



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Utilidad diagnóstica y pronóstica de la citometría de flujo multiparamétrica del lavado broncoalveolar en la enfermedad pulmonar.

D. Erika María Novoa Bolívar

2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Utilidad diagnóstica y pronóstica de la citometría de flujo
multiparamétrica del lavado broncoalveolar en la enfermedad
pulmonar.

Autor: D. Erika María Novoa Bolívar

Director/es: D. Alfredo Minguela Puras y D. José Antonio Ros
Lucas



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Erika María Novoa Bolívar.

doctorando del Programa de Doctorado en

Denominación de su programa de doctorado: Ciencias de la Salud

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Utilidad diagnóstica y pronóstica de la citometría de flujo multiparamétrica del lavado broncoalveolar en la enfermedad pulmonar.

y dirigida por,

D./Dn. Alfredo Minguela Puras

D./Dn. José Antonio Ros Lucas

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados

Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 26 de Septiembre de 2023

Fdo.: *Erika M. Novoa Bolívar.*

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. D. Juan de Dios Berna, Profesor Titular de Universidad del Área de radiología en el Departamento de radiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Utilidad diagnóstica y pronóstica de la citometría de flujo multiparamétrica del lavado broncoalveolar en la Enfermedad Pulmonar.", realizada por D. ERIKA MARIA NOVOA BOLIVAR, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.



En Murcia, a 04 de Septiembre de 2023

Mod:T-20

D. Alfredo Minguela Puras, Doctor y Jefe de Sección del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, AUTORIZA A:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Utilidad diagnóstica y pronóstica de la citometría de flujo multiparamétrica del lavado broncoalveolar en la Enfermedad Pulmonar", realizada por D. ERIKA MARIA NOVOA BOLIVAR, bajo mi inmediata dirección y supervisión y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Firmado por MINGUELA
PURAS, ALFREDO (FIRMA) el
día 19/07/2023 con un
certificado emitido por AC
DNIE 006

En Murcia a 18 de Junio de 2023.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

D, **José Antonio Ros Lucas** DOCTOR de la Universidad de Murcia,
AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Utilidad diagnóstica y pronóstica de la citometría de flujo multiparamétrica del lavado broncoalveolar en la enfermedad pulmonar ", realizada por D^a Erika María Novoa Bolívar, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de septiembre de 2023.

Mod:T-20

AGRADECIMIENTOS

Han sido cuatro años de trabajo, dedicación y sacrificios, una inesperada pandemia ha puesto a prueba nuestra serenidad y resistencia, a pesar de los obstáculos en tiempos difíciles hemos sido capaces de crear, de trabajar en equipo y demostrar que durante la dificultad emerge una mejor versión de nosotros. Finalizado este trabajo de tesis, que ha significado redoblar esfuerzos para no restar rendimiento en la labor asistencial, no descuidar mi rol de madre, esposa, hija, hermana, amiga, compañera y médico, doy las gracias a las personas que me han acompañado y han contribuido con su trabajo, su ayuda, su apoyo y sus consejos. Gracias por las lecciones aprendidas.

Gracias a mi Padre, su voluntad es perfecta.

Gracias, a mis directores de tesis, al Dr. Alfredo Minguela Puras por su trabajo constante, su ayuda y perseverancia, por aportarme nuevos conocimientos en investigación.

Gracias al Dr. José Antonio Ros Lucas por el tiempo dedicado a este trabajo durante estos años, por su paciencia y su labor docente.

Gracias, a los pacientes que han participado en este estudio, a ellos/as dedico todo mi esfuerzo y espero que los resultados de este trabajo puedan contribuir a mejorar las vidas de otros enfermos en un futuro.

Gracias, a los médicos y personal sanitario de los diferentes hospitales de la Región de Murcia, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Hospital Reina Sofía, Hospital Santa Lucía, Hospital Virgen del Rosell, Hospital Comarcal del Noroeste (Caravaca), Hospital Virgen del Castillo (Yecla), Hospital de la Vega Lorenzo Guirao (Cieza), a los servicios de Neumología, Medicina interna, Reumatología, Urgencias, Unidades de Cuidado Intensivo, Radiología y Anatomía Patológica, quienes con su trabajo han aportado la información clínica necesaria para este trabajo. Al Dr. Andrés Parilla Almanza, por compartir su conocimiento y experiencia.

Gracias al personal del laboratorio de citometría de flujo del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), los Dres. José Antonio Campillo Marquina, Dra. Ruth López, al personal técnico y quienes han contribuido con su trabajo a la construcción de esta tesis. A quienes ya partieron de este mundo, como Flori Villar, aportando con su trabajo resultados que hoy hacen parte de esta tesis.

Gracias, a Almudena Otálora y Cristina Ortuño, por su colaboración en la primera fase de este trabajo.

Gracias, a Fernando Pérez Sanz del instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), por sus aportaciones en matemáticas y estadística computacional.

Gracias al Servicio de Informática del Hospital Virgen de la Arrixaca, por su ayuda y orientación.

Gracias a mis compañeros Facultativos y Residentes del Servicio de Inmunología del Hospital Virgen de la Arrixaca, por la paciencia y los gestos de generosidad que han tenido conmigo.

Gracias al Dr. Manuel Muro Amador, por su comprensión y devoción al esfuerzo.

Gracias a la Dra. María del Rocío Álvarez López, y la Dra. Ana María García Alonso, quienes me iniciaron en la investigación.

Gracias a mi familia, a mi esposo Augusto González Rodríguez, por ayudarme a comprender que el proceso de transformación requiere de la práctica continua, por su paciencia y apoyo, a mi hijo Juan David González Novoa por la responsabilidad que ha demostrado, por entender mis ausencias, a los dos, por compartir mi carga y luchar a mi lado.

Gracias a mi madre María Guadalupe de la Cruz Bolívar Pinzón, madre ejemplar, antropóloga, teóloga, filósofa y gran mujer, por ser incondicional, por enseñarme a luchar y a no rendirme a pesar de la adversidad, su ejemplo y fortaleza han sido mi inspiración.

Al Dr. Pablo Jaime Novoa Guzmán, gracias por sus enseñanzas. Q.E.P.D.

Gracias a mi amiga María Carmen Botella Martínez, por su compañía, por recordarme constantemente que mi destino está en cada paso que doy, que quien cae es capaz de levantarse nuevamente, por estar siempre.

Gracias a María Victoria Martínez Sánchez, por animarme siempre a continuar el rumbo sin mirar atrás.

Gracias a todos y todas quienes han contribuido en algún momento de este trabajo y mi memoria no hace justicia a su valiosa labor.

Lo que sabemos es una gota de
agua; lo que ignoramos es el
océano.

Isaac Newton

PRODUCCION CIENTIFICA

TRABAJOS FIN DE GRADO

1. Patología inmunitaria. Estudio citológico del lavado broncoalveolar mediante citometría de flujo. Doctoranda: Almudena Otalora Alcaráz. Director: Alfredo Minguela Puras. Defensa: 10-junio 2019. Calificación: Matrícula de honor.
2. Impacto en la supervivencia global de los pacientes con patología pulmonar intersticial difusa del contenido celular del lavado broncoalveolar. Doctoranda: Cristina Ortuño Hernández. Directores: Alfredo Minguela Puras. Defensa: 1-junio 2022. Calificación: Matrícula de honor.

COMUNICACIONES A CONGRESO

1. E.M. Novoa Bolívar, J.A. Ros Lucas, R. González López, C. Martínez Solano, A. Fernández Torres, V. López Sánchez, J.A. Campillo Marquina, R. López Hernández, A. Otalora Alcázar, C. Ortuño Hernández, A. Minguela Puras. "La tasa de neutrófilos del lavado broncoalveolar como guía para personalizar la terapia inmunosupresora en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial". XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. 10 al 13 de mayo de 2023, Bilbao.
2. R. González López, E.M. Novoa Bolívar, J.A. Ros Lucas, C. Martínez Solano, A. Fernández Torres, V. López Sánchez, J.A. Campillo Marquina, R. López Hernández, A. Otalora Alcaraz, C. Ortuño Hernández, A. Minguela Puras. "Las cifras de linfocitos T CD8 en el lavado broncoalveolar aportan valor pronóstico en la supervivencia de pacientes con cáncer". XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. 10 al 13 de mayo de 2023, Bilbao.

PUBLICACIONES

1. Prognostic value of flow cytometry quantification of BAL lymphocytes and neutrophils in ILD. Erika M. Novoa B, José A. Ros, José A. Campillo, Ruth López-Hernández, Rosana González-López, Almudena Otalora, Cristina Ortuño-Hernández, Inmaculada Ruiz-Lorente, Manuel Muro, Alfredo Minguela. Sometido a E. Resp. J. 2023
2. Flow cytometry of BAL in the diagnosis of ILDs. En fase de redacción.

INDICE

ABREVIATURAS.....	XXI
INTRODUCCIÓN	2
1. GENERALIDADES DE LAS ENFERMEDADES PULMONARES INTERSTICIALES.	2
1.1. Epidemiología de las EPID	4
1.2. Clasificación de las EPID	4
2. DIAGNÓSTICO DE LA EPID.....	8
2.1. Diagnóstico clínico	9
2.2. Diagnóstico radiológico	13
3. ESTUDIO DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA).....	16
3.1. Análisis citológico del LBA.....	20
3.2. Análisis por citometría de flujo del LBA.....	23
4. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO EN LA EPID	25
5. ESTUDIOS DE FUNCIÓN PULMONAR	33
6. ESTIMACIÓN PRONÓSTICA EN LA PATOLOGÍA PULMONAR	34
7. NEUMONÍAS INTERSTICIALES IDIOPÁTICAS (NII)	35
7.1. Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI).....	37
7.2. Neumonía intersticial aguda (NIA).....	44
7.3. Neumonía intersticial no específica (NINE)	45
7.4. EPID asociadas al tabaquismo.....	46

7.5. Neumonía organizada criptogénica (NOC).....	49
7.6. Neumonía intersticial linfoide (NIL).....	50
7.7. Fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática	51
7.8. Neumonías intersticiales idiopáticas no clasificables.	51
8. EPID DE CAUSA CONOCIDA, O ASOCIADAS A ENTIDADES BIEN DEFINIDAS	52
8.1. EPID asociada a enfermedad enfermedades del tejido conectivo (EPID-ETC).....	52
8.2. EPID por inhalación de polvos (neumoconiosis).....	58
8.3. Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) o Alveolitis Alérgica Extrínseca.....	61
8.4. EPID inducidas por fármacos y radioterapia.....	64
9. EPID ASOCIADAS A OTROS PROCESOS NO BIEN CONOCIDOS	65
9.1. Sarcoidosis.....	65
9.2. Eosinofilias pulmonares.....	70
9.3. Histiocitosis pulmonar de celular de Langerhans (HPCL)	71
9.4. Linfangioleiomiomatosis (LAM).....	72
9.5. Otras enfermedades pulmonares menos frecuentes	72
10. TRATAMIENTO DE LA EPID	72
10.1. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO.....	72
10.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	73
10.3. Tratamiento de la Sarcoidosis	76
10.4. Antifibróticos como tratamiento de la FPI	78
10.5. Trasplante de Pulmón	79

JUSTIFICACION	84
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	86
MATERIALES Y MÉTODOS	88
1. PACIENTES Y MUESTRAS, VARIABLES DE ESTUDIO Y GRUPOS DE ESTUDIO	88
1.1.Pacientes y muestras	88
1.2.Criterios de exclusión	89
1.3.Variables de estudio.....	90
1.4.Grupos de estudio.	91
2. PRUEBAS RADIOLÓGICAS.....	93
3. PRUEBAS FUNCIONALES.	94
4. OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y ANÁLISIS CITOMETRICO DE LAS MUESTRAS LBA	95
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	98
RESULTADOS	102
1. Generalidades de las enfermedades pulmonares intersticiales	
1.1.Epidemiología de las EPID en la Región de Murcia.....	104
1.2. Patrones y localizaciones radiológicas.	104
1.3. Pruebas de función pulmonar (PFP).....	109
1.4. Supervivencia de pacientes con patología pulmonar	112
1.5. Impacto de parámetros clínicos y factores de riesgo en la supervivencia	116
1.6. Tratamientos en patología EPID.....	121
2. COMPOSICIÓN LEUCOCITARIA DEL LBA POR PATOLOGÍAS.....	124

2.1. Pacientes sin patología pulmonar.....	124
2.2. Patologías no-EPID.....	125
2.3. Composición leucocitaria del LBA en patologías EPID.....	125
2.4. Composición leucocitaria del LBA en patologías neoplásicas.....	128
3. DISTRIBUCIÓN DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS EN EL LBA SEGÚN PATOLOGÍAS.....	129
3.1 Leucocitos totales recuperados en el LBA por patologías.....	129
3.2. Linfocitos totales en el LBA por patologías.....	130
3.3. Macrófagos en el LBA por patologías.....	132
3.4. Neutrófilos en el LBA por patologías.....	133
3.5. Cociente Neutrófilo/Linfocito.....	134
3.6. Eosinófilos en el LBA por patologías.....	135
3.7. Células dendríticas en el LBA por patologías.....	137
3.8. Linfocitos B en el LBA por patologías.....	138
3.9. Linfocitos T CD4+, T CD8 y cociente CD4/CD8 por patologías.....	139
4. ANÁLISIS DE CLUSTERS DE LAS PATOLOGÍAS EPID EN BASE A PARÁMETROS DE CITOMETRÍA.....	145
4.1 Análisis de clusters con parámetros de citometría seleccionados.....	150
5. VALOR PRONÓSTICO DEL ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DEL LBA.....	151
5.1. Valor pronóstico del porcentaje de linfocitos totales.....	152
5.2. Valor pronóstico del porcentaje de neutrófilos.....	153
5.3. Efectos dosis dependiente y contrapuestos de linfocitos y neutrófilos en la SG de los pacientes con patología pulmonar.....	155

