis de subpoblaciones celulares, puede llevarse a cabo mediante anticuerpos monoclonales (AcM), utilizando diferentes técnicas que más adelante serán comentadas (126-131).

La fórmula celular normal, en sujetos sin enfermedad pulmonar, está constituida por una población mayoritariamente de macrófagos alveolares (85-95%), linfocitos (<12%), neutrófilos (<5%), eosinófilos (<1%) y mastocitos (<1%). En la tabla 6, adaptada de Castella et al. (127) y Reynolds (129), se refleja el perfil celular obtenido en el BAL de la población sana.

Las contraindicaciones para la práctica del BAL son escasas y su potencial relatividad dependerá de la valoración riesgo/beneficio estimada a la hora de indicar la exploración (tabla

7) Además, en ciertos grupos de riesgo, deben tomarse ciertas precauciones (tabla 8). En relación con este punto, un estudio de nuestro grupo en el que se monitoriza la saturación arterial de O₂ con pulsioximetría (OHMEDA BIOX 37/40) durante la realización de 125 fibronoscopias (FB) con y sin BAL, permite recomendar la administración sistemática de O₂ suplementario en pacientes sometidos a FB con BAL, especialmente si el líquido instilado sobrepasa los 150ml (datos no publicados).

Las complicaciones del BAL son escasas y, en general, poco importantes y autolimitadas (tabla 9) (131-137).

TABLA 6

CELULARIDAD DEL BAL EN EL SUJETO NORMAL

nº total de células

10 x 10⁶ - 20 x 10⁶ por 100 ml*

Fórmula celular

- Macrófagos	85 - 95%
- Linfocitos	5 - 12%
- Neutrófilos	menos del 5%
- Eosinófilos	menos del 1%
- Basófilos	menos del 1%
- Células bronquiales	menos del 2%
- Eritrocitos	menos del 5%

Poblaciones linfocitarias

- Linfocitos T totales (CD3)	62 - 90%
- Linfocitos CD4 (+)	39 - 50%
- Linfocitos CD8 (+)	22 - 27%
- Cociente CD4/CD8	1'4 - 1'8**
- Células NK	5 - 10%
- Linfocitos B	5 - 10%
- No tipificables	5%

* hasta 5 veces más en fumadores.

** puede estar invertido en fumadores.

TABLA 7

BAL: CONTRAINDICACIONES

- Falta de colaboración o negativa del paciente.
- Insuficiencia ventilatoria obstructiva severa con FEV₁ inferior a 1 litro o al 50% del valor teórico.
- Pa CO₂ > 50 mmHg
- Pa O₂ < 60 mmHg (refractaria)
- Saturación de O₂ < 90% (refractaria)
- Enfermedad coronaria inestable.
- Insuficiencia cardiaca severa y/o anomalías ECG significativas.
- T de protombina < 50%
- Cifra de plaquetas < 20.000 por ml.

TABLA 8

BAL: PRECAUCIONES EN GRUPOS DE RIESGO

A.- MEDIDAS ESPECIFICAS:

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------|
| - Insuficiencia respiratoria: | oxigenoterapia |
| - Arritmias / Cardiopatía: | oxigenoterapia |
| - Hiperreactividad bronquial: | broncodilatadores. |
| - Edad avanzada | |
| Hepatopatía | limitar dosis de anestésico |
| Nefropatía | |
| - Trastorno de coagulación: | corrección previa |

B.- MEDIDAS GENERALES:

- Premedicación adecuada si es necesaria o aplicable.
- Monitorización continua de ECG y saturación arterial de O₂
- Oxigenoterapia suplementaria.
- Hospitalización y seguimiento estricto en las 24 h siguientes al BAL.
- Restricción del volumen de líquido instilado al mínimo requerido.

TABLA 9

BAL: COMPLICACIONES Y EFECTOS SECUNDARIOS

Fiebre	10-30% de los casos. Suele aparecer a las 4-6 horas de la realización de la técnica y responder a antipiréticos (*).
Infiltrados radiográficos	< 10% de los casos. Suelen iniciarse en las primeras 4 h y resolverse en 24-48 h. (*).
Crepitantes	Pueden auscultarse en la zona en que se realizó el BAL en las primeras 24 horas (*).
Función pulmonar	Descenso transitorio del FEV ₁ , VC, PEF, P _i O ₂ (*) (+)
Broncoespasmo/Sibilancias	Pueden aparecer en pacientes hiperreactivos. Algunos estudios señalan que el BAL no modifica la hiperreactividad bronquial.
Respuesta inflamatoria local	Se ha descrito tras BAL un aumento transitorio de neutrófilos en el tracto respiratorio inferior.
Integridad epitelial	Descenso transitorio de la frecuencia del movimiento ciliar.
Sangrado	Insignificante, salvo trastornos muy severos de la coagulación.
Neumonía postbroncoscopia	Incidencia estimada de 1 caso por mil. Debe descartarse si la fiebre y los infiltrados persisten más de 24-48 horas.
Neumotórax y enfisema mediastínico	Excepcionales

(*) Su incidencia aumenta en relación al número de lóbulos lavados y el volumen de líquido retenido.

(+) Especialmente en pacientes con bronconeumopatía subyacente.

1.7.2. Valor del lavado broncoalveolar en el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas no infecciosas.

El uso clínico del BAL en el diagnóstico y en la monitorización longitudinal de la actividad del proceso en pacientes con EPID no es unánimemente aceptado en la actualidad. De lo que no cabe duda es de sus grandes posibilidades como método de investigación. Una serie de aspectos básicos condicionan la aplicabilidad clínica del BAL: a) la necesidad de estandarizar criterios técnicos y de procesamiento de las muestras entre los distintos grupos; b) la disponibilidad de medios y de una infraestructura adecuada; c) la necesidad de estudios a largo plazo de la morbimortalidad de las EPID y la importancia de que se realicen estudios multicéntricos; d) la concienciación acerca del hecho de que la aplicación clínica del BAL en las EPID depende de lo que le exijamos. Hoy en día, parece evidente que la valoración de la alveolitis mediante la simple determinación del porcentaje de células inflamatorias puede ser una visión excesivamente simplista del problema (126).

El deseo del clínico es que una mejor comprensión de la enfermedad y sus mecanismos patogénicos conduzca a un mejor diagnóstico y estadiaje. Resulta, pues, necesario retomar el pulso con vistas a establecer nuevas claves diagnósticas, nuevos marcadores para el seguimiento de las EPID. En este sentido, las expectativas de cara al futuro se basan en una serie de aspectos clave (20,126,138): a) una mejor caracterización de las subpoblaciones celulares utilizando AcM para definir marcadores de superficie específicos; b) la creciente utilización de ensayos funcionales; c) el desarrollo de la Biología Molecular; d) el estudio de citoquinas en el BAL. Distintos trabajos demuestran la importancia de estas citoquinas en la patogenia de las neumopatías intersticiales. Su determinación en el BAL parece de interés en el estudio de la actividad de estas enfermedades; e) la capacidad de facilitar el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento en las EPID es otro importante papel potencial del BAL.

Así, por ejemplo, el uso racional de anti-citoquinas como agentes terapéuticos enlaza claramente con el futuro (138).

Pero, ¿cuál es en la actualidad la utilidad clínica del BAL en el diagnóstico y seguimiento de las EPID no infecciosas?.

En ciertas EPID, relativamente poco frecuentes, el BAL puede evitar la necesidad de realizar una biopsia pulmonar a cielo abierto, permitiendo establecer un diagnóstico específico:

- Histiocitosis X (HX) (granuloma eosinofílico o granulomatosis de células de Langerhans): las células de Langerhans pueden identificarse al microscopio electrónico mediante la demostración de estructuras pentalaminas características en su citoplasma (gránulos de Birbeck) (139-141). Además, las células de la HX tienen la propiedad de reaccionar con el AcM anti CD1 (OKT6) (142,143) o, de forma menos específica, con anticuerpos policlonales anti-proteína S-100 (144-146).

- Proteinosis alveolar: el BAL puede confirmar su diagnóstico al evidenciar la presencia de material proteínico característico PAS (+) y alcian blue (-). Además de valor diagnóstico, el BAL es útil en el seguimiento y una notable estrategia terapéutica en esta enfermedad (147,148).

- Neoplasias pulmonares: el BAL puede aportar material que permita el diagnóstico citológico de malignidad en tumores primarios y metastásicos del pulmón, aunque con una rentabilidad variable dependiendo del tipo de tumor (129,149). En nuestra experiencia, esta rentabilidad se incrementa en las neoplasias pulmonares difusas (linfangitis carcinomatosa, carcinoma bronquiolo-alveolar) (126), tal como ha sido reconocido por otros autores (150-153). El BAL también puede ser útil en el diagnóstico de la afectación pulmonar por hemopatías malignas (enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemias, macroglobulinemia de

Waldenström, mieloma y micosis fungoide) (149). Un problema común en el curso clínico de pacientes inmunodeprimidos con enfermedades hematológicas malignas es la aparición de infiltrados pulmonares de etiología difícil de precisar (infecciones, infiltración por la enfermedad de base, toxicidad por fármacos, hemorragia pulmonar). La BPA puede evitarse con el uso de la FB con BAL, asociado o no a otras técnicas (126).

Un capítulo en fase de desarrollo, aunque aún no consolidado, es la determinación de marcadores tumorales en el fluido del BAL (154-156).

- Hemorragia alveolar: el BAL tiene una alta rentabilidad en el diagnóstico de estos síndromes, demostrando la existencia de un número significativo de hemosiderófagos con técnicas adecuadas (148,157-160). Una vez confirmado el diagnóstico de hemorragia alveolar, su origen debe ser determinado con las oportunas pruebas complementarias (148).

- Neumonitis eosinofílica: el BAL es de gran valor en las enfermedades pulmonares eosinofílicas, no sólo en el diagnóstico y el seguimiento de pacientes tratados, sino también en el estudio de su patogenia. La mayor rentabilidad diagnóstica la alcanza, quizás, en la neumonía eosinofílica crónica (NEC), en la que la coexistencia de eosinofilia significativa en el BAL y un cuadro clínico-radiológico compatible, evita la práctica de procedimientos diagnósticos más agresivos (161-163). Además, la caracterización de las subpoblaciones de eosinófilos a partir del gradiente de sedimentación mostraría diferencias entre la NEC y otros desórdenes eosinofílicos, como el síndrome de Churg-Strauss, FPI y enfermedad pulmonar inducida por drogas (164).

- Por último, el estudio del contenido lipídico de los macrófagos alveolares puede ser de utilidad en el diagnóstico de neumonía por aspiración y el de neumonía lipoidea y embolismo graso (165-167).

Dejando de lado aquellas situaciones en las que el BAL tiene valor diagnóstico, un

capítulo interesante es el de su aplicación en ciertas enfermedades ocupacionales, como la silicosis y la asbestosis, en las que permite un diagnóstico de exposición (168). En este campo, el empleo de técnicas microanalíticas se encuentra en fase de consolidación (169,170). Un comentario aparte merece la beriliosis, en la que los linfocitos del BAL proliferan al ser estimulados con sales de berilio, lo que ciertos autores consideran diagnóstico de la enfermedad (171)

A pesar de todo ello, en la mayoría de nuestros pacientes con EPID el valor diagnóstico del BAL va a ser puramente orientativo, permitiendo "apoyar un diagnóstico provisional o sugerir una alternativa".

Los estudios iniciales de Reynolds demostraron que las poblaciones celulares inflamatorias están aumentadas en el tracto respiratorio inferior de pacientes con EPID (172). Estos trabajos fueron ampliados por distintos investigadores, particularmente por los grupos de Turner-Warwick y Crystal, llevando al concepto de que la inflamación alveolar es un hecho común en las EPID (173-175). Este concepto de alveolitis, atribuido por Crystal a Fishman (176), ha sido ampliado para incluir distintos tipos de alveolitis (tabla 10). Hoy en día es comúnmente aceptado que el BAL permite una estimación objetiva y real tanto del número como de los diferentes tipos y subtipos celulares que constituyen la alveolitis (126).

Se pensó inicialmente que los distintos patrones de alveolitis podrían ser útiles en el diagnóstico diferencial y caracterización de las EPID (177). Sin embargo, si bien determinadas enfermedades pueden presentar tipos de alveolitis "característicos", puede existir una variabilidad considerable dentro de una misma enfermedad, y distintas enfermedades pueden mostrar patrones similares (131).

En la FPI, la alveolitis suele caracterizarse por una notable expansión y activación de la población macrofágica, junto con neutrofilia y eosinofilia variables (172,173,178). La

neutrofilia, sin embargo, no es un hallazgo absolutamente constante en la FPI y, en algunos casos (10–17%) los linfocitos pueden estar incrementados porcentualmente y activados, lo que se asocia a un mejor pronóstico (125,173,179–181). El recuento diferencial celular puede también tener valor en el manejo clínico de pacientes con FPI, prediciendo y monitorizando la respuesta al tratamiento y ayudando en la selección de las drogas. Así, los pacientes con linfocitosis tienden a responder bien a altas dosis de prednisolona, mientras que los que presentan eosinofilia no responden a esteroides, pero pueden mejorar si son tratados con ciclofosfamida (178,181). De la misma manera, existen evidencias de que la ciclofosfamida puede reducir la alveolitis neutrofílica en pacientes con FPI (182,183), lo que puede conllevar un mejor pronóstico (173).

En las enfermedades vasculares del colágeno (CVD) puede existir alveolitis en el BAL, exista o no EPID manifiesta. La EPID asociada a CVD no difiere sustancialmente de la FPI. La mayor utilidad clínica del BAL en estas enfermedades se ha relacionado con el manejo de la afectación intersticial aguda y el diagnóstico de complicaciones infecciosas. Los pacientes con linfocitosis en el BAL presentan mejor respuesta al tratamiento esteroideo y mejor pronóstico (184, 185).

No existe ninguna característica diagnóstica individual de sarcoidosis en el BAL, aunque la coexistencia de linfocitosis con un cociente $CD4/CD8 > 3.5$ y el marcaje experimental de macrófagos que expresan el fenotipo $RFD1+/RFD7+ > 25\%$, hace el diagnóstico muy probable (186). El aumento del porcentaje de linfocitos a expensas de linfocitos T (LT) y el incremento del cociente $CD4/CD8$ son más evidentes en los estadios O, I y II de la enfermedad (127). La valoración de este cociente $CD4/CD8$ mediante AcM puede tener valor discriminativo (tabla 11). En una serie de 126 pacientes, un ratio $CD4/CD8 > 3.5$ fue específico de sarcoidosis activa en el 93% de los casos (187, 188). En cuanto a la

alveolitis linfocitaria, algunos autores diferencian entre alveolitis de alta intensidad (más del 28% de linfocitos) y de baja intensidad (menos del 28%), teniendo la primera un peor significado pronóstico si no se iniciaba tratamiento esteroideo (118,189), pero ello no ha sido confirmado por otros estudios. En el curso de la evolución, ya sea espontáneamente o como consecuencia del tratamiento, es frecuente observar una tendencia a la disminución de la linfocitosis y una normalización del cociente CD4/CD8. En los casos que progresan a fibrosis (generalmente, estadio radiológico III) puede existir un incremento de neutrófilos en el BAL (190). El estudio de factores solubles en el BAL de pacientes con sarcoidosis ha mostrado niveles elevados de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (191), fibronectina (192), factor activador de plasminógeno (193), ácido hialurónico (194), interleuquina-1 (IL-1) (195) y péptido del procolágeno tipo III (PCP) (196,197). Se ha objetivado también una liberación incrementada de interleuquina-2 (IL-2) e interferón gamma (IF-gamma) por las células del BAL (198,199). No obstante, muchos de estos hallazgos se han observado también en otras patologías y existen problemas metodológicos en cuanto a la proteína de referencia utilizada para cuantificar sus valores. De todas las sustancias estudiadas, los niveles de ECA y PCP parecen ser lo de mayor utilidad en la valoración de la actividad y el pronóstico de la enfermedad (186). El BAL también añade otras características pronósticas en estos pacientes, como puede ser una desproporción elevada del CD4/CD8, la presencia de neutrofilia o bien de mastocitos, marcadores todos ellos de fibrosis e indicadores de mala evolución. Por último, la monitorización de la respuesta terapéutica a los esteroides por medio del análisis del BAL supone un "sistema de detección precoz", en relación a los medios habituales de seguimiento (186).

La alveolitis alérgica extrínseca (AAE) o neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una enfermedad pulmonar intersticial asociada a una exposición repetida a diferentes polvos

orgánicos inhalados, relacionada con alérgenos ocupacionales. Distintos fenómenos inmunológicos juegan un papel esencial en la iniciación y mantenimiento de esta enfermedad a cuyo conocimiento ha contribuido notablemente la información facilitada por el estudio inmunocitológico del BAL (200,201). Desde el punto de vista clínico, el BAL tiene la ventaja de ser el método más sensible en la detección de la alveolitis en sujetos con AAE, por encima de la radiología, las precipitinas y las PFR (202). Fuera de la fase aguda, el perfil celular del BAL en la AAE se caracteriza por una alveolitis linfocitaria, en ocasiones muy llamativa (linfocitosis del 60-70%) (127), a expensas de un incremento de los LT CD8 (+), lo que conlleva que el cociente CD4/CD8 esté disminuido o invertido (203-206). Ampliando el estudio fenotípico, e incluyendo en él marcadores asociados a células natural killer (NK), la alveolitis linfocitaria en enfermos con AAE está característicamente definida por células con el fenotipo CD3(+)/ CD8(+)/ CD56(+)/ CD57(+)/ CD16(-). Este hallazgo en el BAL es altamente sugestivo, y quizás exclusivo, de la NH (202, 207). También se ha descrito que el número de células T que expresan HLA-DR, VLA-1 y γ/δ está incrementado en el BAL de estos pacientes (208-211). Se ha observado asimismo un aumento de la concentración de las inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA en el BAL de sujetos con NH (172, 212). Por último, es posible que las concentraciones de hialuronato y PCP tipo III en el BAL tengan utilidad en la monitorización de la enfermedad (202).

La neumonitis inducida por fármacos se expresa en el BAL de forma distinta dependiendo del agente químico implicado (tabla 12). Si bien los mecanismos que conducen al daño pulmonar secundario a drogas son en gran parte desconocidos, se asume que, bien por un efecto tóxico directo ó efectos indirectos del fármaco sobre las células inflamatorias, se produce inflamación alveolar que se manifiesta generalmente por neumonitis con mayor o menor grado de alveolitis fibrosante (213). El BAL revela habitualmente un incremento del

número total de células. Se observa una alveolitis linfocítica en cerca del 60% de los pacientes, mientras que la alveolitis neutrofilica o mixta es menos frecuente. La alveolitis eosinofílica pura sólo se ve en raras ocasiones. El inmunofenotipo de los linfocitos muestra un marcado aumento de las células CD8+ con un cociente CD4/CD8 disminuido (< 0.5) en la mayoría de los casos, aunque en la alveolitis inducida por metotrexate existen datos contradictorios (214–216). En general, los hallazgos del BAL son poco específicos para el diagnóstico definitivo de enfermedad pulmonar yatrogénica; sin embargo, el BAL es importante para eliminar otros posibles diagnósticos y analizar los mecanismos subyacentes de la enfermedad. Además, lavados seriados, cuando muestran una evolución típica de alveolitis después de la retirada de la droga, pueden tener un importante valor retrospectivo para el diagnóstico (217). Por otra parte, el hallazgo de vacuolas lipídicas en los macrófagos, con un perfil cromatográfico similar al aceite mineral de laxantes o gotas nasales, es muy sugestivo de neumonía lipoidea (218). De la misma manera, la presencia de tesarismosis (grandes inclusiones lamelares de naturaleza fosfolipídica, sobretudo en macrófagos alveolares) junto con linfocitosis, es muy sugestiva de toxicidad por amiodarona (217).

TABLA 10
ANALISIS CELULAR DEL BAL

AUMENTO DE NEUTROFILOS

FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA
FIBROSIS PULMONAR ASOCIADA
ASBESTOSIS PULMONAR
HISTIOCITOSIS X
N. INTERSTICIAL POR FARMACOS
FIBROSIS PULMONAR FAMILIAR
SARCOIDOSIS

AUMENTO DE LINFOCITOS

SARCOIDOSIS
ALVEOLITIS ALERGICA EXTRINSECA
BERILIOSIS
TALCOSIS
NEUMONITIS POR IRRADIACION
N. INTERSTICIAL POR FARMACOS
FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA
FIBROSIS PULMONAR ASOCIADA

AUMENTO DE EOSINOFILOS

EOSINOFILIA PULMONAR
FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA
FIBROSIS PULMONAR ASOCIADA
ASBESTOSIS PULMONAR

AUMENTO DE MASTOCITOS

ALVEOLITIS ALERGICA EXTRINSECA
ASBESTOSIS PULMONAR
SARCOIDOSIS
FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA
FIBROSIS PULMONAR ASOCIADA

TABLA 11
BAL: COCIENTE CD4/CD8 EN LA
ALVEOLITIS LINFOCITICA

CD4/CD8 AUMENTADO

SARCOIDOSIS
BERILIOSIS
ASBESTOSIS
ENFERMEDAD DE CROHN
ARTRITIS REUMATOIDE

CD4/CD8 DISMINUIDO

ALVEOLITIS ALERGICA EXTRINSECA
SILICOSIS
N. INTERSTICIAL POR FARMACOS
BOOP
SIDA

CD4/CD8 NORMAL

TUBERCULOSIS
LINFANGITIS

TABLA 12

PRINCIPALES FARMACOS IMPLICADOS EN LOS DIFERENTES TIPOS
DE ALVEOLITIS

ALVEOLITIS LINFOCITICA:	Metotrexate Azatioprina Ciclofosfamida Sales de oro Busulfán Bleomicina Nitrofurantoina Sulfasalazina Amiodarona
ALVEOLITIS NEUTROFILICA:	Bleomicina Busulfán
ALVEOLITIS EOSINOFILICA:	Nitrofurantoina Penicilina/Ampicilina Sulfasalazina Tetraciclina Bleomicina Cotrimazol
ALVEOLITIS HEMORRAGICA:	Penicilamina Aceites minerales

1.7.3. Lavado broncoalveolar en la Artritis Reumatoide.

El BAL es un útil instrumento en la detección precoz de la neumopatía intersticial en la AR y juega un importante papel en el estudio y comprensión de los cambios fisiopatológicos que tienen lugar en el espacio alvéolo-intersticial en estos pacientes (20).

Los procesos inflamatorios que acontecen en el pulmón de muchos enfermos con AR u otras CVD pueden evolucionar al desarrollo de una EPID similar a la observada en la FPI. No obstante, pueden observarse cambios inmunológicos en el BAL sugestivos de alveolitis tanto en pacientes con CVD y enfermedad pulmonar manifiesta como en aquellos que no presentan clínica respiratoria y cuya RT es normal, apoyando la presencia en estos últimos de una "alveolitis subclínica" subyacente (184). En estos casos, las anormalidades del BAL (sistema de detección precoz de la EPID incipiente) son más frecuentes en pacientes con enfermedad extrapulmonar activa y severa (185).

Los sujetos con AR y enfermedad pulmonar clínica (en base a criterios clínico-radiológico-funcionales) suelen mostrar en el BAL una alveolitis caracterizada por un incremento de la población macrofágica y la presencia de neutrofilia. Por el contrario, los pacientes con AR sin aparente afectación pulmonar presentan con frecuencia linfocitosis en el BAL (14, 16, 63, 184, 185, 219-223). Un patrón similar es observado en enfermos con síndrome de Sjögren primario, mientras que la neutrofilia asociada a linfocitosis con expansión de la población CD8+ es el hallazgo más común en el síndrome de Sjögren secundario (185, 224, 225).

Diferentes estudios mediante BAL han analizado el perfil celular, los factores solubles y los mediadores liberados por los macrófagos alveolares en pacientes con AR, con y sin EPID asociada (184). Los hallazgos más significativos se reflejan en la tabla 13.

Cabe destacar una serie de datos que podrían relacionarse bien con la presencia de

alveolitis subclínica, bien con enfermedad pulmonar establecida en pacientes con AR. Así, por ejemplo:

- el nivel de histamina en el líquido del BAL está significativamente aumentado en pacientes con AR, especialmente en lo que tienen enfermedad pulmonar parenquimatosa activa, en relación a controles (226).
- un marcado incremento, no sólo de neutrófilos, sino también de colagenasa tipo I activa de origen neutrofílico, ha sido hallado en el BAL de sujetos con AR y EPID asociada (227).
- Gilligan et al. demostraron que los pacientes con EPID establecida tienen, además de neutrofilia, una mayor concentración de procolágeno tipo III N terminal y colagenasa en el BAL que los controles y los sujetos con enfermedad incipiente (223).
- los macrófagos alveolares de pacientes con AR sin EPID detectable liberan cantidades aumentadas de anión superóxido, fibronectina y factor quimiotáctico de neutrófilos. El aumento de anión superóxido se correlacionó con el porcentaje de neutrófilos en el BAL (222).
- la producción de factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) por los macrófagos alveolares está incrementada en pacientes con AR con y sin EPID; por el contrario, no se detectó actividad incrementada de IL-1 β en los sobrenadantes en relación a controles (228, 229). Es destacable también que los enfermos con AR y EPID establecida presentaban un marcado aumento de inmunocomplejos en el BAL (229).

Estos y otros ejemplos son expresivos del indudable potencial del BAL en el esclarecimiento de los mecanismos patogénicos que conducen al desarrollo de neumopatía intersticial en la AR. Por el contrario, el papel clínico del BAL en el diagnóstico y seguimiento de la EPID reumatoidea no ha sido establecido.

TABLA 13

HALLAZGOS DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR EN ARTRITIS REUMATOIDE

	AR SIN EPID	AR CON EPID
<u>CELULARIDAD</u>		
Neutrófilos	N	Aumentados
Linfocitos	Aumentados	N
Cociente CD4/CD8	Aumentado	N
Células 5-9 (+)	¿ ?	Aumentadas
<u>COMPONENTES SOLUBLES</u>		
IgM	Aumentada	Aumentada
Inmuno-complejos	N	Aumentados
Factores quimiotácticos de neutrófilos	(+)	(++)
Colagenasa	(+)	(++)
Actividad de elastasa PMN	(-)	(+) pacientes no tratados
Mieloperoxidasa	(+)	(++)
Histamina	N	Aumentada
Activador del plasminógeno	Aumentado	N
Actividad procoagulante	N	Aumentada
Fibrinopéptido A	Aumentado	Aumentado
<u>MEDIADORES DERIVADOS DE MA</u>		
Radicales libres	Aumentados	Aumentados
Factor quimotáctico de neutrófilos	Aumentado	Aumentado
Fibronectina	Aumentada	Aumentada
TNF-alfa	Aumentado	Aumentado
IL-1	N	N

EPID: enfermedad pulmonar intersticial difusa; PMN: polimorfonuclear; MA: macrófago alveolar; TNF: factor de necrosis tumoral; IL-1: interleuquina 1.

1.8 HALLAZGOS HISTOLOGICOS

El diagnóstico específico y definitivo de las enfermedades intersticiales crónicas requiere en muchas ocasiones el estudio histológico del parénquima pulmonar. Si no se realiza el diagnóstico en base a la evaluación clínica y los métodos no invasivos disponibles, deben obtenerse muestras de tejido para su estudio anatopatológico. En series extensas se ha estimado que del 30 al 40% de los pacientes requerirán biopsia pulmonar de algún tipo para el establecimiento del diagnóstico (230,231).

