ESTUDIO DE LA AFECTACIÓN PULMONAR EN LA ARTRITIS REUMATOIDE A TRAVES DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR

J. Ancochea Bermúdez.
Servicio de Neumología. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid.

INTRODUCCIÓN

Ellman y Ball (1948)[1] son probablemente los primeros autores que aluden al pulmón como órgano diana dentro del espectro extraarticular de la Artritis Reumatoide (AR). La AR, enfermedad inflamatoria crónica de causa desconocida, puede asociarse con una variedad de anormalidades pulmonares que incluyen la enfermedad pleutal, nódulos reumatoideos, síndrome de Caplan, vasculitis, bronquiolitis obliterante, enfermedad bullosa apical y enfermedad intersticial pulmonar[2-3] (Tabla 1). De ellas, la más frecuente e interesante es la neumopatía intersticial. Ésta, manifestada en la radiología simple, ocurre en un escaso porcentaje de enfermos. Sin embargo, utilizando parámetros sensibles de función pulmonar y muestras de biopsias pulmonares, se ha establecido que muchos, quizás la mayoría, de los pacientes con AR tienen enfermedad intersticial clínica o subclínica.

TABLA 1

MANIFESTACIONES PLEUROPULMONARES DE LA AR

- Enfermedad pulmonar intersticial (EPID)
- Enfermedad pleural
- Nódulos reumatoides (necrobióticos) Nódulos neumoconióticos (Síndrome de Caplan)
- Infecciones del tracto respiratorio/bronquiectasias
- 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

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 Felty y síndrome de Sjögren secundario y, por último y muy importante, los diferentes medicamentos empleados en el tratamiento de la AR. 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. Algunos de los fármacos en los que está documentado un potencial papel fibrogenético, se utilizan comúnmente en el tratamiento de la AR[4].

Asumiendo el papel de todos estos factores, hoy en día es comúnmente aceptado 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 en que su progresión puede conducir a incapacidad funcional mayor que la derivada de la propia afectación articular[5].

En este contexto, se ha sugerido que el lavado broncoalveolar (BAL) es un instrumento útil 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 en estos pacientes.

Dentro de este complejo escenario, los linfocitos T desempeñan un papel central en los mecanismos de acción y control de la respuesta inmune. También se sabe que el proceso de activación va acompanado de una serie de cambios fenotípicos y moleculares en la superficie de los LT, donde antígenos ya existentes cambian cualitativa y cuantitativamente, apareciendo asimismo nuevas estructuras moleculares[4].

Por otra parte, 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 de colágeno. Los MA, por otra parte, son importantes como "células presentadoras de antígeno" al LT, al que activan e inducen a elaborar productos solubles, y como células responsables de la fagocitosis local de partículas y microorganismos que nos invaden a través de la vía aérea. Por último, los MA son una importante fuente de citocinas[6].

Las citocinas 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. El factor de necrosis tumoral- α(TNF-α) y la interleucina-6 (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[4-7].

HIPÓTESIS DE TRABAJO

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 citocinas 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 anticuerpos monoclonales (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 lipopolisacátido bacteriano -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.

DISEÑO Y METODOLOGÍA
1.- ASPECTOS CLÍNICO-DIAGNÓSTICOS

Pacientes estudiados. Treinta y siete enfermos, 25 mujeres y 12 varones, con AR (criterios de la ACR de 1988)[8] fueron estudiados prospectivamente. Los pacientes, con una edad media de 58.3 años, procedían mayoritariamente de la sección de reumatología del Hospital Universitario 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[9]. Los enfermos con antecendentes 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[6-7] en 16 casos, utilizando un análisis semicuantivativo previamente descrito por Line, et al.[10].

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

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) y 12 fumadores (F) (7 varones y 5 mujeres; edad media, 28.1 años). 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.

Clasificación de la población 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. Ésta se definió por la presencia de anormalidades radiográficas en la radiografía de tórax 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. Grupo 2 (AR - EPID) (n= 22). Pacientes con AR sin enfermedad pulmonar intersticial. 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 língula del pulmón contralateral al afectado.