5.4. Valor pronóstico de la Combinación-linfocito/neutrófilo en patología EPID	156
5.5 Impacto del transporte del LBA desde otros hospitales en la capacidad pronóstica de la Combinación-NL.....	162
5.6 La tasa DLCO complementa el valor pronóstico de la Combinación-Linfocito/Neutrófilo.....	164
5.7. Asociación entre fibrosis y cifras elevadas de neutrófilos	166
5.8. Valor pronóstico del porcentaje de células dendríticas	167
5.9. Valor pronóstico del porcentaje de linfocitos T CD8 en pacientes con cáncer.	171
6. PARÁMETROS DE VALOR PRONÓSTICO EN GRUPOS DE PACIENTES CON EXPOSICIÓN A AGENTES ORGÁNICOS, INORGÁNICOS Y FÁRMACOS	173
6.1 En pacientes con neumonitis por contacto habitual con aves.....	173
6.2. En pacientes con neumonitis por fármacos.	175
6.3. En pacientes con neumonitis por inhalación sustancias orgánicas	176
7. LA TASA DE NEUTRÓFILO PUEDE AYUDAR EN LA PERSONALIZACIÓN DE LAS TERAPIAS	176
DISCUSIÓN	182
1. ACERCA DE LAS APORTACIONES DE ESTE ESTUDIO DE TESIS.....	182
2. ACERCA DE LA CONFIGURACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	182
3. ACERCA DE LAS APORTACIONES DE LAS PRUEBAS RADIOLÓGICAS Y FUNCIONALES.....	189
4. ACERCA DE UTILIDAD DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DEL LBA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA PATOLOGÍA PULMONAR	194
5. ACERCA DE LOS MARCADORES PRONÓSTICOS QUE APORTA LA CITOMETRÍA DEL LBA A LA PATOLOGÍA PULMONAR	200
LIMITACIONES Y ACCIONES FUTURAS.....	210

CONCLUSIONES.....	214
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	218
ANEXO	288

ABREVIATURAS

6MM: Test de 6 minutos Marcha.

ABPA, aspergilosis broncopulmonar alérgica

AATB, aspiración con aguja transbronquial

ACPA, Anticuerpos antiproteínas citrulinadas

ANA, anticuerpos antinucleares

ANCA, anticuerpos anti-citoplasma del neutrófilo

AOS, Apnea Obstructiva del Sueño

AR, artritis reumatoide

ATS/ERS, *del inglés, American thoracic society/European respiratory society*

BALF, *del inglés BAL fluid*

BPTB biopsia pulmonar transbronquial

CCAA, comunidad autónoma

CEFPI, combinación enfisema-FPI

CK, createnina quinasa

CMH, complejo mayor de histocompatibilidad

CFR, Capacidad funcional residual

DC, *del inglés dendritic cell*

DLCO, *del inglés diffusing Capacity for carbon monoxide.*

DMMA, diámetro de masa media aerodinámica

EA-VIH, exacerbación aguda en paciente

ECA, enzima convertidora de angiotensina

ENA, anticuerpos extraíbles del núcleo

EPID, enfermedad pulmonar intersticial difusa

FEEL, fibroelastosis pleuropulmonar

FEV-1, volumen espiratorio forzado en primer segundo

FIAT, fibrosis intersticial asociada a tabaco

FPI, fibrosis pulmonar idiopática

FQ, fibrosis quística

FVC, capacidad vital forzada

FPF, fibrosis pulmonar familiar

GCP, granulomatosis con polivascularitis

GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HAD, hemorragia alveolar difusa

HPCL, histiocitosis pulmonar de células de Langerhans

IMIB, instituto murciano de investigación biosanitaria
IPAF, del inglés *Interstitial Pneumonia Autoimmune Features*
IT, investigación traslacional
NO, neumonía organizada
IMF, intensidad media de fluorescencia
KCO, constante de difusión para el monóxido de carbono
LBA, lavado broncoalveolar
LAM, Linfangioleiomiomatosis
LDH, lactato deshidrogenasa
MA, macrófagos alveolares
ME, microscopía electrónica
MEC, matriz extracelular
NAVM, neumonía asociada a ventilación mecánica
NIA, neumonía intersticial aguda
NID, neumonía intersticial de descamativa
NIL, neumonía intersticial linfoide
NINE, neumonía intersticial no específica
NH, neumonitis por hipersensibilidad
NOC, neumonía organizada criptogénica
OMS, organización mundial de la salud
p-ANCA, Ac. perinuclear anticitoplasma de neutrófilos
PAP, proteinosis alveolar pulmonar
PCI, prevención en el control de las infecciones
PCR, proteína C reactiva
PDFG, factor derivado de crecimiento de plaquetas
PVM, polivasculitis microscópica
RAGE, receptor de productos finales de glicación avanzada
RE, retículo endoplásmico
Rx, radiografía
SSA, síndrome anti-sintetasa
SCS, síndrome de Churg-Strauss
SDRA, síndrome de dificultad respiratoria aguda
SMS, servicio murciano de salud
TACAR, tomografía computarizada de alta resolución
VATS, biopsia mediante toracoscopia videoasistida
VIH, virus de la inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades pulmonares incluyen entidades que pueden afectar diferentes estructuras del árbol respiratorio. Factores como el amplio rango de partículas, aerosoles presentes en el ambiente, el tabaquismo, explican la naturaleza diversa de los desórdenes y los resultados muchas veces desproporcionados a los cuales los procesos fisiopatológicos de la vía aérea deben hacer frente, e incluyen una respuesta inmunitaria amplia y a veces desproporcionada.

Pese a la multitud de procesos respiratorios desencadenados en el pulmón, las enfermedades respiratorias más prevalentes a nivel mundial son, EPOC, asma, infecciones respiratorias agudas, tuberculosis (TBC), cáncer de pulmón. Otras como AOS, también forman parte de los procesos respiratorios más frecuentes de la población.

1. Generalidades de las enfermedades pulmonares intersticiales.

El término enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) engloba un amplio y heterogéneo grupo de entidades patológicas que difieren significativamente en su forma de presentación, etiología, sistemas de prevención, tratamiento y pronóstico. Muchas de estas enfermedades no tienen etiología definida, afectan el espacio alveolo-intersticial y la vasculatura pulmonar, entre ellas destacan la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonitis por hipersensibilidad (NH), las enfermedades pulmonares asociadas al tejido conectivo (EPID-ETC) y la sarcoidosis como las más prevalentes. Se trata de enfermedades muy incapacitantes que comparten características comunes de cicatrización pulmonar, patrones radiológicos algunos definitorios. Se asocia a pérdida progresiva de la transferencia normal de gases y deterioro en la calidad de vida. En los últimos años la ciencia ha avanzado en el conocimiento de estas enfermedades, fundamentalmente en aquellas patologías cuyo resultado es la fibrosis pulmonar.

En su preocupación constante por mejora de la calidad de vida de este colectivo, en 2002 se publicó el consenso internacional de la *american thoracic society/european respiratory society* (ATS/ERS), que estableció una clasificación uniforme del diagnóstico de estas enfermedades basada en criterios clínicos, radiológicos y anatomopatológicos (1), actualizada en 2013 (2). Desde su publicación, se ha tomado como referencia para el diagnóstico de EPID por la mayoría de los centros y sociedades científicas dedicadas al

diagnóstico y manejo de estas enfermedades. En 2012 la ATS publica la guía de práctica clínica en la enfermedad pulmonar intersticial basada en el análisis celular del lavado broncoalveolar (LBA) (3). Adicionalmente, se han publicado guías para la práctica clínica en Sarcoidosis (4), neumonía intersticial con características autoinmunes (5), EPID-ETC (6), NH (7) y FPI (8). Todas estas publicaciones, resumen los esfuerzos de las sociedades científicas por unificar los criterios para el diagnóstico, manejo, seguimiento y tratamiento de las EPID. Sin embargo, se ha realizado muy poco esfuerzo por aplicar e integrar la citometría de flujo al manejo clínico de estas patologías. La citometría de flujo ha irrumpido de forma decisiva en numerosas especialidades clínicas (hematología, inmunología, oncología, reumatología, etc.) tanto en el diagnóstico, como en el seguimiento y monitorización de las terapias de diversas patologías. En cambio, continúa sin aplicarse de forma decidida en la patología pulmonar, donde las células inmunitarias que infiltran el parénquima pulmonar y el espacio alveolar pueden ofrecer información crítica para el diagnóstico y la evaluación pronóstica de los pacientes. Este estudio de tesis pretende rellenar este vacío.

Para ello, es necesario conocer bien la fisiopatología del pulmón, un órgano constantemente expuesto a multitud de noxas presentes en el medio ambiente. La barrera mucosa respiratoria y el aclaramiento mucociliar son mecanismos homeostáticos que mantienen el equilibrio entre el epitelio y el medio externo, pero precisan de la intervención de elementos de la inmunidad(9). El macrófago es la célula más prevalente en la barrera epitelial alveolar, junto a linfocitos T efectoros. Sin embargo, éstas no son las únicas poblaciones responsables del cuidado y mantenimiento de la homeostasis inmunitaria del huésped(10). La forma más sencilla de recuperar y estudiar dichas células inmunitarias es mediante el uso del LBA. El LBA es la toma de muestras del tracto respiratorio inferior mediante la instilación y posterior recuperación de solución salina estéril en el momento de la broncoscopia. Este es un procedimiento importante que con frecuencia ayuda en el diagnóstico de la infección pulmonar, particularmente en el huésped inmunocomprometido y en otras patologías pulmonares(11).

1.1. Epidemiología de las EPID

La epidemiología es crucial para establecer la magnitud de la carga de una enfermedad en una población, permite establecer planes de prevención y el manejo de las enfermedades. También es fundamental para comprender los factores de riesgo y la patogenia de las enfermedades. Kaul y col. evaluaron la incidencia, prevalencia y frecuencias relativas de las EPID, obteniendo variaciones de la incidencia de 1 a 31,5 por 100.000/persona/año y de la prevalencia de 6,3 a 71 por 100.000 personas (12). De acuerdo con las afirmaciones de las últimas reuniones de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), la incidencia y prevalencia de la EPID irá en aumento, actualmente se estima que está alrededor de 8 casos por cada 100.000 habitantes, siendo la FPI la más frecuente, con una incidencia de 1,6 casos por cada 100.000 habitantes(13) ,(14),(15). En España se han realizado estudios epidemiológicos en Andalucía (Estudio RENIA), cuyos datos de incidencia (7,2/100.000 h) se asemejan a los obtenidos en el estudio nacional SEPAR(14). En Madrid (16) entre los años 2005-06 utilizando como referencia el consenso ATS/ERS publicado en 2002, con una incidencia de 3 casos/100.000 habitantes/año, siendo las neumopatías intersticiales idiopáticas (NII) las más frecuentes (FPI 29,5%, sarcoidosis 15,2% y EPID-ETC 13,3%)(17) ,(13).

En Europa se han realizado estudios epidemiológicos relacionados con la EPID en Reino Unido, donde describen una incidencia de 3-6 por 100.000/persona/año, en Finlandia la prevalencia fue de 16-18 100.000/persona/año. En Nuevo Méjico (EE. UU) la incidencia era de 11 y 7 por 100.000/persona/año para varones y mujeres, respectivamente(15,18).

En conjunto los datos muestran grandes diferencias en la prevalencia, que varían según la población y posiblemente de las influencias de otros factores.

1.2. Clasificación de las EPID

Aunque se conocen más de 150 causas diferentes de EPID, la clasificación propuesta por la ATS/ERS (Tabla 1) establece 3 grupos principales (1).

- 1) **De causa no conocida:** cuyo principal exponente es la FPI.
- 2) **EPID de causa conocida:** patologías cuya causa está bien establecida ya sea porque la enfermedad pulmonar se desarrolla en el contexto de una enfermedad autoinmune sistémica (AES) como la artritis reumatoide (AR), o en el caso de la

neumoconiosis y la NH porque la fuente es la inhalación de productos conocidos, de forma concomitante se pueden dar casos de EPID inducidas por fármacos. Con menor frecuencia se dan las EPID asociadas a enfermedades hereditarias en las cuales, muchos de los genes guardan relación con vías que conducen a alteraciones en el metabolismo del surfactante, a un aumento de la señalización de estrés del retículo endoplásmico (RE) y a un acortamiento de los telómeros. En estos casos, los estudios genéticos ofrecen una base molecular para poder explicar los fenotipos y en ocasiones, proporcionan información que influye directamente en el tratamiento de los pacientes (tablas 1 y 2)

Tabla 1. Clasificación de las EPID
<p>Neumonías intersticiales idiopáticas (NII): De causa no conocida</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fibrosis pulmonar idiopática (FPI) 2. Neumonía intersticial aguda (NIA) 3. Neumonía intersticial no específica (NINE) 4. Neumonías asociadas al tabaquismo <ul style="list-style-type: none"> - Bronquiolitis respiratoria con enfermedad pulmonar intersticial (BR/EPID) - Neumonía intersticial descamativa (NID) 5. Neumonía organizada criptogénica (NOC) 6. Neumonía intersticial linfoide (NIL) 7. Fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática 8. Neumonías intersticiales idiopáticas no clasificables
<p>EPID de causa conocida o asociada a otras entidades clínicas bien definidas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. EPID asociadas a conectivopatías (EPID-ETC) 2. Neumoconiosis (por polvos inorgánicos) 3. Neumonitis por hipersensibilidad (NH) 4. EPID inducidas por fármacos y radioterapia 5. EPID asociadas a enfermedades hereditarias (tabla 2)
<p>Grupo Heterogéneo de entidades primarias o asociadas a procesos no bien definidos.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sarcoidosis 2. Eosinofilia pulmonar 3. Linfangioleiomiomatosis (LAM) 4. Proteínosis alveolar 5. Microlitiasis alveolar 6. Histiocitosis pulmonar de células de Langerhans (HPCL) 7. Amiloidosis

3) **EPID asociadas a procesos no bien definidos**, dentro de este grupo se encuentran la sarcoidosis, histiocitosis de Langerhans, entre otras.