Existen distintos tipos de biopsia del parénquima pulmonar. Alguno de ellos, como la toma de muestras a través del broncoscopio rígido y la biopsia percutánea por punción, han sido abandonados y no deben aplicarse para el diagnóstico de infiltrados difusos parenquimatosos (130).

La biopsia transbronquial (BTB) a través del fibrobroncoscopio flexible permite obtener muestras de pared bronquial y del parénquima pulmonar que alcanzan hasta los 2-5mm, por lo que se pueden apreciar lesiones bronquiales e intraalveolares. Se considera el primer procedimiento diagnóstico agresivo en pacientes con EPID, a menudo combinado con el BAL en el mismo acto endoscópico. La rentabilidad diagnóstica de la BTB es alta en algunas neumopatías difusas no infecciosas como la sarcoidosis y la linfangitis carcinomatosa, pero en la mayoría de las EPID, y concretamente en la asociada a AR, es poco sensible y específica. Hallazgos inespecíficos en las muestras obtenidas por BTB se encuentran en el 31-59% de los casos de EPID en que se realizó (232,233). El tamaño de la muestra, el número de alvéolos obtenidos y el número de tomas realizadas, representan parámetros histopatológicos y metodológicos que pueden ser usados para evaluar la rentabilidad diagnóstica de la BTB (234). La BTB no es rentable para subclasificar las diferentes neumonías intersticiales, pues ello requerirá una toma de mayor tamaño tisular (232). A pesar

de todo ello, dada la escasa agresividad y yatrogenia de la técnica, su práctica es norma habitual para la mayoría de los grupos. Las complicaciones de la BTB son escasas: neumotórax (menos del 5%) y hemorragia (1-9%). Sus contraindicaciones incluyen bullas, ampollas subpleurales, hipertensión pulmonar manifiesta, fallo respiratorio, ventilación mecánica, trastorno severo de la coagulación y falta de colaboración del paciente (232,233).

La biopsia pulmonar abierta (BPA) o biopsia pulmonar en cuña por toracotomía tiene un gran rendimiento en las enfermedades pulmonares difusas, tanto agudas como de larga evolución (130). Se considera el método ideal en la valoración, diagnóstico y clasificación de estos procesos (232). La rentabilidad diagnóstica de la BPA en más de 2200 pacientes de series combinadas osciló entre el 92 y el 100% (231). Es un procedimiento seguro, incluso en pacientes en mala situación. La mortalidad de la BPA en series combinadas fue menor del 1'8% y la mayoría de las muertes fueron debidas a enfermedad pulmonar subyacente como hipertensión pulmonar severa y neoplasia terminal (230,231).

Las ventajas de realizar BPA en pacientes con FP son las siguientes: a) permite excluir definitivamente otros posibles diagnósticos; b) ofrece información pronóstica; c) justifica el empleo de tratamientos agresivos durante largos períodos de tiempo en aquellos enfermos que, en base a los hallazgos histológicos, pueden responder (235). A pesar de ello, la BPA es un procedimiento agresivo, puede estar contraindicado en ciertos grupos de riesgo, generalmente cuando se realiza se hace en una sola ocasión a lo largo de la evolución de la enfermedad, y es difícil precisar el momento adecuado en que debe llevarse a cabo (20). La pregunta, pues, sigue flotando en el aire: ¿cuándo y en qué pacientes debe realizarse BPA?. La respuesta a esta cuestión no es uniforme y depende de los protocolos de referencia de los distintos grupos.

En la EPID establecida asociada a AR el patrón histológico más común es la

neumonitis intersticial usual (UIP), de evolución progresiva y severa. Cambios tempranos incluyen la infiltración perivascular, peribronquiolar e intersticial por linfocitos con algunas células plasmáticas y macrófagos. Cuando la enfermedad avanza, puede aparecer extensa fibrosis y distorsión de los septos alveolares que pueden evolucionar a pulmón en panal (74). Si bien la mayoría de las veces los hallazgos histopatológicos no son específicos, ciertos hechos la diferencian de la FPI. Estos hallazgos abarcan la presencia de un infiltrado linfocítico prominente e hiperplasia linfoide con folículos germinales adyacentes a los vasos y vías aéreas (74). No obstante, la presencia de nódulos reumatoides en el pulmón es, posiblemente, la única lesión histológica específica de AR (236). Llama la atención el escaso número de trabajos en la literatura sobre los hallazgos histopatológicos de la neumopatía intersticial reumatoidea. El más interesante de ellos es el realizado por Yousem et al., que presentan la histopatología de 40 BPA en pacientes con AR y enfermedad pulmonar activa, observando un amplio espectro de cambios morfológicos que conllevan diferente pronóstico y que les permite distinguir cinco patrones histológicos mayores en el pulmón reumatoide (236) (tabla 14).

TABLA 14

BIOPSIA PULMONAR EN AR

1. Nódulos reumatoides pulmonares
2. Neumonía intersticial usual (UIP)
3. Bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa
4. Hiperplasia linfoide
5. Neumonía intersticial celular (CIP)
6. Otros (DIP, reacción granulomatosa sarcoidea, infiltrados eosinófilos, angeitis).

(Yousem, Colby, Carrington. Am Rev Respir Dis, 1985)

1.9 TRATAMIENTO

El tratamiento de la EPID/FP asociada a AR no difiere en principio, del que se establece para la FPI. La respuesta a esteroides, valorada por parámetros clínicos a las 4-8 semanas, es similar en los enfermos con FP reumatoidea (43%) que en los que presentan FPI (54%). El porcentaje de fallecimientos a los 5 años de seguimiento es también semejante: 54 y 52%, respectivamente, en la serie de Turner-Warwick (69).

El objetivo fundamental del tratamiento consiste en suprimir la alveolitis y evitar la progresión de la enfermedad. Antes de considerar los diferentes tratamientos propuestos, conviene puntualizar una serie de hechos: a) la FP establecida es prácticamente intratable, pero la inflamación tisular aguda perifibrótica puede, a menudo, suprimirse con esteroides (237); b) la terapéutica debe continuarse tanto tiempo como la enfermedad pulmonar esté activa (237); c) en el pulmón adulto normal existen aproximadamente 300 millones de alveólos. La EPI en fase inicial presenta conjuntamente alveólos normales, afectados de "alveolitis", y alveólos con evidencia de deterioro y fibrosis. Según avanza la enfermedad, la proporción de estos últimos aumenta y esto refuerza lo señalado en los dos apartados anteriores (123); d) las alteraciones en los métodos habituales de valoración de la enfermedad (clínica, RT, PFR) nos hablan de lo que "ya ha sucedido" en el pulmón, es decir, progresión de alveolitis a fibrosis. Si estos parámetros de valoración no mejoran con el tratamiento impuesto no significa que no esté siendo beneficioso, ya que puede estar actuando previniendo grados mayores de deterioro (175).

Estos razonamientos han llevado a los investigadores clínicos a buscar métodos fiables que traduzcan la eficacia terapéutica y nos permitan indicar la duración del tratamiento. La gammagrafía con Ga 67 y el BAL son, en la actualidad, los procedimientos más estudiados

en este sentido.

Algunos autores, incluso, han sugerido que el número de neutrófilos desciende después de la administración de dosis elevadas de esteroides por vía intravenosa (238). El mecanismo de acción de los esteroides en la FP no se conoce con exactitud, aunque podría estar relacionado con la supresión de la migración de neutrófilos y linfocitos al parénquima pulmonar y con la disminución de inmunocomplejos circulantes y locales. Otros mecanismos podrían ser su efecto sobre la función de los macrófagos alveolares, fundamentalmente la inhibición de la liberación de factores quimiotácticos, así como la disminución de la adherencia de los neutrófilos a las superficies endoteliales (239).

La dosis aceptada de corticosteroides (prednisona ó 6-metil prednisolona) es de 1 mg/kg/día por vía oral y toma única matutina durante 6 semanas, con un descenso de 2,5 mg/semana hasta llegar a una dosis de mantenimiento de 0.25mg/kg/día (123,239). Con esta pauta existe una respuesta favorable en aproximadamente el 44% de los pacientes; sin embargo, la mejoría es muchas veces temporal (238). Una vez alcanzada la dosis de 0,25mg/kg/día, se debe modificar ésta de acuerdo con la clínica y las PFR, procurando mantener al paciente con la dosis mínima necesaria, que generalmente oscila entre 5-10 mg/día o a días alternos (239). Existe escasa experiencia con la administración de otros corticoides como el deflazacort.

La falta de respuesta clínica a los esteroides indicaría la necesidad de administración de otros fármacos, solos o asociados a los primeros. Por desgracia, no existen aún series amplias en las que basarnos para establecer preferencias.

Scott y Bacon describen su experiencia con metotrexate en 2 pacientes aislados. Demuestran mejoría basándose en datos clínicos, radiológicos y de las PFR. La dosis que emplean es de 20 y 40 mg/semana por vía intramuscular y en uno de los enfermos se

administró conjuntamente 10 mg de prednisona/día (22). La D-penicilamina se mostró eficaz en 3 enfermos con AR y EPID asociada; sin embargo 2 de ellos tuvieron que suspenderla por efectos secundarios. Otros 9 pacientes no respondieron a esta droga (22). La azatioprina, que ha demostrado su eficacia relativa en la neumonitis intersticial difusa (240), ha resultado útil en un caso de EPID asociada a AR, a dosis de 100 mg/día (22). Una paciente con escasa respuesta a esteroides y que desarrolló fiebre, náuseas y vómitos cuando se le administró azatioprina, obtuvo mejoría con ciclofosfamida a dosis aproximadas a los 100 mg/día (240). La influencia de la ciclofosfamida y de los esteroides en el tratamiento de la EPID ha sido considerada en un trabajo reciente con un seguimiento longitudinal de hasta 4 años. Los pacientes con buena respuesta terapéutica adquirirían recuentos celulares normales en el BAL. Por contra, los que no respondían mostraban elevación persistente de neutrófilos y eosinófilos (238).

La ciclosporina, que ha demostrado su efecto "in vitro" inhibiendo la producción de ciertas linfoquinas derivadas de linfocitos T y que tiene actividad frente a macrófagos y fibroblastos, ha sido ensayada con resultados aceptables en ratones con FP inducida (240).

La eficacia de otros fármacos, como colchicina, ribavirina y ciertos antiinflamatorios no esteroideos, no ha sido establecida (239).

Existen una serie de medidas complementarias como la prevención y el tratamiento de procesos pulmonares intercurrentes, la oxigenoterapia cuando está indicada y el tratamiento de la hipertensión pulmonar y cor pulmonale crónico en fases avanzadas de la enfermedad.

Por último, el trasplante pulmonar constituye, sin duda, una posibilidad terapéutica de gran importancia para los pacientes con FP. No obstante, sus indicaciones en la EPID asociada a AR no han sido establecidas.

2. PATOGENIA

2.1. MECANISMOS PATOGENICOS QUE CONDUCEN AL DESARROLLO DE FIBROSIS PULMONAR.

El desarrollo de FP es probablemente la consecuencia de la actuación de varios agentes lesivos sobre el pulmón. Se caracteriza por el acúmulo de colágeno en la matriz extracelular de este órgano. Los estudios con animales de experimentación, a los que se les ha inducido FP con bleomicina, han establecido que el exceso de colágeno depositado es secundario a un aumento de su síntesis (241,242). Actualmente sabemos que la cantidad de colágeno sintetizado está regulada por factores estimuladores e inhibidores y que su desequilibrio conduce al establecimiento de FP (243). Los fibroblastos, sintetizan procolágeno de tipo I y III, que son precursores de la mayoría del colágeno del intersticio pulmonar (244).

En biopsias pulmonares obtenidas de pacientes con FP, los fibroblastos tienen aumentado su retículo endoplásmico y por inmunofluorescencia se ha observado que presentan abundante procolágeno intracelular (243). Sin embargo, las causas por las que se produce esta activación y proliferación de fibroblastos todavía no están suficientemente aclaradas, aunque se han descrito una serie de factores que son capaces "in vitro" de inducir estos fenómenos.

La mayoría de los autores coinciden en señalar el importante papel que realizan los macrófagos alveolares (MA) como células colaboradoras en la producción de fibrosis. En general, se acepta que los MA actúan como células efectoras sobre el fibroblasto, influenciando en su proliferación y en la síntesis del colágeno (245-248). Los MA, por otra parte, son importantes como células presentadoras de antígeno al linfocito T, activándolo (249-251), y como células responsables de la fagocitosis local de partículas y microorganismos que nos invaden a través de la vía aérea (252,253). Además, se ha

reconocido al MA como una fuente importante de citoquinas.

En la figura 1 se representa un esquema patogénico de producción de FP, basado en el de Roschmann (22), y ligeramente modificado por nosotros. La mayoría de los pasos que en él se representan han sido demostrados "in vitro" con células procedentes del BAL de pacientes con FPI, pero se acepta que el mecanismo patogénico de esta entidad es básicamente similar al de otras FP, incluida la que se asocia a AR.

Los MA actuarían como células presentadoras de un antígeno desconocido al linfocito T al que activan e inducen a elaborar productos solubles, entre los que se encuentran factores de crecimiento y diferenciación de linfocitos B. Datos preliminares de nuestro grupo avalan esta activación celular T, pues son células portadoras en su superficie de moléculas relacionadas con activación (254). Nos llamó la atención el escaso porcentaje de linfocitos T, obtenidos del BAL de pacientes con AR y EPID, que son positivos para marcadores directamente implicados en proliferación, como los receptores para IL-2 y transferrina (254). La escasa proliferación observada en estas células T también se ha referido en cultivo mixto; los MA son menos eficaces para promover la proliferación T que los monocitos autólogos de sangre periférica (255). El mecanismo por el que se reclutan linfocitos en el intersticio y subsecuentemente en el alvéolo se desconoce, aunque se piensa que obedece a algún estímulo quimiotáctico que los atrae y los "ancla" por medio de moléculas de superficie (homing receptors) (256).

Los linfocitos B pulmonares se encuentran en proporciones similares cuando se comparan pacientes con FPI y sujetos sanos (257). Sin embargo, el número de estas células que secretan inmunoglobulinas, particularmente IgG, está aumentado (258), y en el BAL de sujetos con FPI se han encontrado niveles elevados de IgG (172). No obstante, en pacientes con AR con y sin enfermedad pulmonar intersticial se han hallado en el líquido procedente

del BAL niveles elevados de IgM (14). La activación y subsiguiente diferenciación de células B a células B productoras de anticuerpos probablemente esté mediada por linfoquinas elaboradas por el linfocito T activado.

Las inmunoglobulinas producidas localmente se combinarían con antígenos para formar complejos inmunes a nivel pulmonar. Esto es importante, porque se considera que la FP idiopática es una enfermedad localizada en el pulmón, más que una alteración sistémica inmune que utiliza el pulmón como órgano diana (175).

Se desconoce frente a qué están dirigidas las inmunoglobulinas producidas, pero existen datos que hacen sospechar que es contra componentes de la pared alveolar que reconocen como antígenos. En este sentido, hay autores que piensan que se trata del colágeno tipo I que se halla aumentado considerablemente en estos pacientes (175). Se han encontrado depósitos de inmunoglobulinas y complemento en las paredes alveolares y en el líquido procedente del BAL de pacientes con fibrosis intersticial (259).

Los complejos inmunes producidos estimulan a los MA para, a su vez, producir factores solubles (22,175). Se ha observado que estas células, procedentes de enfermos con FPI, tienen sus receptores para la porción Fc de la IgG y para la fracción C3b del complemento ocupados, y esto indicaría la existencia de complejos inmunes en su superficie (175,260). También se ha demostrado en estos enfermos por inmunofluorescencia, IgG en el citoplasma de los MA, lo que sugiere que estas células han fagocitado complejos de IgG (175).

Siguiendo el esquema de la figura 1, los MA activados por los inmunocomplejos elaboran factor quimiotáctico para los neutrófilos (FQN), que recluta neutrófilos procedentes de la sangre. Este factor también es quimiotáctico para monocitos y eosinófilos (261). Esto hace pensar que los MA contribuyen notablemente a la formación de la alveolitis neutrofílica

y eosinofílica.

Sin embargo, otros factores derivados del MA se han implicado en la patogenia de la FP. Martinet et al (262) han demostrado que los MA activados liberan un producto similar al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Este polipéptido tiene acción mitogénica sobre células de origen mesenquimal y posee actividad quimiotáctica para fibroblastos, neutrófilos y monocitos. Es además capaz de inducir la formación de anión superóxido y de estimular la adhesión y agregación celular y liberación de enzimas lisosomales de los neutrófilos y monocitos. El PDGF es igualmente capaz de estimular a los fibroblastos a que liberen colagenasa. Todos estos hechos indican que esta proteína contribuye al daño del epitelio alveolar, al colapso septal y al acúmulo de exudados en el alvéolo que son característicos de la FP (262,263).

Por otra parte, los MA, una vez estimulados, son también capaces de elaborar fibronectina, factor de crecimiento derivado de macrófagos e interleuquina-1 (IL-1) (175,195,246,264,265). Todos estos factores son amplificadores de la población de fibroblastos y han sido sobre todo estudiados en sarcoidosis y FPI. La IL-1, además de ser esencial en la activación y proliferación T y tener otras muchas propiedades, se produce abundantemente cuando se cultivan los MA con interferón gamma (IFN γ). Los MA, convenientemente estimulados, también son capaces de producir IFN alfa y gamma, y estas citoquinas estimulan in vitro la proliferación fibroblástica (266,267).

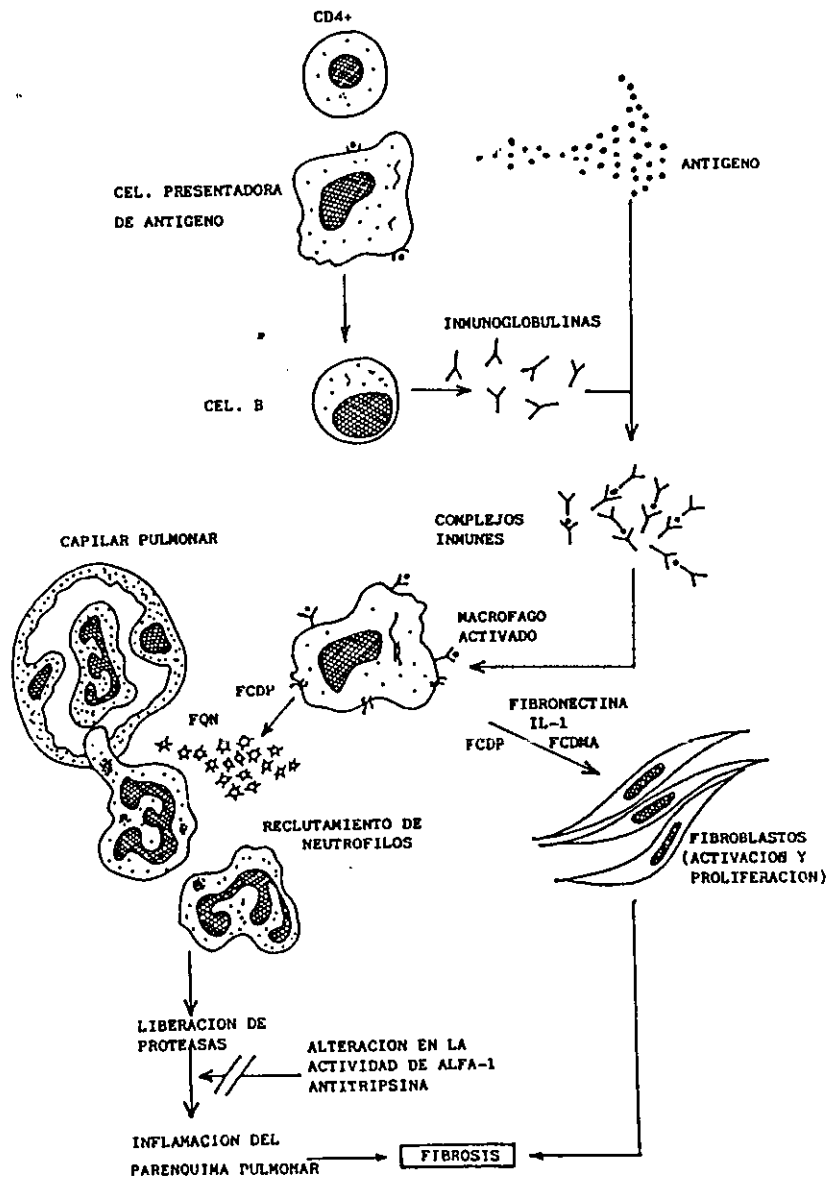
Sin embargo, en la literatura existen hechos contradictorios. Algunos autores han encontrado un factor soluble sintetizado por los MA que inhibe la producción de colágeno por los fibroblastos (245,268). Este factor estimularía la producción de prostaglandina E2 endógena por el fibroblasto y aumentaría el AMP_c intracelular, dando como resultado la supresión de la producción de colágeno. Posteriormente se ha visto que este polipéptido está

mayoritariamente elaborado por una subpoblación de MA más densos y pequeños, que fue obtenida in vitro por gradientes de Percoll (245). Es probable que en el pulmón, y seguramente en otros lugares, exista un equilibrio entre subpoblaciones de macrófagos. Cualquier agente que sea capaz de romperlo podrá predisponer al huésped a padecer fibrosis.

Los neutrófilos reclutados también son capaces de dañar a los componentes de la pared alveolar liberando proteasas (268). El déficit de inhibidores de proteasas que se ha encontrado en pacientes con AR y EPID/FP asociada contribuye aún más al establecimiento de fibrosis en el pulmón (249-251).

Si el esquema teórico expuesto en la figura 1 es real y la secuencia de acontecimientos sucede en el orden establecido, tal vez nos podamos explicar el porqué responden mejor al tratamiento con esteroides los enfermos que presentan alveolitis linfocítica. Cuando en el BAL obtenemos muestras con aumento de neutrófilos y/o eosinófilos, se está estableciendo localmente fibrosis y esto podría justificar la escasa respuesta a fármacos que se ha comentado en otros apartados de este trabajo.

Figura 1. Esquema patogénico simplificado de la neumopatía intersticial asociada a AR.



FCDP o PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

FQNP: factor quimiotáctico de neutrófilos.

FCDMA: factor de crecimiento derivado de macrófagos.

IL-1: interleuquina-1.

2.2. MECANISMOS DE ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS T.

—ANTIGENOS DE ACTIVACION.

Los linfocitos T (LT) desempeñan un papel central en los mecanismos de acción y control de la respuesta inmune. Por otra parte, las observaciones realizadas en el sistema inmune humano y en otros sistemas animales modelo han puesto de manifiesto la existencia de un conjunto de interacciones entre los diferentes tipos de linfocitos y otras células del sistema inmune. La identificación y posterior caracterización de las moléculas de la membrana de los LT constituyen la primera etapa para comprender y dilucidar sus mecanismos efectores. En estos estudios, los anticuerpos monoclonales (AcM) frente a estructuras de la membrana celular son reactivos de uso imprescindible. Durante los últimos años se han obtenido un gran número de AcM que reconocen antígenos (Ag) de la membrana de los LT. También se han identificado estructuras moleculares que se expresan en los LT después de ser estimulados por antígenos o mitógenos. Se han descubierto varios mecanismos moleculares a través de los que los LT pueden ser activados. Los AcM frente a antígenos de activación han servido como marcadores para detectar la existencia de poblaciones activadas en ciertos procesos patológicos del sistema inmune.

Los precursores inmaduros de las células T se diferencian en una serie de subpoblaciones celulares funcionalmente especializadas que circulan y se localizan en los órganos linfoides periféricos. Estas subpoblaciones están constituidas por un número indeterminado de clones, cada uno de los cuales es capaz de reconocer selectivamente un tipo de determinante antigénico. Los LT responden al antígeno únicamente cuando éste es presentado sobre la membrana de otra célula, asociado a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH), denominándose a este fenómeno "restricción". La interacción de

la célula T con el complejo Ag/CPH se establece por medio de estructuras heterodiméricas y polimórficas, distribuidas clonalmente, que se denominan genéricamente "receptores para antígenos". Estas glicoproteínas se encuentran ancladas a la membrana plasmática en asociación con otras cadenas monomórficas, denominada CD3, formando un complejo multimolecular. El complejo CD3 incluye cinco tipos de polipéptidos, designados alfa, delta, epsilon, teta y eta. Estas estructuras son esenciales para la expresión de los TcR, así como para la transmisión de señales de activación al LT.

Las células T maduras se dividen en subpoblaciones especializadas en funciones de cooperación y actividad citotóxica/supresora. Las subpoblaciones de LT citotóxicos (Tc) y de LT cooperadores (Th) presentan la particularidad de reconocer el antígeno asociado, de manera preferente aunque no exclusiva, a moléculas del CPH de clase I y II, respectivamente. Esta restricción se correlaciona con la expresión en la membrana de las glicoproteínas CD4 y CD8, siendo las células CD4+ restringidas por moléculas de clase II y las CD8+ por las de clase I. La célula T tras interactuar con el complejo bimolecular Ag/CPH en el microambiente adecuado, experimenta una serie de cambios metabólicos que la capacitan para mediar las funciones propias de la estirpe (síntesis de linfoquinas, cooperación celular, actividades citotóxica y supresora), así como para dividirse. La división mitótica de la célula T se desencadena como consecuencia de la unión de la interleucina-2 (IL-2) con sus receptores de membrana específicos (269), siendo ambas moléculas sintetizadas "de novo" tras la estimulación antigénica. La síntesis de IL2 está mediada por linfocitos T CD4+, requiriéndose para su producción óptima la presencia de otra molécula soluble, la interlenquina-1 (IL-1) (270). De las múltiples actividades biológicas que hasta ahora se han descrito de la IL-1, la más relevante es su papel como primera señal para que los LT produzcan IL-2 y otras linfoquinas que los hagan proliferar para actuar sobre los linfocitos

B y convertirse en células efectoras. A través de esta secuencia, ya ampliamente reconocida in vitro, la IL-1 actuaría sobre un receptor específico para ella en el LT previamente activado (segunda señal). La actuación casi simultánea de estas dos señales daría lugar a que la célula T elabore IL-2 y exprese en su superficie la molécula receptora para esta última glicoproteína (receptor para IL-2). Con la aparición de esta última se produce la proliferación de células T que a su vez siguen produciendo IL-2 y otras linfoquinas como interferon- γ (271).