TABLA 2

ANTICUERPOS MONOCLONALES*		
AcM	Especificidad	Distribución celular
D3/9	CD45	Leucocitos
SpVT3b	CD3	Células T maduras
HP 2/6	CD4	Subpoblación celular T, monocitos
B 9.4	CD8	Subpoblaciones celulares T y NK
Bu/12	CD19	Células B
MAR 108	CD25	Linfocitos activados y monocitos
TS 1/2	HLA-DR	Células B, monocitos, células T activadas
FG 1/6	CD 71	Células activadas
FG 1/10	4F2	Monocitos, linfocitos activados
TS 2/7	CD49a	Linfocitos activados
TP1/55	CD69	Células activadas T, B y NK
Bear 1	CD11b	Células NK, monocitos, subpoblación T minor
B73. 1	CD16	Células NK, monocitos, subpoblación T minor
Leu 19	CD56	Células NK, subpoblación celular T minor
HNK 1	CD57	Células NK, subpoblación T minor

* La tabla refleja sólo la distribución en leucocitos.

2.- ESTUDIO COMPARATIVO DE ANTÍGENOS DE DIFERENCIACIÓN LEUCOCITARIA EN LINFOCITOS DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL) Y SANGRE PERIFÉRICA (LSP) DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA

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

El grupo control está constituido por 16 voluntarios sanos, pertenecientes a los grupos 3 y 4, de los cuales 8 eran no fumadores y 8 fumadores. Se incluyeron además 7 pacientes con AR sin neumopatía intersticial asociada, pertenecientes al grupo 2 (AR-EPID), todos no fumadores.

Separación de las células y análisis por inmunofluorescencia. Se siguieron los pasos y metodología ya publicados por nuestro grupo[11].

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 suplementado con 10% de suero de ternera fetal (medio completo).

Posteriormente, las células se incubaron con medio completo durante 1 hora a 37ºC 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., con diferentes anticuerpos monoclonales (AcM) (Tabla 2), 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. Harpeaden, Gran Bretaña). La población linfoide se seleccionó estableciendo una ventana en función de los parámetros de dispersión frontal de la luz (forward fight scatter) (FLS) y dispersión a 90º (90º 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 1000 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.

3.- ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE TNF- (αE IL-6 POR LOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA Y CONTROLES SANOS

Grupo de estudio. El estudio 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).

Metodología

1. BAL, según técnica convencional.
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 106 células viables/pocillo en 1 ml de medio completo (RPMI 1640 + 10% en suero de ternera fetal), durante 1 hora a 37ºC y 5% de CO_2.
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) (100u/ml) durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2.
6. Recogida del sobrenadante a las 24 horas, centrifugación y congelación a -80ºC.
7. Detección de TNF- αe IL-6 por ELISA[12-13].

4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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 (X2) con correción 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 poblaciónes y subpoblaciones linfoides en AR y controles se expresan mediante el porcentaje de células positivas (X±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 BAUBAL.

La producción de TNF- αe 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 clínicos 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.

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.

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.

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, no se observaron diferencias en cuanto al tratamiento previo entre los grupos. Desde la puesta en marcha del protocolo en 1988, hemos podido observar 7 enfermos con AR y patología pulmonar inducida por fármacos, siguiendo los criterios propuestos por Hakala[14]. 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 existencia de EPID asociada se correlacionó con la presencia de títulos más altos de FR y de una VSG más elevada. 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 el 40% de los enfermos del grupo 1 la RT PA y L mostró cambios compatibles con neumopatía intersticial, aunque fue normal en todos los pacientes del grupo 2. 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 cambos 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 [6-7] 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

Ga[6-7] discrimine sobre la presencia o no de EPID, 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 $AaPO_2$, estadísticamente significativos, en el grupo 1. Sólo un 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 x 10000/ml en los cinco grupos, se observó una gran dispersión en los datos obtenidos. Los controles NF presentaban una menor celularidad (22.9 ± 7.1 x 10000/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 ± 13.6 x 10000/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.

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. Dieciséis 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 (>l2%).

Un estudio posterior de nuestro grupo[15] realizado en 32 pacientes con AR y sospecha de afectación pulmonar demostró que los enfermos con neutrofilia en el BAL mostraban peor evolución clínica, con alta mortalidad e incapacidad (media de seguimiento 4.8 años), a pesar de tratamiento esteroideo o inmunosupresor. Por el contrario, la existencia de un patrón linfocítico en el BAL se asoció a buena evolución, no precisándose tratamiento adicional. Es de reseñar que se evidenció también neutrofilia en el BAL en un grupo de pacientes con AR y bronquiectasias que mostraron evolución favorable.

Subpoblaciones linfocitarias en lavado broncoalveolar y sangre periférica

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.

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. Para cada par de muestras, se analizó la MFI de la expresión de CD3, y se calculó la relación CD3 MFI-LSP/CD3 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. 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.