Tabla 2. Enfermedades hereditarias asociadas a EPID.

1. Esclerosis Tuberosa
2. Neurofibromatosis
3. Hipocalcemia Hipocalciuria Familiar
4. Síndrome de Hermansky-Pudlak
5. Enfermedades metabólicas (Enfermedad de Niemann-Pick, Enfermedad de Gaucher, Cistinuria, Lipogranulomatosis de Faber)
6. Deficiencia de la proteína B del Surfactante
7. Deficiencia fatal del surfactante
8. Proteínosis congénita.
9. EPID asociada a la reducción o mutación de la proteína C del surfactante.
10. Fibrosis Pulmonar Idiopática Familiar
11. Microlitiasis Alveolar

En 2013 se incorpora la última actualización, en la que se dividen las NII en mayores, raras y no-clasificables (2). Además, se incluye la fibroelastosis pleuropulmonar idiopática y la neumonía intersticial linfocítica (NIL) como patologías raras. Se elimina el término alveolitis fibrosante criptogénica y se acepta como entidad propia a la NINE. Las NII mayores se clasifican en fibrosantes crónicas (FPI), asociadas al tabaco como la neumonía intersticial descamativa (NID) y la bronquiolitis respiratoria asociada a EPID (BR-EPID), NII agudas/subagudas (NIA) y la neumonía organizada criptogénica (NOC), ver figura 1.

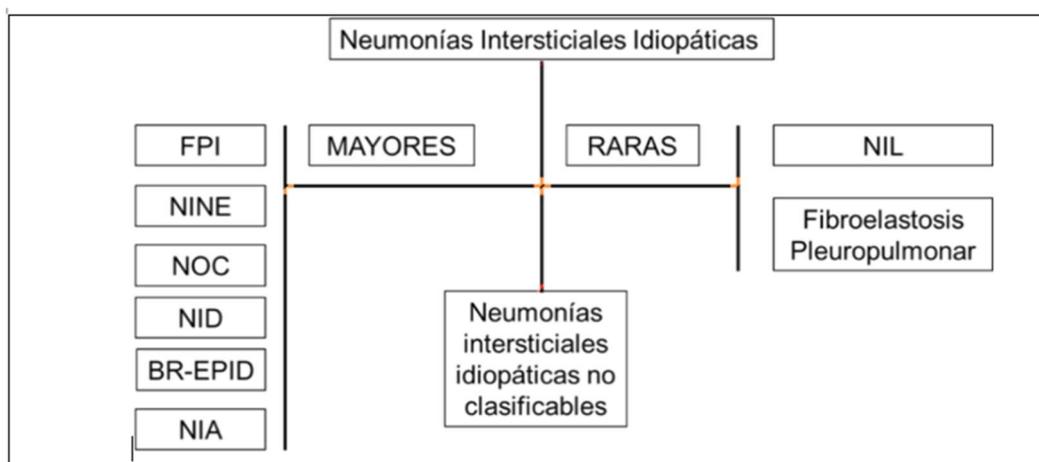


Figura 1. Clasificación Neumonías intersticiales idiopáticas. Actualización 2013

La actualización del 2013 hace especial énfasis en la relevancia de los comités multidisciplinares como “gold estándar” para el diagnóstico de las EPID, para presentar y discutir los hallazgos clínicos, radiológicos y anatomopatológicos, así como decidir las diferentes líneas de tratamiento (tabla 3). La experiencia constituye un factor relevante, por tanto, reafirma la existencia de comités con experiencia en los centros de referencia (2).

Tabla 3. Categorización radiológica y anatomopatológica en las NII mayores (Travis et al., 2013).		
Categoría	Diagnóstico (clínico/radiológico/patológico)	Cuadro radiológico y/o patológico
NI-Fibrosantes crónicas	FPI NINE	NIU NINE
NI-Relacionadas con tabaco	BR-EPID NID*	Bronquiolitis respiratoria NID
NI-Agudas/subagudas	NOC NIA	Neumonía organizada Daño alveolar agudo

Definición de abreviaturas: neumonía intersticial idiopática (NII), fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonía intersticial no específica (NINE), bronquiolitis asociada a enfermedad pulmonar intersticial (BR-EPID), neumonía intersticial difusa (NID), neumonitis organizada criptogénica (NOC), neumonía intersticial aguda (NIA), neumonía intersticial usual (NIU). *la NID puede ocasionalmente ocurrir en no fumadores.

2. Diagnóstico de la EPID

El abordaje diagnóstico de las EPID es complejo dada la similitud entre las características clínicas y su curso temporal variable, que puede ser agudo, subagudo o crónico. La causa puede ser conocida o desconocida, el contexto de la enfermedad en el momento de la presentación puede tener manifestaciones extrapulmonares y/o sistémicas. Una vez se ha reconocido una enfermedad intersticial en un paciente, el patrón y distribución de la imagen radiológica contribuyen a las primeras consideraciones diagnósticas. Para un diagnóstico más sutil la tomografía computarizada de alta resolución (TACAR) es la prueba diagnóstica clave. Aunque las pruebas de función respiratoria y de difusión son necesarias y exhaustivas, no pueden en general apoyar un diagnóstico específico de EPID (19,20).

Como se puede observar en la figura 2 se ofrece un resumen del algoritmo diagnóstico propuesto para los centros hospitalarios dedicados al diagnóstico y tratamiento de las EPID. En los pacientes con EPID puede realizarse broncoscopia para obtener material para análisis microbiológicos, citológicos e histológicos. Las técnicas empleadas incluyen la biopsia pulmonar transbronquial (BPTB) y la aspiración con aguja transbronquial (AATB) para los análisis citológico o histológico (aguja de Wang). La broncoscopia dada su morbilidad no es obligatoria en todos los pacientes con EPID.

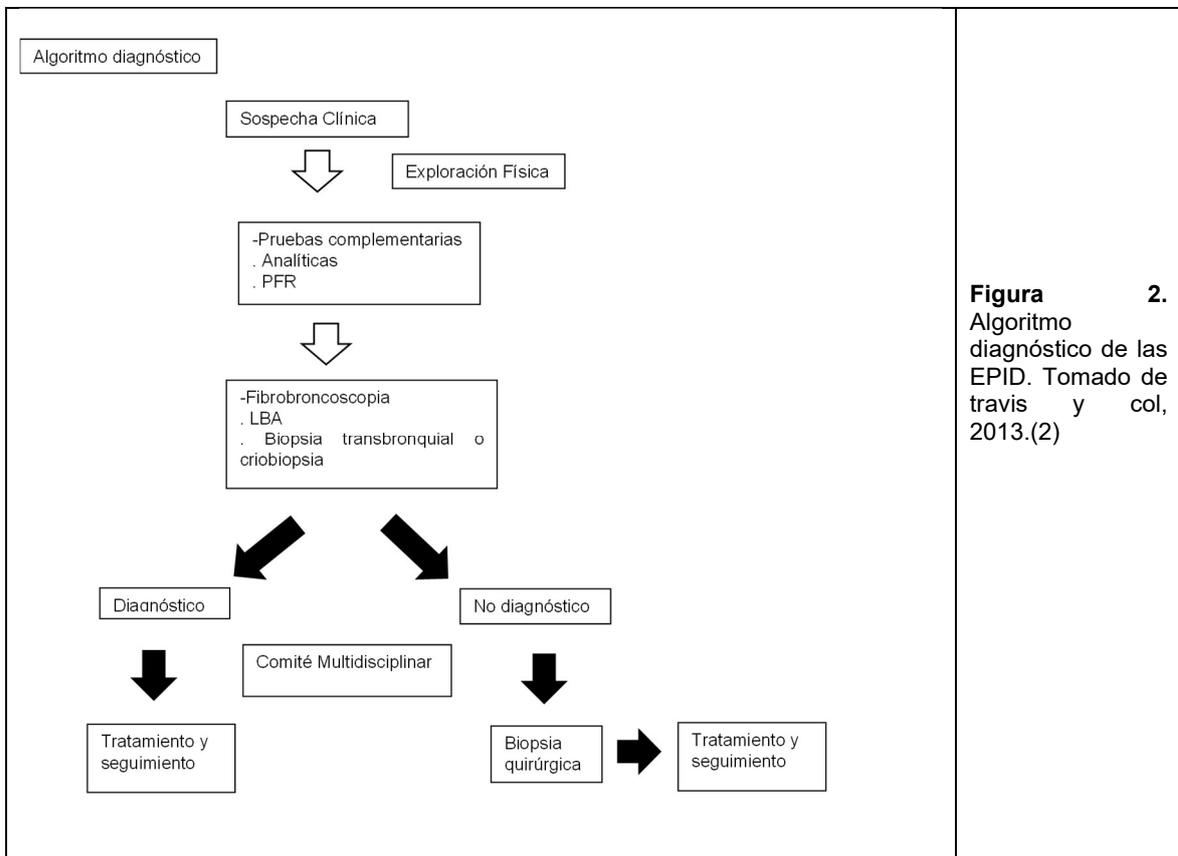


Figura 2. Algoritmo diagnóstico de las EPID. Tomado de Travis y cols, 2013.(2)

En conjunto con los análisis del LBA, la BPTB y/o la AATB (con la posibilidad de guiarlas con ecografía endobronquial) se puede confirmar un diagnóstico de sarcoidosis, linfangitis carcinomatosa, neumonía eosinofílica, proteinosis alveolar, histiocitosis pulmonar de células de Langerhans (HPCL), NIL y varias infecciones bacterianas, víricas y micóticas, evitando así más intervenciones invasivas como la mediastinoscopia o la biopsia mediante toracoscopia videoasistida (VATS)(2)

2.1. Diagnóstico clínico

El síntoma cardinal de las EPID es la disnea progresiva (21). El comienzo de esta puede variar desde semanas hasta años y la progresión varía de paciente a paciente. La inespecificidad de la sintomatología hace que se pueda retrasar el diagnóstico, hasta en 2 años en el caso de la FPI. Otros síntomas característicos, son la tos seca persistente, que puede ser motivo de consulta. Los cuadros agudos, como las NH, pueden asociarse a febrícula y artralgias. El neumotórax es característico de la linfangioleiomiomatosis (LAM) y de la HPCL. Menos frecuente es la hemoptisis y en las neumoconiosis puede darse la melanoptisis.

Una anamnesis bien orientada puede proporcionar hasta 1/3 de los diagnósticos. Para el correcto estudio y proceso diagnóstico de las EPID es preciso tener en cuenta una serie de factores:

- Tiempo de evolución: el tiempo de inicio de la sintomatología puede ayudar a la hora de establecer el diagnóstico diferencial entre ellas. Algunas tienen un curso agudo o subagudo, como la NIA o la NOC, en cambio en otras la sintomatología es más insidiosa con años de evolución. La FPI puede cursar con brotes, que incluso podría ser la forma de debut(22–24).
- Edad y sexo: la edad de aparición varía entre las diferentes entidades, entre los 20 y 40 años es más frecuentes la sarcoidosis, HPCL, las EPID-ETC y la LAM. La FPI suele diagnosticarse en sujetos mayores de 50 años. El sexo también ayuda a orientar el diagnóstico, la LAM es propia del sexo femenino y también las EPID-ETC son más frecuentes en las mujeres, a diferencia de la FPI que es más frecuente en varones. (25)
- Antecedentes familiares: pueden proporcionar información muy útil. Los pacientes con FPI pueden tener algún otro miembro de la familia afectado (fibrosis pulmonar familiar, FPF). La microlitiasis alveolar, la esclerosis tuberosa, la neurofibromatosis

y la sarcoidosis son otros ejemplos de entidades clínicas con historia hereditaria y EPID asociada. (26)

- Hábito tabáquico: la exposición al humo de tabaco se relaciona con cambios en la vía aérea y en el parénquima pulmonar. Aunque el enfisema y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) constituye la forma más habitual de daño pulmonar por tabaco, en algunos casos el tabaco genera un daño sobre el epitelio alveolar produciendo infiltrados y fibrosis intersticial (27). Algunas EPID como la NID, la BR-EPID, neumonía eosinófila aguda o la HPCL son propias de fumadores. El tabaco es también un factor de riesgo de desarrollar FPI y artritis reumatoide (AR) y AR asociada a EPID, o la combinación Enfisema-FPI (CEFPI). Recientemente se ha definido una nueva entidad que es la Fibrosis Intersticial asociada a Tabaco (FIAT), de significado clínico aún no aclarado. En cambio, existen otras entidades, como la sarcoidosis y la NH, en las que el consumo de tabaco es menos frecuente.(28)
- Historia ocupacional y ambiental: la exposición a agentes orgánicos es causa de NH y la exposición a polvos inorgánicos de neumoconiosis. La anamnesis laboral debe ser extensa e incluir las actividades laborales, en especial, la presencia de polvo inorgánico, así como la fecha en que tuvo lugar la exposición y la duración de esta. La exposición a gases o polvos pueden dañar el pulmón, generando neumonitis agudas o subagudas que conlleven una fibrosis pulmonar. La exposición a partículas de pequeño tamaño, ya que el tamaño óptimo para que las partículas se depositen en los alveolos y pequeñas vías respiratorias es el de 1-5 micras de diámetro (29). Las condiciones ambientales en las que se produce la respiración juegan también un papel importante, de todas ellas el grado de humedad una de las características a tener más en cuenta. (30)
- Utilización de fármacos y radioterapia: no es infrecuente encontrar a los fármacos implicados como causa de EPID. Es imperativo recoger en la anamnesis los fármacos que toma o ha tomado el paciente, la dosis y duración del tratamiento. Un instrumento útil de consulta, para determinar si un fármaco produce o no toxicidad pulmonar la constituye la página web: www.PNEUMOTOX.com. El antecedente de radioterapia torácica puede ser causa de EPID.
- Exploración física: en líneas generales, las EPID se caracterizan principalmente por la presencia de estertores crepitantes en la auscultación y la presencia o no de acropaquias. A medida que progresa la enfermedad y aparece signos de hipertensión pulmonar y cor pulmonale, es posible encontrar edemas,

hepatomegalia e ingurgitación yugular. La presencia de sibilantes puede orientar hacia una NH o una eosinofilia pulmonar.