La IL-2 es una linfoquina que sintetizan subpoblaciones especializadas de LT activados y cuya función es estimular la división mitótica de los mismos(272). Para que esta acción se lleve a cabo es necesario que la IL-2 se una específicamente a receptores de membrana, los cuales son sintetizados "de novo" tras la estimulación antigénica del LT (273,274). El esquema más aceptado para que se produzca este fenómeno divide al proceso en dos etapas: una de activación celular, seguida de una segunda fase de expansión proliferativa de las poblaciones inicialmente activadas. En la primera fase, la interacción de las células T con el antígeno, el cual es presentado por los monocitos/macrófagos, induce en los LT la expresión de receptores para IL-2. También en esta primera fase la interacción con el antígeno induce a los macrófagos a la producción de IL-1, la cual actúa a través de receptores específicos en los LT (275). La acción de la IL1 es fundamental para que las células T cooperadoras que han recibido la señal antigénica produzcan IL-2. En una segunda fase las células T activadas producen IL-2, que inducirá la proliferación de aquellos linfocitos que expresen receptores para IL-2. En este esquema existen dos tipos diferentes de células T: por un lado células T cooperadoras, CD4+, que producirán IL-2 y por otro, células T supresoras/citotóxicas, CD8+, que también reconocen el antígeno y se van a expandir convirtiéndose en células efectoras. La demostración de la existencia de receptores específicos

para IL-2 en la membrana de los LT se realizó inicialmente utilizando IL-2 radiomarcada (275). Posteriormente, mediante AcM se han identificado dos glicoproteínas de 55 Kd y 75 Kd que constituyen el receptor de alta afinidad para IL-2 (α -IL-2) (276,277), y recientemente se ha detectado una tercera subunidad (γ) (278).

ANTIGENOS DE ACTIVACION DE LINFOCITOS T.

Se sabe que el proceso de activación va acompañado de un conjunto de cambios fenotípicos y moleculares en la superficie de los LT, donde antígenos ya existentes cambian cualitativa y cuantitativamente, apareciendo asimismo nuevas estructuras moleculares. Algunos de los antígenos de nueva aparición han sido identificados y se ha estudiado su cinética de expresión en el proceso de activación (279). Así, se ha comprobado la existencia de antígenos de aparición muy temprana (antes de la síntesis de DNA) y, fundamentalmente, son receptores de ligandos necesarios para el crecimiento celular. Entre ellos el receptor para IL-2, ya mencionado (277,280); el receptor para transferrina compuesto por un dímero de 200 Kd con dos subunidades de 90 Kd (281,282); una estructura heterodimérica con glicoproteínas de 40 y 100 Kd, denominada 4F2, que juega un papel como intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (283). Recientemente se ha descrito un nuevo antígeno de activación denominado CD69 o AIM (284), del inglés "activation inducer molecule", el cual se expresa muy precozmente tras la activación de células T con diferentes mitógenos como la fitohemaglutinina, ésteres de de forbol o anti-CD3. La molécula CD69 tiene una estructura heterodimérica unida por puentes disulfuro y formada por dos cadenas polipeptídicas de 33 y 27 Kd. La expresión del AIM antecede a los otros antígenos de activación de aparición temprana como el 4F2 y el α -IL-2. Una vez que se produce la expresión de CD69 en la membrana celular, la unión específica de un AcM desencadena una fuerte respuesta proliferativa de la célula en combinación con

ésteres de forbol. La activación de los linfocitos a través de la molécula CD69 induce la síntesis de IL-2 y de su receptor, inhibiéndose esta vía de activación por un AcM anti-r-IL-2.

Los antígenos de aparición temprana podrían estar implicados en el crecimiento celular. De hecho, la aparición del receptor para IL-2 es crítica en este contexto, ya que su expresión es regulada por la estimulación antigénica (285) y es imprescindible para la expansión clonal de los LT. Entre otras moléculas que se expresan más tardíamente sobre la superficie de la célula T activada cabe destacar: a) antígenos HLA de clase II (DR), cuyo papel funcional en el proceso es todavía incierto y b) la integrina denominada VLA-1, (very late activation antigen) formada por un heterodímero (CD49a/CD29) que constituye un receptor para proteínas de matriz extracelular como colágeno y laminina (286). Las moléculas de activación conocidas y otras moléculas aún no identificadas seguramente están implicadas en diferentes etapas de la activación de los LT, así como en sus funciones efectoras (receptores para citoquinas, cooperación con otros linfocitos y otros tipos celulares linfoides o no linfoides, etc).

El estudio de las subpoblaciones linfocitarias en el BAL mediante el uso de AcM ha sido esencial para establecer modelos de respuesta inmunológica en distintos procesos patológicos pulmonares. Básicamente existen dos tipos de técnicas para el análisis con AcM:

- técnicas de inmunofluorescencia: directa (IFD), indirecta (IFI), citometría de flujo.
- técnicas inmunoenzimáticas: inmunoperoxidasa, inmunofosfatasa alcalina.

El citómetro de flujo consiste esquemáticamente en: a) fuente de láser; b) sistema de flujo laminar en el que las células interaccionan con el láser; c) serie de detectores y filtros que permiten captar parámetros variados (dispersión de la luz frontal y a 90°, fluorescencia); d) amplificación y conversión analógico-digital; e) información precisa y casi inmediata de la población celular estudiada (287).

El estudio inmunológico de las muestras obtenidas mediante BAL puede resultar complejo. Los factores que dificultan este tipo de análisis son varios (288): a) gran diversidad de Ags de diferenciación leucocitaria; b) falta de especificidad en la expresión de muchos Ags (la mayor parte de los Ags pueden ser coexpresados por más de un tipo celular, lo que dificulta el estudio de inmunofenotipo); c) desconocimiento de la significación funcional de algunos de los Ags identificados; d) falta aún por determinar cambios en la expresión de Ags según estadio madurativo y/o activación funcional de las células, tanto de la serie linfoide como de la línea monocítico-macrofágica, existentes en el tracto respiratorio inferior; e) falta de estandarización del método más adecuado de estudio inmunológico de las muestras del BAL, lo que impide la comparación de resultados entre laboratorios; f) falta aún por establecer un panel standard de AcM aplicable al estudio de inmunofenotipo en la práctica habitual.

2.3 CITOQUINAS DEL PULMON

Las citoquinas (CQ) son un grupo heterogéneo de moléculas polipeptídicas de bajo peso molecular, producidas por una gran variedad de células, que regulan el crecimiento, diferenciación, migración y función celulares. Ello hace que desempeñen un papel esencial en la inflamación y en la regulación de la respuesta inmune y, por lo tanto, en la patogenia de un gran número de procesos de base inmunológica, entre los que se encuentra la AR. Por otra parte, en los últimos años se han descrito diversas anti-citoquinas (reguladores endógenos específicos de la actividad de distintas CQ), cuyo potencial terapéutico en ciertas enfermedades inmunoinflamatorias ha sido destacado (289-292).

Cuando se habla de CQ en general, se engloba un amplio grupo de factores, estructuralmente diferentes, conocidos también con otros términos como interleuquinas (mediadores de comunicación entre leucocitos), linfoquinas (secretadas primariamente por linfocitos), monoquinas (secretadas, inicial o ampliamente, por monocitos), interferones, factores de crecimiento de células mesenquimales, factores estimuladores de colonias mieloides, e intercrinas (tabla 15).

Sporn y Roberts comparan la red de CQ a un "lenguaje complejo de señalización celular", sugiriendo que la respuesta final de una célula diana está determinada por los distintos mensajes concurrentes recibidos en la superficie celular (293). Si esta comparación es válida, es lógico pensar que las enfermedades inmunológicas pulmonares no son consecuencia del déficit o sobreactividad de CQ aisladas, sino del efecto resultante de distintos mediadores inflamatorios y antiinflamatorios. Dicho de otra manera, una misma CQ puede ejercer diferentes efectos dependiendo de su dosis, del estado de activación y/o maduración de la célula diana y de la presencia o ausencia de otras CQ en el microambiente celular. De ello se deduce que los acontecimientos inflamatorios en el pulmón u otros órganos

son regulados por complejas redes y/o cascadas de CQ que están interactuando (294).

Las CQ son mediadores muy potentes que actúan a concentraciones picomolares e inician su acción a través de la interacción con receptores celulares específicos de alta afinidad en la superficie de las células diana, regulando los acontecimientos inmunológicos y fisiológicos. La secreción de CQ es un hecho breve y autolimitado, pudiendo actuar localmente sobre la propia célula secretora (acción autocrina), sobre las células vecinas (acción paracrina) o, incluso, sobre células a distancia de otros tejidos (acción endocrina). Por otra parte, las CQ no sólo son producidas por tipos celulares diversos, sino que actúan también sobre una gran variedad de estirpes celulares (pleiotropismo). Además, sus efectos son a menudo redundantes, pues varias CQ comparten acciones similares. Por último, una CQ induce, a menudo, la síntesis de otras CQ, dando lugar a "cascadas" en las que una segunda o tercera CQ puede mediar algunas de las acciones biológicas de la primera (138,292,295).

Los sistemas de detección de CQ pueden, básicamente, ser encuadrados en tres grupos:

- Análisis biológicos. Detectan CQ biológicamente activas en virtud de alguna acción teóricamente específica (proliferación, producción de otro factor, etc). Son sensibles, pero a menudo inespecíficos, dada la redundancia de acciones ya comentada.

- Inmunoanálisis (RIA,ELISA). Buena sensibilidad y especificidad.

- Métodos de detección de RNAm de CQ (Northern blot, hibridación "in situ", reacción en cadena de la polimerasa-PCR-). Sensibles y específicos. Presentan la limitación de que la expresión de RNAm no supone necesariamente traducción en cuanto a la proteína (producto biológicamente activo).

De una manera global, las CQ se consideran en la actualidad mediadores-clave de la inflamación que también condicionan diferentes respuestas fisiológicas necesarias para el mantenimiento de la homeostasis (138). El TNF- α y la IL-6, junto con la IL-1, IL-2 e IL-8,

son polipéptidos proinflamatorios que juegan un papel relevante en la respuesta inflamatoria e inmune a nivel pulmonar.

La mayor fuente celular de TNF- α son los macrófagos activados, si bien otras células como LT, células NK y mastocitos activados, pueden secretar también esta proteína. Sus acciones proinflamatorias son las que merecen en la actualidad mayor interés, aunque fue descubierto por sus efectos antineoplásico y catabólico. De hecho es, junto con la IL-1, el paradigma de CQ proinflamatoria, pudiendo actuar ambas de forma sinérgica. En realidad, comparte muchas acciones biológicas con la IL-1, si exceptuamos las de activación linfocitaria. El TNF- α parece tener mayor potencial que la IL-1 para el daño tisular. Es quimiotáctico para células inflamatorias y activa neutrófilos y células endoteliales. Estimula el crecimiento de fibroblastos y la producción de IL-6, IL-8, PGE₂, IL-1 α y colagenasa. Existe una proteína relacionada, llamada linfotoxina o TNF- β , que es producida por LT activados y que, a pesar de tener con el TNF- α sólo una homología aminoacídica del 32%, sus productos protéicos se fijan al mismo receptor y causa efectos similares. No obstante, la linfotoxina es sintetizada en general en mucho menor cantidad y usualmente actúa como factor paracrino local y no como mediador de daño sistémico (289,294,296-299).

Existen dos inhibidores conocidos de TNF- α que son en realidad "receptores solubles", es decir, las regiones extracitoplasmáticas de los dos receptores celulares conocidos de TNF- α (300,301).

El TNF- α es producido abundantemente por los macrófagos de la sinovial reumatoide. Se ha subrayado su importante papel patogénico en la artritis, lo que convierte a esta CQ en un objetivo atractivo para tratar de bloquear su acción con fines terapéuticos (292,302,303).

Dentro de este contexto, un estudio reciente señala que los macrófagos alveolares obtenidos mediante BAL en enfermos con AR con y sin enfermedad pulmonar intersticial

detectable, liberan espontáneamente amplias cantidades de TNF- α ; por el contrario, no se detectó modificación en la síntesis de IL-1 en los sobrenadantes (229).

La interleuquina 6 (IL-6) es una CQ pleiotrópica, muchos de cuyos efectos se solapan o son sinérgicos con los de la IL-1 y el TNF- α . Fue descrita inicialmente como un factor inductor de múltiples acciones (factor de crecimiento de plasmocitomas o de hibridomas, factor estimulador de hepatocitos, factor estimulador de células B o interferón β -2). Hoy se sabe que estimula la proliferación de LT y la diferenciación terminal de células B y que posee acciones locales y sistémicas. Es, posiblemente, el mayor inductor de reactantes hepáticos de fase aguda por los hepatocitos. Es producida por macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos B y T y queratinocitos. Ciertas CQ (IL-1, TNF, PDGF), DNA y RNA víricos, y endotoxina, pueden estimular la producción de IL-6 (291,294,304-306).

La IL-6 parece jugar un papel central en la iniciación y coordinación de la respuesta inflamatoria in vivo (294,306).

Varios grupos han detectado IL-6 en la membrana sinovial de la AR (307,308). Niveles elevados de esta CQ han sido documentados en el líquido sinovial de estos pacientes (294,304), e incluso se han correlacionado con la actividad de la enfermedad (294).

TABLA 15 (A)

RELACION DE CITOQUINAS

<u>INTERLEUQUINAS</u>	<u>Acción más significativa</u>
IL-1	Mediador de inflamación Mitogénesis linfocitos T Reacción de fase aguda
IL-2	Proliferación de linfocitos T
IL-3	Hematopoyesis mieloide
IL-4	Proliferación de linfocitos B
IL-5	Proliferación de linfocitos B Diferenciación de eosinófilos
IL-6	Proliferación de linfocitos B y T Reacción de fase aguda
IL-7	Proliferación de linfos B y T inmaduros
IL-8	Quimiotaxis de polimorfonucleares
IL-9	Proliferación de linfocitos T inmaduros
IL-10	Inhibición de la síntesis de citoquinas
IL-11	Proliferación de linfocitos B
IL-12	Proliferación de linfocitos T
IL-13	No definida. Información preliminar
 <u>FACTOR DE NECROSIS TUMORAL</u>	
TNF- α (caquectina)	Mediador de inflamación Necrosis tumoral Reacción de fase aguda
TNF- β (linfotoxina)	Similar a TNF- α
 <u>INTERFERONES</u>	
IFN- α	Inhibición de la replicación vírica
IFN- β	Inhibición de la replicación vírica
IFN- γ	Activación de macrófagos

TABLA 15 (B)

FACTOR ESTIMULADOR
DE COLONIAS

Acción más significativa

Macrofágicas (M-CSF)

Granulocíticas (G-CSF)

Hemopoyesis mieloide

Granulocítico-Macrofágicas (GM-CSF)

Múltiples (Multi-CSF/IL-3)

FACTOR DE CRECIMIENTO DE
CELULAS MESENOQUIMALES

Crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

Crecimiento epitelial (EGF)

Transformador del crecimiento (TGE)

Proliferación de células
mesenquimales

Crecimiento de fibroblastos (FGF/HBGF)

INTERCRINAS

Factor quimiotáctico de neutrófilos
derivado de macrófagos (MDNCF/IL-8)

Factor plaquetario 4 (PF4)

Quimiotaxis de neutrófilos y otros leucocitos

Beta tromboglobulina (β -TG)
Proteína inducida por IFN-10 (IP10)

OBJETIVOS

El lavado broncoalveolar (BAL) puede contribuir de forma decisiva al estudio y comprensión de los acontecimientos fisiopatológicos que tienen lugar en el espacio alvéolo-intersticial en pacientes con Artritis Reumatoide (AR) y enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) asociada. Dentro de este complejo escenario, los linfocitos T (LT) desempeñan un papel central en los mecanismos de acción y control de la respuesta inmune, y la implicación de ciertas citoquinas en la patogenia de la enfermedad parece relevante. En base a estos argumentos, se han planteado los siguientes objetivos:

1.- Analizar las características clínico-epidemiológicas, datos biológicos, radiológicos, y parámetros de función pulmonar, en pacientes con AR con y sin EPID asociada. Evaluar la frecuencia y tipo de alveolitis asociada a AR mediante el estudio celular del BAL.

2.- Caracterizar fenotípicamente las poblaciones linfoides obtenidas por BAL en pacientes con AR y EPID, mediante la utilización de AcM y análisis por citometría de flujo. Determinar la presencia de marcadores de activación en linfocitos del BAL y sangre periférica de sujetos con AR y EPID, y de controles sanos.

3.- Valorar la producción (espontánea e inducida por LPS) de TNF- α e IL-6 por los macrófagos alveolares de pacientes con AR y EPID asociada.

En función de los hallazgos obtenidos, tratar de establecer posibles conexiones con la patogenia de la neumopatía intersticial reumatoidea.

MATERIAL Y METODOS

1. CONSIDERACIONES GENERALES

1.1. PACIENTES ESTUDIADOS

Treinta y siete enfermos, 25 mujeres y 12 varones, con AR clásica o definida según los criterios de la American Rheumatism Association (ARA) (309) (tabla 16) fueron estudiados prospectivamente, en un período de tiempo comprendido entre los años 1988 y 1992.

Los pacientes, con una edad media de 58.3 años (rango 36-75), procedían mayoritariamente de la Sección de Reumatología del Hospital de la Princesa y todos aceptaron su participación en un protocolo común, que fue aprobado por la Comisión de Investigación del Centro.

El tiempo de evolución y actividad de la AR, hábito tabáquico, medicaciones recibidas y la presencia de complicaciones extraarticulares, incluyendo síntomas y signos de enfermedad pulmonar, fueron expresamente evaluados. Para el diagnóstico de síndrome de Sjögren secundario se utilizaron los criterios propuestos por Molina et al. (310) (tabla 17). Los enfermos con antecedentes de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infección respiratoria recurrente, o exposición profesional a polvos orgánicos o minerales fueron previamente excluidos del estudio. Ningún paciente fue estudiado dentro de las 6 semanas siguientes a un episodio de infección respiratoria aguda.

La valoración clínica se completó en todos los casos con la determinación de parámetros analíticos, estudio radiográfico del tórax, pruebas funcionales respiratorias y lavado broncoalveolar. Se realizó gammagrafía pulmonar con Ga 67 en 16 casos, utilizando un análisis semicuantitativo previamente descrito (101).

Los pacientes fueron divididos en dos grupos, según la existencia o no de EPID

asociada, en base a criterios radiológicos y/o de función pulmonar.

1.2. DATOS ANALITICOS.

En muestra sanguínea obtenida en cada paciente en el momento de su inclusión en el estudio, se realizaron de forma sistemática las siguientes determinaciones: cifra de hemoglobina, hematocrito, fórmula y recuento leucocitarios, plaquetas, velocidad de sedimentación globular (VSG), título de factor reumatoide (FR), proteinograma e inmunolectroforesis (IgG, IgA, IgM), presencia de crioglobulinas, niveles de $\alpha 1$ -antitripsina, y anticuerpos antinucleares (ANA).

Como método de detección de FR se utilizó la hemaglutinación en porta por diluciones seriadas del suero con hematíes de carnero sensibilizados (Rheumaton^R test. Wampole Lab. Cranbury, New Jersey), expresando los resultados semicuantitativamente. Se consideró positivo un título $> 1/20$. La presencia de ANA se valoró por técnica de inmunofluorescencia indirecta en el laboratorio de Inmunología, aceptándose como positivos títulos $> 1/40$. El resto de parámetros se obtuvieron mediante técnicas estandarizadas de rutina.

1.3. RADIOGRAFIA DE TORAX

La valoración de la presencia o ausencia de datos radiológicos de afectación intersticial en la radiografía de tórax (RT) PA y L fue realizada por separado por un radiólogo y un neumólogo experimentados que desconocían los datos clínicos y complementarios de los pacientes. La interpretación fue discordante en 4 casos (10,8%), solicitándose en ellos el informe de un segundo radiólogo. Para obviar esta discrepancia, eliminar factores subjetivos de interpretación, y mejorar la capacidad de resolución, se incluyó en el protocolo a partir de enero de 1990, la práctica (complementaria a la RT convencional) de cortes de alta definición

mediante TAC torácico (Toshiba. TCT-600 HQ), que se llevó a cabo en 20 enfermos.

1.4. PRUEBAS FUNCIONALES RESPIRATORIAS.

Los volúmenes y capacidades pulmonares, flujos espiratorios forzados, resistencia de la vía aérea (Raw) y curvas \dot{V}/V fueron medidos con un body-pletismógrafo (Body Test; E. Jaeger. Würzburg, Alemania), utilizándose como valores de referencia los propuestos por la ECSC (European Coal and Steel Community) (311). Se determinó por single-breath la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO) (Alveo-Diffusion Test; E. Jaeger), empleándose como valores teóricos los señalados por Cotes (312). Se realizó también a todos los pacientes gasometría arterial basal en reposo tras punción en la arteria radial (Ph-blood gas analyzer. IL 1306 Instrumentation Laboratory. Milán, Italia). Para el cálculo del gradiente alveoloarterial de O_2 ($AaPO_2$) se utilizó la ecuación: $AaPO_2 = PAO_2 - PaO_2$, siendo la $PAO_2 = PIO_2 - PaCO_2 \times (FIO_2 + [1-FIO_2/R])$, donde PIO_2 corresponde a la PO_2 inspirada, FIO_2 a la fracción inspiratoria de O_2 (aire ambiente: 0.21) y R al cociente respiratorio ($\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$). Se siguieron las normas y recomendaciones establecidas por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) para el estudio de la función pulmonar.

La definición funcional de enfermedad pulmonar intersticial incluyó una relación FEV_1/FVC normal (mayor del 70%) y la reducción (menos del 80% de los valores teóricos) de al menos dos de los siguientes parámetros: TLC, FVC y DLCO.

1.5 LAVADO BRONCOALVEOLAR.

El BAL fue realizado siempre por el mismo broncoscopista, salvo en el caso en que éste fue sometido a la prueba, como integrante del grupo control. Tras premedicación con atropina subcutánea y anestesia tópica de hipofaringe y laringe con lidocaína 1%, el

fibrobroncoscopio (Olympus BF-B3R) fue introducido en el árbol traqueobronquial. Se administró oxígeno suplementario con sonda nasal a 4 l/min a todos los sujetos y se utilizó un máximo de 8 ml de lidocaína como anestesia local durante el procedimiento. Tras la exploración rutinaria de ambos árboles bronquiales, el FB se enclavó en uno de los subsegmentarios del lóbulo medio, instilándose entre 150 y 300 ml de solución salina isotónica en alícuotas de 50 ml, aspirándose manual y suavemente después de la introducción de cada una. En todos los casos, el porcentaje global de líquido recuperado fue superior al 45%. El fluido obtenido fue filtrado a través de gasa estéril, mezclado, y llevado inmediatamente al laboratorio para su análisis. Se desechó el líquido obtenido en la primera alícuota, tras ser cuantificado. El conteo celular total se realizó utilizando un hemocitómetro (Coulter S plus IV/V D), anotándose la media de dos determinaciones. La viabilidad celular fue evaluada mediante el test de azul trypan. El estudio de las diferentes poblaciones celulares y sus porcentajes respectivos se estableció por microscopía óptica, tras coloración de May-Grünwald-Giemsa, identificándose un mínimo de 400 células. En ningún caso se observaron células ciliadas y epiteliales escamosas, y la presencia de eritrocitos fue excepcional y siempre inferior al 2%. El procedimiento fue en general bien tolerado y las complicaciones escasas. En 4 enfermos con AR (10,8%) y 2 controles sanos (8,3%) se registró una pirexia transitoria a las pocas horas de la realización de la prueba.

Se definió como alveolitis linfocítica, la existencia de un porcentaje de linfocitos en el recuento diferencial del BAL mayor del 12%; si el % de polimorfonucleares era mayor del 5%, existía alveolitis neutrofílica (tabla 6). Sólo en 2 pacientes con AR y EPID asociada se identificaron eosinófilos.

1.6 GRUPO CONTROL

El grupo control está constituido por 24 voluntarios sanos (estudiantes, enfermeras y médicos del Hospital de la Princesa) e incluía 12 no fumadores (NF) (6 varones y 6 mujeres; edad media 25.3 años; rango, 21–37 años) y 12 fumadores (F) (7 varones y 5 mujeres; edad media, 28.1 años; rango, 21–36 años). Los sujetos del grupo F fumaban cigarrillos regularmente al ser incluidos en el estudio con una media de 1.2 ± 0.1 paquetes/día, llevaban fumando 9.0 ± 1.8 años y consumido una media de 10.9 ± 2.4 paquetes/año. Todos aceptaron voluntariamente su participación en el protocolo.

Antes de ser incluidos en el mismo, fueron evaluados en base a la historia clínica, exploración física, radiografía de tórax, espirometría (Spiro Analyzer ST-250. Fukuda Sangyo Co, LTD), y analítica de rutina de sangre periférica. Una evaluación normal de estos datos debía acompañarse de la ausencia de historia ocupacional en relación con polvos o irritantes, ausencia de mediación, exposición a animales domésticos, e infección respiratoria durante las 6 semanas previas a la realización del BAL.

1.7 CLASIFICACION DE LA POBLACION ESTUDIADA.

Los pacientes con AR y controles fueron divididos en los siguientes grupos:

Grupo 1 (AR + EPID) (n = 15). Pacientes con AR y enfermedad pulmonar intersticial clínica. Esta se definió por la presencia de anomalías radiográficas en la RT PA y L (y/o HRTAC) compatibles con patología intersticial y/o un patrón restrictivo en los tests de función pulmonar, en base a los criterios anteriormente expuestos. De los 15 enfermos, 2 eran fumadores activos y 4 ex-fumadores que habían abandonado este hábito al menos 12 meses antes del estudio. La edad media era de 62.1 años (rango 48–75).

Grupo 2 (AR - EPID) (n = 22). Pacientes con AR sin enfermedad pulmonar intersticial. De los 22 pacientes encuadrados en este grupo, 15 eran no fumadores, 3 fumadores y 4 ex-fumadores. La edad media era de 57.4 años (rango, 36-75).

Grupo 3 (controles NF) (n = 12). Controles sanos no fumadores.

Grupo 4 (controles F) (n = 12). Controles sanos fumadores.

Dada la diferencia de edad entre los pacientes con AR y controles sanos, se estableció un Grupo 5 (grupo misceláneo) (n = 8), con el objeto de analizar ciertas variables seleccionadas en las que la edad podía ser un factor determinante. Este grupo está constituido por pacientes sin evidencia de enfermedad pulmonar difusa en los que se indicó fibrobroncoscopia por diferentes motivos (hemoptisis autolimitada en 3 casos, nódulo pulmonar solitario en 4, y derrame pleural izquierdo no filiado en 1), realizándose el BAL en el lóbulo medio o llingula del pulmón contralateral al afectado. Cinco eran no fumadores y 3 fumadores, 6 mujeres y 2 varones, con una edad media de 58.1 años (rango, 47-71).

TABLA 16

CRITERIOS REVISADOS DE LA ARA DE 1987 PARA EL DIAGNOSTICO Y CLASIFICACION DE LA ARTRITIS REUMATOIDE*

CRITERIO	DEFINICION
1. Rigidez matutina	Yuxta o articular, que se mantenga al menos durante una hora antes de su máxima mejoría.
2. Artritis de 3 o más localizaciones	Simultáneamente entre 14 áreas posibles (IFP, MCF, muñeca, codo, rodilla, tobillo, MTF. Derecha o izquierda).
3. Artritis de las manos	Al menos en un área (muñeca, IFP, MCF).
4. Artritis simétrica	Simultánea en ambos lados del cuerpo. Con la afección de IFP, MCF o MTF; no se exige una simetría absoluta.
5. Nódulos reumatoides	Nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas, en superficies extensoras, o en regiones yuxtaarticulares. Objetivados por un médico.
6. Factor reumatoide sérico	Con cualquier método que resulte positivo en menos del 5% de controles normales.
7. Alteraciones radiológicas	En radiografías PA de manos y muñecas. Deben incluir erosiones o descalcificaciones inequívocas en, o junto a, las articulaciones afectas.

