

# Diagnóstico de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas: estudio del BAL - Su utilidad para el diagnóstico

**Autores:** Rodríguez-Martín Isabel<sup>1</sup>, Galán-Paéz Juan<sup>2</sup>, Sánchez Margalet Víctor<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioquímica Clínica. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. España

<sup>2</sup> Universidad de Sevilla Escuela Técnica Superior de Ingeniería Informática. Universidad de Sevilla. Sevilla

<sup>3</sup> Laboratorio de Bioquímica Clínica. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. España.

## Resumen

**Introducción:** Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas son un grupo heterogéneo de enfermedades respiratorias con difícil diagnóstico. El estudio del lavado broncoalveolar mediante citometría de flujo puede definir patrones celulares típicos en diferentes enfermedades, proporcionando algo de ayuda en el diagnóstico diferencial. El objetivo de este estudio ha sido analizar retrospectivamente la utilidad clínica de las subpoblaciones celulares y linfocitarias detectadas en el lavado broncoalveolar por citometría de flujo, con la finalidad de definir patrones celulares típicos que permitan el diagnóstico diferencial de enfermedades granulomatosas pulmonares.

**Materiales y métodos:** En el estudio se han incluido 44 pacientes retrospectivamente. Los sujetos fueron diagnosticados de sarcoidosis o neumonitis por hipersensibilidad durante un periodo de 3 años. Se realizó el análisis celular de lavado broncoalveolar por citometría de flujo, pruebas histológicas y de imagen (TACAR), como parte del diagnóstico. Los porcentajes de células T, células B, células NK, CD4, CD8 y CD4 / CD8 se analizaron por citometría de flujo, a través de los marcadores CD3 +, CD19 + CD4 +, CD8 +, CD3 + CD4-CD8- y CD3 + CD16-CD56-.

**Resultados:** Concluimos que los parámetros de mayor utilidad fueron la linfocitosis y sobre todo, el cociente CD4/CD8. Este cociente se presentó alto en patologías como la sarcoidosis y se invirtió en la neumonitis por hipersensibilidad, con respecto a los valores hallados en sangre periférica.

**Conclusiones:** El estudio de BAL es útil para discriminar entre enfermedades pulmonares intersticiales granulomatosas y otras EPID.

**Palabras clave:** Enfermedades pulmonares intersticiales; Citometría de flujo; Lavado broncoalveolar

## Introducción

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo muy heterogéneo de entidades que afectan predominantemente al intersticio pulmonar.

El diagnóstico de este grupo tan heterogéneo de patologías es, en muchas ocasiones, todo un reto para el personal clínico, por múltiples causas.

En primer lugar, existen más de 150 causas de EPID (aunque sólo es posible establecer el diagnóstico etiológico en el 40-50% de los casos). En la patogénesis de la enfermedad están involucrados factores tanto exógenos (metales, sustancias orgánicas, maderas, fármacos, virus...), como endógenos (enfermedades autoinmunes, reflujo gastroesofágico...). En segundo lugar, durante años existió una falta de uniformidad en la clasificación de estas patologías. Por último, el contexto clínico en el cual se desarrollan es a menudo común e inespecífico, incluso en muchas ocasiones pueden presentar una sintomatología indistinguible de otras patologías tumorales o autoinmunes<sup>1, 2</sup>.

Entre las manifestaciones clínicas que presentan estos pacientes la disnea es la manifestación más frecuente, así como la presencia de tos que se acentúa con el ejercicio.

Los síntomas extrapulmonares también son habituales y permiten, en ocasiones, dirigir el diagnóstico. Pueden presentarse manifestaciones clínicas a nivel neurológico, ocular, dérmico, digestivo o cardíaco.

Entre estas patologías distinguimos la sarcoidosis y la neumonitis por hipersensibilidad (NH). Ambas patologías presentan en común el carácter granulomatoso (el 60% de las NH se manifiestan con granulomas), así como la existencia de manifestaciones pulmonares y extrapulmonares comunes, lo cual, dificulta enormemente el diagnóstico etiológico entre ambas.