- Diagnóstico radiológico: en el 90% de las EPID se detectan alteraciones radiológicas al diagnóstico. En algunos casos la radiografía de tórax puede ser normal, destacando únicamente la disnea de esfuerzo como clave para el diagnóstico. Hay características radiológicas que pueden orientar al diagnóstico. La TACAR constituye hoy día la técnica de elección en las EPID, por su excelente resolución y mejor correlación con la anatomía patológica, su valor diagnóstico y pronóstico y por permitir localizar la zona donde realizar la Biopsia(31). El tipo de patrón radiológico, así como la distribución de este tienen también valor de orientación diagnóstica.

Tabla 4. Frecuencia de las neumonías Intersticiales idiopáticas asociadas a ETC

	Esclerodermia	AR	Sjögren	EMTC	DM/PM	LES
Frecuencia	Probable	Común	Posible	Común	Probable	Inusual
Tipo	NINE (80-90%) NIU (10-20%)	NIU (50-60%) NINE NO NID	NINE (30-60%) NIL (20%)	NINE	NINE NO NIU DAD	NINE NO NIL NIU

*Abreviaturas: neumonía intersticial no específica, NINE; neumonía intersticial usual, NIU; neumonitis obliterante, NO; neumonía intersticial linfocitaria, NIL, daño alveolar difuso, DAD; enfermedades del tejido conectivo, ETC.
Fuente: (32-34)

- Enfermedades del tejido conectivo (ETC): indagar sobre síntomas de enfermedades sistémicas (colagenopatías, sarcoidosis) que pueden asociarse a EPID.
El patrón radiológico en las EPID y la frecuencia de las NII asociadas a ETC varía según la enfermedad de la que se trate (tabla 4), mostrando un predominio del patrón NINE, excepto en la AR en donde predomina el patrón NIU.
La AR se relaciona con EPID entre un 10-20% de los casos y puede preceder a la aparición de la sintomatología articular. En la dermatomiositis-polimiositis hay afectación pulmonar entre el 40-60% de los casos. En los síndromes anti-sintetasa entre el 60-90%, en la esclerodermia en hasta el 60% de los casos y constituye la principal causa de mortalidad, por último, en la ETC en hasta el 70% de los casos. Es menos frecuente en el lupus, donde es más frecuente la presencia de serositis. La posibilidad de ETC, debe tenerse presente en mujeres jóvenes, en FPI y cuando el patrón predominante sea la NINE. El patrón de NINE, salvo en la AR donde predomina el patrón de NIU, es el patrón más frecuente en las ETC. Una revisión reciente (35) recomienda en la analítica inicial incluir los anticuerpos antinucleares

(ANA), los marcadores de miositis y síndrome anti-sintetasa (SSA), marcadores del síndrome de Sjögren (anti-Ro/SSA) y anti La/SSB), de AR (factor reumatoide y Ac. Anti-proteínas citrulinadas/ACPA) y los Acs. Anti-citoplasma del neutrófilo/ ANCA) (tabla 5). En ocasiones, a pesar la sintomatología sistémica y algunos marcadores de autoinmunidad, no se cumplen los criterios necesarios para el diagnóstico definitivo de una EPID-ETC. Para estos casos se ha acuñado el término IPAF: Interstitial Pneumonia Autoimmune Features (20), (30)

- Diagnóstico de laboratorio: los parámetros analíticos, permiten descartar la presencia de una causa secundaria: ETC o NH, principalmente. Dentro de las pruebas a tener en cuenta se debe incluir: hemograma completo, velocidad de sedimentación, factor reumatoide (FR), bioquímica completa incluyendo determinación del calcio, urea, creatinina, función hepática, autoinmunidad (ANA, ENA y ANCA), enzima convertidora de angiotensina (ECA), marcadores de inflamación (LDH, proteína C reactiva, fibrinógeno), enzimas musculares (Creatinina quinasa y aldolasa) y precipitinas. (36)

Se han realizado múltiples intentos por encontrar biomarcadores que permitan monitorizar la actividad de la enfermedad o predecir el pronóstico en diferentes EPID. Los cambios intraindividuales de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina sérica o de la concentración sérica del receptor soluble para la IL-2 son, hasta cierto punto, útiles para vigilar la actividad de la enfermedad en la sarcoidosis (37). La actividad de la LDH es, hasta cierto punto, predictiva del pronóstico en la FPI(38). La presencia de eosinofilia debe hacer pensar en las eosinofilia pulmonares, la hipercalcemia o hipercalciuria en sarcoidosis, los marcadores de inflamación muscular como la creatinina quinasa o la aldolasa en polimiositis/dermatomiositis. Las precipitinas positivas, aunque indican respuesta específica a un antígeno, si hay exposición pueden sugerir NH. Sin embargo, solo indican sensibilización tras exposición y un resultado negativo no descarta una NH.

Tabla 5. Pruebas complementarias de laboratorio útiles en el diagnóstico de la EPID

Prueba analítica	Indicación	Interpretación
ANA; Factor Reumatoide; ANA específicos, incluidos Acs anti-Jo-1 o SCL_70	Sospecha de EMTC o EPID idiopática (en la que no puede excluirse EMTC)	Aparecen títulos bajos hasta en el 20% de los pacientes con FPI; los títulos elevados indican una ETC subyacente
Actividad de creatinasa, mioglobina, aldolasa	Sospecha de miositis	Los valores altos apoyan un diagnóstico de dermatomiositis
Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgE, subclases de IgG)	Sospecha de Inmunodeficiencia	La hipogammaglobulinemia de origen secundario es la más prevalente y responsable de las más de 150 causas de defectos humorales, ya sea por mecanismos de pérdida o destrucción proteica, entre las principales causas; Farmacológicas, Hematológicas, Defectos nutricionales, HIV, Trasplantados, entre otros). Es imprescindible descartar hipogammaglobulinemia secundaria, previo al diagnóstico de una Inmunodeficiencia primaria (menos frecuente).(39)
	Más frecuente hipogammaglobulinemia de origen secundario (Farmacológica, oncológica, pérdida de proteínas intestinal y/o renal, etc.).	
	Inmunodeficiencias primarias, menos frecuentes.	La inmunodeficiencia variable común precisa un proceso diagnóstico largo y complejo y requiere la valoración por un especialista en inmunología clínica.
c-ANCA, p-ANCA	Sospecha de vasculitis	Los c-ANCA son indicativos de Granulomatosis con polivascularitis (síndrome de Wegener) o PVM; los p-ANCA son indicativos de Sind. De Churg Strauss o Polivascularitis microscópica
Acs. Anti-Membrana basal glomerular	Hemoptisis debida a HAD, insuficiencia renal.	Un resultado positivo es diagnóstico de síndrome de Goodpasture
Actividad de la ECA en suero, receptor de IL-2 soluble en suero	Sarcoidosis	Sensibilidad y especificidad bajas
Acs. IgG específicos en el suero	Exposición a antígenos que causan NH	Válido solo dentro de un contexto clínico adecuado

*neumonitis por hipersensibilidad (NH), enfermedad del tejido conectivo (ETC), hemorragia alveolar difusa (HAD)

2.2. Diagnóstico radiológico

Una radiografía de tórax anómala es a menudo el primer hallazgo en pacientes con EPID. Los hallazgos más frecuentes son un patrón retículo nodular difuso, con opacidades en vidrio deslustrado o ambos. El patrón y la distribución de la apariencia radiológica contribuyen a las primeras consideraciones diagnósticas (tabla 6). (38,40,41)

Tabla 6. Hallazgos radiológicos característicos en la radiografía de tórax.	
Volúmenes pulmonares bajos	FPI, EPI relacionada con ETC, NH crónica, asbestosis, fibrosis crónica inducida por fármacos, NOC crónica, o NID
Volúmenes pulmonares conservados o aumentados	BR-EPID, FPI más enfisema, HPCL, LAM, sarcoidosis, esclerosis tuberosa, neurofibromatosis, bronquiolitis.
Predominio en la zona superior	Sarcoidosis, silicosis, neumoconiosis de los mineros del carbón, NH, HPCL, beriliosis, NRC, síndrome de Caplan, artritis reumatoide nodular.
Predominio en la zona inferior	FPI, EPID-ETC, asbestosis, NID, NH crónica.
Predominio periférico	FPI, NOC, NEC.
Micronodular	Infección, sarcoidosis, NH, neoplasia maligna.
Engrosamiento de tabiques	Neoplasia maligna, Insuficiencia cardíaca izquierda crónica, infección, enfermedad venooclusiva pulmonar.
Patrón en panal	FPI, asbestosis, EPID-ETC, NH crónica, sarcoidosis
Opacidades migratorias	Enfermedad de Löffler, NOC, NH, ABPA
Líneas B de Kerley	Insuficiencia cardíaca izquierda crónica, linfangitis carcinomatosa.
Enfermedad Pleural	EPID-ETC, asbestosis, neoplasia maligna, EPID inducida por radiación, sarcoidosis.
Neumotórax	HPCL, LAM, esclerosis tuberosa, neurofibromatosis
Linfadenopatía mediastínica/hiliar	Sarcoidosis, neoplasia maligna, silicosis, beriliosis, EPID-ETC, infección.
Normal (alrededor del 10%)	NH, NINE, EPID-ETC, BR-EPID, bronquiolitis, sarcoidosis.

ABPA, aspergilosis broncopulmonar alérgica; BR-EPID, bronquiolitis respiratoria y EPID; EPID, enfermedad pulmonar intersticial; ETC, enfermedad del tejido conectivo, FPI, fibrosis pulmonar idiopática; HPCL, histiocitosis pulmonar de células de Langerhans; LAM, linfangioleiomiomatosis; NEC, neumonía eosinofílica crónica; NH, neumonitis por hipersensibilidad; NID, neumonía intersticial desamativa; NINE, neumonía intersticial no específica; NOC, neumonía organizada criptogénica.

Para un diagnóstico más sutil, la TACAR es la técnica diagnóstica clave y es suficiente para el diagnóstico en un número significativo de los pacientes con FPI. (40) Los criterios radiológicos que ayuden a realizar un diagnóstico de certeza de la FPI se presentan a continuación (tabla 7).

Tabla 7. Criterios diagnósticos de fibrosis pulmonar idiopática.

Patrón NIU (las cuatro características)	Patrón de posible NIU (las tres características)	Patrón incompatible con NIU (cualquiera de las siete características)
. Predominio subpleural basal	. Predominio subpleural basal	. Predominio en la zona superior o media del pulmón.
. Anomalía reticular.	. Anomalía reticular.	. Predominio peri bronco vascular.
. Patrón en panal, con o sin bronquiectasias por tracción.	. Ausencia de las características presentadas como incompatibles con patrón de NIU (ver tercera columna.	. Anomalía en vidrio deslustrado extensa (extensión > anomalía reticular)
. Ausencia de las características presentadas como incompatibles con patrón de NIU (ver tercera columna.		. Múltiples micronódulos (bilaterales, alejados de las zonas con patrón en panal).
		. Atenuación difusa en mosaico/ atrapamiento aéreo (bilateral, Hoy en 3 o más lóbulos)
		. Consolidación en segmentos / lóbulos broncopulmonares.

NIU, neumonía intersticial usual. Tomado de Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al .an official ATS/ ERS/JRS / ALAT.

Statement; idiopathic pulmonary fibrosis. Evidence-based guidelines for diagnosis and management. Am J. Respir Crit care Med. 2011; 183: 794.

Las observaciones que ofrece la TACAR como diagnóstico alternativo a la FPI se muestran en las tablas 8 y 9. La interpretación de las radiografías de tórax y las TACAR debe incluir siempre una revisión completa de todas las imágenes radiológicas disponibles (estudio comparativo), y debe realizarse en comunicación directa entre el neumólogo y el radiólogo con el fin de optimizar el rendimiento diagnóstico.