IFP: interfalángicas proximales; MCF: metacarpofalángicas; MTF: metatarsfalángicas. *Se acepta el diagnóstico de artritis reumatoide si se cumplen 4 de estos 7 criterios. Los criterios 1-4 deben mantenerse al menos durante 6 semanas.

TABLA 17

CRITERIOS DIAGNOSTICOS DEL SINDROME DE SJOGREN*

CRITERIOS MAYORES

1. Síntomas de xerostomía y xeroftalmía
2. Tumefacción recurrente de glándula parótida

CRITERIOS MENORES

1. Prueba de Schirmer positiva (papel de filtro humedecido en menos de 5mm a los 5 minutos)
2. Exploración ocular con rosa de Bengala patológica
3. Biopsia de glándula salival accesoria patológica

*Debe cumplirse un criterio mayor y, al menos, uno de los criterios menores.

2. ESTUDIO COMPARATIVO DE ANTIGENOS DE DIFERENCIACION LEUCOCITARIA EN LINFOCITOS DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL) Y SANGRE PERIFERICA (LSP) DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA.

2.1. GRUPO DE ESTUDIO.

Se incluyeron en esta parte del trabajo los 15 pacientes del grupo 1 (AR + EPID), cuyas características han sido previamente descritas.

El grupo control está constituido por 16 voluntarios sanos, pertenecientes a los grupos 3 y 4, de los cuales 8 eran no fumadores (4 varones y 4 mujeres; edad media, 24.6 años; rango, 21-35 años) y 8 fumadores (6 varones y 2 mujeres; edad media 28.4 años; rango, 21-36 años). Los 8 controles restantes no fueron incluidos al haberseles realizado el BAL previamente a la optimización de la metodología de estudio del inmunofenotipo de las poblaciones linfocitarias del BAL y SP. Se incluyeron además 7 pacientes con AR sin neumopatía intersticial asociada, pertenecientes al grupo 2 (AR - EPID), todos no fumadores.

2.2. SEPARACION DE LAS CELULAS Y ANALISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA.

Se siguieron los pasos y metodología ya publicados por nuestro grupo (313).

Las células mononucleares periféricas de pacientes y controles se obtuvieron por centrifugación de la sangre venosa heparinizada en un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Suecia).

Las muestras del BAL fueron concentradas por centrifugación (10 minutos a 300 g), resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640, y centrifugadas en gradientes de Ficoll-Hypaque. Las células recuperadas se lavaron 2 veces y fueron sometidas a un choque

hipotónico para lisar los eritrocitos residuales, mediante resuspensión de los sedimentos celulares en agua destilada durante 15 segundos y dilución posterior en RPMI 1640 suplemento con 10% de suero de ternera fetal (medio completo).

Posteriormente, las células se incubaron con medio completo durante 1 hora a 37°C en placas de Petri. Las células no adheridas al plástico fueron recuperadas, contadas en cámara de Neubauer, distribuidas, y teñidas por inmunofluorescencia indirecta (IFI), tal como describieron previamente Aramburu et al. (314), con diferentes anticuerpos monoclonales (AcM) (tabla 18), utilizando como segundo reactivo el fragmento F(ab')₂ de un antisuero de cabra anti-IgG de ratón (Dakopatts, Dinamarca), marcado con fluoresceína.

El análisis fenotípico de las diferentes subpoblaciones celulares se realizó en un citofluorímetro de flujo EPICS-C (Coulter Scientific. Harpenden, Gran Bretaña). La población linfoide se seleccionó estableciendo una ventana en función de los parámetros de dispersión frontal de la luz (forward light scatter) (FLS) y dispersión a 90° (90° LS), analizados en las muestras de linfocitos de sangre periférica. En todos los casos, un AcM específico para CD45 (antígeno común leucocitario) marcó más del 95% de las células seleccionadas. Al menos 2 x 10³ células fueron analizadas para cada marcador y las proporciones de células positivas se calcularon sustrayendo el fondo de la fluorescencia de los controles negativos, que fueron incubados con el sobrenadante de mieloma P3X63. Se calculó para algunos marcadores la intensidad de fluorescencia media (MFI) en escala lineal, expresada en unidades arbitrarias, y se analizaron las variaciones de la MFI en las muestras del BAL y LSP del mismo sujeto.

TABLA 18

ANTICUERPOS MONOCLONALES*

AcM	Especificidad	Referencia	Distribución celular
D3/9	CD45	Pulido et al (315)	Leucocitos
SpVT3b	CD3	Spits et al (316)	Células T maduras
HP 2/6	CD4	Carrera et al (317)	Subpoblación celular T, monocitos
B 9.4	CD8	Malissen et al (318)	Subpoblaciones celulares T y NK
Bu/12	CD19	Ling et al (319)	Células B
MAR 108	CD25	López-Botet et al (320)	Linfocitos activados y monocitos
TS1/2	HLA-DR	Sánchez-Madrid et al (283)	Células B, monocitos, células T activadas
FG1/6	CD71	Sánchez-Madrid et al (283)	Células activadas
FG1/10	4F2	Sánchez-Madrid et al (283)	Monocitos, linfocitos activados
TS2/7	CD49a	Hemler et al (321)	Linfocitos activados
TP1/55	CD69	Cebrián et al (284)	Células activadas T, B y NK
Bear 1	CD11b	Keizer et al (322)	Células NK, monocitos, subpoblación T minor
B73.1	CD16	Perussia et al (323)	Células NK, monocitos, subpoblación T minor
Leu 19	CD56	BD (*)	Células NK, subpoblación celular T minor
HNK1	CD57	Abo y Balch (324)	Células NK, subpoblación celular T minor

* La tabla refleja sólo la distribución en leucocitos.

(*) Distribuido comercialmente por Becton Dickinson, Mountain View, Cal.

3. ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE TNF- α E IL-6 POR LOS MACROFAGOS ALVEOLARES DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA Y CONTROLES SANOS.

3.1. GRUPO DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo entre Febrero de 1991 y Diciembre de 1992 e incluyó a 8 pacientes del grupo 1 (AR + EPID) (6 mujeres y 2 varones; 7 no fumadores y 1 ex-fumador; edad media, 59.3 años) y controles sanos fumadores (F) (n = 6) y no fumadores (NF) (N = 6).

Los controles NF (4 mujeres y 2 varones) pertenecen al grupo 3 y su media de edad es de 25.1 años (rango, 21-35).

Los controles F (4 varones y 2 mujeres) forman parte del grupo 4, siendo su edad media de 29.1 años (rango, 22-36).

3.2. METODOLOGIA.

- 1.- BAL, según técnica previamente descrita.
- 2.- Concentración celular mediante centrifugación (10 minutos a 300 g), resuspensión en RPMI-1640, y centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque.
- 3.- Adherencia al plástico de 10^6 células viables/pocillo en 1 ml de medio completo (RPMI 1640 + 10% en suero de ternera fetal), durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂.
- 4.- Recogida del sobrenadante y comprobación de la homogeneidad de la adherencia.
- 5.- Incubación por duplicado con medio completo, en presencia y ausencia de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (100 ng/ml) durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.
- 6.- Recogida del sobrenadante a las 24 horas, centrifugación y congelación a -80°C.
- 7.- Detección de TNF- α e IL-6 por ELISA.

3.3. ENSAYO DE TNF- α .

El TNF- α se analizó por una técnica de ELISA puesta a punto en el laboratorio de Inmunología, utilizando dos AcM específicos (9/17 y 10/18) suministrados por Laboratorios Andrómaco, S.A.

A continuación se describe el desarrollo de la técnica.

El AcM 9/17 (20 $\mu\text{g/ml}$) diluido en PBS (phosphate-buffered saline solution) se adsorbe en placas de 96 micropocillos de fondo plano (Costar) (50 $\mu\text{l/pocillo}$), incubando a 4°C durante 12-18 horas. Se lava (3x) con PBS y se incuba 1 hora a 37°C con leche en polvo desnatada diluida al 1% en PBS. Después de tres lavados con PBS y leche en polvo al 0.05%, se incuban por duplicado durante 1 hora a 37°C cada una de las muestras (50 $\mu\text{l/pocillo}$) y las diluciones seriadas de una preparación de TNF recombinante purificado como patrón, dejando varios pocillos como control negativo (blanco).

Las placas se lavan (3x) con 200 $\mu\text{l/pocillo}$ de PBS y Tween-20 (Sigma) al 0.05% (V/V). Se incuba 1 hora a temperatura ambiente con el AcM 10/18, previamente marcado con biotina (Pierce) (0.1 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{l/pocillo}$) y diluido en PBS-Tween.

Se lava (4x) con PBS-Tween y se incuba 1 hora con avidina marcada con peroxidasa (Pierce) (dilución 1/1000 en PBS-Tween). Tras lavar (5x) con PBS-Tween, se añaden 50 $\mu\text{l/pocillo}$ de una solución tampón citrato-fosfato (pH=5) suplementada con ortofenil diamina (OPD. Sigma) (0.4 mg/ml) y 4 μl de H₂O₂ (30 vol). Se incuba durante 20 minutos y se para la reacción con SO₄H₂ 2N (50 $\mu\text{l/pocillo}$).

La densidad óptica (DO) se lee (LP400. Diagnostics Pasteur) aplicando un filtro de 492 nm. La curva patrón se representa en función de la DO obtenida para cada una de las concentraciones conocidas de la dilución de TNF- α , y las concentraciones de cada muestra problema se estiman interpolando la DO correspondiente en la zona linear de la curva. El

límite inferior de sensibilidad de esta técnica es de 50 pg/ml. En aquellos casos en los que la elevada concentración no permitió una interpolación fiable, se procedió a repetir la determinación diluyendo la muestra (1/10).

3.4. ENSAYO PARA IL-6

La detección de IL-6 se realizó en colaboración con el Dr. Gijs Jochems, adscrito a la Unidad de Biología Molecular del Hospital de la Princesa, empleando la técnica de ELISA descrita por Jochems et al. (325). Se resume a continuación el protocolo aplicado, resaltándose las diferencias con el ensayo anteriormente descrito para el TNF- α .

Las placas de ELISA se trataron adsorbiendo el AcM anti IL-6 (AcM 16) a una concentración de 1 μ g/ml en PBS. La solución de lavado utilizada fue PBS-Tween 0.02%. La saturación se realizó incubando con PBS-Tween suplementado con gelatina al 0.2% (PTG) y añadiendo las muestras (100 μ l/pocillo) o las diluciones de la IL-6 recombinante, durante 12 horas a 4°C.

Tras lavar (5x) con PBS-Tween se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal anti-IL-6 marcado con biotina y diluido en PTG. Después de lavar (5x) se incubó durante 30 minutos con estreptavidina marcada con peroxidasa (Dakopatts) diluida al 1/1000 con PTG. Para amplificar, se incubó sucesivamente con una solución de biotina-tiramina (Sigma) en tampón fosfato 50mM (pH=8) y con estreptavidina-peroxidasa (1/1000), intercalando los correspondientes lavados (5x).

Finalmente, se añadió la solución sustrato preparada en tampón acetato sódico 0.11M (pH = 5,5), 0.1 mg/ml de TMB (Merck) y H₂O₂ al 3%, parando la reacción con SO₄H₂ 2N y leyendo a 450 nm (LP400. Diagnostics Pasteur).

4. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis de las características clínicas y datos complementarios de los pacientes con AR (grupos 1 y 2) se realizó mediante el cálculo de chi cuadrado (X^2) con corrección de Yates (variables cualitativas) y con el test no paramétrico de Mann-Whitney (variables cuantitativas), considerándose no significativo cualquier valor de p superior a 0.05.

La celularidad, porcentaje de líquido recuperado y recuento diferencial celular del BAL en los cinco grupos de estudio, se compararon entre todos ellos mediante el test de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni, previo análisis global por ANOVA. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p corregido < 0.05 .

Los datos del estudio de las poblaciones y subpoblaciones linfoides en AR y controles se presentan en tablas que expresan el porcentaje de células positivas ($\bar{X} \pm SD$) para cada marcador estudiado, tanto en BAL como en LSP. El análisis estadístico incluyó el test de Wilcoxon en las comparaciones LSP/BAL y el test de Mann-Whitney cuando se compararon LSP/LSP y BAL/BAL.

La producción de TNF- α e IL-6 por los macrófagos alveolares de pacientes con AR y controles sanos F y NF se llevó a cabo, previo análisis global entre los datos de los tres grupos por ANOVA que justificó comparaciones múltiples, mediante el test de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni. Un valor de p corregido < 0.05 fue considerado significativo.

RESULTADOS

DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES.

Según la presencia o ausencia de anormalidades en la RT PA y L (y/o HRTAC) compatibles con patología intersticial y/o un patrón restrictivo en los tests de función pulmonar, los 37 pacientes con AR fueron divididos en dos grupos. El grupo 1 está constituido por 15 enfermos con AR y EPID asociada, y el grupo 2 por 22 pacientes con AR sin evidencia clínica de enfermedad pulmonar intersticial, en base a los criterios previamente definidos.

Las características clínicas de ambos grupos se reflejan en la tabla 19. No hubo diferencias en cuanto a la edad, hábito tabáquico y tiempo de evolución de la enfermedad. El 46.6 % de los pacientes del grupo 1 eran varones, frente a un 22.7% en el grupo 2, sin poder demostrarse una influencia del sexo en la categorización de los mismos ($p = 0.11$).

El 86.6 % de los enfermos del grupo 1 presentaban disnea de esfuerzo, mientras que el 66.6% referían tos no productiva y un 13.3% dolor torácico. La exploración física reveló acropaquias en 6 de los 15 enfermos de este grupo, auscultándose crepitantes de predominio en bases en el 73.3%. La presencia de nódulos subcutáneos o síndrome de Sjögren secundario no se correlacionó con la existencia o no de EPID asociada a AR ($p = 0.56$ y $p = 0.83$, respectivamente).

Si bien todos los pacientes estaban siendo tratados con distintos esquemas terapéuticos que incluían la utilización de antiinflamatorios no esteroideos, sales de oro, penicilamina, corticoides y/o inmunosupresores (tabla 20), no se observaron diferencias en cuanto al tratamiento previo entre los grupos. Desde la puesta en marcha del protocolo en 1.988, hemos podido observar 7 enfermos con AR y patología pulmonar inducida por fármacos, siguiendo los criterios propuestos por Hakala (68). De los 7 pacientes, 4 habían sido tratados con oro,

2 con penicilamina (uno de los cuales fue diagnosticado de BOOP en el estudio histológico del pulmón) y 1 con metotrexate. Estos 7 casos fueron excluidos del presente estudio.

DATOS COMPLEMENTARIOS.

La valoración de los resultados de diferentes parámetros analíticos, técnicas de imagen y datos de función pulmonar en los dos grupos de AR, se muestran en la tabla 21.

La existencia de EPID asociada se correlacionó con la presencia de títulos más altos de FR ($p = 0.00039$) y de una VSG más elevada ($p = 0.04$). No hubo diferencias significativas en cuanto a la positividad de los ANA ni en el resto de las determinaciones realizadas en sangre periférica.

Sólo en 6 de los 15 enfermos del grupo 1 (40%) la RT PA y L mostró cambios compatibles con neumopatía intersticial, aunque fue normal en todos los pacientes del grupo 2 ($p = 0.005$). Ello supone que la proporción de enfermos con AR y RT normal que presentan EPID objetivada por otros medios (pruebas funcionales respiratorias y/o HRTAC) es de 9/31 (29%) en nuestra serie. Por el contrario, la HRTAC fue significativamente más sensible que la RT, mostrando cambios intersticiales bilaterales, de predominio en campos medios e inferiores en el 90% de los casos del grupo 1 en que se realizó. En el caso restante, la HRTAC torácica fue valorada como normal en un paciente con clara afectación clínica y funcional respiratoria.

La gammagrafía pulmonar con Ga 67 se realizó a 16 enfermos, existiendo captación patológica del radioisótopo en 11 (8 del grupo 1 y 3 del grupo 2). En estos 16 casos, no se pudo demostrar que la positividad del Ga67 discrimine sobre la presencia o no de EPID ($p=0.48$), aunque puede ser útil, y quizás complementario a otras técnicas, en la detección de alveolitis subclínica (existía una captación aumentada en 3/6 pacientes del grupo 2).

El estudio de la función pulmonar demostró una reducción de la FVC, TLC y DLCO, así como un aumento del AaPO₂, estadísticamente significativos, en el grupo 1. Sólo 1 paciente de este grupo no cumplía criterios funcionales de EPID, siendo encuadrado en el mismo en base a los hallazgos radiológicos.

CELULARIDAD DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR.

El análisis celular del líquido obtenido mediante BAL se realizó en todos los sujetos del grupo 1 (AR+EPID), grupo 2 (AR-EPID), grupo 3 (controles NF), grupo 4 (controles F) y grupo 5 (misceláneo), previamente definidos.

Al comparar el número de células $\times 10^4/\text{ml}$ en los cinco grupos, se observó una gran dispersión en los datos obtenidos. Los controles NF presentaban una menor celularidad ($22.9 \pm 7.1 \times 10^4/\text{ml}$) que era estadísticamente significativa en relación a los grupos 1, 2 y 4. En el grupo 1 se evidenció una tendencia a una mayor concentración celular ($44.9 \pm 13.6 \times 10^4/\text{ml}$) que alcanzó significación estadística al compararla con la de los grupos 3 y 5 (p corregida < 0.05), pero no al hacerlo con los pacientes del grupo 2 y los controles fumadores.

El porcentaje de líquido obtenido y el recuento porcentual de las diferentes poblaciones celulares obtenidas en los distintos grupos se detallan en la tabla 22.

La proporción del fluido recuperado en el grupo 1 fue estadísticamente menor que en los otros grupos. También se obtuvo un volumen porcentual menor en el grupo 2 en relación al grupo control no fumador. Los pacientes con AR con y sin EPID asociada presentaron un menor recuento porcentual de macrófagos, en comparación con las poblaciones control y grupo misceláneo. De forma destacable, los enfermos del grupo 2 (AR-EPID) mostraron un porcentaje de linfocitos (18.6 ± 8.3) significativamente mayor que el del resto de los grupos estudiados. Dieciseis de los 22 pacientes del grupo 2 (72.7%) presentaron linfocitosis ($>$

12%) en el análisis celular del BAL. En los controles NF se evidenció una mayor proporción de linfocitos (9.2 ± 4.0) que en los sujetos sanos F (2.5 ± 1.2). Por último, es de destacar que los pacientes con AR y EPID asociada (grupo 1) mostraron en el recuento celular un porcentaje de neutrófilos significativamente elevado (9.9 ± 5.2) en comparación con el resto de los grupos. Diez de los 15 pacientes del grupo 1 (66.6%) presentaron neutrofilia (>5%) en el BAL, asociada en 4 casos a linfocitosis (>12%).

SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LAVADO BRONCOALVEOLAR Y SANGRE PERIFERICA.

El estudio fenotípico de las poblaciones linfoides del BAL y SP mediante AcM se llevó a cabo en los 15 pacientes con AR+EPID (grupo 1) y 16 controles sanos (8F y 8NF), cuyas características ya han sido señaladas.

El análisis comparativo de los resultados obtenidos se detalla en las tablas 23,24 y 25.

No se observaron diferencias entre las proporciones de linfocitos T y B en las muestras del BAL y SP, tanto del grupo AR como del grupo control (tabla 23). Para cada par de muestras, se analizó la MFI de la expresión de CD3, y se calculó la relación $CD3 \text{ MFI-LSP}/CD3 \text{ MFI-BAL}$, que en todos los casos fue > 1 , revelando que la densidad de la expresión del complejo receptor CD3/LT era menor en los LT del BAL. La expresión de los antígenos asociados a células NK (CD16, CD56, CD57 y CD11b) fue significativamente mayor en las muestras de SP, excepto el porcentaje de células CD57 (+) de los pacientes con AR que fue similar en LSP y BAL (tabla 24). Es destacable que la expresión de estos marcadores asociados a NK estaba significativamente elevada en LSP del grupo AR en relación a controles, hecho que también se observó en el BAL para CD57 (tabla 24).

En lo que se refiere a la expresión de los marcadores de activación estudiados (tabla

25), las proporciones de linfocitos CD25 (+) y CD71 (+) fueron bajas tanto en el BAL como en SP, aunque la expresión de CD71 fue mayor en el BAL de controles y AR. El porcentaje de células HLA-DR (+) estaba significativamente elevado en el BAL del grupo AR en relación a SP, hecho que no fue observado en controles. De la misma manera, el número de células VLA-1 (+) y CD69 (+) fue claramente mayor en las muestras del BAL de AR y controles en comparación con SP. La expresión del antígeno 4F2 también fue mayor en el BAL, aunque en el grupo AR no alcanzó significación estadística; la MFI de los linfocitos 4F2(+) fue también más alta en el BAL que en SP. Cuando se comparó la expresión de los antígenos de activación (CD25, CD71, CD69, 4F2, CD49a y HLA-DR) entre controles sanos y pacientes con AR, observamos proporciones significativamente mayores de todos estos marcadores (con la excepción de CD25) en los pacientes con AR, tanto en BAL como en LSP (tabla 25). La expresión comparativa de algunos de estos marcadores de activación (CD69, VLA-1 y HLA-DR) fue especialmente marcada en las muestras del BAL del grupo AR.

Estos resultados nos llamaron la atención, lo que nos obligó a hacer un análisis crítico de las posibles variables que podían influir en los mismos. Se consideró en primer lugar el factor edad, ya que la edad media del grupo AR era de 62.1 años y la de los controles oscilaba entre los 21 y 36 años. Para valorar la posible influencia de la diferencia de edad, las muestras del BAL del grupo misceláneo (n=8) (edad media, 58.1 años) fueron analizadas para ciertos marcadores (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD71, CD69, 4F2, VLA-1 y HLA-DR), confirmándose la existencia de un porcentaje de células positivas significativamente mayor en el grupo AR en cuanto a la expresión de CD69, VLA-1 y HLA-DR ($p < 0.01$), así como de 4F2 ($p < 0.05$), en relación al grupo misceláneo. Ello nos permitió descartar que los resultados obtenidos en el BAL del grupo AR estuviesen condicionados por la diferencia de edad en relación a los controles.

La segunda variable que se analizó, y que se consideró a "priori" la más importante, fue la posible influencia del hábito tabáquico. En efecto, mientras que en el grupo de enfermos con AR+EPID (n=15) 9 eran NF, 2F y 4 ex-fumadores, en el grupo control (n=16) 8 eran F y 8 NF. Ello nos condujo a comparar las muestras del BAL y SP de los controles F (n=8) y NF (n=8). Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 26,27 y 28. Los controles F mostraron proporciones más altas de células CD8(+) y un número menor de linfocitos CD4(+) en las muestras del BAL, en comparación con LSP, lo que conllevó una reducción significativa del cociente CD4(+)/CD8(+). La distribución de las subpoblaciones CD4(+) y CD8(+) estaba también significativamente alterada cuando las células del BAL de F se compararon con las de NF (tabla 26). Especialmente interesante nos pareció que, cuando se compararon los datos obtenidos en las células del BAL de F y NF, el grupo NF mostró porcentajes significativamente mayores de células CD69(+), 4F2(+) y HLA-DR(+). Estos datos confirmaron que, efectivamente, el hábito tabáquico influía de forma significativa en la expresión de ciertos marcadores. Como consecuencia de ello, se repitió el estudio estadístico comparando los resultados del grupo AR (n=15) con los controles NF (n=8). Este análisis evidenció que, al comparar las muestras del BAL del grupo AR + EPID con las de NF, se mantenía la significación estadística para los marcadores CD69 (82.4 ± 7.8 frente a 63.2 ± 14.0), VLA-1 (55.7 ± 14.2 frente a 32.2 ± 11.2) y HLA-DR (44.2 ± 18.4 frente a 20.2 ± 8.8), no existiendo diferencias significativas en cuanto a la expresión de 4F2 (82.1 ± 14.0 frente a 77.6 ± 10.1). Por el contrario, el análisis comparativo de la expresión de antígenos de activación celular en linfocitos del BAL de controles NF y pacientes NF con AR sin EPID asociada (n=7) no evidenció diferencias estadísticamente significativas.

PRODUCCION DE TNF- α E IL-6 POR LOS MACROFAGOS ALVEOLARES.

El estudio se realizó en 8 pacientes con AR + EPID (7 NF y 1 ex-fumador) y controles sanos NF (n=6) y F (n=6).

Se evaluó la producción espontánea e inducida por LPS (100 ng/ml) de TNF- α e IL-6 por los MA, mediante las técnicas de ELISA anteriormente descritas.

Los resultados obtenidos se reflejan en las tablas 29 y 30.

Tanto la liberación espontánea como la inducida de TNF- α por los MA del grupo AR estaba significativamente incrementada en relación a controles F y NF (p corregida < 0.01) (tabla 29). Al comparar los datos de controles sanos F y NF se observó una clara tendencia a una mayor producción de TNF- α en las muestras incubadas con LPS en el grupo NF (41.9 ± 10.9 ng/ml), aunque no alcanzó significación estadística en relación a F (23.0 ± 6.8 ng/ml), probablemente por el número limitado de casos analizados.

Los MA estimulados con LPS de los pacientes con AR + EPID liberaron también cantidades incrementadas de IL-6 en relación a controles F ($p < 0.01$) y NF ($p < 0.05$). Es reseñable, por último, que tanto la producción espontánea como la inducida de IL-6, estaba significativamente reducida en el grupo F, no sólo al comparar las muestras con las del grupo AR ($p < 0.01$), sino también al hacerlo con las de sujetos sanos NF ($p < 0.05$) (tabla 30).

TABLA 19

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES CON ARTRITIS
REUMATOIDE (AR)

	Grupo 1 (AR+EPID) (n = 15)	Grupo 2 (AR-EPID) (n = 22)
Edad (años) (\bar{X} , rango)	62 (48-75)	57 (36-75)
Sexo	8H, 7V	17H, 5V
No fumador (%)	9 (60%)	15 (68.2%)
Fumador (%)	2 (13.3 %)	3 (13.6%)
Ex-fumador (%)	4 (26.6%)	4 (18.2%)
Duración de la AR (años) (\bar{X} , rango)	8.7 (0-20)	9.1 (1-26)
Tos seca (%)	10 (66.6%) (*)	2 (9%)
Disnea de esfuerzo (%)	13 (86.6%) (*)	3 (13.6%)
Crepitantes secos (%)	11 (73.3%) (*)	1 (4.5%)
Acropaquias (%)	6 (40%) (*)	0
Nódulos subcutáneos (%)	7 (46.6%)	7 (31.8%)
Sd. de Sjögren asociado (%)	4 (26.6%)	4 (18.2%)

(*) $p < 0.01$. Test de chi cuadrado con corrección de Yates.

TABLA 20

TRATAMIENTO QUE RECIBIAN LOS PACIENTES CON AR

	Grupo 1 (AR+EPID) (n = 15)	Grupo 2 (AR-EPID) (n = 22)
Sales de oro	5/15	9/22
Penicilamina	1/15	3/22
Esteroides	4/15	3/22
Sales de oro + esteroides	2/15	2/22
Metotrexate	1/15	----
Metotrexate + esteroides	1/15	1/22
Azatioprina	1/15	2/22
Azatioprina + esteroides	1/15	1/22
Ciclofosfamida	1/15	1/22
Ciclofosfamida + esteroides	----	1/22
AINES	7/15	10/22

No significación estadística entre los dos grupos para ninguna de la modalidades terapéuticas.