El proceso diagnóstico se inicia con una evaluación clínica (que engloba el conocimiento exhaustivo de la historia clínica, exploración física, análisis bioquímico e inmunológico del paciente, etc), radiografía de tórax, pruebas funcionales respiratorias y pruebas de imagen como TACAR (tomografía axial computarizada de alta resolución), SI esto no fuera suficiente, además el estudio se completa con la realización de otras pruebas más invasivas, como la biopsia pulmonar quirúrgica o el estudio del lavado broncoalveolar (BAL).

El lavado broncoalveolar es un método que permite el estudio de las vías respiratorias inferiores a través del análisis de las formas celulares y bioquímicas.

Esta técnica consiste en la instilación de suero salino en bolos de unos 20-50 ml, (hasta conseguir entre 120-200 ml) a nivel del segmento pulmonar. Después de cada instilación, se aspira el contenido, obteniendo una primera alícuota (muestra bronquial) representativa de la celularidad de la vía aérea.

Es una técnica sencilla, segura (tasa de complicaciones menor del 3%) y bien tolerada y que aporta mucha información clínica en el estudio de las enfermedades pulmonares.

A pesar de ello, la utilidad de esta técnica sigue siendo controvertida, pues parece presentar un alto valor diagnóstico para ciertas patologías pulmonares (proteínosis alveolar, neumonías eosinófilas, histiocitosis X, infecciones o hemorragia alveolar) pero sólo es orientativa de otras (fibrosis pulmonar, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, neumoconiosis o toxicidad farmacológica)<sup>3, 4</sup>.

Así, nos planteamos la utilidad y valor diagnóstico del estudio citológico del lavado broncoalveolar, el cual parece definir determinados patrones celulares típicos de enfermedad, que podrían ser útiles al diagnóstico etiológico de enfermedades pulmonares intersticiales difusas.

El objetivo del estudio ha sido realizar un análisis descriptivo retrospectivo del estudio citológico y de las subpoblaciones linfocitarias en el BAL efectuado a pacientes con sarcoidosis y neumonitis por hipersensibilidad en nuestra área hospitalaria.

Se persigue demostrar que el lavado broncoalveolar puede presentar patrones celulares típicos de enfermedad, permitiendo discriminar entre diferentes EPID y siendo un apoyo de alto valor al diagnóstico clínico.

## Materiales y métodos

Se trata de un estudio observacional retrospectivo, en el que se incluyen todos los pacientes diagnosticados con sarcoidosis y neumonitis por hipersensibilidad, a los que se les realizó un lavado broncoalveolar como parte del diagnóstico, entre enero de 2015 y junio de 2018 en H.U.V. Macarena de Sevilla.

En todos los casos, siempre que no existiera contraindicación, se efectuó un lavado broncoalveolar para identificar y determinar los porcentajes y recuentos absolutos de linfocitos, así como las subpoblaciones linfocitarias. Conjuntamente se midieron los mismos parámetros en sangre periférica de los pacientes, con el fin de poder realizar un estudio comparativo como parte del diagnóstico. Ambas muestras, sangre periférica y BAL, fueron obtenidas y procesadas en el mismo momento.

*Los pacientes:* Se incluyen en el estudio todos los pacientes diagnosticados con sarcoidosis y neumonitis por hipersensibilidad (N = 44), desde enero de 2015 a junio de 2018. En todos ellos el lavado broncoalveolar formó parte del diagnóstico.

El diagnóstico final se estableció de 2 formas: *a)* con confirmación histológica, y *b)* diagnóstico clínico sin confirmación histológica, basado en los datos clínicos y analíticos, estudio funcional, TACAR, parámetros celulares e inmunitarios en el BAL y el propio seguimiento de los pacientes a lo largo del tiempo.

El diagnóstico final fue establecido por el servicio de Neumología de nuestro centro hospitalario, el cual quedó reflejado en el historial clínico de cada paciente (en el programa informático Diraya del Sistema Andaluz de Salud). Los datos clínicos para la realización de este estudio (diagnóstico clínico de cada paciente) fueron tomados del sistema electrónico de historias clínicas Diraya y relacionados directamente con los datos por el personal de laboratorio de Bioquímica Clínica.

El estudio fue aprobado por Comité de Ética de la Investigación de nuestro centro.

*Lavado broncoalveolar:* El lavado broncoalveolar fue realizado a través de un fibrobroncoscopio (Olympus). El volumen de instilación fue de 180 ml. Se recuperaron al menos 3 alícuotas que fueron enviadas a los diferentes laboratorios (Bioquímica general, Microbiología y Anatomía Patológica) para su estudio completo.