Tabla 8. Hallazgos en la TACAR que desestiman fibrosis pulmonar idiopática (FPI)

Observaciones en la TACAR atípicas de FPI	Diagnóstico probable
Nódulos centrolobulillares, atrapamiento aéreo, opacidades en vidrio deslustrado, respeto relativo de las bases.	NH
Derrame pleural, engrosamiento pleural, dilatación esofágica	Enfermedad vascular del colágeno
Placas pleurales, engrosamiento pleural	Asbestosis
Anomalía focal	Cicatriz localizada

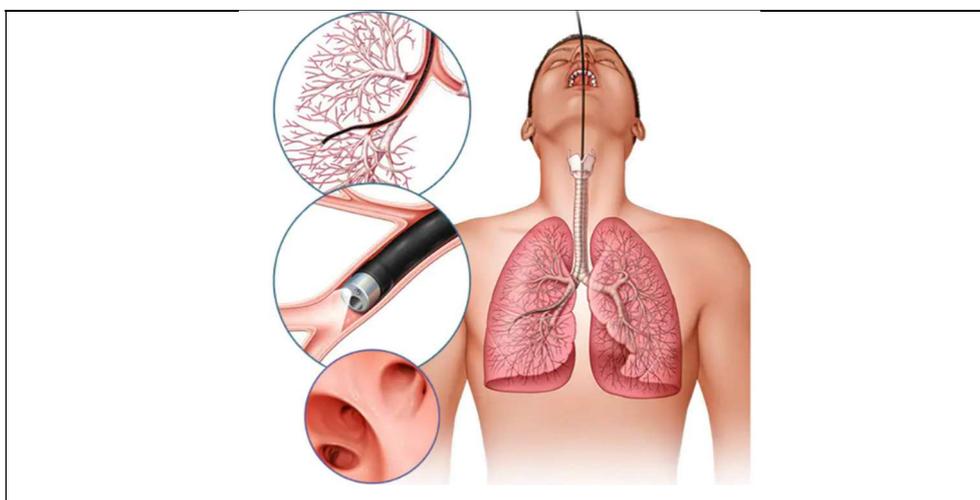
Tabla 9. Consideraciones diagnósticas basadas en los patrones de la TACAR

Observaciones específicas en TACAR	Entidad
Quistes	HPCP, LAM, NIL, síndrome de Birt-Hogg-Dubé.
Nódulos perilinfáticos	Sarcoidosis, enfermedad crónica por berilio, Carcinoma linfangítico, linfoma
Nódulos	NH
Centrolobulillares	Bronquiolitis respiratoria
Patrón de árbol en brote	Infección, aspiración, otras formas de bronquiolitis
Atenuación en mosaico	NH, Bronquiolitis obliterante, Tromboembolia pulmonar

HPCP, histiocitosis pulmonar de células de Langerhans; NIL, neumonía intersticial linfoide; NH, *neumonitis por hipersensibilidad*.

3. Estudio del lavado broncoalveolar (LBA)

El LBA es una prueba útil y segura que debe de realizarse en todos los casos en los que se sospeche una enfermedad pulmonar intersticial, especialmente en las que no existe un patrón radiológico compatible con NIU en el TACAR. Aporta tanto valor diagnóstico como pronóstico, ver tabla 10. Una vez obtenido el LBA mediante broncoscopia, ver en la figura 3, se distribuyen en alícuotas que serán utilizadas para diferentes propósitos diagnósticos como se esquematiza en la figura 4. En un paciente sano el LBA está constituido principalmente por macrófagos en un 90% y linfocitos en un 5-10% y en menor cantidad polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. Dentro de la población de linfocitos en su mayoría contiene linfocitos T y solo en un 5% Linfocitos B. Dentro de los linfocitos T distinguimos la población TCD4+ y TCD8+ en una relación normal entre 1,5-2:1(42).



Indicaciones: tos persistente, infección y detección de irregularidades en una radiografía de tórax u otra prueba.

Otras indicaciones diagnósticas:

- . La visualización directa de la vía aérea, incluso hasta los bronquios subsegmentarios
- . La recolección de muestras de las secreciones y las células respiratorias mediante lavados y cepillados bronquiales y el lavado de las vías aéreas periféricas y los alvéolos
- . La biopsia de estructuras endobronquiales, parenquimatosas y mediastínicas

Los usos terapéuticos incluyen

- . Succión de secreciones retenidas
- . Colocación de un tutor endobronquial
- . Eliminación de los cuerpos extraños
- . Uso de la dilatación con balón para aliviar las estenosis de las vías aéreas

Broncoscopia rígida:

- . Cuando se necesitan una mayor abertura y canales más amplios para una mejor visualización e instrumentación, como sucede cuando se investiga una hemorragia pulmonar vigorosa
- . Cuando se visualizan y extraen cuerpos extraños aspirados en niños pequeños
- . Cuando se visualizan lesiones endobronquiales obstructivas para una posible citorreducción con láser o la colocación de una endoprótesis.

Figura 3. Indicaciones de la broncoscopia. *Imagen tomada de Mayo clinic.org.*

Mediante esta técnica un segmento o subsegmento del pulmón es lavado con suero salino estéril. Seguidamente se recoge el lavado, que contiene elementos representativos del tracto respiratorio inferior, despreciándose de esta forma la primera fracción del árbol bronquial. Su recogida, transporte y procesamiento están estandarizados y constituye un paso previo para su estudio en cada servicio donde se remiten las muestras (43). El análisis citológico e inmunohistoquímico del LBA es hoy en día una de las pruebas de laboratorio de mayor interés diagnóstico de las EPID. El LBA puede en algunos casos evitar la realización de la biopsia, en ocasiones puede ser orientativo apoyando el diagnóstico de presentación o sugerir un diagnóstico alternativo. El análisis mineralógico y la determinación de los cuerpos de asbesto pueden ser útil en el estudio de las neumoconiosis.

Existen dudas acerca de la rentabilidad diagnóstica del LBA ya que se explora únicamente una parte de pulmón y puede que ser representativa de la inflamación pulmonar de una enfermedad que afecte de forma difusa. Hay estudios que han objetivado que el LBA cambiaba dependiendo del lóbulo en el que se realizará.

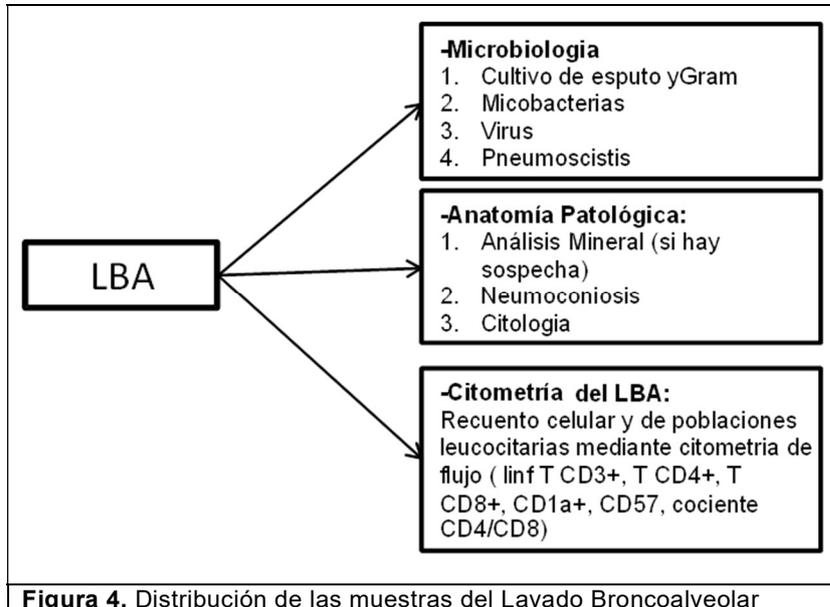


Tabla 10. Utilidad diagnóstica del lavado broncoalveolar

Enfermedades en las que el LBA posee valor diagnóstico

- 1.-PA, material proteináceo, PAS+ y azul cian, cuerpos lamelares en ME
- 2.-Histiocitosis de Langerhans: CD1 >5%; gránulos de Birbeck en ME
- 3.-Eosinofilia pulmonares: eosinofilia > 20%
- 4.-HAD: hemosiderófagos > 20%

Enfermedades en las que el LBA posee valor orientativo

- 1.-Sarcoidosis: predominio linfocitario, cociente CD4/CD8 > 3,5
- 2.-NH: predominio linfocitario, mastocitos, inversión del cociente CD4/CD8.
- 3.-FPI: predominio neutrófilos con/sin eosinófilos
- 4.-Neumonitis por fármacos: citología variable, inversión del cociente CD4/CD8.
- 5.-NO: predominio linfocitario, con cierto grado de neutrófilos y eosinófilos, inversión del cociente CD4/CD8.
- 6.-NID y BR-EPID: macrófagos hiperpigmentados
- 7.-NIA: predominio linfocitario, neumocitos tipo II atípicos, fragmentos de membrana hialina.

***abreviaturas: proteinosis alveolar (PA), microscopio electrónico (ME), hemorragia alveolar aguda (HAD), neumonitis por hipersensibilidad (NH), fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonía organizada (NO), neumonía intersticial difusa (NID), bronquiolitis asociada a EPID (BR-EPID), neumonía intersticial aguda (NIA).**

(3)

La primera guía para el procedimiento y recolección del LBA en España fue publicada en 1994, para entonces la técnica no estaba estandarizada, lo cual dificultaba la comparación de resultados entre los distintos autores (44). Más tarde en 2012, la ATS publica *An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease*, e incluye las últimas recomendaciones acerca de cómo realizar el procedimiento, transporte, procesamiento y análisis del LBA (3) establece que, durante la broncoscopia flexible estándar, el broncoscopio se coloca en posición de cuña dentro del segmento broncopulmonar seleccionado. Se instila solución salina normal (a temperatura ambiente) a través del broncoscopio, con un volumen total que oscila entre 100 a 300 ml y dividido en tres a cinco alícuotas. Después de la instilación de cada alícuota, el suero salino instilado se recupera generalmente utilizando una presión de succión negativa inferior a 100 mm Hg. La presión de succión negativa debe ajustarse para evitar el colapso visible de las vías respiratorias. El volumen total mínimo extraído debe ser igual o superior al 5% del volumen instilado (la toma de muestras óptima > 30%). Si durante el procedimiento se recupera menos del 5% del volumen de cada alícuota instilada debido a la retención de la mayor parte del líquido en el pulmón, se debe retirar la alícuota, el procedimiento debe abortarse para evitar un mayor riesgo para el paciente.

Se necesita un volumen mínimo de 5 ml para el análisis celular del LBA (el volumen óptimo es de 10-20 ml); es aceptable agrupar todas las alícuotas del LBA extraído para los análisis de rutina. El líquido LBA debe recogerse en recipientes que no favorezcan la adherencia celular a la superficie del recipiente (por ejemplo, vidrio recubierto de silicona o polipropileno u otros plásticos diseñados para el cultivo de tejidos en suspensión). El método de transporte depende del tiempo que se prevea que tardará en llegar al laboratorio de análisis. El líquido LBA puede transportarse a temperatura ambiente si el laboratorio se encuentra en el mismo centro. Si la entrega puede tardar entre 30 y 60 minutos, las muestras deben transportarse a 4°C. Si el tiempo de entrega es superior a 1 hora, se desaconseja el transporte en la solución salina de lavado original. En su lugar, las células deben centrifugarse a una velocidad que mantenga la integridad celular (por ejemplo, 250-300 g durante 10 min) y resuspenderlas en un medio suplementado con nutrientes (p. ej., MEM125mM HEPES o RPMI 1640125mM HEPES) y a 4°C, donde pueden permanecer hasta 24 horas. Si no se dispone de una centrifuga, se puede añadir MEM o RPMI a la muestra de lavado agrupada y almacenarla posteriormente a 4°C durante un máximo de 12 horas, pero la muestra debe transportarse al laboratorio tan pronto como sea posible. El líquido LBA no debe congelarse ni transportarse con hielo seco.

El procesamiento rápido del LBA una vez que llega al laboratorio proporciona resultados óptimos, el material utilizado en el laboratorio no debe favorecer la adherencia de las células a las superficies de los recipientes. Las muestras con moco espeso pueden colarse a través de una gasa suelta, o bien disolver pequeñas cantidades de moco. Si es necesario, pueden disolverse pequeñas cantidades de moco con ditiotreitol. A continuación, la muestra debe centrifugarse a velocidad adecuada, resuspenderse y analizarse. El LBA que no se vaya a analizar inmediatamente debe ser centrifugado, el sedimento celular resuspendido en un medio suplementado con nutrientes, y luego refrigerado a 4°C hasta 24 horas. Las células que ya estaban suspendidas en un medio suplementado con nutrientes debido a un retraso en el transporte pueden ser simplemente refrigeradas a 4°C. Las muestras obtenidas más de 24 horas antes no son aptas para el análisis (3)

3.1. Análisis citológico del LBA

El gold estándar del análisis citológico del LBA es el estudio al microscopio de muestras depositadas en portas con citospin y teñidas con May Grunwald Giemsa. En este análisis es factible diferenciar y cuantificar células inmunitarias como los macrófagos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y células dendríticas, aunque estas últimas pueden requerir de tinciones específicas. Además, se pueden apreciar peculiaridades morfológicas en las células inmunitarias o tisulares (células epiteliales columnares epiteliales escamosas/ciliadas) y deposición de materiales. Por último, es posible detectar células neoplásicas.

Las cifras de las células inmunitarias de un LBA normal son: macrófagos >85%, linfocitos 10-15%, neutrófilos <3%, eosinófilos <1% y células dendríticas <1%. Las células epiteliales columnares epiteliales escamosas/ciliadas deben representar menos del 5%, cifras superiores pueden indicar una mala calidad de la muestra (3)

Cuando la obtención del LBA se realiza con una técnica estandarizada, se examina y combinan con datos clínicos y de imagen, los recuentos recuento diferencial de células y otras características pueden proporcionar información importante que contribuye significativamente al diagnóstico de EPID específicas (45–47) (48).

Los patrones celulares tienden a reflejar perfiles celulares inflamatorios en los tejidos pulmonares afectados (49), pero pueden obtenerse patrones celulares que no son típicos de un diagnóstico específico de EPID, muestran poco o ningún cambio con respecto a los perfiles normales o muestran patrones mixtos con cambios significativos en el porcentaje relativo de más de un tipo de célula inmunitaria nucleada(46). Además, pueden observarse en diversos trastornos de las vías respiratorias (p. ej. bronquiolitis, bronquitis, asma, bronquitis eosinofílica, bronquiectasias y ABPA). No obstante, algunas características del LBA o ciertos patrones celulares con cambios significativos en uno o más de un tipo de células pueden ser consistentes o sugerir tipos específicos de EPID:

- Con linfocitos >15%: sarcoidosis, neumonía inespecífica, NH, neumonitis inducida por drogas, EPID-ETC, neumonía por radiación, NOC y síndromes linfoproliferativos.
- Con Eosinófilos >1%: neumonía eosinofílica, neumonitis inducida por drogas, trasplante de médula ósea, asma, bronquitis, síndrome Churg-Straus, NH,

enfermedad de Hodgkin e infecciones (bacterianas, fúngicas, helmínticas, *Pneumocystis*).