TABLA 21

DATOS COMPLEMENTARIOS DE LOS ENFERMOS CON AR

	Grupo 1 (AR+EPID) (n = 15)	Grupo 2 (AR-EPID) (n = 22)
Hb (g/dl) ($\bar{X} \pm SD$)	12.6 \pm 2.1	12.7 \pm 2.3
VSG (mm/h) ($\bar{X} \pm SD$)	41.6 \pm 25.5 (*)	24.7 \pm 15.3
FR > 1/20 (n,%)	12 (80%)	15 (68.2%)
Título de FR ($\bar{X} \pm SD$)	1/250 \pm 1/374 (#)	1/22 \pm 1/24
ANA > 1/40 (n,%)	4 (26.6%)	9 (40.9%)
RT compatible con EPID (n,%)	6 (40%) (#)	0
HRTAC compatible con EPID (n,%)	9/10 (90%) (#)	0/10
Ga67 patológico (n,%)	8/10 (80%)	3/6 (50%)
FVC (% del valor teórico) ($\bar{X} \pm SD$)	67.1 \pm 10.9 (*)	101.3 \pm 8.8
TLC (% del valor teórico) ($\bar{X} \pm SD$)	75.3 \pm 9.1 (*)	99.1 \pm 5.3
DLCO (% del valor teórico) ($\bar{X} \pm SD$)	61.8 \pm 8.2 (#)	105.4 \pm 6.7

Análisis estadístico: Las variables cualitativas (presencia o no de una condición) se compararon entre grupos mediante el test de chi cuadrado con corrección de Yates.

Variables cuantitativas: Mann Whitney U test.

(*) p < 0.05

(#) p < 0.01

TABLA 22

ANÁLISIS DE LA CELULARIDAD DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL) EN PACIENTES CON AR Y CONTROLES

	Grupo 1 (AR+EPID) (n = 15)	Grupo 2 (AR-EPID) (n = 22)	Grupo 3 (Controles NF) (n = 12)	Grupo 4 (Controles F) (n = 12)	Grupo 5 (Misceláneo) (n = 8)
Líquido recuperado (%)	58.4±7.8(*) (46 - 76)	70.5±7.9(**) (50 - 88)	81.7±5.8 (74 - 91)	74.3±7.8 (63 - 90)	68.8±8.3 (51 - 83)
Macrófagos (%)	81.1±8.7(†) (64 - 95)	79.3±8.6(†) (59 - 89)	90.0±4.6 (80 - 98)	96.2±1.5 (93 - 98)	92.4±3.9 (86 - 97)
Linfocitos (%)	8.9±6.7 (0 - 23)	18.6±8.3(††) (6 - 40)	9.2±4.0(†††) (2 - 16)	2.5±1.2 (0 - 5)	6.3±3.1 (0 - 12)
Neutrófilos (%)	9.9 ± 5.2 (#) (0 - 21)	2.0±1.8 (0 - 5)	0.7±0.9 (0 - 3)	1.3±1.2 (0 - 5)	1.2±0.8 (0 - 5)

Los datos se expresan como $\bar{X} \pm SD$. Valores límites entre paréntesis.

Nivel de significación: valor de p corregido < 0.05 (Mann - Whitney U test con corrección de Bonferroni).

(*) significativo en relación a los grupos 2, 3 y 4.

(**) significativo en relación al grupo 3.

(†) significativo en relación a los grupos 3, 4 y 5.

(††) significativo en relación a los grupos 1,3,4 y 5.

(†††) significativo en relación al grupo 4.

(#) significativo en relación a los grupos 2,3,4 y 5.

TABLA 23

EXPRESION DE ANTIGENOS DE DIFERENCIACION LINFOCITARIA

Porcentaje de células positivas ($\bar{X} \pm SD$)

	CD19		CD3		CD4		CD8	
	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL
AR + EPID (n = 15)	6.7 ± 4.1	4.0 ± 4.2	69.2 ± 8.8	73.2 ± 8.2	43.2 ± 12.8	44.9 ± 21.4	32.8 ± 11.8	43.4 ± 17.6
Controles (n = 16)	5.3 ± 2.9	5.0 ± 4.8	71.3 ± 6.3	69.3 ± 10.3	41.3 ± 4.9	40.6 ± 14.6	28.4 ± 6.9	32.7 ± 9.5

Análisis estadístico: Test de Wilcoxon para LSP/BAL y Mann-Whitney U test cuando se comparan LSP/LSP y BAL/BAL.

TABLA 24

EXPRESION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE ASOCIADOS A CELULAS NK EN LINFOCITOS DEL BAL Y SANGRE PERIFERICA

Porcentaje de células positivas ($\bar{X} \pm SD$)

	CD16		CD56		CD57		CD11b	
	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL
AR + EPID (n = 15)	29.0 ± 12.2 (**)	5.3 ± 4.5	28.3 ± 11.9 (**)	11.7 ± 8.6	33.6 ± 14.4 (**)	28.3 ± 12.9 (**)	47.6 ± 14.0 (**)	16.8 ± 9.7 (*)
Controles (n = 16)	17.5 ± 6.9 (**)	4.8 ± 5.0	19.9 ± 6.7 (**)	8.0 ± 4.1	17.9 ± 9.6 (**)	10.7 ± 6.4 (**)	29.2 ± 9.4 (**)	8.2 ± 5.6 (**)

Análisis estadístico: LSP/BAL (test de Wilcoxon)

LSP/LSP y BAL/BAL (Mann - Whitney U test)

(**) P < 0.01

(*) p < 0.05

TABLA 25

EXPRESION DE ANTIGENOS DE ACTIVACION EN LINFOCITOS DEL BAL Y SANGRE PERIFERICA

Porcentaje de células positivas ($\bar{X} \pm SD$)

	CD25		CD71		CD69		4F2		CD49a		HLA-DR	
	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL
AR + EPID (n = 15)	15.0 ± 10.8	15.0 ± 9.9	3.0 ± 2.1 ^(**)	10.0 ± 5.6	11.0 ± 6.3 ^(**)	82.4 ± 7.8	71.6 ± 25.4	82.1 ± 14.0	3.6 ± 1.9	55.7 ± 14.2 ^(**)	22.6 ± 10.7	44.2 ± 18.4 ^(**)
Controles (n = 16)	7.5 ± 5.2	9.6 ± 3.9	0.6 ± 0.6 ^(**)	6.0 ± 2.8	5.0 ± 4.6 ^(**)	53.9 ± 16.2	45.1 ± 21.7	67.3 ± 14.0 ^(**)	2.1 ± 2.8	29.3 ± 11.1 ^(**)	14.2 ± 8.6	15.3 ± 8.4 ^(**)

- Análisis estadístico: LSP/BAL (test de Wilcoxon)

LSP/LSP y BAL/BAL (Mann-Whitney U test)

(**) P < 0.01

(*) P < 0.05

TABLA 26

EXPRESION DE ANTIGENOS DE DIFERENCIACION LEUCOCITARIA EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) Y LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL) DE CONTROLES SANOS

Porcentaje de células positivas ($\bar{X} \pm SD$)

	CD19		CD3		CD4		CD8		CD4/CD8	
	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL
FUMADORES (n = 8)	5.2 ± 2.6	4.6 ± 3.7	71.0 ± 6.0	67.6 ± 8.5	42.6 ± 5.8	31.3 ± 7.7	27.0 ± 2.9	39.2 ± 8.0	1.6 ± 0.3	0.9 ± 0.4
NO FUMADORES (n = 8)	5.3 ± 3.5	5.5 ± 6.2	71.6 ± 7.3	75.1 ± 9.7	40.1 ± 4.2	49.8 ± 15.3	29.8 ± 9.8	26.2 ± 6.8	1.6 ± 0.9	1.9 ± 1.0

- Análisis estadístico: test de Wilcoxon al comparar PBL/BAL y Mann-Whitney U test para PBL/PBL y BAL/BAL.

(**) p < 0.01

(*) p < 0.05

TABLA 27

EXPRESION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE ASOCIADOS A CELULAS NK EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) Y LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL) DE CONTROLES SANOS

Porcentaje de células positivas ($\bar{X} \pm SD$)

	CD16		CD56		CD57		CD11b	
	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL
FUMADORES (n = 8)	18.2 ± 7.7 (**)	7.8 ± 5.9	19.5 ± 7.9 (*)	9.5 ± 5.1	17.5 ± 10.0	11.1 ± 1.8	27.3 ± 7.7 (**)	10.8 ± 6.5
NO FUMADORES (n = 8)	16.7 ± 6.9 (**)	1.7 ± 1.3 (*)	20.3 ± 6.4 (**)	6.5 ± 2.5	18.3 ± 10.4 (**)	10.3 ± 9.5	31.0 ± 11.6 (**)	5.6 ± 3.6

(**) p < 0.01

(*) p < 0.05

TABLA 28

EXPRESION DE ANTIGENOS DE ACTIVACION CELULAR EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP)
Y LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL) DE CONTROLES SANOS

Porcentaje de células positivas ($\bar{X} \pm SD$)

	CD69		4F2		CD25		CD71		DR		CD49a	
	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL	LSP	BAL
FUMADORES (n = 8)	4.0 ± 4.6 (**)	44.6 ± 14.5 (*)	36.1 ± 20.1 (*)	57.1 ± 10.3 (*)	5.1 ± 3.5 (*)	11.2 ± 4.3 (**)	0.6 ± 0.7 (**)	6.0 ± 4.1 (**)	11.1 ± 2.7 (**)	10.3 ± 5.4 (**)	1.1 ± 0.9 (**)	26.3 ± 11.7 (**)
NO FUMADORES (n = 8)	6.1 ± 5.1 (**)	63.2 ± 14.0 (*)	54.1 ± 22.1 (*)	77.6 ± 10.1 (**)	9.8 ± 6.2 (**)	8.0 ± 3.2 (**)	0.6 ± 0.7 (**)	6.0 ± 1.3 (**)	17.3 ± 11.9 (**)	20.2 ± 8.8 (**)	3.2 ± 3.9 (**)	32.2 ± 11.2 (**)

(**) p < 0.01

(*) p < 0.05

TABLA 29

PRODUCCION DE TNF- α POR LOS MACROFAGOS ALVEOLARES

TNF- α (ng/ml)

	Grupo 1 (AR+EPID) (n = 8)	Grupo 2 (Controles NF) (n = 6)	Grupo 3 (Controles F) (n = 6)
MA			
No estimulados	2.6 \pm 1.7 (*) (0.6 - 5.2)	0.3 \pm 0.1 (0.1 - 0.6)	0.2 \pm 0.1 (0.1 - 0.5)
+ LPS	76.2 \pm 17.4 (*) (49.4 - 98.7)	41.9 \pm 10.9 (28.0 - 60.1)	23.0 \pm 6.8 (15.5 - 34.6)

Los datos se expresan como $\bar{X} \pm$ SD. Valores límites entre paréntesis.

Nivel de significación: Valor de p corregido < 0.05 (Mann - Whitney U test con corrección de Bonferroni)

(*) p < 0.01 en relación a los grupos 2 y 3.

TABLA 30

PRODUCCION DE IL-6 POR LOS MACROFAGOS ALVEOLARES

IL-6 (ng/ml)

	Grupo 1 (AR+EPID) (n = 8)	Grupo 2 (Controles NF) (n = 6)	Grupo 3 (Controles F) (n = 6)
MA			
No estimulados	14.0 ± 4.6 (6.7 - 19.1)	11.1 ± 3.1 (6.8 - 14.5)	2.8 ± 1.5 (*) (**) (1.1 - 5.1)
+ LPS	120.8 ± 18.3 (i) (ii) (102.5 - 148.0)	93.3 ± 11.5 (#) (79.5 - 107.5)	53.3 ± 21.6 (31.2 - 80.0)

Los datos se expresan como $\bar{X} \pm SD$. Valores límites entre paréntesis.

Nivel de significación: valor de p corregido < 0.05 (Mann-Whitney U test con corrección de Bonferroni)

(*) p < 0.01 en relación al grupo 1.

(**) p < 0.05 en relación al grupo 2.

(i) p < 0.01 en relación al grupo 3.

(ii) p < 0.05 en relación al grupo 2.

(#) p < 0.05 entre los grupos 2 y 3.

DISCUSSION

La asociación de enfermedad pulmonar intersticial (EPID) y artritis reumatoide (AR) fue descrita por primera vez por Ellman y Ball en 1.948 (11). Si bien la incidencia de esta manifestación extraarticular de la AR varía ampliamente dependiendo de los criterios diagnósticos utilizados y de la población seleccionada para el estudio, se ha señalado que muchos, quizás una mayoría, de los pacientes con AR presentan alteraciones del intersticio pulmonar, clínicas o subclínicas (14-19, 27). La EPID manifestada clínicamente o detectable en la RT convencional, probablemente ocurre en menos del 20% de la población de AR (14,23-28). Sin embargo, utilizando parámetros sensibles de función pulmonar y muestras de biopsias pulmonares se ha establecido que 30-70% de los enfermos con AR tienen enfermedad intersticial subclínica (17, 19, 27).

A pesar del incremento de información sobre los acontecimientos celulares y bioquímicos que tienen lugar en el tejido sinovial reumatoide, la patogenia de la neumopatía intersticial en la AR sigue siendo escasamente conocida. Dentro de este contexto, el BAL, que ha jugado un papel relevante en la comprensión de los mecanismos patogénicos de diferentes enfermedades del intersticio pulmonar, no ha sido utilizado de forma generalizada en la AR. La finalidad de nuestro trabajo fue valorar la aportación del BAL al estudio de la enfermedad pulmonar intersticial, clínica y subclínica, asociada a AR.

En el grupo de pacientes estudiados (n=37), la presencia o no de EPID no se correlacionó con la edad y el tiempo de evolución de la enfermedad, ni se asoció con el sexo, hábito tabáquico, ni con la existencia de nódulos subcutáneos o síndrome de Sjögren secundario. La disnea, la auscultación de estertores crepitantes, la tos seca y la presencia de acropaquias fueron, por este orden, los datos clínicos más frecuentemente observados en el grupo AR + EPID. No existían diferencias entre los dos grupos de enfermos en cuanto al

tratamiento recibido, aunque el papel real de los fármacos en el desarrollo de EPID es difícilmente predecible, pues en muchas ocasiones la eventual toxicidad pulmonar secundaria a éstos no puede ser diferenciada de la afectación pulmonar por la propia enfermedad de base. Además, varios de los agentes antirreumáticos potencialmente fibrogenéticos son utilizados concomitante o secuencialmente en el tratamiento de la AR, lo que hace más difícil objetivar el agente causal.

El estudio analítico confirmó apreciaciones previas de otros autores (22), observándose la presencia de títulos más altos de FR y velocidad de sedimentación más elevada en los pacientes con AR + EPID, no habiendo diferencias en cuanto a la positividad de los ANA y otras determinaciones analíticas que se han relacionado con la actividad de la enfermedad articular. La RT convencional fue escasamente sensible en la detección o no de EPID. La HRTAC mejoró considerablemente esta sensibilidad, lo que parece confirmar el papel creciente de esta exploración en el estudio de las neumopatías difusas (75,78,326). En cuanto a la gammagrafía pulmonar con Ga67, mostró, en nuestra experiencia, un comportamiento irregular, no asociándose la existencia de captación patológica con la presencia o no de EPID, aunque puede ser útil, como técnica complementaria, en la detección precoz de alveolitis subclínica, tal como ha sido señalado (75,98-100) y sugieren nuestros propios datos.

La exploración funcional respiratoria constituye un pilar fundamental en el diagnóstico objetivo y seguimiento de estos enfermos. Alteraciones de la función pulmonar parecen existir en más del 40% de los enfermos con AR, en series no seleccionadas, y estos tests funcionales se consideran un indicador fiable de la presencia de alteraciones histopatológicas (27,88). Un hallazgo habitual es la reducción de la DLCO (27,92), siendo el patrón espirométrico más frecuente el de tipo restrictivo con FVC y TLC disminuidas debido a un aumento de la rigidez pulmonar (72). En relación con algunos aspectos anteriormente comentados, el papel

de ciertos fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la AR en las alteraciones funcionales pulmonares es difícil de establecer. En todo caso, las PFR no parecen útiles en la evaluación específica de la alveolitis en las neumopatías intersticiales (88).

El procedimiento más definitivo para valorar la inflamación en el intersticio pulmonar es, indudablemente, la BPA. Sin embargo, se hacen necesarios métodos no invasivos que estimen el grado de inflamación de forma fiable y repetitiva. La aplicación del BAL, posiblemente complementado con otras exploraciones como la gammagrafía con Ga67 y/o la HRTAC, ha despertado grandes esperanzas en función de su poder discriminativo en la caracterización del componente inflamatorio o alveolitis que precede al establecimiento de FP. En efecto, nuestros pacientes con AR sin EPID asociada en base a criterios radiológico-funcionales, presentaron en el BAL un porcentaje de linfocitos (18.6 ± 8.3) significativamente mayor que el grupo AR + EPID, controles y grupo misceláneo. Por el contrario, en los pacientes con AR + EPID el hallazgo fundamental en el análisis porcentual de la celularidad del BAL fue la presencia de neutrofilia ($9.9\% \pm 4.0$, en nuestra serie), asociándose esta neutrofilia a un mayor deterioro clínico-funcional respiratorio. Estos datos concuerdan con los de otros autores (14,16,63,184,219-223). De ellos se deduce que el BAL, no sólo puede definir patrones de alveolitis característicos en la AR, según la presencia o no de EPID, sino que también parece ser de utilidad en la detección de neumopatía intersticial subclínica.

Por otra parte, el análisis de los elementos celulares del BAL es una aproximación válida al estudio de ciertos aspectos de la respuesta inmune a nivel pulmonar (129,327-329). En comparación con los MA, los linfocitos constituyen habitualmente una pequeña proporción del total de células recuperadas mediante BAL y son mayoritariamente LT. A pesar de ello, su capacidad de reconocimiento antigénico y sus funciones inmunoregulatoras les confieren un papel central. La utilización de AcM específicos para antígenos de

diferenciación de superficie celular, en combinación con técnicas de citometría de flujo, nos permite explorar de forma útil y precisa el fenotipo de las células linfoides del BAL. Además, está bien establecido que la expresión de determinados antígenos de superficie refleja el estado de activación-diferenciación de los linfocitos, y algunas de estas estructuras han sido caracterizadas como receptores para ligandos bien definidos, implicados en funciones tróficas durante la activación celular T (330).

La mayoría de los estudios sobre los linfocitos del BAL se han limitado al análisis de las proporciones de las principales subpoblaciones celulares T CD4 (+) y CD8 (+), mientras que la expresión de marcadores de activación celular T ha sido evaluada sólo de forma ocasional y aparentemente con resultados contradictorios. Por una parte, se ha señalado que relativamente pocos linfocitos del BAL expresan niveles detectables de antígenos de activación como la cadena α (CD25) del receptor de IL-2, el receptor de transferrina (CD71) y el antígeno HLA-DR (331,332), dato que nosotros observamos también en los pacientes con AR + EPID para los 2 primeros marcadores pero no para HLA-DR (44.2% \pm 18.4 células positivas). Por otro lado, se ha destacado que una elevada proporción de los linfocitos del BAL expresan el antígeno VLA-1 (CD49a/CD29), miembro de la superfamilia de las integrinas que fue originalmente catalogado como antígeno de activación "tardía" en linfocitos T (333) y que es ampliamente expresado en la BAL de nuestros pacientes con AR. En base a la expresión diferencial de los antígenos de superficie CD45RA, CD29 y Leu9, se ha propuesto recientemente que una mayoría de los LT del BAL pueden representar células de memoria (334).

Entre los objetivos del presente trabajo se fijó el de evaluar comparativamente, en linfocitos del BAL y sangre periférica de sujetos sanos fumadores y no fumadores y pacientes con AR y EPID asociada, la presencia de diferentes marcadores de superficie que se sabe son

expresados en estadios definidos del proceso de activación celular T in vitro. Entre ellos, se incluyó el análisis de la molécula CD69, que es sintetizada "de novo" en LSP muy precozmente tras activación y que está presumiblemente implicada en la regulación de la función celular T (284,335,336).

Uno de los hallazgos más interesantes de nuestro estudio fue la clara influencia que el hecho de fumar ejercía sobre los resultados obtenidos. Para evaluar los efectos del hábito tabáquico en la expresión de los diferentes antígenos de diferenciación leucocitaria y los marcadores de activación estudiados, se analizó comparativamente el inmunofenotipo de los linfocitos del BAL y SP de jóvenes sanos fumadores y no fumadores. En cuanto a las diferencias fenotípicas entre los linfocitos del BAL y SP, nuestros resultados señalan que las proporciones de linfocitos T y B fueron similares, mientras que los LSP incluían un número significativamente mayor de células que expresan antígenos de superficie asociados a células NK, observación que concuerda con la de otros autores (337). Además, nuestros datos confirman trabajos previos que observan un incremento de la proporción de linfocitos del BAL VLA-1 (+), mientras que la expresión de los antígenos CD25, CD71 y HLA-DR fue escasamente detectable (331-333). Al menos dos interpretaciones diferentes pueden ser dadas para explicar la aparente expresión disociada de antígenos de activación "intermedios" (CD25, CD71) y "tardíos" (VLA-1) que nosotros también observamos en el BAL de controles y AR. Tal como se ha sugerido (334), la primera posibilidad es que la mayoría de los LT del BAL pueden ser células de "memoria" que tienen disminuida la expresión de las moléculas de superficie asociadas con una respuesta activa. De hecho, aplicando análisis de inmunofluorescencia de doble color, se ha establecido que la mayoría de los linfocitos CD4 (+) del BAL y del parénquima pulmonar muestran el fenotipo CD45RO (+) CD45RA(-), atribuido a los LT activados de memoria (338,339). Otra interpretación podría ser que

proporciones sustanciales de linfocitos del BAL estén experimentando realmente una activación metabólica, pero que la estimulación antigénica "in vivo" conduzca a la expresión de un número de moléculas funcionales de IL-2 y r-Tr que puede estar por debajo del límite inferior del umbral de detección de los ensayos de inmunofluorescencia. En relación con este argumento, Marathias et al. (339) observaron que los linfocitos pulmonares, comparados con LSP, muestran altas proporciones de células en las fases S/G2/M del ciclo celular, mientras que la detección de CD25 fue comparable en ambos tipos de muestras. En base a nuestros datos, esta última posibilidad puede ser indirectamente apoyada por la alta expresión de 4F2 y, en particular, de CD69 detectada en los linfocitos del BAL en comparación con LSP. Es de reseñar que una disociación similar entre la expresión de CD69 y CD25 ha sido previamente descrita en análisis inmunohistoquímicos de LT activados en lesiones inflamatorias de hepatitis vírica (340). El dímero de superficie 4F2, que se cree funciona como intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (341), se expresa débilmente sobre una fracción de LSP, incrementándose tras la estimulación linfocitaria T (342). Es destacable que CD69 es un Ag de superficie indetectable sobre la mayoría de los LSP, pero es rápidamente sintetizado "de novo" después de la activación linfocitaria (284,335,336). Si bien por el momento el papel fisiológico preciso de CD69 es desconocido, parece estar implicado en la regulación de la activación linfocitaria (335). La alta expresión de estas glicoproteínas de superficie en los linfocitos del BAL sugiere que una proporción importante de éstos puede estar experimentando una respuesta activa. Un argumento adicional que apoya esta posibilidad se deriva de la comparación entre la intensidad de la expresión de CD3 en linfocitos del BAL y SP. En todos los casos estudiados, la tinción fluorescente con el AcM anti CD3 fue más brillante en LSP. Recientemente, se ha observado un descenso en la densidad de superficie de la expresión del complejo receptor de LT en las células del BAL, en comparación con LSP

de pacientes con sarcoidosis (343), y este dato ha sido interpretado como indicativo de una estimulación antigénica reciente, que modula el receptor linfocitario T. Estudios prospectivos en diferentes situaciones patológicas deben discernir por análisis de inmunofluorescencia de doble color, la distribución de los marcadores de activación entre las subpoblaciones linfocitarias T CD4(+) y CD8(+). Datos preliminares de nuestro laboratorio indican que ambas subpoblaciones pueden expresar CD49a y CD69 en muestras de BAL.

En lo que respecta a la comparación entre las células del BAL de fumadores y no fumadores sanos, las proporciones de linfocitos T Y B y células NK fueron similares en ambos grupos. Es reseñable que, si bien se hallaron proporciones significativamente mayores de células CD16(+) en el BAL de fumadores, la expresión de los restantes marcadores asociados a células NK fue comparable en ambos grupos. El significado de la aparente reducción de células CD16(+) en no fumadores es incierto; este hallazgo requiere ser confirmado en estudios más extensos, considerando en particular que la expresión de ese receptor de superficie parece estar disminuida tras la activación celular (344). Confirmando trabajos previos (327,345), nuestros datos muestran en fumadores un cociente CD4(+)/CD8(+) significativamente reducido, que no se observó en LSP. El mecanismo que conduce a este desbalance de las subpoblaciones linfocitarias T CD4(+) y CD8(+) no ha sido aclarado. Es destacable que la expresión de los antígenos de activación 4F2 y CD69 estaba también reducida en los controles F en relación a NF. Este hallazgo puede tener varias interpretaciones. En primer lugar, un recambio alterado de los LT del compartimento broncoalveolar podría reducir el número de células que exhiben un fenotipo activado (346). Además, la respuesta "in vivo" a la estimulación antigénica puede estar parcialmente debilitada en los LT del BAL de fumadores, posibilidad que está avalada por trabajos previos que describen una respuesta antigénica deprimida "in vitro" en tales muestras (347). Los

mecanismos que justifican estos defectos, deben implicar un efecto indirecto de los componentes del humo del tabaco sobre el papel accesorio de los macrófagos alveolares. Además, entre otros defectos funcionales, se ha descrito en MA de fumadores una capacidad de presentación antigénica disminuida, hecho que ha sido revisado por varios investigadores (348,349). Finalmente, la proporción de linfocitos del BAL que expresan antígenos de activación en fumadores puede estar también influenciada a través de la producción de eicosanoides por los macrófagos pulmonares. De hecho, se sabe que la PGE₂ inhibe la producción de IL-2, la expresión de su receptor, y la respuesta proliferativa de los LT a la estimulación mitogénica (350). Apoyando este argumento, se ha mostrado que la proliferación "in vitro" de los LT del BAL está deprimida en relación a LSP y puede ser normalizada parcialmente, bien eliminando los macrófagos de las preparaciones celulares o añadiendo indometacina, que inhibe la vía de la ciclooxigenasa (349,351). Además, recientemente se han observado niveles incrementados de eicosanoides en el fluido del BAL de fumadores (352).

Estos datos sugieren que la inhalación del humo del cigarrillo podría mediar un efecto inmunomodulador sobre la respuesta "in vivo" a la estimulación antigénica dentro del pulmón. Es difícil definir hasta qué punto los defectos parciales detectados pueden contribuir a la mayor susceptibilidad a infecciones respiratorias en fumadores y al desarrollo a largo plazo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica y cáncer de pulmón. Se requieren estudios comparativos en sujetos normales de diferentes grupos etarios, en individuos expuestos a diferentes factores ambientales, y en pacientes con distintas condiciones patológicas, para poder precisar el valor clínico potencial de la monitorización de la expresión de antígenos de activación en las células del BAL.