Conjuntamente a la obtención del BAL, se tomó una muestra de sangre periférica de cada paciente por venopunción.

A pesar de la variabilidad (tabaquismo o edad, sobre todo) está aceptado que la celularidad presente en el fluido BAL, en sujetos normales, es: mayoritariamente macrófagos (80-95%), linfocitos (< 15%), y neutrófilos (2-5%). Los eosinófilos, basófilos y células plasmáticas forman el grupo minoritario (1-3%).

*Procesamiento del lavado broncoalveolar:* El antisuero empleado para la identificación y determinación de los porcentajes y recuentos absolutos de linfocitos fue el reactivo TBNK de 6 colores BD Multitest de Becton Dickinson.

El estudio inmunológico, realizado por citometría de flujo (citómetro BD FACSCanto II), incluyó en ambas muestras la identificación y recuento de linfocitos T, B y NK, monocitos y polimorfonucleares, así como las subpoblaciones CD4+ y CD8+ de linfocitos T y la relación existente entre ambas (cociente CD4+/CD8+).

## Resultados

En el estudio se incluyen 44 pacientes: 32 pacientes con sarcoidosis y 12 pacientes que presentaron neumonitis por hipersensibilidad.

La edad media ( $\pm$  desviación estándar) de la muestra fue  $60.80 \pm 15.46$  años.

En cuanto al sexo, el 62% eran hombres (N = 27) y 38% eran mujeres (N = 17).

En relación a la sarcoidosis, los pacientes fueron: 22 de ellos eran mujeres (70%) y 10 hombres (30%); y la edad media de esta población fue  $56.1 \pm 11.07$  años. Se evidenciaron diferencias para la edad y el sexo con respecto al resto de patologías respiratorias difusas; así en la sarcoidosis predominó el sexo femenino sobre el masculino y la edad media de presentación fue más temprana ( $56.1 \pm 11.07$ ).

Para valorar la utilidad diagnóstica del lavado broncoalveolar pasaremos a describir los resultados obtenidos para cada una de las patologías respiratorias:

En primer lugar, en el estudio de los pacientes con sarcoidosis, nuestros resultados concluyeron que la sarcoidosis se presenta como una alveolitis linfocitaria, con predominio de linfocitos CD4+: 60.94% ( $\pm 20.20$ ) linfocitos, 8.94% ( $\pm 19.00$ ) monocitos y 30.12% ( $\pm 16.19$ ) polimorfonucleares. Se observa un claro aumento de la población linfocitaria con respecto al resto de poblaciones celulares en BAL.

Por otro lado, en relación al cociente de subpoblaciones linfocitarias CD4+/CD8+, podemos afirmar que existe un claro aumento de dicho cociente en el lavado broncoalveolar con respecto a los valores de dicho cociente en sangre. La media del cociente CD4+/CD8+ en sangre fue  $1.09 (\pm 0.59)$ , mientras que en lavado broncoalveolar fue de  $5.35 (\pm 3.75)$ . De esta forma, puede verse que la mayoría de los pacientes (68.8% de los pacientes) muestran un cociente CD4+/CD8+ superior a 3.5.

En segundo lugar, en relación a los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad, al igual que en el caso anterior, el estudio de BAL presentó un aumento de linfocitos: 63.33% ( $\pm 10.40$ ) linfocitos, 5.00 ( $\pm 0.00$ ) monocitos, 31.67 ( $\pm 10.40$ ) polimorfonucleares.

Sin embargo, el cociente en estos pacientes estaba notablemente disminuido en BAL con respecto a los valores encontrados en sangre periférica: la media del cociente CD4+/CD8+ en sangre fue de  $2.07 (\pm 1.47)$ , mientras que dicho cociente toma valores de  $0.2 (\pm 0.119)$  en BAL.

## Discusión

La utilidad diagnóstica de BAL ha sido objeto de numerosos estudios. La mayor parte de ellos coinciden en el valor diagnóstico del BAL ante determinadas patologías, como la proteinosis alveolar, histiocitosis X o la hemorragia alveolar. Pero a esto debemos sumarle que no son pocos los trabajos que aún discuten su utilidad en muchas otras EPID (sarcoidosis, neumonías asociadas a fármacos o conectivopatías), donde parece tener un valor mayormente orientativo, no diagnóstico. Por este motivo, en la mayoría de los trastornos respiratorios, el estudio del BAL no parece suficiente para el diagnóstico final.