En lo que se refiere a la expresión de los marcadores de activación estudiados, 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 VI-A- 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. 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.

Se analizó la Posible influencia del hábito tabáquico en los resultados obtenidos. Mientras que en el grupo de enfermos con AR+EPID (n=15) 9 eran NF, 2F y 4 exfumadores, 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 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 NE 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, VLA-1 y HLA-DR, no existiendo diferencias significativas en cuanto a la expresión de 4F2. 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.

Producción de TNF-a e IL-6 por los macrófagos 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- a e IL-6 por los MA, mediante técnicas de ELISA.

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. Al comparar los datos de controles sanos F y NF se observó una clara tendencia a una mayor producción de TNFa en las muestras incubadas con LPS en el grupo NF, aunque no alcanzó significación estadística en relación a F, 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 y NF. Es reseñable, por último, que tanto la producción espontánea como la inducida de IL6, estaba significativamente reducida en el grupo F, no sólo al comparar las muestras con las del grupo AR, sino también al hacerlo con las de sujetos sanos NE

CONCLUSIONES

1. El BAL permite definir patrones característicos de alveolitis en la AR, según la presencia o no de EPID asociada y puede ser de utilidad en la detección temprana de neumopatía intersticial subclínica en estos pacientes. El análisis celular del BAL puede tener valor pronóstico y condicionar la actitud terapéutica.
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 significativarnente elevada en los MA de pacientes con AR y EPID asociada respecto a la de los controles, sugiriendo una hiperreactividad de los MA en estos enfermos, quizás presensibilizados como consecuencia del propio proceso inflamatorio pulmonar.
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 IL6.
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.
6. De los datos obtenidos en el presente estudio puede inferirse que el tratamiento con anticuerpos monoclonales (AcM) y el potencial terapéutico de inhibidores de determinadas citocinas como el TNF-α puede permitir el desarrollo de nuevas estrategias, con el objeto de interrumpir la cascada de acontecimientos patogénicos que conducen al desarrollo de EPID en la AR.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ellman P, Ball RE. Rheumatoid diseases with joint and pulmonary manifestations. Br Med J 1948; 2: 816-20.

2. King TE. Connective tissue disease. In: Schwarz MI, King TE, cds. Interstitial lung disease. St. Louis, Missouri. Mosby Year Book, 1993: 271-308.

3. Ancochea J, Carmona L, Girón R, Alvaro-Gracia JM. The spectrum of pulmonary manifestations in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1995; 38(9): S365.

4. Ancochea J. Aspectos clínico-diagnósticos e inmunológicos de la enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada a AR: aportación del lavado broncoalveolar. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 1993.

5. Roschmann RA, Rothenberg RJ. Pulmonary fibrosis in rheumatoid arthritis: a review of clinical features and therapy. Seminars Arthritis Rheum 1987; 16: 174-85.

6. Du Bois RM. The alveolar macrophage. Thorax 1985; 40: 321-7.

7. Kelley J. Cytokines of the lung. Am Rev Respir Dis 1990; 12.141: 765-88.

8. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988; 31: 315-24.

9. Molina R, Provost TT, Amett FC, et al. Primary Sjögren's syndrome in men. Clinical, serological and immunogenetic features. Am J Med 1986; 80: 23-31.

10. Line BR, Fulmer JD, Reyno1ds HY, Roberts WC, Jones 14. AE, Harrys EK, Crystal RG. Gallium 67 citrate scanning in the staging of idiopathic pulmonary fíbrosis: coffelations with physiologic and morphologic features and bronchoalveolar lavage. Am Rev Respir Dis 1978; 118: 355-65.

11. 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 1993; 104: 32-7.

12. Aramburu J, Rodríguez A, Balboa MA, Melero I, Alonso JL, Alonso M, López-Botet M. Stimulation of IL-2 activated natural killer cells through the Kp43 surface antigen upregulates TNF-a production involving the LFA-1 integrin. J Immunol 1993; 151: 3420-9.

13. Jochems GJ, Klein MR, Jordans R, et al. Heterogencity in both cytokine production and responsiveness of a panel of monocional human Epstein-Barr virus transformed Bcells lines. Hum Antibod Hybridornas 199 1; 2: 57-64.

14. Hakala M. Poor prognosis in patients with rheumatoid arthritis hospitalized for interstitial lung fibrosis. Chest 1988; 93: 114-8.

15. Carmona L, Girón R, Ancochea J. Neutrophilia in bronchoalveolar lavage is marker for bad prognosis in interstitial lung disease associated to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1995; 38(9): S364.