- Neutrófilos >3%: FPI, neumonía por aspiración, infecciones (bacterianas, fúngicas, bronquitis), asbestosis, NIA y daño alveolar difuso.
- El aumento del número de mastocitos en se ha asociado a NH, reacciones a fármacos, sarcoidosis, EPI asociada a enfermedad vascular del colágeno, FPI, NE y neoplasias. Se han observado células plasmáticas en el LBA en NH, reacciones a fármacos, neoplasias e infección (50).
- Los macrófagos alveolares también pueden mostrar ciertos cambios morfológicos, como: aspecto espumoso en la NH; citoplasma marcadamente vacuolado con tinción positiva de las vacuolas para la grasa en la neumonía por aspiración crónica, inclusiones citoplasmáticas asociadas a infecciones víricas (por ejemplo, neumonía por citomegalovirus); hematíes ingeridos y fragmentos de hematíes y hemosiderina con hemorragia alveolar difusa (HAD); cuerpos de amianto ingeridos; u otras partículas de polvo.
- Un LBA sanguinolento, que puede variar de rosa a rojo en caso de hemorragia aguda, o marrón anaranjado en caso de hemorragia subaguda característico de la hemorragia alveolar difusa (HAD), especialmente si las alícuotas de líquido BAL no muestran ninguna disminución de la decoloración sanguinolenta o (especialmente) si la decoloración aumenta(51). Si hay HAD los glóbulos rojos deben ser identificables en la citospin y los macrófagos se teñirán positivamente para la hemosiderina, cuando se tiñen con una tinción de hierro si el inicio de la hemorragia ha precedido al momento del LBA 24-48 h.
- Un LBA recién extraído con aspecto lechoso o marrón claro a blanquecino, turbio, con restos floculentos que se depositan en el fondo del recipiente antes de la centrifugación sugiere la proteinosis alveolar pulmonar (PAP) como diagnóstico probable. El diagnóstico puede confirmarse si el sedimento, que es material lipoproteínico derivado del surfactante, se tiñe positivamente con la tinción periódica de ácido-Schiff.

Hay algunos patrones celulares que son definitorios de patologías específicas:

- Un recuento diferencial de linfocitos > 25% sugiere enfermedad granulomatosa (sarcoidosis, NH o enfermedad crónica por berilio), neumonía intersticial celular inespecífica, reacción a fármacos, neumonía intersticial linfoide, NOC o linfoma.

- Cocientes de linfocitos T CD4/CD8 > 4 es altamente específico para la sarcoidosis en ausencia de una mayor proporción de otros tipos de células inflamatorias.
- Recuento de linfocitos > 50% sugiere NH o neumonía intersticial celular inespecífica.
- Recuento celular de mastocitos 1%, linfocitos > 50% y neutrófilos > 3% sugiere NH aguda.
- Recuento de neutrófilos > 50% indica lesión pulmonar aguda, neumonía por aspiración o infección supurativa.
- Recuento de eosinófilos > 25% es prácticamente diagnóstico de neumonía eosinofílica aguda o crónica (52), (53).

Otras observaciones, como el aspecto macroscópico del líquido de células inusuales (p. ej. células plasmáticas, mastocitos y macrófagos espumosos o cebados) o material extraño información importante que puede conducir a un diagnóstico específico. En el contexto clínico adecuado, ciertos hallazgos macroscópicos y celulares en el LBA son muy sugestivos de entidades específicas de EPID en la tabla 10, pero estas observaciones deben interpretarse en el contexto clínico del paciente y los hallazgos radiológicos, reconocer que las imágenes radiográficas, incluida la TACAR, pueden no parecer particularmente anormales en ciertas formas de EPID (por ejemplo, neumonías intersticiales o HP sin FPI).

3.2. Análisis por citometría de flujo del LBA

El estudio del LBA por citometría de flujo proporciona un análisis rápido de características cualitativas y cuantitativas de las células. Mediante el análisis de la expresión de marcadores celulares utilizando anticuerpos monoclonales fluorescentes se pueden identificar y contar las diferentes poblaciones leucocitarias.

Las publicaciones acerca de la citometría de flujo del LBA son limitadas (54,55)(56,57).(58) (59). No existe hasta la fecha ningún documento que respalde la validez y relevancia de la citometría de flujo del LBA en el diagnóstico de las EPID. Actualmente los comités y grupos científicos consideran la citometría del LBA como una técnica de apoyo al diagnóstico de algunas patologías agudas, simplemente por su rapidez. No obstante, en determinadas EPID, el estudio del LBA propone patrones típicos de la enfermedad, aportando apoyo al diagnóstico. En una cohorte prospectiva de 562 pacientes estudiada en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla en pacientes con FPI (n=132), sarcoidosis (n=123), EPID-ETC (n=133), NOC (n=89) y NH (n=85), demostraron un predominó del patrón linfocitario en la NH y la sarcoidosis, y describieron el cociente CD4/CD8 como el parámetro más útil para identificar sarcoidosis (CD4/CD8, mediana de 2,3). En el resto de las enfermedades el índice estaba invertido, con una mediana para la FPI, la NH, la NOC y las EPID-ETC de 1,76; 0,45; 0,35, y 0,33, respectivamente. Concluyen que los parámetros del LBA, junto a los datos clínicos, radiológicos, ayudan a discriminar entre las EPID y que, por lo tanto, debe considerarse una técnica de gran utilidad en el manejo clínico, sobre todo cuando la biopsia pulmonar no resulta diagnóstica o no es posible realizarla. (Jara-Palomares et al., 2009). Un estudio posterior del mismo grupo en el que 44 pacientes diagnosticados de sarcoidosis y NH fueron evaluados mediante citometría de flujo, pruebas histológicas y TCAR, concluye que los parámetros de mayor utilidad fueron la linfocitosis y sobre todo el cociente CD4/CD8. Este cociente se presentó elevado en patologías como la sarcoidosis y se invirtió en la NH (61,62).

Los pacientes diagnosticados de sarcoidosis presentan una alveolitis linfocitaria con notable aumento del cociente CD4/CD8 en el LBA. Un 68.8% de los pacientes presentan un cociente superior a 3.5. Un aumento del citado cociente es muy específico de la sarcoidosis, mientras que el aumento de linfocitos es más sensible. Pacientes con cociente CD4/CD8 > 4 tienen una alta probabilidad de desarrollar sarcoidosis (valor predictivo del 94%), mientras que cocientes CD4/CD8 < 1 permiten excluir la enfermedad (63),(64). 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.

Por su parte, la NH es una enfermedad pulmonar inflamatoria no IgE mediada, que 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. La patogenia se basa en una reacción inmunomediada frente a estas partículas inhaladas, que durante la fase aguda es mediada por reacciones de hipersensibilidad tipo III, mediada por el depósito de inmunocomplejos *in situ* en el espacio intersticial, como resultado de la interacción con el antígeno inhalado y los Anticuerpos IgG preexistentes en el espacio alveolar, la activación del complemento puede contribuir a la alveolitis y neutrofilia. Sin embargo, algunos sujetos con anticuerpos precipitantes frente a antígenos de la NH (precipitinas), no desarrollan enfermedad parenquimatosa o sintomática. Por lo que se cree que la reacción de hipersensibilidad tipo IV (mediada fundamentalmente por linfocitos T CD8 y responsable de la formación de granulomas, incluye respuesta celular Th1 y posiblemente Th17, que contribuye a la expresión de la enfermedad. (65). La NH por su carácter granulomatoso y su clínica de manifestación extrapulmonar (tos, disnea o pérdida de peso), plantea un diagnóstico complejo, ya que puede ser clínicamente similar a otras patologías, como la sarcoidosis. El estudio citológico por citometría del LBA permite orientar el diagnóstico, ya que, aunque ambas cursan con linfocitosis, en la primera se observan cocientes CD4/CD8 disminuidos y en la segunda aumentados. Todos los pacientes con NH muestran alteraciones en el LBA, de tal manera que un LBA sin alteraciones excluye el diagnóstico de NH. Es el método más sensible. Predomina la linfocitosis, con linfocitos T CD8. Un aumento de linfocitos T CD4 lleva a pensar en un mal pronóstico, pues un aumento de T CD4 y/o neutrófilos se ha relacionado con mayor posibilidad de desarrollar fibrosis (66).

En la actualidad la citometría de flujo está comenzando a describir en sus informes el resto de las células inmunitarias presentes en el LBA. Diversas publicaciones(67) describen las cifras de linfocitos (con sus subpoblaciones T, y en ocasiones B y NK), macrófagos/monocitos, neutrófilos, eosinófilos y células dendríticas CD1a+. Esto está permitiendo ofrecer resultados rápidos y precisos, que los clínicos comienzan a valorar, por su utilidad diagnóstica.

4. Análisis histopatológico en la EPID

El conocimiento de la anatomía normal puede servir de ayuda para el diagnóstico de la enfermedad pulmonar intersticial, ya que la interpretación de las muestras de biopsia pulmonar es una parte esencial del diagnóstico de la EPID. Consiste en un proceso de evaluación de una biopsia pulmonar quirúrgica que conlleva contestar a varias preguntas. A diferencia de gran parte de la anatomía patológica quirúrgica de la enfermedad pulmonar neoplásica, llegar al diagnóstico correcto en la enfermedad pulmonar no neoplásica a menudo requiere la correlación con los hallazgos clínicos y radiológicos. La temática de la EPID cubre varios cientos de entidades, y la anatomía patológica de la EPID ha sido el tema de varios tratados amplios (7,8,37,48–50,63,68–76).

El pulmón puede dividirse en compartimentos anatómicos separados por espacios alveolares, intersticio alveolar, vías respiratorias grandes, vías respiratorias pequeñas, vasos pulmonares y pleura. Al examinar el pulmón, es importante reconocer la posibilidad de enfermedad en cualquiera o todos estos componentes. Adicionalmente, el parénquima alveolar puede dividirse en varias zonas que pueden ayudar a la elaboración del diagnóstico diferencial, es aquí donde son necesarias varias definiciones:

- 1) Un lóbulo primario se define como la porción del pulmón aireada por un bronquiólo respiratorio,
- 2) Un lóbulo secundario se define como una región de pulmón centrada en un bronquiólo respiratorio, unida en sus márgenes periféricos por septos interlobulares fibrosos, y que se extiende distalmente hasta la superficie pleural, ver figura 5. Esta construcción histológica se reconoce al microscopio más fácilmente que el lóbulo primario; por tanto, los anatomopatólogos (y los radiólogos) utilizan a menudo el término lóbulo indistintamente del lóbulo secundario.(77)

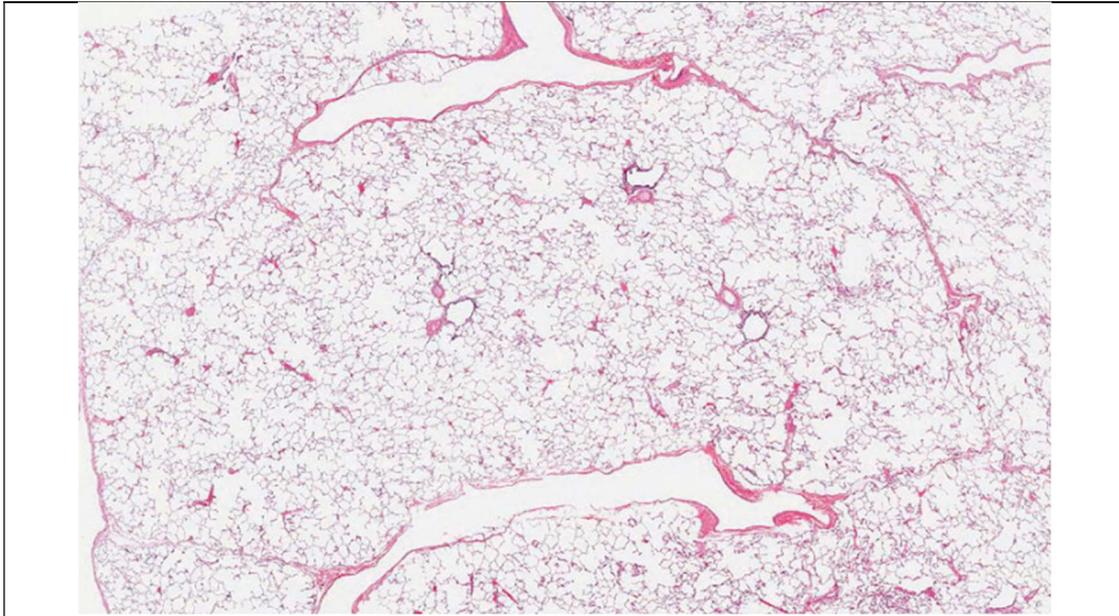


Figura 5. Lóbulo secundario. La imagen con poco aumento del parénquima pulmonar normal resalta la arquitectura lobular pulmonar. Los bronquiólos y las ramas asociadas de la arteria pulmonar forman el centro del lóbulo. Los límites periféricos están delimitados por los septos interlobulares que contienen tanto venas pulmonares y linfáticos como la pleura visceral. *Tomado de Enfermedad pulmonar intersticial. (77)*