Numerosas evidencias experimentales apuntan a la participación de las células T en la patogenia de la AR. Esencialmente, la mayoría de los trabajos se han centrado en el análisis del componente celular en el líquido sinovial y en el estudio del infiltrado celular en la membrana sinovial. Los LT del líquido sinovial muestran predominantemente el fenotipo CD4(+) CD45RO(+) (353) asignado a la subpoblación de LT de memoria o activados. Por otra parte, se ha apreciado un incremento en la expresión de antígenos HLA de clase II en las células T, así como de la integrina VLA-1, que constituye un receptor para colágeno y laminina, y que se considera en células T como un antígeno de activación tardía (354). Asimismo parece existir en estas células un incremento de la expresión de CD69 (355). También se ha descrito un ligero incremento de la expresión de otros antígenos de activación, como los receptores de transferrina y de IL-2 (356), aunque este hallazgo no ha sido confirmado por otros autores (357). Estos datos se han interpretado como el resultado de la activación "in situ" de los linfocitos T en respuesta a un estímulo no definido. En favor de esta posibilidad, se ha comprobado en algunos estudios que el repertorio de TcR (receptor de células T) expresado por las células T sinoviales en la AR es oligoclonal en comparación con las células T de sangre periférica del mismo individuo (357).

Nosotros detectamos un incremento significativo en la expresión de diferentes antígenos de activación linfocitaria, incluyendo CD71, CD69, CD49a (VLA-1) y HLA-DR al comparar las muestras del BAL con las de sangre periférica. También observamos en el BAL de controles sanos un aumento de CD71, CD69, 4F2 y CD49a, indicativo de la activación linfocitaria en un órgano en el que se produce permanentemente el contacto con antígenos exógenos. En una primera fase, este hecho dificultó la interpretación de los resultados obtenidos en los pacientes con AR. Sin embargo, cuando comparamos directamente la expresión de los marcadores de activación en el BAL entre pacientes y controles sanos

apreciamos diferencias significativas en las proporciones de células CD71(+), CD69(+), CD49a(+) y HLA-DR(+), que estaban incrementadas en los enfermos con AR. La significación estadística se mantuvo para la expresión diferente de CD69, CD49a y HLA-DR, incluso cuando se compararon los pacientes con AR (en su mayoría no fumadores) con la población de controles sin hábito tabáquico.

Así pues, nuestros datos sugieren que la situación en el pulmón de pacientes con AR y EPID parece parcialmente superponible a la observada en las lesiones articulares, apuntando una hipotética implicación de las células T en el desarrollo de la EPID asociada a la AR. El estudio del repertorio de TcR expresado por las subpoblaciones CD4 y CD8 del BAL podría contribuir a respaldar la hipótesis, como ya se mencionó para el estudio de las lesiones sinoviales.

Conviene destacar que en el análisis del fenotipo del componente linfoide en las AR apreciamos cierta heterogeneidad en la distribución de las subpoblaciones CD4 y CD8, estando el cociente CD4/CD8 invertido en algunos casos, al margen del hábito tabáquico. Nuestros datos coinciden con las observaciones de otros autores (14) sin que esté claro el posible significado patogénico en relación con el desarrollo de EPID. La misma incógnita puede plantearse en relación con el incremento observado en la expresión de CD57 en las células del BAL de las AR, respecto a los controles. Este marcador se encuentra en células NK y una subpoblación de linfocitos T. Dado que para el resto de marcadores asociados más específicamente a células NK (CD16 y CD56) no se encontraron diferencias significativas, se sugiere indirectamente que están aumentadas las células T CD57(+). El aumento de esta población se ha observado en otras situaciones patológicas, especialmente en sujetos sometidos a transplante de médula ósea, donde se ha relacionado con la incidencia de infección por citomegalovirus secundarias a la inmunosupresión, incluso sin manifestaciones

clínicas (358). Dado que muchos pacientes con AR y EPID están sometidos a tratamiento inmunosupresor cabe la posibilidad de que se trate de un fenómeno secundario, no relacionado directamente con la patogenia de la enfermedad. No disponemos de información sobre la prevalencia de la reactivación subclínica del CMV en AR sometidas a inmunosupresión. Por el mismo motivo, las diferencias observadas en la expresión de marcadores asociados a células NK en LSP entre el grupo AR y controles deben interpretarse con cautela, teniendo en cuenta además la diferencia de edad entre ambas poblaciones.

Durante los últimos años, numerosos investigadores han contribuido a definir el "patrón" de expresión de CQ en la membrana sinovial de la AR (359-363), demostrándose una importante elevación de los niveles de CQ secretadas primariamente por macrófagos como IL-1, TNF- α , IL-6 y GM-CSG. En contrapartida, sólo se detectan cantidades pequeñas de productos de secreción de células T, como la IL-2 y el IFN- γ , sin que esto excluya la posible implicación patogénica de estos linfocitos, como ya se discutió anteriormente. En base a la información acumulada, parece indiscutible que las CQ juegan un papel esencial en la patogenia de esta enfermedad. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la implicación de estos polipéptidos en el desarrollo de las manifestaciones pulmonares asociadas a AR.

A la hora de abordar el estudio de CQ en el BAL, nos planteamos las siguientes posibilidades teóricas (138):

- 1.- Cuantificación de CQ en el líquido recuperado.
- 2.- Estudio de las células por análisis directo, analizando el mensajero (RNAm) para una CQ dada.
- 3.- Estudio de las células en cultivo, midiendo directamente la proteína (CQ), tanto su producción espontánea como inducida (respuesta a estímulos).

Cada uno de estos métodos presenta ventajas e inconvenientes, proporcionando información complementaria. En base a los medios disponibles en nuestro laboratorio, abordamos el estudio de la producción, espontánea e inducida por LPS, de TNF- α e IL-6 por lo macrófagos obtenidos mediante BAL en sujetos con AR + EPID y controles sanos. El papel de estas dos CQ proinflamatorias en la patogenia de la AR ha sido resaldado, fundamentalmente en estudios realizados en la membrana sinovial reumatoidea. (292,294,302-304,307,308).

Como paso previo, a la hora de evaluar la liberación de CQ por los MA humanos, nos pareció necesario hacer una consideración especial sobre la posible influencia del hábito tabáquico. Se ha señalado, por ejemplo, que el hecho de fumar es un modulador que reduce la incidencia de enfermedades granulomatosas pulmonares (364,365) y suprime en gran parte las respuestas inmunes humorales (366). Como posibles mecanismos subyacentes se han implicado una respuesta proliferativa reducida de las células T pulmonares a mitógenos (367), una menor capacidad de los MA para producir y/o liberar IL-1 (368,369) y un balance alterado entre la proporción de células T CD4 y CD8 en el fluido del BAL (345). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la influencia que el humo del tabaco ejerce sobre la capacidad de los MA humanos de liberar TNF e IL6. Yamaguchi et al., en un trabajo publicado hace unos meses (370), sugieren la posible implicación del TNF- α en los mecanismos por lo cuales el fumar modula los fenómenos inmunes locales a nivel pulmonar. En este estudio confirman observaciones previas (371-373) que encuentran una liberación incrementada de TNF en pacientes con sarcoidosis pulmonar. Observan además que la capacidad de los MA de fumadores estimulados con LPS para liberar TNF- α está significativamente reducida tanto en sujetos sanos como en enfermos con sarcoidosis pulmonar, en relación a no fumadores (370).

Estudios previos demuestran que la liberación de IL-1 β por los MA estimulados in vitro está también reducida en fumadores (368,369). El TNF- α y la IL-1 son dos monoquinas no relacionadas estructuralmente, pero que comparten diferentes propiedades biológicas. Se ha demostrado también que el TNF induce la liberación de IL-1 por los MA en animales de experimentación (374), formando un circuito de amplificación implicado en la respuesta inmune. En este contexto, los procesos inflamatorios e inmunes en el pulmón de fumadores, pueden estar notablemente alterados por el déficit relativo de estas dos CQ. Dado que están implicadas no sólo en la respuesta inmune de hipersensibilidad, sino también en los mecanismos de defensa del huésped frente a agentes infecciosos y neoplasias (375,376), la liberación disminuida de estas CQ puede incrementar el riesgo de los fumadores de cigarrillos de desarrollar toda una variedad de trastornos pulmonares. No obstante, el mecanismo celular preciso de la regulación en la producción de CQ por el humo del tabaco, dista de ser conocido. La liberación de otras CQ producidas localmente puede también estar afectada por el hábito de fumar.

Nuestros resultados mostraron que, efectivamente, el tabaquismo influye en la producción local de ciertas CQ por los MA. Observamos una clara tendencia a una menor producción de TNF- α por los MA incubados con LPS de sujetos sanos F en relación a NF. En lo relativo a la IL-6, tanto la producción espontánea como la inducida de esta CQ, estaba significativamente reducida en las muestras del BAL de fumadores. Estos datos resaltan el marcado impacto del hábito tabáquico sobre la respuesta inmunitaria de las células del BAL, aspecto ya tratado anteriormente a propósito del estudio de la expresión de antígenos de activación. Para profundizar más en la cuestión debería abordarse el análisis de la expresión de receptores para la endotoxina en los MA y, eventualmente, estudiar las vías de transducción de señales. Este capítulo es particularmente complejo dado que, aunque el papel

de CD14 como receptor para LPS está bien establecido, hay indicios de la existencia de otras moléculas en macrófagos implicadas en la respuesta a la endotoxina (377). Por otra parte, las rutas metabólicas que preceden a la biosíntesis y secreción de TNF- α son sólo parcialmente conocidas.

Al analizar la producción de estas CQ en el grupo de pacientes con AR y EPID asociada, se demostró una secreción de TNF- α significativamente elevada en los cultivos de MA de los pacientes en relación a controles, tanto F como NF. Este incremento de la secreción de TNF- α se observó tanto basalmente como en presencia de un estímulo específico (LPS), sugiriendo una hiperreactividad del MA en los pacientes con AR y EPID asociada. Apoyando esta hipótesis se apreció también una secreción significativamente elevada de IL-6 en las muestras de AR respecto a los sujetos sanos F y NF. Ante estos resultados cabe preguntarse qué factores pueden determinar que incluso la respuesta al potente estímulo que supone la endotoxina tienda a ser mayor en los MA de los pacientes con AR + EPID. En diferentes sistemas experimentales se ha observado que otros estímulos, como el IFN- γ , potencian la secreción de TNF- α en respuesta al LPS (378); por otra parte, se ha descrito que los macrófagos aislados de lesiones granulomatosas en las que participan linfocitos T responden más intensamente al LPS que las células obtenidas de granulomas inespecíficos (379). Considerando estos datos, la interpretación más plausible es que los MA en las AR + EPID se encuentran pre-sensibilizados como consecuencia del propio proceso inflamatorio pulmonar en el que, como ya se indicó anteriormente, pueden jugar un papel importante las células T. Así pues, nuevamente obtuvimos indicaciones de que el trastorno inflamatorio pulmonar en las AR puede presentar rasgos fisiopatológicos superponibles a los que desencadenan la sinovitis. A pesar de ello, se requieren estudios más extensos y detallados para profundizar en el fenómeno y sus implicaciones.

CONCLUSIONES

1. El BAL puede definir patrones característicos de alveolitis en la AR, según la presencia o no de EPID asociada; como consecuencia, el BAL parece de utilidad en la detección temprana de la neumopatía intersticial subclínica en pacientes con AR.
2. La expresión en los linfocitos T del BAL de los marcadores de activación CD69, CD49a y HLA-DR, está significativamente aumentada en pacientes con AR y EPID asociada, en relación a la de los controles sanos fumadores y no fumadores.
3. La producción in vitro de TNF- α e IL-6, tanto basal como inducida por LPS, se encuentra significativamente elevada en los MA de pacientes con AR y EPID asociada respecto a la de los controles, sugiriendo una hiperreactividad del MA en estos enfermos.
4. El hábito tabáquico modula la respuesta inmune local a nivel pulmonar, produciendo en el BAL: un balance alterado de las proporciones de células T CD4+ y CD8+, una disminución en la expresión de ciertos antígenos de activación linfocitaria (CD69, HLA-DR y 4F2), y una reducción de la capacidad de los MA para producir TNF- α e IL-6.
5. El conjunto de los datos sugiere que el trastorno inflamatorio pulmonar en la AR presenta rasgos fisiopatológicos superponibles a los que desencadenan la sinovitis, resaltando el valor del BAL en el estudio y comprensión de la respuesta inmunoinflamatoria pulmonar.

BIBLIOGRAFIA

1. Turner-Warwick M. Immunologic aspects of systemic diseases of the lung. *Proc R Soc Med* 67:541-547, 1974.
2. Hunninghake GW, Fauci AS. Pulmonary involvement in the collagen vascular diseases. *Am Rev Respir Dis* 119:471-503, 1979.
3. Stanford R.E. Rheumatoid and other collagen lung diseases. *Semin Respir Med.* 4:107-113, 1982.
4. Eisenberg H. The interstitial lung diseases associated with the collagen-vascular disorders. *Clin Chest Med* 3:565-578, 1982.
5. Doll NJ, Salvaggio JE. Pulmonary manifestations of the collagen vascular diseases. *Semin Respir Dis* 5:273-281, 1984.
6. Gordon DA, Stein JL, Broder I. The extra-articular features of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 54:445-452, 1973.
7. Hurd ER. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 8:151-176, 1979.
8. Scott DGI, Bacon PA, Tribe CR. Systemic rheumatoid vasculitis: a clinical and laboratory study of 50 cases. *Medicine* 60:288-297, 1981.
9. Gordon DA, Broder I, Hyland RH. Rheumatoid arthritis. In: Cannon GW, Simmerman GA, eds. *The lung in rheumatic diseases*. New York, Marcel Dekker, 229, 1990.
10. Short CL. The antiquity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 17:193-205, 1974.
11. Ellman P, Ball RE. Rheumatoid diseases with joint and pulmonary manifestations. *Br Med J* 2:816-820, 1948.
12. Gordon DA, Hyland RH, Broder I. Clinical presentation and differential diagnosis of pulmonary abnormalities. In: Utsinger PD, Zvaifler N, Ehrlich G, eds. *Rheumatoid*.

- Arthritis. Etiology, diagnosis, management. Philadelphia: J.B. Lippincott Company 441-463, 1985.
13. Caplan A. Certain radiological appearances in the chest of coal miners suffering from rheumatoid arthritis. *Thorax* 8:29-37, 1953.
 14. Garcia JGN, Parhami N, Killan D, Garcia PL, Keogh BA. Bronchoalveolar lavage fluid evaluation in rheumatoid arthritis. *Am Rev Respir Dis* 133:450-454, 1986.
 15. King T.E. Connective tissue disease. In: Schwarz MI, King TE, eds. *Interstitial lung disease*. St. Louis, Missouri, Mosby Year Book, 271-308, 1993.
 16. Tishler M, Grief J, Fireman E, Yaron M, Topilsky M. Bronchoalveolar lavage: a sensitive tool for early diagnosis of pulmonary involvement in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol* 13:547-550, 1986.
 17. Popper MS, Bogdonoff ML, Hughes RL. Interstitial rheumatoid lung disease. *Chest* 62:243-250, 1972.
 18. Whorwell PJ., Wojtulewski JA, Lacey BW. Respiratory function in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 2:175, 1975.
 19. Cervantes-Pérez P, Toro-Pérez AH, Rodríguez-Jurado P. Pulmonary involvement in rheumatoid arthritis. *JAMA* 243:1715-1719, 1980.
 20. Ancochea J. Alveolitis subclínica y enfermedad pulmonar intersticial en la artritis reumatoide. Ponencia I Simposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar. Madrid, 1993.
 21. Merino J. Pulmón y drogas: etiopatogenia del daño pulmonar inducido por fármacos. Ponencia XXI Congreso Nacional SEPAR. Torremolinos, 1988.
 22. Roschmann RA, Rothenberg RJ. Pulmonary fibrosis in rheumatoid arthritis: a review of clinical features and therapy. *Seminars Arthritis Rheum.* 16:174-185, 1987.

23. Walker WC, Wright V. Pulmonary lesions and rheumatoid arthritis. *Medicine* 47:501-520, 1968.
24. Patterson CD, Harrille WE, Pierce JA. Rheumatoid lung disease. *Ann Intern Med* 62:685-697, 1965.
25. Stack BHR, Grant JWB. Rheumatoid interstitial lung disease. *Br J Dis Chest* 59:202-211, 1965.
26. Bain LS, Robertson PD. Rheumatoid lung disease. *Ann Phys Med* 9:110-116, 1967
27. Frank ST, Weg JG, Harkleroad LE, Fitch RF. Pulmonary dysfunction in rheumatoid disease. *Chest* 63:27-34, 1973.
28. Jurik AG, Davidsen D, Graudal H. Prevalence of pulmonary involvement in rheumatoid patients and its relationship to some characteristics of the patients. *Scand J Rheumatol* 11:217-224, 1982.
29. Schernthaner G, Scherak D, Kolarz G, Kummer F. Seropositive rheumatoid arthritis associated with decreased diffusion capacity of the lung. *Ann Rheumatic Dis* 35:258-262, 1976.
30. Tomasi TB, Fudenberg HH, Finby N. Possible relationship of rheumatoid factors and pulmonary disease. *Ann J Med* 33:243-248, 1962.
31. Sievers K, Aho K, Hurri L, Perttla Y. Study of rheumatoid pulmonary disease: a comparison of roentgenological findings among patients with rheumatoid factor titers and with completely negative reactions. *Acta Tuberc Scand* 35:21-34, 1964.
32. Geddes DM, Webley M, Brewerton DA, Turton CW, Turner-Warwick M, Murphy AH, Ward AM. α 1-antitrypsin phenotypes in fibrosing alveolitis and rheumatoid arthritis. *Lancet* 2:1049-1051, 1977.
33. Michalski JP, McCoombs CL, Scopelitis E, Bilindo JJ, Medsger TA. Alpha-1

- antitrypsin phenotypes including M subtypes in pulmonary disease associated with rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 29:586-591, 1986.
34. Sanders PA, Thomson W, Browne DA, Dyer PA, Grennan D. Alpha-1 antitrypsin (PI) allotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 45:450-453, 1986.
 35. Kucera MRF. A possible association of rheumatoid arthritis and sarcoidosis. *Chest* 95:604-606, 1989.
 36. Fellbaum C, Domej W, Popper H. Rheumatoid arthritis with extensive lung lesions. *Thorax* 44:70-71, 1989.
 37. Rosenow EC III, Martin WJ II. Drug-induced interstitial lung disease. In Schwarz MI, King TE, eds. *Interstitial lung disease*. St. Louis, Missouri. Mosby Year Book. 255-270, 1993.
 38. Edlavitch SA. Adverse drug event reporting. Improving the low U.S. reporting rates. *Arch Intern Med* 148:1499-1503, 1988.
 39. Koch-Weser J. Fatal reactions to drug therapy. *N. Engl J Med* 291:302-303, 1974.
 40. Rosenow EC III. Drug-induced lung diseases. In: Kelly WN, ed. *Textbook of Internal Medicine*. Philadelphia: JB Lippincott 1939-1943, 1989.
 41. Rosenow EC III. Drug-induced pulmonary disease. In: Murray JF, Nadel JA, eds. *The textbook of respiratory medicine*. Philadelphia; WB. Saunders 1681-1702, 1988.
 42. Cooper JAD Jr, White DA, Matthay RA. Drug-induced pulmonary disease. Part I: cytotoxic drugs. *Am Rev Respir Dis* 133:321-340, 1986.
 43. Cooper JAD Jr, White DA, Matthay RA. Drug-induced pulmonary disease. Part II: drugs. *Am Rev Respir Dis* 133:488-505, 1986.
 44. Rice KL. Pulmonary infiltrates associated with noncytotoxic drugs. *Semin Respir Infect* 3:229-239, 1988.

45. Shil Wc, Prete PE. Pleuropulmonary manifestations of rheumatoid arthritis. *Sem Arthritis Rheum* 13:235-243, 1984.
46. Evans RB, Ettensohn DB, Fawaz-Estrup F, Lally EV, Kaplan SR. Gold lung: recent developments in pathogenesis, diagnosis and therapy. *Semin Arthritis Rheum* 16:196-205, 1987.
47. Scott DL, Bradby VH, Aitman TJ, Zaphiropoulos GC, Hawkins CF. Relationship of gold and penicillamine therapy to diffuse interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis* 40:136-141, 1981.
48. Slingerland R, Hoogsteden HC, Adriaansen HJ, Van der Kwast TH, Hilvering C. Gold-induced pneumonitis. *Respiration* 52:232-236, 1987.
49. Winterbauer RH, Wilske KR, Wheelis RF. Diffuse pulmonary injury associated with gold treatment. *N Engl J Med* 294:919-921, 1976.
50. Morley TF, Klomansky HJ, Adelizzi RA, Giudice JC. Pulmonary gold toxicity. *Eur J Resp Dis* 65:627-632, 1984.
51. McCormick J, Cole S, Lahiri S, Kanauft F, Cohen S, Yoshida T. Pneumonitis caused by gold salt therapy. Evidence for the role of cell-mediated immunity in its pathogenesis. *Am Rev Respir Dis* 122:145-152, 1980.
52. Camus P, Reybet Degat O, Instrabo E, Jeannin L. D-penicillamine induced severe pneumonitis. *Chest* 81:376-378, 1982.
53. Carson CW, Cannon GW, Egger MJ, Ward MJ, Clegg DO. Pulmonary disease during the treatment of rheumatoid arthritis with low dose pulse methotrexate. *Sem Arthritis Rheum* 16:186-195, 1987.
54. Ridley MG, Wolfe CS, Mathews J. Life threatening acute pneumonitis during low dose methotrexate treatment for rheumatoid arthritis: a case report and review of the

- literature. *Ann Rheum Dis* 47:784-788, 1988.
55. Hakkinen PJ, Whiteley JW, Witschi HR. Hyperoxia but not thoracic X-irradiation, potentiates bleomycin and cyclophosphamide-induced lung damage in mice. *Am Rev Respir Dis* 126:281-285, 1982.
 56. Thruston JG, Marks P, Trapnell D. Lung changes associated with phenylbutazone treatment. *Br Med J* 2:1422-1423, 1976.
 57. Wang KK, Bowyer BA, Fleming CR. Pulmonary infiltrates and eosinophilia associated with sulfasalazine. *Mayo Clin Proc* 59:343-346, 1984.
 58. Averbuch M, Halpern Z, Hallak A. Sulfasalazine pneumonitis. *Am J Gastroenterol* 80:343-345, 1985.
 59. Yaffe BH, Korelitz I. Sulfasalazine pneumonitis. *Am J Gastroenterol* 78:493-494, 1983.
 60. Jones GR, Malone DNS. Sulfasalazine lung disease. *Thorax* 27:713-717, 1972.
 61. Hamadel MA, Atkinson J, Smith LJ. Sulfasalazine-induced pulmonary disease. *Chest* 101:1033-1037, 1992.
 62. Zitnik RJ, Cooper JAD Jr. Pulmonary disease due to antirheumatic agents. *Clin Chest Med* 11:139-150, 1990.
 63. Laffon A, García de Vicuña R, Humbría A, Aspa FJ, Ancochea J. La neumopatía intersticial en la artritis reumatoide. Técnicas diagnósticas y utilidad del lavado broncoalveolar. En: Rodríguez de la Serna A, Blanch J, Benito P, eds. *Temas actuales de Reumatología*. Barcelona: Espaxs SA. 223-254, 1990.
 64. Weis RB, Bruno S. Hypersensitivity to cancer chemotherapeutic agents. *Ann Intern Med* 94:66-72, 1981.
 65. Sostman HD, Mathay RA, Putman CE. Methotrexate-induced pneumonitis. *Medicine*

- 55:371-388, 1976.
66. Adam M, Kuhn K. Investigation of the reactions of metals with collagen in vitro. *Eur J Biochem* 3:407-410, 1968.
 67. Ninmi BE, Bavetta LA. Collagen defect induced by penicillamine. *Science* 150:905-907, 1965.
 68. Hakala M. Poor prognosis in patients with rheumatoid arthritis hospitalized for interstitial lung fibrosis. *Chest* 93:114-118, 1988.
 69. Turner-Warwick M. The immunology of connective tissue disorders of the lung. In: Daniele RP, ed. *Immunology and immunologic diseases of the lung*. Cambridge, Massachusetts: Blackwell Scientific Publications. 397-410, 1988.
 70. Xaubet A, Cáceres J, Agustí C, Roca J. Expresión clínica, radiográfica y funcional respiratoria. En: Xaubet A, Jordana M, eds. *Fibrosis pulmonar*. Barcelona: Ed. Doyma S.A. 23-45, 1991.
 71. Brannan HM, Good CA, Divertie MB, Baggenstoss AH. Pulmonary disease associated with rheumatoid arthritis. *JAMA* 189:914-918, 1964.
 72. Hyland RH, Gordon DA, Broder I, Davies GM, Russel ML. A systemic controlled study of pulmonary abnormalities in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol* 10:395-405, 1983.
 73. Turner-Warwick M, Evans RC. Pulmonary manifestations of rheumatoid disease. *Clin Rheum Dis* 3:549-564, 1977.
 74. Dixon AS, Dixon J, Ball J. Honeycomb lung and chronic rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 16:241-245, 1957.
 75. Lynch DA, Gamsu G. Newer imaging techniques in the assessment of interstitial lung disease. In: *Interstitial lung disease*. Schwarz MI, King TE, eds. St Louis, Missouri:

- Mosby Year Book. 91-118, 1993.
76. Dickey BF, Myers AR. Pulmonary manifestations of collagen-vascular disease. In: Pulmonary diseases and disorders. Fishman AP, ed. New York: Mc Graw-Hill. 645-666, 1988.
 77. Kreel L. Computed tomography in the evaluation of pulmonary asbestosis. *Acta Radiol (Diagn)* 17: 405-412, 1976.
 78. Mathieson JR, Mayo JR, Staples CA, Muller NL. Chronic diffuse infiltrative lung disease: comparison of diagnostic accuracy of CT and chest radiography. *Radiology* 171:111-116, 1989.
 79. Grenier P, Maurice F, Musset D. Bronchiectasis: assessment by thin-section CT. *Radiology* 161:95-99, 1986.
 80. Muller NL, Staples CA, Miller RR. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia: CT features in 14 patients. *Am J Roentgenol* 154:983-987, 1990.
 81. Fisher MR. Magnetic resonance for evaluation of the thorax. *Chest* 95:166-173, 1989.
 82. Gamsu G, Sostman D. Magnetic resonance imaging of the thorax. *Am Rev Respir Dis* 139:254-274, 1989.
 83. Schneider M, Probst R, Wey W. Magnetic resonance imaging - a useful tool for airway assessment. *Acta Anaesthesiol Scand* 33:429-431, 1989.
 84. Cherniack RM. Physiologic alterations in interstitial lung disease. In: Schwarz MI, King TE, eds. Interstitial lung disease. St. Louis, Missouri: Mosby Year Book. 79-90, 1993.
 85. Morgan WK, Wolfel DA. The lungs and pleura in rheumatoid arthritis. *Am J Roentgenol Radiol Ther* 98:334-342, 1966.
 86. Martel W, Abell MR, Mikkelsen WM, Whitehouse WM. Pulmonary and pleural

- lesions in rheumatoid disease. *Radiology* 90:641-653, 1968.
87. Crystal RG, Fulmer JD, Roerts WC, Mos ML, Line BR, Reynolds HY. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintinographic, cytological and biochemical aspects. *Ann Intern Med* 85:769-788, 1976.
 88. Keogh BA, Crystal RG. Clinical significance of pulmonary function test. *Chest* 78:856-865, 1980.
 89. González Mangado N. Valor clínico de la medición de la capacidad de difusión pulmonar. *Arch Bronconeumol* 24:128-132, 1987.
 90. Austrian R, Mc Clement JH, Renzetti AD, Donald KW, Riley RL, Cournand A. Clinical and physiologic features of some of pulmonary diseases with impairment of alveolar capillary diffusion: the syndrome of "alveolla - capillary block". *Am J Med* 11:667, 1951.
 91. Macklem PT. New test to assess lung function. *N Engl J Med* 293:339-342, 1975.
 92. Davidson C, Brooks GF, Bacon PA. Lung function in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 33:293-297, 1974.
 93. Collins RL, Turner RA, Johnson AM, Whitley NO, McLean RL. Obstructive pulmonary disease in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 19:623-628, 1976.
 94. Geddes DM, Webley M, Emerson PA. Airways obstruction in Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis* 38:222-225, 1979.
 95. Sassoon CSH, McAlpine SW, Tashkin DP, Bydur A, Quismorio FP, Mongan ES. Small airways function in non smokers with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 27:1218-1226, 1984.
 96. Scott TE, Wise RA, Hochberg MC, Wigley FM. HLA DR4 and pulmonary dysfunction in Rheumatoid Arthritis. *Am J Med* 82:765-771, 1987.