En relación a nuestro trabajo, coincidimos con la bibliografía consultada, en el valor diagnóstico de BAL en determinadas EPID, entre las que incluimos la sarcoidosis y la neumonitis por hipersensibilidad, en las que BAL presenta un alto valor como<sup>5-7</sup>.

La sarcoidosis es una enfermedad multisistémica de origen desconocido, que se caracteriza por la presencia de granulomas no caseificantes. Debido a esta característica multisistémica el enfoque diagnóstico puede ser complejo (no existe una prueba de diagnóstico individual para la sarcoidosis).

A pesar de que la sarcoidosis puede afectar a múltiples órganos, el pulmón está implicado en la mayoría de los casos (80-95% de los casos). Los síntomas pulmonares incluyen disnea, tos, malestar, y sibilancias. Otros órganos frecuentemente afectados son: ojos, piel y ganglios linfáticos<sup>8</sup>.

La sarcoidosis afecta predominantemente a adultos jóvenes. La mayor parte son personas de 20-40 años, y es claramente más frecuente en mujeres que en hombres (relación 3:1). Este hecho fue confirmado en nuestros pacientes, en los que se concluyó una mayor incidencia en mujeres jóvenes.

Aunque su etiología es desconocida se apunta a una causa de origen genético ligado a determinados factores ambientales. En cuanto a los factores genéticos, parecen tener mayor susceptibilidad de padecer la enfermedad aquellas personas con HLA DR11, 12, 14, 15 y 17; por otra parte, los estudios parecen concluir que poseer HLA DR1 y DR2 confiere un carácter protector. En cuanto a los factores exógenos cabe citar: microbianos (micobacterias), agentes orgánicos (polen de pino), inorgánicos (berilio, aluminio) o fármacos (metotrexato).

Así, los granulomas característicos que se forman son debidos a una respuesta inmune persistente frente a antígenos que actúan de forma continuada, capaces de inducir una respuesta exagerada en individuos genéticamente predispuestos.

Como consecuencia de esta reacción inmunitaria, los pacientes diagnosticados de sarcoidosis, presentaron una alveolitis linfocitaria con notable aumento del cociente CD4+/CD8+ en BAL. De esta forma, un 68.8% de los pacientes presentaron un cociente CD4+/CD8+ superior a 3.5. Un aumento del citado cociente es muy específico de la enfermedad sarcoidea (mientras que el aumento de linfocitos es más sensible). Así, la bibliografía consultada apunta a que aquellos pacientes que muestran un cociente CD4+/CD8+ > 4 presentan una alta probabilidad de desarrollar sarcoidosis (valor predictivo del 94%), mientras que cocientes CD4+/CD8+ < 1 permiten excluir la enfermedad<sup>9-11</sup>.

Este hecho parece relacionado con la propia naturaleza de la enfermedad, la cual se caracteriza por la presencia de granulomas no caseificantes constituidos fundamentalmente por macrófagos y linfocitos CD4+, que aparecen como consecuencia de una respuesta inmunológica exagerada.

En segundo lugar, la neumonitis por hipersensibilidad es una enfermedad intersticial difusa, que habitualmente se caracteriza por la presencia de granulomas (en el 60% de los casos), ocasionados por la inhalación crónica de una amplia variedad de productos orgánicos. En este grupo incluimos multitud de sustancias: soja, paja, madera, grano de café, caña de azúcar, embutidos... Casi siempre su origen es ocupacional. Las más frecuentes son: "el pulmón del granjero" (heno enmohecido, Ag T. vulgaris) y "la enfermedad del pulmón del cuidador de aves" (suero, proteínas y excrementos de ave, Ag T. vulgaris).

La patogenia se basa en una reacción inmunológica frente a estas partículas inhaladas, dando lugar a reacciones de hipersensibilidad tipo III (mediada por inmunocomplejos y linfocitos CD8+) y reacción de hipersensibilidad tipo IV (mediada fundamentalmente por linfocitos CD8+ y responsable de la formación de granulomas)<sup>12</sup>.