Gran parte de la valoración histológica del pulmón se realiza mediante la evaluación de las estructuras del lóbulo secundario. La porción central de un lóbulo secundario contiene lo que se denomina, el *haz broncovascular*, que consta de una vía respiratoria pequeña asociada con la arteria pulmonar. El tejido circundante consta de espacios y septos alveolares. Los septos interlobulares, en la periferia del lóbulo, contienen las venas pulmonares. El límite distal del lóbulo constituye la pleura visceral. Los linfáticos pulmonares están presentes en los haces broncovasculares, los septos interlobulares y el tejido conectivo subpleural. Utilizando la unidad estructural del lóbulo, se pueden describir varios patrones de distribución. Un proceso intersticial difuso involucra a la mayoría de los septos alveolares dentro del lóbulo. Un proceso bronquiocéntrico muestra la acentuación de la enfermedad en el tejido que rodea las vías respiratorias pequeñas. Un patrón lobular periférico muestra la acentuación de la inflamación o de la fibrosis en las regiones subpleural y paraseptal. Un patrón linfático muestra una distribución de la enfermedad que involucra a las regiones subpleurales, los septos interlobulares y los haces broncovasculares. Otros patrones de enfermedad son la distribución angiocéntrica y la aleatoria. Varios de estos patrones de distribución también pueden describir procesos consolidativos en los que existe relleno alveolar. (77)

Definir el proceso de la enfermedad dentro de la biopsia pulmonar requiere, primero, establecer si se trata de una lesión pulmonar aguda; los dos patrones comunes de lesión pulmonar aguda son el daño alveolar difuso y la neumonía organizada. Sobre la base de estas enfermedades pueden parecer otras enfermedades crónicas con fibrosis. El daño alveolar difuso es un patrón histológico de lesión pulmonar que se debe al daño del componente endotelial y epitelial del alvéolo: el capilar alveolar y el neumocito de tipo 1. Histológicamente, la aparición de daño alveolar difuso varía en función del tiempo transcurrido desde la lesión inicial (78),(79). En las primeras horas después de la lesión, las fugas de la barrera vascular-epitelial del alvéolo provocan una acumulación de líquido rico en proteínas dentro de los espacios alveolares. En el transcurso de 12-24 h, los septos alveolares se engrosan por edema e inflamación mínima aguda y crónica. A medida que progresa la lesión, las paredes alveolares tienen la apariencia de fibrosis parecida a tejido de granulación con proliferación de fibroblastos dentro de una matriz mixoide. Los espacios alveolares se rellenan además por membranas hialinas, ver figura 6. Estas membranas hialinas aparecen de forma homogénea eosinófila con una ligera apariencia cérea (el término proviene de *hyalos*, que en griego significa vidrio). Están presentes cerca de la superficie alveolar. Aunque parecen bastante uniformes al microscopio óptico, cuando se ven al microscopio electrónico estas membranas hialinas parecen estar compuestas por una papilla de nucleoplasma, citoplasma, fibrina y otras proteínas derivadas de la muerte celular debida a la lesión aguda. A menudo, los vasos pequeños (generalmente arterias pulmonares ≤ 2 mm) muestran pequeños trombos de fibrina en su luz. Se piensa que esto se debe a la activación de la cascada de la coagulación debida al daño tisular (79) .

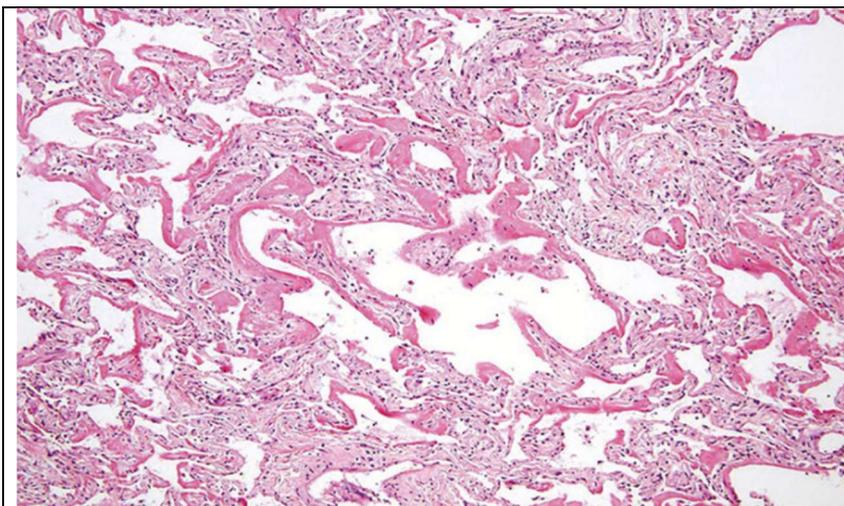


Figura 6. Daño alveolar difuso. Los septos alveolares están engrosados por edema y un infiltrado linfocítico disperso. Los espacios alveolares contienen membranas hialinas, material eosinófilo parecido a una película que se acumula a lo largo de los septos alveolares. *tomado de collard & Richeldi, 2018. (77)*

A menudo, se observan cambios metaplásicos escamosos en los bronquiólos distales. Los cambios histológicos de la lesión pulmonar aguda son: engrosamiento del septo alveolar uniforme (a veces puede evitar los lóbulos adyacentes), edema del septo alveolar, fibrosis parecida al tejido de granulación, membranas hialinas (patognomónicas de daño alveolar difuso), fibrina y edema en los espacios aéreos, hiperplasia de los neumocitos de tipo 2, trombos en vasos pequeños, metaplasia escamosa de las vías respiratorias distales y de los conductos alveolares y cuadro clínico de insuficiencia respiratoria aguda .

Establecer la presencia de fibrosis, la fibrosis puede definirse simplemente como el depósito excesivo de colágeno en el pulmón. Este puede estar en forma de fibrosis de tejido disperso parecido al edematoso de granulación, como en el daño alveolar difuso organizado o la neumonía organizada, o como fibrosis colágena densa, como en la neumonía intersticial fibrosa. La enfermedad pulmonar fibrosa puede evaluarse utilizando un sistema basado en patrones caracterizado por la distribución dentro del lóbulo secundario. Algunas enfermedades muestran un patrón de fibrosis característico. Si la enfermedad muestra un patrón lobular periférico, un patrón difuso, un patrón bronquiocéntrico o una combinación de estos patrones puede ayudar a establecer un diagnóstico o diagnóstico diferencial se muestra en la figura 7.

La Neumonía intersticial usual, se caracteriza por fibrosis lobular periférica, la fibrosis se acentúa por debajo de la pleura y a lo largo de los septos interlobulares, el diagnóstico histológico se realiza con mayor precisión cuando se observan pruebas de enfermedad crónica activa. La cronicidad está representada por la fibrosis y el patrón en panal microscópico y la actividad está representada por los focos fibroblásticos (80), (81). La formación de patrón en panal microscópica realmente no se parece mucho al panal de abejas. El patrón en panal microscópico del tipo observado en la NIU rara vez aparece uniformemente y se caracteriza por espacios aéreos ensanchados e irregulares, delimitados por epitelio bronquiolar o cúbico, con frecuencia repletos de macrófagos y neutrófilos que en ocasiones contienen mucina, rodeados de fibrosis colágena densa con músculo liso intercalado. Los focos fibroblásticos suelen estar presentes en la interfase entre la fibrosis periférica densa y el tejido pulmonar central menos afectado. Estos focos están compuestos por fibroblastos dentro de una matriz mixoide edematosa. Los fibroblastos se disponen a menudo con sus núcleos girados paralelos a la superficie alveolar. Una capa superpuesta de células epiteliales reactivas aumentadas de tamaño está frecuentemente presente en el borde alveolar.

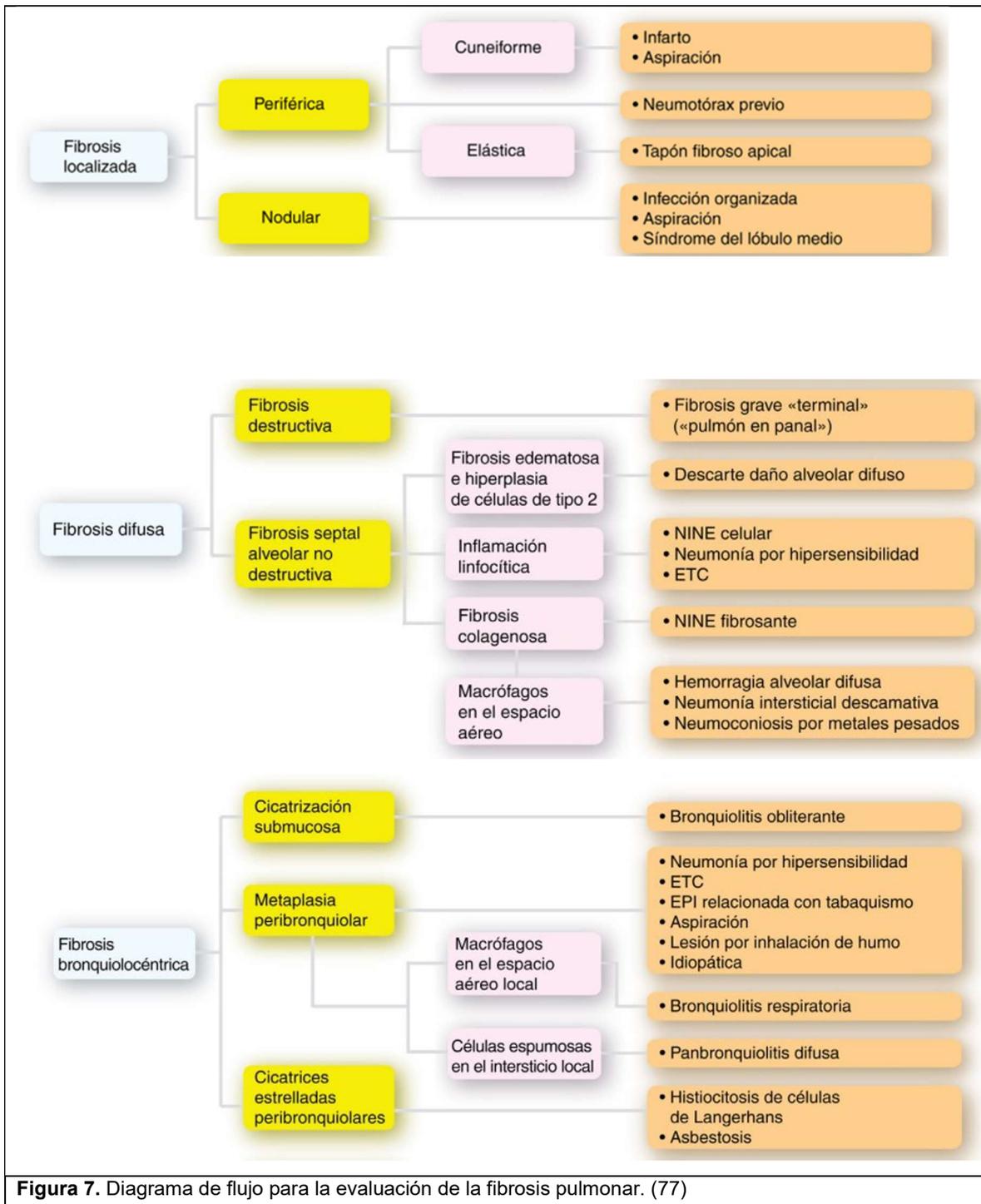


Figura 7. Diagrama de flujo para la evaluación de la fibrosis pulmonar. (77)

Los focos de fibroblastos pueden ocasionalmente ser difíciles de separar de la neumonía organizada, pero pueden ser reconocidos por indicios histológicos y antecedentes en la historia clínica de cronicidad, (tabla 11).

Tabla 11. Diferenciación entre neumonía organizada y focos de fibroblastos.

Neumonía organizada	Focos de fibroblastos
Aspecto redondeado o polipoideo	Protuberantes o semilunares
Espacio aéreo visible en la mayor parte de su superficie	Colágeno denso presente a lo largo de la mitad de su superficie
Localizada dentro de la vía respiratoria o del espacio aéreo	Localizados en el intersticio
Ramificaciones frecuentes	Ramificaciones infrecuentes
Capa epitelial superficial delgada o ausente	Capa epitelial superficial reactiva
Fibroblastos dispuestos al azar	fibroblastos a menudo paralelos a la superficie alveolar

El diagnóstico definitivo y específico de las EPID hasta la fecha, precisa en muchas ocasiones de la realización de una biopsia pulmonar. Las áreas susceptibles de biopsia deben determinarse mediante los hallazgos en el TACAR. Deben tomarse muestras de al menos dos áreas diferentes; una de aspecto macroscópico patológico y otra con aspecto sano. La biopsia transbronquial por fibrobroncoscopia tiene un rendimiento de hasta un 60%, es útil en enfermedades peribroncovasculares o con distribución linfangítica y con características histológicas específicas como la sarcoidosis, linfangitis carcinomatosa, daño alveolar difuso, proteinosis alveolar o neumonía eosinófila. En otros casos presenta una rentabilidad moderada, como en las vasculitis, la amiloidosis, la histiocitosis y la LAM. No es útil en el diagnóstico para las NII salvo la neumonía organizada, ya que suelen tener una distribución más periférica (21). Debido a la variabilidad en el rendimiento de las biopsias transbronquiales, como consecuencia principalmente del tamaño de la muestra, se ha comenzado a generalizar el uso de las criobiopsias. En lugar de pinza se utilizan criosondas, lo que permite obtener muestras de mayor tamaño e incrementar la rentabilidad diagnóstica (82). En aquellos casos en los que no ha sido posible llegar al diagnóstico, la biopsia quirúrgica abierta por minitoracotomía o por videotoracoscopia está indicada en todos los casos en los que no se ha obtenido un diagnóstico específico. La videotoracoscopia precisa de menor tiempo operatorio, menos complicaciones y de estancia hospitalaria. La biopsia quirúrgica conlleva la toma de muestras más periféricas, permitiendo estudiar también la relación entre la pleura y el parénquima pulmonar.