97. Keogh BA, Crystal RG. Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders. *Thorax* 37: 1-10, 1982.
98. Ramos M, Badrinas F. La gammagrafía torácica con citrato de Galio⁶⁷ en las enfermedades intersticiales pulmonares. *Arch Bronconeumol* 22:249-250, 1986.
99. Carrió I, Berná Ll, Estorch M. Estudios isotópicos en neumología. *Arch Bronconeumol* 27:121-124, 1991.
100. Bekerman C, Hoffer PB, Bitran JD. Gallium-67 citrate imaging studies of the lung. *Semin Nucl Med* 10:286-301, 1980.
101. Line BR, Fulmer JD, Reynolds HY, Roberts WC, Jones AE, Harrys EK, Crystal RG. Gallium 67 citrate scanning in the staging of idiopathic pulmonary fibrosis: correlations with physiologic and morphologic features and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 118:355-365, 1978.
102. Rohatgi PK, Baier H. Quantitative gallium scanning in pulmonary sarcoidosis. *Respiration* 44:304-313, 1983.
103. Rohatgi PK, Bates HY, Noss RW. Computer-assisted sequential quantitative analysis of gallium scans in pulmonary sarcoidosis. *Eur J Respir Dis* 66:248-255, 1985.
104. McLean RG, Steele P, Murray IP. Quantitation of pulmonary gallium-67 uptake: comparison of computer-derived indices. *Nucl Med Commun* 6:425-433, 1985.
105. Bourguet P, Delaval P, Herry JY. Direct quantitation of thoracic gallium-67 uptake in sarcoidosis. *J Nucl Med* 27:1550-1556, 1986.
106. Bisson G, Lamoureux G, Begin R. Quantitative gallium-67 lung scan to assess the inflammatory activity in the pneumoconioses. *Semin Nucl Med* 17:72-80, 1987.
107. Min-Fu T. Mechanism of gallium-67 accumulation in inflammatory lesions. *J Nucl Med* 26:88-92, 1985.

108. Agustí C. Evaluación clínica de los pacientes con fibrosis pulmonar. En: Xaubet A, Jordana M, eds. *Fibrosis pulmonar*. Barcelona: Ed. Doyma S.A. 73-84, 1991.
109. Stevens DA, Allegra JC. Gallium accumulation in early pulmonary *Pneumocystis carinii* infection. *South Med J* 79:1148-1151, 1986.
110. Walsh TJ, Bekerman C, Chausow A, Szidon P. The value of gallium-67 scanning in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 132:746-747, 1985.
111. Lecklitner ML, Johnson DR, Hughes JJ. Gallium-67 and pulmonary complications of amiodarone. *Clin Nucl Med* 13:826-828, 1988.
112. Dake MD, Hattner R, Warnock ML, Golden JA. Gallium-67 lung uptake associated with amiodarone pulmonary toxicity. *Am Heart J* 109:1114-1116, 1985.
113. Kanner RE, Barkman HWJ, Rom WN, Taylor ATJ. Gallium-67 citrate imaging in underground coal miners. *Am J Ind Med* 8:49-55, 1985.
114. Yeh SD, White DA, Stover PDE. Abnormal gallium scintigraphy in pulmonary alveolar proteinosis (PAP). *Clin Nucl Med* 12:294-297, 1987.
115. Check IJ, Kidd MR, Staton GWJ. Systemic and lung protein changes in sarcoidosis. Lymphocyte counts, gallium uptake values and serum angiotensin-converting enzyme levels may reflect different aspects of disease activity. *Ann NY Acad Sci* 465:607-617, 1986.
116. Rohatgi PK, Kuzmowych TV. Assessment of activity in chronic sarcoidosis: usefulness of serum angiotensin converting enzyme and gallium scan. *Respiration* 49:140-146, 1986.
117. Gelb AF, Dreisen RB, Epstein JD. Immune complexes, gallium lung scans, and bronchoalveolar lavage in idiopathic interstitial pneumonitis-fibrosis. *Chest* 84:148-153, 1983.

118. Line BR, Hunninghake GW, Keogh BA, Jones AE, Johnston GS, Crystal RG. Gallium-67 scanning to staging the alveolitis of sarcoidosis: correlation with clinical studies, pulmonary function studies and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 123:440-446, 1981.
119. Bisson G, Drapeau G, Lamoreaux G, Cantin A, Rola-Pleszczynsky M, Begin R. Computer-based quantitative analysis of Gallium-67 uptake in normal and diseased lungs. *Chest* 84:513-517, 1983.
120. Beamunt D, Herry JY, Sapene M, Bourguet P, Larzul JJ, de Labarthe B. Gallium-67 in the evaluation of sarcoidosis: Correlations with serum angiotensin converting enzyme and bronchoalveolar lavage. *Thorax* 37:11-18, 1982.
121. Rossi GA, Hunninghake GW, Line BR, Keogh BA, Crystal RG. Mechanisms of gallium-67 uptake in the lung in pulmonary sarcoidosis. *Bull Europ Physiopath Res* 17:54, 1981.
122. Baughman RP, Shipley R, Eisentrout CE. Predictive value of gallium scan, angiotensin-converting enzyme level, and bronchoalveolar lavage in two-year follow-up of pulmonary sarcoidosis. *Lung* 165:371-377, 1987.
123. Crystal RG, Gadek JE, Ferrans CJ, Fulmer FD, Line BR, Hunninghake GW. Interstitial lung disease: Current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am J Med* 70:542-568, 1981.
124. Greene NB, Solinger AM, Baughman RP. Patients with collagen vascular disease and dyspnea. The value of gallium scanning and bronchoalveolar lavage in predicting response to steroid therapy and clinical outcome. *Chest* 91:698-703, 1987.
125. Rudd RM, Haslam PL, Turner-Warwick M. Cryptogenic fibrosing alveolitis. Relationships of pulmonary physiology and bronchoalveolar lavage to response to

- treatment and prognosis. *Am Rev Respir Dis* 124:1-8, 1981.
126. Ancochea J. Lavado alveolar en las neumopatías intersticiales difusas no infecciosas. Tema a debate. II Hispano-Luso de Neumología. XXVI Congreso de SEPAR. Sevilla, 1993.
 127. Castella J, Llorente JL, Puzo MC, Sanchis J, Sueiro A, Xaubet A. Normativa sobre la práctica del lavado broncoalveolar (BAL). Recomendaciones SEPAR. Barcelona, Ed. Doyma S.A. 1989.
 128. Xaubet A, Agustí C. Lavado Broncoalveolar. *Arch Bronconeumol* 27:134-138, 1991.
 129. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 135:250-263, 1987.
 130. Xaubet A, Ramírez J. Aspectos citológicos, bioquímicos y anatomopatológicos. En: Xaubet A, Jordana M, eds. *Fibrosis pulmonar*. Barcelona: Ed. Doyma S.A. 47-63, 1991.
 131. Thompson AB, Spurzem JR, Rennard SI. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. In: Schwarz MI, King TE, eds. *Interstitial lung disease*. St. Louis, Missouri: Mosby Year Book 119-126, 1993.
 132. Klech H, Pohl W. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 2:561-585, 1989.
 133. Klech H, Pohl W, Hutter C. Safety and side-effects of bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Rev* 2:54-57, 1992.
 134. Credle WF, Smiddy JF, Elliot RC. Complications of fiberoptic bronchoscopy. *Am Rev Respir Dis* 109:67-72, 1974.
 135. Pereira W Jr, Kovnat DM, Snider GL. A prospective cooperative study of complications following flexible fiberoptic bronchoscopy. *Chest* 73:813-816, 1978.
 136. Strumpf IJ, Feld MK, Gornelius MJ, Keogh BA, Crystal RG. Safety of fiberoptic

- bronchoalveolar lavage in evaluation of interstitial lung disease. *Chest* 8: 268-271, 1981.
137. Rankin JA, Synder PE, Schacter EN, Matthay RA. Bronchoalveolar lavage, its safety in subjects with mild asthma. *Chest* 85:723-728, 1984.
 138. Ancochea J, Girón R. Citoquinas del pulmón. Ponencia I Symposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar. Madrid, 1993.
 139. Colby T, Lombard C. Histiocytosis X in the lung. *Hum Pathol* 14:48-53, 1983.
 140. Basset F, Soler P, Jaurand MC, Bignon J. Ultrastructural examination of BAL for diagnosis of pulmonary histiocytosis X: preliminary report on four cases. *Thorax* 32:303-306, 1977.
 141. Basset F, Soler P, Hance A. The Langerhans cell in human pathology. *Ann NY Acad Sci* 465:325-338, 1986.
 142. Chollet S, Soler P, Doumovo P, Richard MS, Ferrans V, Basset F. Diagnosis of histiocytosis X by immunodetection of Langerhans cells in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Pathol* 115:225-232, 1984.
 143. Murphy GF, Harrist TJ, Bhan AK, Nihm MC. Distribution of cell surface antigens in histiocytosis X: quantitative immunoelectron microscopic analysis using monoclonal antibodies. *Lab Invest* 48:90-97, 1983.
 144. Haimoto H, Hosoda S, Kato K. Differential distribution of immunoreactive S100 and S100 proteins in normal non-nervous human tissues. *Lab Invest* 57:489-498, 1987.
 145. Cagle PT, Mattioli CA, Troung LD, Greenberg SD. Immunohistochemical diagnosis of pulmonary eosinophilic granuloma on lung biopsy. *Chest* 94:1133-1137, 1988.
 146. Rabkin MS, Kjeldsberg CR, Wittwer CT, Marty J. A comparison study of two methods of peanut agglutinin staining with S100 immunostaining in 29 cases of

- histiocytosis X. *Arch Pathol Lab Med* 114:511-515, 1990.
147. Martin RJ, Coalson JJ, Rogers RM, Horton FO, Manous LE. Pulmonary alveolar proteinosis: the diagnosis by segmental lavage. *Am Rev Respir Dis* 121:819-825, 1980.
 148. Danel C, Israël-Biet D, Costabel U, Wallaert B, Klech H. The clinical role of BAL in rare pulmonary diseases. *Eur Respir Rev* 2:83-88, 1992.
 149. Rennard SI. Assessment of the clinical value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of cancer in the lung. *Eur Respir Rev* 2:100-105, 1992.
 150. Springmeyer SC, Hackman R, Carlson JJ, Mc Clellan JE. Bronchiolo-alveolar cell carcinoma diagnosed by bronchoalveolar lavage. *Chest* 83:278-279, 1983.
 151. Sestini P, Rottoli L, Gotti G, Miracco C, Luzi P. Bronchoalveolar lavage diagnosis of bronchioloalveolar carcinoma. *Eur J Respir Dis* 66:55-58, 1985.
 152. Febullo AJ, Eiten Sohn DB. Bronchoalveolar lavage in lymphangitic spread of adenocarcinoma to the lung. *Chest* 87:129-131, 1985.
 153. Levy H, Horak DA, Lewis MI. The value of bronchial washings and bronchoalveolar lavage in the diagnosis of lymphangitic carcinomatosis. *Chest* 94:1028-1030, 1988.
 154. Goldstein N, Lippmann ML, Goldberg SK, Fein AM, Shapiro B, Leon SA. Usefulness of tumor markers in serum and bronchoalveolar lavage of patients undergoing fiberoptic bronchoscopy. *Am Rev Respir Dis* 132:60-64, 1985.
 155. Macchia V, Mariano A, Cavalcanti M, Coppa A, Cecere C, Fraioli G, Elia S, Ferrante G. Tumor markers and lung cancer: correlation between serum and bronchial secretion levels of CEA, TPA, CANAG CA-50, NSE and ferritin. *Int J Biol Markers* 2:151-156, 1987.
 156. Alvarez-Sala R. Estudio de marcadores tumorales en el lavado broncoalveolar.

- Ponencia I Symposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar. Madrid, 1993.
157. Kahn F, Jones J, England D. Diagnosis of pulmonary hemorrhage in the immunocompromised host. *Am Rev Respir Dis* 136:155-160, 1987.
 158. Linder J, Robbins R, Rennard SI. Cytologic criteria for pulmonary hemorrhages. *Acta Cytologica* 32:763, 1988.
 159. 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* 44:299-300, 1990.
 160. Xaubet A, Torres A, Marco F, Puig de la Bellacasa J, Faus R, Agusti Vidal A. Pulmonary infiltrates in immunocompromised patients. Diagnostic value of telescoping plugged catheter and bronchoalveolar lavage. *Chest* 95:130-135, 1989.
 161. Lieske TR, Sunderranjan EV, Passamonte PM. Bronchoalveolar lavage and technetium-99m glucoheptonate imaging in chronic eosinophilic pneumonia. *Chest* 85:282-284, 1984.
 162. Pesci A, Bertorelli G, Manganelli P, Mori PA, Strinati F, Marangio E, Olivieri D. Bronchoalveolar lavage in chronic eosinophilic pneumonia. *Respiration* 54:16-22, 1988.
 163. Prin L, Capron M, Gosset P, Wallaert B, Kusnierz JP, Blettry O, Tonnel AB, Capron A. Eosinophilic lung disease: immunologic studies of blood and alveolar eosinophils. *Clin Exp Immunol* 63:249-257, 1986.
 164. Bart F, Wallaert B, Prin L, Gosselin B, Ramon P, Tonnel AB. Pulmonary involvement in allergic granulomatosis and angiitis. Evaluation of alveolitis by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 133:313A, 1986.
 165. Corwin RW, Irwin RS. The lipid-laden alveolar macrophages as a marker of

- aspiration in parenchymal lung disease. *Am Rev Respir Dis* 132:576-581, 1985.
166. Chastre J, Fagon JY, Soler P, Fichelle A, Dombret MC, Hutten D, Hance AJ, Gibert C. Bronchoalveolar lavage for rapid diagnosis of the fat embolism syndrome in trauma patients. *Ann Intern Med* 113:583-588, 1990.
167. Roger N, Xaubet A, Agustí C, Bertrán A, Zabala E, Torres A, Picado C, Rodríguez-Roisín R. Diagnóstico de la embolia grasa mediante el lavado broncoalveolar. I *Symposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar*. Madrid, 1993.
168. Costabel U, Donner CF, Haslam PL, Rizzato G, Teschler H, Velluti G, Wallaert B. Clinical role of BAL in occupational lung diseases due to mineral dust exposure. *Eur Respir Rev* 2:89-96, 1992.
169. Monsó E. Lavado broncoalveolar y silicosis. Análisis mineralológico. Ponencia I *Symposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar*. Madrid, 1993.
170. Costabel U. Bronchoalveolar lavage from patients with asbestosis. Ponencia I *Symposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar*. Madrid, 1993.
171. Rossman MD, Kearn JA, Elias JA, Cullen MR, Epstein PE, Preuss OP, Markham TN, Daniele RP. Proliferative response of bronchoalveolar lymphocytes to berilium. *Ann Intern Med* 108:687-693, 1988.
172. Reynolds HY, Fulmer JD, Kazmierowski JA, Roberts WC, Frank MM, Crystal RG. Analysis of cellular and protein components of bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest* 59:165-175, 1977.
173. Haslam PL, Turton CWG, Lukoszek A, Salsbury AJ, Dewar A, Collins JV, Turner-Warwick M. Bronchoalveolar lavage fluid cell counts in cryptogenic fibrosing alveolitis and their relation to therapy. *Thorax* 35:328-339, 1980.

174. DuBois RM, Townsend PJ, Cole PJ, Haslam PL, Turner-Warwick M. Bronchoalveolar macrophages in sarcoidosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Clin Allergy* 11:409-419, 1981.
175. Crystal RG, Bitterman PR, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA. Interstitial lung diseases of unknown cause: disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. *N Engl J Med* 310:154-166, 235-244, 1984.
176. Fishman AP. UIP, DIP, and all that. *N Engl J Med* 298:843-844, 1978.
177. Daniele RP, Elias JA, Epstein PE, Rossman MD. Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis, and management of interstitial lung disease. *Ann Intern Med* 102:93-108, 1985.
178. Haslam PL, Bauer W, De Rose V, Eckert H, Olivieri D, Poulter LW, Rossi GA, Teschler H. The clinical role of BAL in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev* 2:58-63, 1992.
179. Shindoh Y, Shimura S, Tomioka M, Aikawa T, Sasaki H, Takishima T. Cellular analysis in bronchoalveolar lavage fluids in infiltrative and fibrotic stages of idiopathic pulmonary fibrosis. *Tohoku J Exp Med* 149:47-60, 1986.
180. Watters LC, Schwarz MI, Cherniack RM, Waldrom JA, Dunn TL, Stanford RE, King TE. Idiopathic pulmonary fibrosis. Pretreatment bronchoalveolar lavage cellular constituents and their relationships with lung histopathology and clinical response to therapy. *Am Rev Respir Dis* 153:696-704, 1987.
181. Turner-Warwick M, Haslam PL. The value of serial bronchoalveolar lavages in assessing the clinical progress of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 135:26-34, 1987.
182. Brown CH, Turner-Warwick M. The treatment of cryptogenic fibrosing alveolitis with

- immunosuppressant drugs. *Q J Med* 40:289-302, 1971.
183. O'Donnell K, Keogh B, Cantin A, Crystal RG. Pharmacologic suppression of the neutrophil component of the alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 136:288-292, 1987.
 184. Wallaert B, Hoorelbeke A, Sibille Y, Rossi GA. The clinical role of bronchoalveolar lavage in collagen-vascular diseases. *Eur Respir Rev* 2:64-68, 1992.
 185. Wallaert B, Hatron PY, Grosbois JM, Tonnel AB, Devulber B, Voisin C. Subclinical pulmonary involvement in collagen-vascular diseases assessed by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 133:574-580, 1986.
 186. Poulter LW, Rossi GA, Bjerner L, Costabel U, Israël-Biet D, Klech H, Pohl W, Semenzato G. The value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and prognosis of sarcoidosis. *Eur Respir Rev* 2:75-82, 1992.
 187. Costabel U, Zaiss A, Wagner DJ. Value of bronchoalveolar lavage lymphocyte subpopulations for the diagnosis of sarcoidosis. In: Grassi C, Rizzato G, Pozzi E, eds. *Sarcoidosis and other granulomatous disorders*. Amsterdam: Excerpta Medica 429, 1988.
 188. Costabel U. The value of bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases. Ponencia I Symposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar. Madrid, 1993.
 189. Crystal RG, Roberts WC, Hunninghake GW, Gadek JE, Fulmer JD, Line BR. Pulmonary sarcoidosis: a disease characterized and perpetuated by activated lung T lymphocytes. *Ann Intern Med* 94:73-94, 1981.
 190. Roth C, Huchon GJ, Arnoux A, Stanislas-Leguern G, Marsac JH, Chretien J. Bronchoalveolar cells in advanced pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 124:9-12, 1981.

191. Perrin-Fayolle M, Pacheco Y, Harf R, Montagnon B, Biot N. Angiotensin converting enzyme in bronchoalveolar lavage fluid in pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 36:790-792, 1981.
192. Rennard SI, Bitterman PB, Crystal RG. Pathogenesis of fibrosis in the granulomatous lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 130:492, 1984.
193. Robinson B, Gadek J, Fells G, Crystal RG. Increased plasminogen activator release by pulmonary alveolar macrophages in patients with chronic interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 127:281S, 1983.
194. Bjermer L, Engstrom-Laurent A, Thunell M, Hallgren R. Hyaluronic acid in bronchoalveolar lavage fluid in patients with sarcoidosis: relationship to lavage mast cells. *Thorax* 42:933-938, 1987.
195. Hunninghake GW. Release of interleukin-1 by alveolar macrophages of patients with active pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 129:569-572, 1984.
196. Bjermer L, Thurell M, Hallgren R. Procollagen III peptide in bronchoalveolar lavage fluid: a potential marker of altered collagen synthesis reflecting pulmonary disease in sarcoidosis. *Lab Invest* 55:654, 1986.
197. Curull V, Segura RM, Morell F, De Gracia X, López D. Péptidos del procolágeno tipo I y tipo III en la sarcoidosis pulmonar. *Arch Bronconeumol* 29:47S, 1993.
198. Pinkston P, Bitterman PB, Crystal RG. Spontaneous release of interleukin-2 by lung T-lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. *N Engl J Med* 308:793-800, 1983.
199. Robinson RBW, McLemore TL, Crystal RG. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T-lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* 75:1488-1495, 1985.
200. Salvaggio J, DeShazo RD. Pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Chest*

- 89:190S-193S, 1986.
201. Semenzato G. Current concepts on bronchoalveolar lavage cells in extrinsic allergic alveolitis. *Respiration* 54 (suppl. 1): 59-65, 1988.
 202. Semenzato G, Bjermer L, Costabel U, Haslam PL, Olivieri D, Trentin L. Clinical role of bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis. *Eur Respir Rev* 2:69-74, 1992.
 203. Semenzato G. Cellular events taking place in the lung of hypersensitivity pneumonitis. Ponencia. I Symposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar. Madrid, 1993.
 204. Semenzato G, Agostini C, Zambello R, Trentin L, Chilosi M, Pizzolo G, Marcer G, Cipriani A. Lung T-cells in hypersensitivity pneumonitis: phenotypic and functional analyses. *J Immunol* 137:1164-1172, 1986.
 205. Costabel U, Bross KJ, Marxen J, Matthys H. T lymphocytosis in bronchoalveolar lavage fluid of hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 85:514-518, 1984.
 206. Leatherman JW, Michael AF, Schwartz BA, Hoidal JR. Lung T-cell in hypersensitivity pneumonitis. *Ann Intern Med* 100:390-392, 1984.
 207. Costabel U, Zaiss A, Ruhle KM, Matthys H. Diagnostic usefulness of bronchoalveolar lavage cell populations in hypersensitivity pneumonitis: results of a discriminant analysis. *Am Rev Respir Dis* 134:344A, 1988.
 208. Costabel U, Bross KJ, Ruhle KH, Lohr GW, Matthys H. Ia-like antigens on T-cell and their subpopulations in pulmonary sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis: analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Am Rev Respir Dis* 131:337-342, 1985.
 209. Konishi K, Mouri T, Nakadate S, Aoyama Y, Obara A, Itoh H, Mori Y, Sugawara K, Tamura M. Lymphocyte activation and farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 139:187A,

- 1989.
210. Trentin L, Migone N, Zambello R, Francia di Celle P, Aina F, Feruglio C, Bulian P, Masciarelli M, Agostini C, Cipriani A, Marcer G, Foà R, Pizzolo G, Semenzato G. Lymphocytic alveolitis in hypersensitivity pneumonitis. Mechanisms accounting for cell growth in the lung. *J Immunol* 145:2147–2154, 1990.
 211. Semenzato G, Trentin L. Cellular immune responses in the lung of hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J.* 3:357–359, 1990.
 212. Patterson R, Wang FLF, Fink JN, Calvanico JN, Roberts M. IgA and IgG antibody activities of serum and bronchoalveolar fluids from symptomatic and asymptomatic pigeon breeders. *Am Rev Respir Dis* 120:1113–1118, 1979.
 213. Barth J. Drug-induced pulmonary disease. Ponencia. I Symposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar. Madrid, 1993.
 214. Akoun GM, Cadranet JL, Rosenow EC, Milleron BJ. Bronchoalveolar lavage cell data in drug induced pneumonitis. *Allergie et Immunologie* 23:245–252, 1991.
 215. Akoun GM, Cadranet JL, Blanchette GB, Milleron BJ, Mayaud CM. Bronchoalveolar lavage cell data in amiodarone-associated pneumonitis. Evaluation in 22 patients. *Chest* 99:1177–1182, 1991.
 216. White DA, Rankin JA, Stover DE, Gellene RA, Gupta S. Methotrexate pneumonitis. Bronchoalveolar lavage findings suggest an immunologic disorder. *Am Rev Respir Dis* 139:18–21, 1989.
 217. Israël-Biet D, Danel C, Costabel U, Rossi GA, Wallaert B. The clinical role of BAL in drug-induced pneumonitis. *Eur Respir Rev.* 2:97–99, 1992.
 218. Silverman JF, Turner RC, Lee West R, Dillard TA. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of lipoid pneumonia. *Diagn Cytopathol* 5:3–8, 1989.