En pacientes con neumonitis por hipersensibilidad el estudio inmunológico por citometría de BAL presentó un alto valor. La NH por su carácter granulomatoso y su clínica de manifestación extrapul-

monar (tos, disnea o pérdida de peso), presenta un diagnóstico complejo, ya que puede ser clínicamente similar a otras patologías, como la sarcoidosis.

Todos los pacientes con NH muestran alteraciones en el BAL, de tal manera que un BAL sin alteraciones excluye el diagnóstico de NH. Es el método más sensible. Predomina la linfocitosis, con linfocitos CD8+, que aparecen como consecuencia de la reacción de hipersensibilidad tipo III y IV que se produce frente a las partículas inhaladas, por tanto, los cocientes en estos pacientes se observan menores a uno. Un aumento de linfocitos CD4+ lleva a pensar en un mal pronóstico, pues un aumento de CD4+ (así como de neutrófilos) se ha relacionado con una mayor posibilidad de fibrosis<sup>13</sup>.

Como puede observarse, estas patologías pueden presentar una clínica común que dificulta en gran medida su diagnóstico, sin embargo, existen claras diferencias en relación a las poblaciones celulares presentes en el lavado broncoalveolar. Así, en aquellas circunstancias en las que es difícil diferenciar entre NH y sarcoidosis, el estudio citológico de BAL nos ha permitido orientar el diagnóstico, ya que en la primera se observan cocientes CD4/CD8 disminuidos en BAL y en la segunda patología estos cocientes aumentan considerablemente su valor.

## Conclusiones

Las enfermedades pulmonares intersticiales (EPID) suponen, en la mayoría de los casos, todo un reto diagnóstico para el clínico.

Sin embargo, en el contexto clínico y diagnóstico adecuado, el análisis del lavado broncoalveolar por citometría de flujo resulta útil en el estudio de la enfermedad pulmonar, presentando un alto valor diagnóstico en ciertas patologías como la sarcoidosis y la neumonitis por hipersensibilidad.

Del mismo modo, tras la revisión realizada, consideramos que son necesarios más estudios acerca del lavado broncoalveolar, con el fin de descubrir nuevos marcadores en BAL, de cualquier naturaleza (inmunológicos, bioquímicos, celulares), más específicos, que contribuyan a un mejor conocimiento de la enfermedad pulmonar intersticial difusa.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses

**Fuente de financiación:** Ninguna.

## Bibliografía

1. Kalchier-Dekel O, Galvin JR, Burke AP, Atamas SP, Todd NW. Interstitial Lung Disease and Pulmonary Fibrosis: A Practical Approach for General Medicine Physicians with Focus on the Medical History. *J Clin Med*. 2018; 7(12): 476.
2. Ryu JH, Daniels CE, Hartman TE, Yi ES. Diagnosis of interstitial lung diseases. *Mayo Clin Proc*. 2007; 82(8): 976-86.
3. Wells AU. The clinical utility of bronchoalveolar lavage in diffuse parenchymal lung disease. *Eur Respir Rev*. 2010; 19(117): 237-41.
4. Meyer KC. The clinical utility of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease - is it really useful? *Expert Rev Respir Med*. 2014; 8(2): 133-5.
5. Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful? *Eur Respir J* 2011; 38(4): 761-9.
6. Martin WR, Padrid PA, Cross CE. Bronchoalveolar lavage. *Clin Rev Allergy* 1990; 8(2-3): 305-32.
7. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018; 120: 5.1.1-5.1.2.
8. Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 2007; 357(21): 2153-65.
9. Drent M, Mansour K, Linszen C. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28(5): 486-95.
10. Kantrow SP, Meyer KC, Kidd P, Raghu G. The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *Eur Respir J* 1997; 10: 2716-21.
11. Oda K, Ishimoto H, Yatera K, et al. Relationship between the ratios of CD4/CD8 T-lymphocytes in the bronchoalveolar lavage fluid and lymph nodes in patients with sarcoidosis. *Respir Investig* 2014; 52(3): 179-83.
12. Ohshimo S, Bonella F, Guzman J, Costabel U. Hypersensitivity pneumonitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2012; 32(4): 537-56.
13. Drent M, van Velzen-Blad H, Diamant M, Wagenaar SS, Hoogsteden HC, van den Bosch JM. Bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis: effect of time elapsed since antigen exposure. *Eur Respir J* 1993; 6(9): 1276-81.