219. Nagai S, Fujimura N, Hirata R, 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* 67:1-9, 1985.
220. García JGN, Wolven RG, Garcia PL, Keogh BA. Assessment of interlobar variation of bronchoalveolar lavage cellular differentials in interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 133:444-449, 1986.
221. Herer B, De Castelbajac D, Israël-Biet D, Venet A, Huchon G, Chretien J. Le lavage broncho-alvéolaire dans les formes pulmonaires de la polyarthrite rhumatoïde. *Ann Med Interne* 139:310-314, 1988.
222. Perez TH, Farre JM, Gosset Ph, Wallaert B, Duquesnoy B, Voisin C, Delcambre B, Tonnel AB. Subclinical alveolar inflammation in rheumatoid arthritis: Superoxide anion, neutrophil chemotactic activity and fibronectin generation by alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2:7-13, 1989.
223. Gilligan DM, O'Connor CM, Ward K, Moloney D, Bresnihan B, Fitzgerald MX. Bronchoalveolar lavage in patients with mild and severe rheumatoid lung disease. *Thorax* 45:591-596, 1990.
224. Wallaert B, Prin L, Hatron PY, Tonnel AB, Voisin C. Lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage in Sjögren's syndrome. Evidence for an expansion of cytotoxic/suppressor subset in patients with alveolar neutrophilia. *Chest* 92:1025-1031, 1987.
225. Hatron PY, Wallaert B, Gosset D, Tonnel AB, Voisin C, Devulder B. Subclinical lung inflammation in Sjögren syndrome. Correlation with clinical and biological characteristics of the disease. *Arthritis Rheum* 30:1126-1131, 1987.
226. Casale TB, Little MM, Furst D, Wood D, Hunninghake GW. Elevated BAL fluid

- histamine levels and parenchymal pulmonary disease in rheumatoid arthritis. *Chest* 96:1016-1021, 1989.
227. Weiland JE, García JG, Davis WB, Gadek JE. Neutrophil collagenase in rheumatoid interstitial lung disease. *J Appl Physiol* 62:628-633, 1987.
228. Pérez TH, Gosset Ph, Farre JM, Duquesnoy B, Wallaert B, Tonnel AB. Production spontanée de tumor necrosis factor par les macrophages alvéolaires au cours de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Mal Respir. Suppl.* 1:R18, 1989.
229. Gosset Ph, Pérez TH, Lassalle P, Duquesnoy B, Farre JM, Tonnel AB, Capron A. Increased TNF- α secretion by alveolar macrophages from patients with Rheumatoid Arthritis. *Am Rev Respir Dis* 143:593-597, 1991.
230. Gaensler EA. Open and closed lung biopsy. In: Scakner MA, ed. *Diagnostic technique in pulmonary diseases (part II)*. New York: Marcel Dekker. 579-622, 1980.
231. Gaensler EA, Carrington CB. Open biopsy for chronic diffuse infiltrative lung disease: clinical, roentgenographic, and physiological correlations in 502 patients. *Ann Thorac Surg* 30:411-426, 1980.
232. Wall CP, Gaensler EA, Carrington CB, Hayes JA. Comparison of transbronchial and open biopsies in chronic infiltrative lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 123:280-285, 1981.
233. Golden JA. Interstitial (diffuse parenchymal) lung disease: tissue diagnosis and therapy. In: Baum GL, Wolinsky E, eds. *Textbook of pulmonary diseases*. Boston: Little, Brown and Company. 995-1018, 1989.
234. Fraire AE, Cooper ShP, Greenberg SD, Rowland LP, Langston C. Transbronchial lung biopsy: histopathologic and morphometric assessment of diagnostic utility. *Chest* 102:748-752, 1992.

235. Rahgu G. Idiopathic pulmonary fibrosis. A rational clinical approach. *Chest* 92:148-154, 1987.
236. Yousem SA, Colby TV, Carrington CB. Lung biopsy in rheumatoid arthritis. *Am Rev Respir Dis* 131:770-777, 1985.
237. Turner-Warwick M. Widespread pulmonary fibrosis. In: Fishman AP, ed. *Pulmonary diseases and disorders*. New York: McGraw-Hill. 755-772, 1988.
238. Turner-Warwick M, Haslam PL. Clinical applications of bronchoalveolar lavage. *Clin Chest Med* 8:15-26, 1987.
239. Xaubet A. Estrategia terapéutica. En: Xaubet A, Jordana M, eds. *Fibrosis pulmonar*. Barcelona: Ediciones Doyma, S.A. 65-71, 1991.
240. Winterbauer RH, Hammar SP, Hallman KO. Diffuse interstitial pneumonitis. Clinicopathologic correlations in 20 patients treated with prednisone/azathioprine. *Am J Med* 65:661-672, 1978.
241. Phan SH, Thrall RS, Ward PA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Biochemical demonstration of increased rate of collagen synthesis. *Am Rev Respir Dis* 121:501-506, 1980.
242. Laurent GJ, McAnulty RJ. Protein metabolism during bleomycin-induced pulmonary fibrosis. In vivo evidence for collagen accumulation because of increased synthesis and decreased degradation of newly synthesized collagen. *Am Rev Respir Dis* 128:82-88, 1983.
243. Clark JG, Greenberg J. Modulation of the effects of alveolar macrophages on lung fibroblast collagen production rate. *Am Rev Respir Dis* 135:52-56, 1987.
244. Hance AJ, Bradley K, Crystal RG. Synthesis of type I and type III collagen by rabbit and human lung cells in culture. *J Clin Invest* 57:102-111, 1976.

245. Elias JA, Rossman MD, Zurier RB, Daniele RP. Human alveolar macrophage inhibition of lung fibroblast growth. A prostaglandin-dependent process. *Am Rev Respir Dis* 131:94-99, 1985.
246. Bitterman PB, Rennard SI, Hunninghake GW, Crystal RG. Human alveolar macrophage growth factor for fibroblast. Regulation and partial characterization. *J Clin Invest* 70:806-822, 1982.
247. Korn JH, Halushka PV, Le Roy EC. Mononuclear cell modulation of connective tissue function. Suppression of fibroblast growth by stimulation of endogenous prostaglandin production. *J Clin Invest* 65:543-544, 1980.
248. Jimenez SA, McArthur W, Rosenbloom J. Inhibition of collagen synthesis by mononuclear cell supernates. *J Exp Med* 150:1421-1431, 1979.
249. Lipscomb MF, Toews GB, Lyons CR, Uhr JW. Antigen presentation by Guinea pig alveolar macrophages. *J Immunol* 126:286-290, 1981.
250. Toews GB, Vial WC, Dunn MM, Guzzetta P, Nuñez G, Stastny P, Lipscomb MF. The accessory cell function on human alveolar macrophages in specific T cell proliferation. *J Immunol* 132:181-186, 1984.
251. De Shazo RD, Banks DE, Diem JE, Nordberg JA, Baser Y, Bevier D, Salvaggio JE. Bronchoalveolar lavage cell-lymphocyte interactions in normal nonsmokers and smokers. *Am Rev Respir Dis* 127:545-548, 1983.
252. Green GM, Jakob GJ, Low RB, Davis GS. Defense mechanisms of the respiratory membrane. *Am Rev Respir Dis* 115:479-514, 1977.
253. Du Bois RM. The alveolar macrophage. *Thorax* 40:321-327, 1985.
254. Ancochea J, Laffón A, Aspa FJ, García de Vicuña R, Jiménez C, Díaz-González F, López-Botet M, Baena N, González A. Estudio de marcadores de activación

- linfocitaria en lavado broncoalveolar y sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide. *Arch Bronconeumol* 25 (Supl 1):67-68, 1989.
255. Rossi GA, Zocchi E, Sacco O, Balbi B, Ravazzoni C, Damiani G. Alveolar macrophage stimulation of T cell proliferation in autologous mixed lymphocyte reaction. *Am Rev Respir Dis* 133:78-82, 1986.
256. Hynes RO. Integrins: a family of cells surface receptors. *Cell* 48:549-554, 1987.
257. Hunninghake GW, Kawanami O, Ferrans VJ, Joung RC, Roberts WC, Crystal RG. Characterization of the inflammatory and immune effectors cells in the lung parenchyma of patients with interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 123:407-412, 1981.
258. Lawrence EC, Martin RR, Blaese RM. Increased bronchoalveolar IgG secreting cells in interstitial lung diseases. *N Engl J Med* 302:1186-1188, 1980.
259. Dreisin RB, Schwartz ML, Theofilopoulos MD, Stanford RI. Circulating immune complexes in the idiopathic interstitial pneumonitis. *N Engl J Med* 298:353-357, 1978.
260. Du Bois RM, Townsend PJ, Coles PJ. Alveolar macrophages lysosomal enzyme and C3b receptors in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Clin Exp Immunol* 40:60-65, 1980.
261. Hunninghake GW, Gadek JE, Fales HM, Crystal RG. Human alveolar macrophage-derived chemotactic factor for neutrophils stimuli and partial characterization. *J Clin Invest* 66:473-483, 1980.
262. Martinet Y, Rom WN, Grotendorst GR, Martin GR, Crystal RG. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 317:202-209, 1987.
263. Devel TF, Senior RM. Growth factors in fibrotic diseases. *N Engl J Med* 317:236-237, 1987.

264. Rennard SI, Hunninghake GW, Bitterman PB, Crystal RG. Production of fibronectin by the human alveolar macrophage mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7147-7151, 1981.
265. Eden E, Turino GM. Interleukin-1 secretion by human alveolar macrophages stimulated with endotoxin is augmented by recombinant immune (gamma) interferon. *Am Rev Respir Dis* 133:455-460, 1986.
266. Nugent KM, Glazier J, Monick MM. Stimulated human alveolar macrophages secrete interferon. *Am Rev Respir Dis* 131:714-718, 1985.
267. Hunninghake GW, Nugent KM, Hemken C. Mediators released by human lung cells are potent growth factors for human lung fibroblasts. *Clin Res* 32:563A, 1984.
268. Bitterman PB, Rennard SI, Crystal RG. Environmental lung disease and the interstitium. *Clin Chest Med* 2:393-412, 1981.
269. Smith KA. T-cell growth factor. *Immunol Rev* 51:337-346, 1980.
270. Gillis S, Mizel SB. T-cell lymphoma model for the analysis of interleukin-1 mediated T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1133-1137, 1981.
271. Matshusima K, Taguchi M, Kovacks EJ, Young HA, Oppenheim JJ. Intracellular localization of human monocyte associated interleukin-1 (IL-1) activity and release of biologically active IL-1 from monocytes by trypsin and plasmin. *J Immunol* 136:2883-2891, 1986.
272. Smith KA. Interleukin 2. In: Paul WE, Fathman CG, Metzger H, eds. *Annu Rev Immunol* 2:319-333, 1984.
273. Robb RJ, Munk A, Smith KA. T cell growth factor receptors: quantitation, specificity and biological relevance. *J Exp Med* 154:1455-1474, 1981.

274. Miyawaki T, Yachie A, Uwadana N, Ohzeki S, Nagaoki T, Taniguchi NJ. Functional significance of Tac antigen expressed on activated human T lymphocytes: Tac antigen interacts with T cell growth factor in cellular proliferation. *J Immunol* 129:2474-2478, 1982.
275. Robb RJ, Greene WC, Rush CH. Low and high affinity cellular receptors for interleukin-2. Implications for the level of Tac antigen. *J Exp Med* 160:1126-1146, 1984.
276. Carrera Ramírez AC, Ortiz de Landázuri M. Receptores para interleucina-2. *Inmunología*. Edición del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid 231-246, 1987.
277. Mingari MC, Gerosa F, Carra G, Accolla RS, Moretta A, Zubler RH, Waldmann TA, Moretta L. Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cell via surface receptors similar to those of activated T cell. *Nature* 312:641-643, 1984.
278. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 11:245-268, 1993.
279. Cotner T, Williams JM, Christenson L, Shapiro HM, Strom TB, Strominger J. Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. *J Exp Med* 157:461-472, 1983.
280. Uchiyama T, Broder S, Waldmann TA. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cell. I: Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac+ cell. *J Immunol* 126:1393-1397, 1981.
281. Judd W, Poodry CA, Strominger JL. Novel surface antigen expressed on dividing cell but absent from nondividing cells. *J Exp Med* 152:1430-1435, 1980.
282. Terhorst C, Van Agthoven A, Leclair K, Snow P, Reinherz EL, Schlossman SF.

- Biochemical studies of the human thymocyte cell-surface antigens T6, T9 and T10. *Cell* 23:771-780, 1981.
283. Sánchez-Madrid F, Toribio ML, Gambón F, de Landázuri MO. Cell surface molecular changes on the activation of human thymocytes. *J Immunol* 135:3938-3943, 1985.
284. Cebrián M, Yagüe E, Rincón M, López-Botet M, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, and activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 168:1621-1638, 1988.
285. Hemler ME, Brenner MB, McLean JM, Strominger JL. Antigenic stimulation regulates the level of expression of interleukin 2 receptor on human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2171-2175, 1984.
286. Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: structures, functions and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 8:365-400, 1990.
287. López-Botet M. Análisis por citometría de flujo de la expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria en linfocitos del lavado broncoalveolar. Ponencia. I Symposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar. Madrid, 1993.
288. Martín Juan J. Estudio con microscopio de fluorescencia de expresión de antígenos de diferenciación de serie linfoide y de línea monocítico-macrofágica en el lavado broncoalveolar en patología intersticial difusa. Ponencia. I Symposium Internacional sobre Lavado Broncoalveolar. Madrid, 1993.
289. Kelley J. Cytokines in the lung. *Am Rev Respir* 141:765-788, 1990.
290. Durum SK, Mealy K. Hilton Head revisited-Cytokine explosion of the 80s takes shape for the 90s. *Immunol Today* 11:103-106, 1990.
291. Whicher JT, Evans SW. Cytokines in disease. *Clin Chem* 36:1269-1281, 1990.
292. Alvaro-Gracia JM. Citocinas en la membrana sinovial de la artritis reumatoide. *Rev*

- Esp Reumatol 19:378-387, 1992.
293. Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 332:217-219, 1988.
 294. Elias JA, Kotloff R, Ray P. Cytokines in pulmonary inflammation. In: Fishman AP, ed. *Update: Pulmonary diseases and disorders*. New York: Mc Graw-Hill 93-114, 1992.
 295. Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 113:981-986, 1991.
 296. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79:319-326, 1987.
 297. Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 316:379-385, 1987.
 298. Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem* 57:5015-5018, 1988.
 299. Rosenblum MG, Donato NJ. Tumor necrosis factor α : a multifaceted peptide hormone. *CRC Crit Rev Immunol* 9:21-44, 1989.
 300. Seckinger P, Isaaz S, Dayer JM. Purification and biologic characterization of a specific tumour necrosis factor inhibitor. *J Biol Chem* 264:11966-11973, 1989.
 301. Engelmann H, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, Wallach D. A tumour necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from TNF toxicity. *J Biol Chem* 264:11974-11980, 1989.
 302. Brennan FM, Maini RN, Feldman M. TNF α . A pivotal role in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 31:293-298, 1992.
 303. Keffer J, Probert L, Cazlaris H. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: A predictive genetic model of arthritis. *Embo J* 10:4025-4031, 1991.
 304. O'Garra A. Peptide regulatory factors. Interleukins and the immune system 1. *Lancet*

- 1:943-946, 1989.
305. Le J, Vilcek J. Biology of disease. Interleukin-6: A multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase response. *Lab Invest* 61:588-602, 1989.
 306. Mizel SB. The interleukins. *FASEB J* 3:2379-2388, 1989.
 307. Guerne PA, Zuran BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 83:585-592, 1989.
 308. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol* 144:3347-3353, 1990.
 309. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315-324, 1988.
 310. Molina R, Provost TT, Arnett FC, Bias WB, Hochberg MC, Wilson RW, Alexander EL. Primary Sjögren's syndrome in men. Clinical, serologic and immunogenetic features. *Am J Med* 80:23-31, 1986.
 311. Quanjer PH. Standardized lung function testing. *Bull Europ Physiopath Resp* 19 (Suppl 5): 1-95, 1983.
 312. Cotes JE. Lung function: assessment and application in medicine. 4th edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979.
 313. Ancochea J, González A, Sánchez MJ, Aspa J, López-Botet M. Expression of lymphocyte activation surface antigens in bronchoalveolar lavage and peripheral blood

- cells from young healthy subjects. *Chest* 104:32-37, 1993.
314. Aramburu J, Balboa MA, Ramírez A, Silva A, Acevedo A, Sánchez-Madrid F, de Landázuri MO, López-Botet M. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor- γ/δ T lymphocytes. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* 144:3238-3247, 1990.
315. Pulido R, Cebrián M, Acevedo A, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Comparative biochemical and tissue distribution study of four distinct CD45 antigen specificities. *J Immunol* 140:3851-3857, 1988.
316. Spits H, Yssel H, Leeuwenberg J, de Vries J. Antigen specific cytotoxic T cell and antigen-specific proliferating T cell clones can be induced to cytolytic activity by monoclonal antibodies against T3. *Eur J Immunol* 15:88-93, 1985.
317. Carrera A, Sánchez-Madrid F, López-Botet M, Bernabeu C, de Landázuri MO. Involvement of the CD4 molecule in a post-activation event on T cell proliferation. *Eur J Immunol* 17:179-186, 1987.
318. Malissen B, Rebai N, Liabeuf A, Mawas C. Human cytotoxic T cell structures associated with the expression of cytolysis. I. Analysis at the clonal level of the cytolysis inhibiting effect of seven monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 12:739-747, 1982.
319. Ling NR, MacLennan ICM, Mason DY. B cell and plasma cell antigens: new and previously defined clusters. In: Mc Michael AJ, ed. *Leukocyte Typing III*. Oxford, England: Oxford University Press 302-335, 1987.
320. López-Botet M, Moretta A, Lowenthal J, Accolla R, Pantaleo G, Moretta L. Characterization of monoclonal antibodies directed against the human interleukin-2

- receptor. *Immunología* 5:46-50, 1986.
321. Hemler ME, Sánchez-Madrid F, Flotte TJ, Krensky AM, Burakoff SJ, Bhan AK, Springer TS, Strominger JL. Glycoproteins of 210.000 and 130.000 m.w. on activated T cells: cell distribution and antigenic relation to components on resting cells and T cell lines. *J Immunol* 132:3011-3018, 1984.
322. Keizer GD, Borst J, Figdor CG, Spits H, Miedema F, Terhorst C, de Vries JE. Biochemical and functional characteristics of the human leucocyte membrane antigen family LFA-1, Mo1 and gp-150. *Eur J Immunol* 15:1142-1147, 1985.
323. Persussia B, Acuto O, Terhorst C, Faust J, Lazarus R, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1 a monoclonal antibody blocking FcR functions: studies of B73.1 antibody-antigen interactions on the lymphocyte membrane. *J Immunol* 130:2142-2148, 1983.
324. Abo T, Balch CM. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol* 127:1024-1029, 1981.
325. Jochems GJ, Klein MR, Jordens R, Pascual-Salcedo D, van Bostel-oosterhof F, van Lier RAW, Zeijlemaker WP. Heterogeneity in both cytokine production and responsiveness of a panel of monoclonal human Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines. *Hum Antibod Hybridomas* 2:57-64, 1991.
326. Müller NL, Staples CA, Miller RR, Vedal S, Thurlbeck WM, Ostrow DN. Disease activity in idiopathic pulmonary fibrosis: CT and pathologic correlation. *Radiology* 165:731-734, 1987.
327. The BAL Cooperative Group Steering Committee. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis* 141 (Suppl): 169-202, 1990.

328. Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* 97:149-206, 1979.
329. Crystal RG, Reynolds HY, Kalica AR. Bronchoalveolar lavage. The report of an International Conference. *Chest* 90:122-131, 1986.
330. Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: The missing link. *Annu Rev Immunol* 8:421-452, 1990.
331. Davidson BL, Jeffrey F, Pessano S, Daniele RP, Rovera G. Differentiation and activation phenotypes of lung T lymphocytes differ from those of circulating T lymphocytes. *J Clin Invest* 76:60-65, 1985.
332. Müller-Quemheim J, Saltini C, Sondermeyer P, Crystal RG. Compartmentalized activation of the interleukin 2 gene by lung T lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 137:3475-3483, 1986.
333. Saltini C, Hemler ME, Crystal RG. T lymphocytes compartmentalized on the epithelial surface of the lower respiratory tract express the very late activation antigen complex VLA-1. *Clin Immunol Immunopathol* 46:221-233, 1988.
334. Dominique S, Bouchonnet F, Smiejan JM, Hance AJ. Expression of surface antigens distinguishing "naive" and previously activated lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 45:391-396, 1990.
335. Hara T, Jung LKL, Bjorndahl JM, Fu SM. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 KD/32KD disulfide-linked early activation antigen (EA1) by 12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens and antigens. *J Exp Med* 164:1988-2005, 1986.

336. Cosulich ME, Rubartelli A, Risso A, Cozzolino F, Bargellesi A. Functional characterization of an antigen involved in an early step of T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4205-4209, 1987.
337. Yamada M, Tamura N, Shirai T, Kira S. Flow cytometric analysis of lymphocyte subsets in the bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of healthy volunteers. *Scand J Immunol* 24:559-565, 1986.
338. Becker S, Harris DT, Koren HS. Characterization of normal human lung lymphocytes and interleukin-2-induced lung T cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3:441-448, 1990.
339. Marathias KP, Preffer FI, Pinto C, Kradin RL. Most human pulmonary infiltrating lymphocytes display the surface immunophenotype and functional responses of sensitized T cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:470-476, 1991.
340. García Monzón C, Moreno-Otero R, Pajares JM, García-Sánchez A, López-Botet M, O. de Landázuri M, Sánchez-Madrid F. Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8+ T lymphocytes in viral chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 98:1029-1035, 1990.
341. Michalak M, Quackenbush EJ, Letarte M. Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchanger activity in cardiac skeletal muscle sarcolemmal vesicles by monoclonal antibody 44D7. *J Biol Chem* 261:92-95, 1986.
342. Haynes BF, Hemler ME, Mann DL, Eisenbarth GS, Shelhamer J, Mostoski HS, Thomas CA, Strominger JL, Fauci AS. Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J Immunol* 126:1409-1414, 1981.
343. Dubois RM, Kirby M, Balbi B, Saltini C, Crystal RG. Lymphocytes-T that

- accumulate in the lung in Sarcoidosis have evidence of recent stimulation of the T cell antigen receptor. *Am Rev Resp Dis* 145:1205-1211, 1992.
344. Trinchieri G. Biology of Natural Killer cells. *Adv Immunol* 47:187-376, 1989.
345. Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Rühle KH, Matthys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest* 90:39-44, 1986.
346. Berman JS, Beer DJ, Theodore AC, Kornfeld H, Bernardo J, Center DM. Lymphocyte recruitment to the lung. *Am Rev Respir Dis* 142:238-257, 1990.
347. Daniele RP, Dauber JH, Altose MD, Rowlands DT Jr, Gorenberg DJ. Lymphocyte studies in asymptomatic cigarette smokers: comparison between lung and peripheral blood. *Am Rev Respir Dis* 116:997-1002, 1977.
348. Lipscomb MF. The alveolar macrophage: role in antigen presentation and accessory cell function. In: Daniele RP, ed. *Immunology and immunologic diseases of the lung*. London: Blackwell Scientific Publications 79-96, 1988.
349. Lawrence EC. Cellular immune responses of the lung. In: Daniele RP, ed. *Immunology and immunologic diseases of the lung*. London: Blackwell Scientific Publications 97-111, 1988.
350. Rincón M, Tugores A, López-Rivas A, Silva A, Alonso M, de Landázuri MO, López-Botet M. Prostaglandin E₂ and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of Interleukin-2 receptors in human T cells. *Eur J Immunol* 18:1791-1796, 1988.
351. Mc Combs CC, Michalski JP, Westerfield BT, Light RW. Human alveolar macrophages suppress the proliferative response of peripheral blood lymphocytes. *Chest* 82:266-271, 1982.

352. Zijlstra FJ, Vincent JE, Mol WM, Hoogsteden HC, Van Hall PThW, Jongjean RC. Eicosanoid levels in bronchoalveolar lavage fluid of young female smokers and non-smokers. *Eur J Clin Invest* 22:301-306, 1992.
353. Cush J, Lipsky PE. Cellular basis for rheumatoid inflammation. *Clin Orthopaedics Rel Res* 265:9-12, 1991.
354. Hemler ME, Glass D, Coblyn JS, Jacobson JG. Very late activation antigens on rheumatoid synovial fluid T lymphocytes: association with stages of T cell activation. *J Clin Invest* 78:696-702, 1986.
355. Laffón A. Comunicación personal (datos no publicados).
356. Pitzalis C, Kingsley GH, Lanchbury JSS, Murphy J, Panayi GS. Expression of HLA-DR, DQ and DP antigens and IL-2 receptor on synovial fluid T lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis: evidence for a "frustrated" activation. *J Rheumatol* 14:662-666, 1987.
357. Sewell KL, Trentham DE. Patogenia de la artritis reumatoide. *Lancet (Ed. esp.)* 22:338-342, 1993.
358. Izquierdo M, Balboa MA, Fernández-Rañada JM, Figuera A, Torres A, Iriondo A, López-Botet M. Relation between the increase of circulating CD3+ CD57+ lymphocytes and T cell dysfunction in recipients of bone marrow transplantation. *Clin Exp Immunol* 82:145-150, 1990.
359. Miossec P. The role of IL-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 5:305-308, 1987.
360. Zvaifler NJ. New perspectives in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 85 (Supl 4A):12-17, 1988.
361. Harris Ed. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl*

- J Med 322:1277-1289, 1990.
362. Arend W, Dayer JM. Cytokine and cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 33:305-315, 1990.
363. Firestein GS. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 3:398-406, 1991.
364. Warren CPW. Extrinsic allergic alveolitis: a disease commoner in non-smokers. *Thorax* 32:567-569, 1977.
365. Douglas JG, Middleton WG, Gaddie J, Petrie GR, Choo-Kang YFJ, Prescott RJ, Crompton GK. Sarcoidosis: a disorder commoner in non-smokers?. *Thorax* 41:787-791, 1986.
366. Morgan DC, Smyth JT, Lister RW, Pethybridge RJ. Chest symptoms and farmer's lung: a community survey. *Br J Ind Med* 30:259-265, 1973.
367. Daniele RP, Dauber JH, Altose MD, Rowlands DT Jr, Gorenberg DJ. Lymphocyte studies in asymptomatic cigarette smokers: a comparison between lung and peripheral blood. *Am Rev Respir Dis* 116:997-1005, 1977.
368. Yamaguchi E, Okazaki N, Itoh A, Abe S, Kawakami Y, Okuyama H. Interleukin 1 production by alveolar macrophages is decreased in smokers. *Am Rev Respir Dis* 140:397-402, 1989.
369. Brown GP, Iwamoto GK, Monick MM, Hunninghake GW. Cigarette smoking decreases interleukin 1 release by human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 256:260C-264, 1989.
370. Yamaguchi E, Itoh A, Furuya K, Miyamoto H, Abe S, Kawakami Y. Release of tumor necrosis factor- α from human alveolar macrophages is decreased in smokers. *Chest* 103:479-483, 1993.

371. Bachwich RP, Lynch JP, Larrick J, Spengler M, Kunkel SL. Tumor necrosis factor production by human sarcoid alveolar macrophages. *Am J Pathol* 125:421-425, 1986.
372. Spatafora M, Merendino A, Chiappara G, Gjomarkaj M, Melis M, Bellia V, Bonsignore G. Lung compartmentalization of increased TNF releasing ability by mononuclear phagocytes in pulmonary sarcoidosis. *Chest* 96:542-549, 1989.
373. Baughman RP, Strohofer SA, Buchsbaum J, Lower EE. Release of tumor necrosis factor by alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. *J Lab Clin Med* 115:36-42, 1990.
374. Debs RJ, Fuchs HJ, Philip R, Brunette EN, Duzgunes N, Shellito JE. Immunomodulatory and toxic effects of free and liposome-encapsulated tumor necrosis factor- α in rats. *Cancer Res* 50:375:380, 1990.
375. Liew FY, Li Y, Millot S. Tumor necrosis factor- α synergizes with major through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145:4306-4310, 1990.
376. Feinman R, Henriksen-DeStefano D, Tsujimoto M, Vilcek J. Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J Immunol* 138:635-640, 1987.
377. Wright SD. Multiple receptors for endotoxin. *Curr Opin Immunol* 3:83-90, 1991.
378. Stein M, Gordon S. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur J Immunol* 21:431-437,1991.
379. Chensue S, Otterness I, Higashi G, Forsch C, Kunkel S. Monokine production by hypersensitivity (*Schistosoma mansoni* egg) and foreign body (sephadex bead)-type granuloma macrophages. Evidence for sequential production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 142:1281-1286,1989.

Presidente
Secretario

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de *Aprto con laude por unanimidad*

Madrid, 28. 10. 1893

Francisco I. Gamboa