Cuando en la biopsia se observa un patrón en panal microscópico y hay fibrosis destructiva difusa, es tentador el uso del término pulmón fibroso terminal o pulmón en panal, ejemplo en la figura 8. Esto puede ser aceptable en los casos en que el anatomopatólogo conozca la extensión de la enfermedad mediante una tomografía computarizada (y existe una fibrosis uniforme generalizada), pero en ocasiones no es así y un informe de una biopsia

como pulmón terminal se emite con demasiada frecuencia en referencia a una región localizada de la cicatriz. Es preferible ser descriptivo en estos casos y hacer el diagnóstico de fibrosis intersticial extensa con un comentario explicando que un proceso de cicatrización está presente a lo largo de la biopsia. Si se dispone de datos clínicos y radiológicos, se puede determinar si las características histológicas son coherentes con el diagnóstico clínico. En muchos de estos casos, los datos clínicos apoyan un diagnóstico de NIU, (tabla 12).

Tabla 12. Diagnóstico de neumonía intersticial usual (NIU).

HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS

- Fibrosis macroscópica/radiográfica basal y periférica
- Fibrosis subpleural y paraseptal microscópica
- Patrón en panal microscópico subpleural
- Focos de fibroblastos en la interfase entre el pulmón fibroso y el menos afectado
- Aspecto normal del pulmón en las regiones centrolobulillares

CLAVES PARA DIAGNÓSTICOS ALTERNATIVOS

- Fibrosis bronquiolocéntrica: NH crónica, ETC,
- EPID relacionada con tabaquismo
- Granulomas: NH crónica
- Pulmón centrolobulillar con engrosamiento parecido al de la NINE: ETC
- Inflamación/fibrosis pleural: ETC
- Distribución apical: tapón fibroso apical, neumotórax previo, neumoconiosis
- Acumulación alveolar de macrófagos: EPI relacionada con tabaquismo, reacción farmacológica
- Edad < 50 años: ETC, fibrosis intersticial familiar (mutaciones del surfactante C, mutaciones de la telomerasa)

EPID, enfermedad pulmonar intersticial Difusa; ETC, enfermedad del tejido conectivo; NH, neumonía por hipersensibilidad; NINE, neumonía intersticial no específica

El ensanchamiento difuso de los septos alveolares sin destrucción estructural importante se conoce como NINE. El patrón de NINE puede clasificarse además como celular, en el que las células inflamatorias son la fuente del engrosamiento del septo alveolar, o fibroso, en el que la deposición de colágeno es la causa del engrosamiento del septo alveolar (83). El patrón de fibrosis de la NINE ha sido descrito como fibrosis en tela de araña polvorienta, se muestra en la figura 8. Esta es una descripción fácil de recordar, y describe eficazmente el engrosamiento uniforme del septo alveolar que se observa.

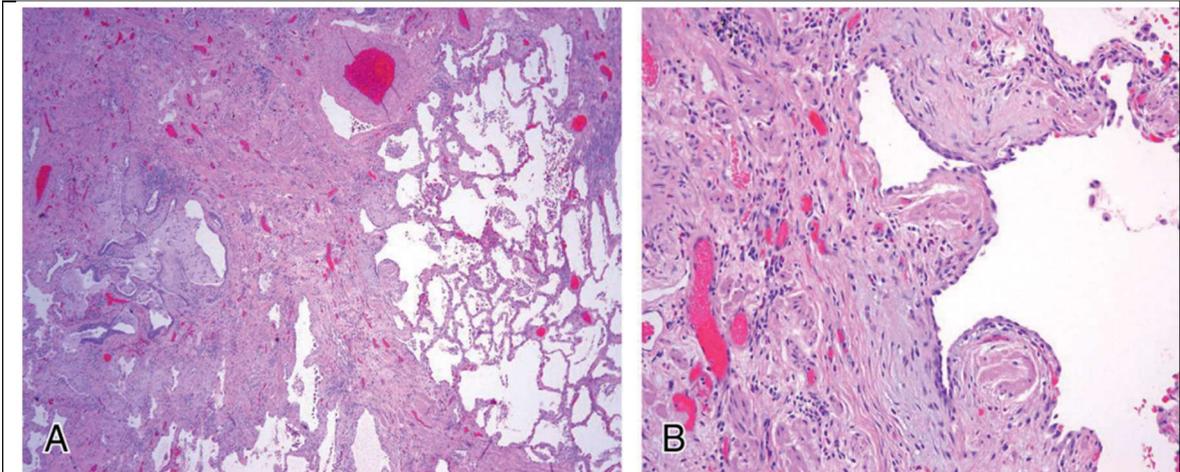


Figura 8. Neumonía intersticial usual (NIU). A. La imagen con poco aumento muestra la heterogeneidad temporal clásica de la NIU. La fibrosis intersticial marcada con patrón en panal subpleural microscópico está presente en la parte inferior izquierda, mientras que el parénquima de aspecto relativamente normal se observa más centralmente en la parte inferior derecha. B. La vista con gran aumento de un área en la interfase entre el parénquima fibroso y el parénquima menos afectado muestra varios focos fibroblásticos. Obsérvese la presencia de hiperplasia de células de tipo 2 en el epitelio suprayacente. Tomado de Collard & Richeldi, 2018

La arquitectura alveolar permanece relativamente intacta en este tipo de fibrosis no destructiva hasta bastante tarde en el desarrollo de la enfermedad, cuando a menudo hay una reducción alveolar. Los hallazgos anatomopatológicos de la NINE incluyen engrosamiento uniforme de los septos alveolares (es decir, hay grados similares de inflamación o fibrosis en las zonas periférica, central o de transición dentro del lóbulo). El pronóstico de la NINE se relaciona con el grado de fibrosis: los casos celulares conllevan un pronóstico favorable y los casos fibróticos una menor supervivencia (aunque algo mejor que la NIU)(1,41,84)

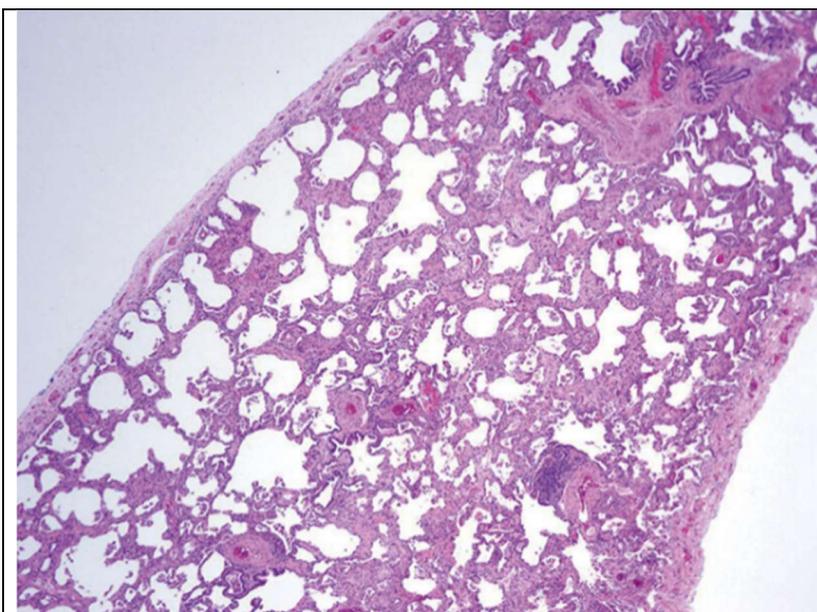


Figura 9. Patrón histopatológico de fibrosis de la NINE ha sido descrito como fibrosis en tela de araña polvorienta. (Collard & Richeldi, 2018)

Varias enfermedades pulmonares muestran un patrón de NINE, ver figura 9. Las entidades más frecuentes con este patrón son EPID-ETC, reacciones farmacológicas y NH. Otras enfermedades que muestran un engrosamiento difuso de los septos alveolares que pueden parecer una NINE, son enfermedades agudas como el daño alveolar difuso organizado (85), enfermedades fibrosas como la fibrosis intersticial relacionada con tabaquismo (86) y enfermedades menos frecuentes como el patrón septal alveolar de la amiloidosis(87)

5. Estudios de función pulmonar

Las pruebas de función pulmonar son un elemento básico para establecer el diagnóstico, orientar el pronóstico, controlar la evolución de la enfermedad y monitorizar la respuesta al tratamiento. En el 15% de los casos la alteración de la función pulmonar puede ser la primera manifestación de las EPID. No obstante, una exploración funcional respiratoria normal no excluye el diagnóstico de EPID (21). La alteración de la difusión de monóxido de carbono (DLCO) en las EPID suele ser muy precoz y, de hecho, es casi siempre el primer parámetro funcional respiratorio que se altera. Por lo tanto, la medición de la DLCO resulta muy sensible, aunque totalmente inespecífica para la detección de EPID. En este sentido un estudio realizado en pacientes en los que se disponía de evidencia histológica de EPID, pero a la vez presentaban una radiografía de tórax normal, mostró que la DLCO estaba normalmente descendida en más del 70% de los pacientes. No obstante, hay que tener presente que, es necesario corregir siempre el valor de DLCO por el volumen alveolar al que se haya realizado la prueba, debido a que con frecuencia los pacientes afectados de diversas neumopatías intersticiales tienen volúmenes alveolares bajos. Aunque lo normal es que también KCO (constante de difusión para el monóxido de carbono) se encuentre disminuída, a veces nos encontramos con pacientes que, a pesar de un DLCO baja, tienen KCO aparentemente «normal» (es decir superior al 80% del teórico) y evidencia histológica de EPID. En esta situación la interpretación de KCO como «normal» puede ser engañosa ya que, indudablemente, existe un deterioro en la transferencia de CO (88). A pesar de la utilidad que la DLCO tiene en el diagnóstico inicial de las neumopatías intersticiales difusas, desgraciadamente no existe ninguna correlación entre el valor de DLCO o KCO y el grado de celularidad y/o fibrosis demostrada histológicamente (89).

6. Estimación pronóstica en la patología pulmonar

Como en la mayoría de las especialidades clínicas existen marcadores con valor pronóstico en la patología pulmonar para facilitar la personalización del tratamiento. Sin embargo, la complejidad y gran diversidad de la patología pulmonar ha propiciado un desarrollo más bien limitado en este caso, y centrado particularmente en FPI y EPOC.

En FPI se ha desarrollado un score predictivo a partir de los datos clínicos, radiológicos y fisiológicos (CRF) de los pacientes que se correlaciona con el alcance y la gravedad de las características histopatológicas (90). La cifra de linfocitos en el LBA es un factor determinante en la supervivencia de paciente con FPI(91). En FPI también tiene impacto sobre la supervivencia el índice de masa corporal (IMC), la capacidad vital forzada (FVC), la capacidad de difusión (DLCO), hipoxemia en reposo, capacidad de caminar y la puntuación en la prueba de evaluación de la EPOC (92). Igualmente se han caracterizado los factores pronósticos en la EPOC (93) y en la hipertensión arterial pulmonar (94).

Se ha descrito que la presencia de neutrófilos en el LBA se relaciona con progresión a fibrosis en la enfermedad pulmonar intersticial (95,96). En FPI cada duplicación del porcentaje inicial de neutrófilos del LBA se asocia con un aumento del 30% en el riesgo de mortalidad, aunque no observaron asociación entre el porcentaje de linfocitos o eosinófilos en el LBA y la mortalidad (94). Además, las cifras de neutrófilos altos y de linfocitos bajos en LBA son factores pronósticos de mortalidad durante la hospitalización en hemorragia alveolar difusa (97). También en la Sarcoidosis el aumento de los porcentajes de neutrófilos en el LBA se asocia a mal pronóstico y a una mayor probabilidad de necesitar tratamiento con corticoides (98). El cociente neutrófilo/linfocito (NL) del LBA y los parámetros de la función pulmonar pueden contribuir a optimizar el tratamiento de los pacientes con FPI y a mejorar el seguimiento (99). Los autores describen que el cociente NL se correlacionó inversamente con los porcentajes de capacidad vital forzada (CVF) y volumen espiratorio forzado en 1 segundo (VEF1). Por otro lado, en pacientes con cáncer de pulmón el cociente NL elevado se asocia a supervivencia más corta (100), así mismo les ocurre a los pacientes con infección por *Mycobacterium avium* (101). Además, cocientes NL < 2,9 en sangre periférica se asocian a mayor riesgo de mortalidad (96).

7. Neumonías Intersticiales Idiopáticas (NII)

Las NII son enfermedades pulmonares intersticiales de etiología desconocida que comparten características clínicas y radiológicas similares, y se distinguen principalmente por los patrones histopatológicos en la biopsia de pulmón y clasifican en 8 subtipos histológicos, todas se caracterizan por diversos grados de inflamación, fibrosis y disnea.

El diagnóstico se basa en una adecuada y metódica anamnesis, TACAR, las pruebas de función pulmonar (PFP) y la biopsia pulmonar. El tratamiento varía de acuerdo con el subtipo. El pronóstico es variable, aunque presentan una elevada tasa de mortalidad asociada al desarrollo de fibrosis(102) .

En 2002, un panel de expertos de la ERS y la ARS elaboró un consenso en el que se clasificaban y definían por primera vez las NII. Se definieron los criterios diagnósticos y las características clínicas de siete entidades clínico-patológicas, FPI, NIA, NINE, neumonías asociadas a tabaquismo como BR-EPID y NID, NOC, NIL y fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática. En 2013 se publicó una puesta al día del consenso de 2002, en el que se introdujeron y nuevas entidades clínicas (2) (tabla 13)

Tabla 13. Clasificación de las NII. Consenso 2013.

- . Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)
- . Neumonía intersticial no específica idiopática (NINE)
- . Bronquiolitis respiratoria asociada a EPID (BR-EPID)
- . Neumonía intersticial descamativa (NIC)
- . Neumonía organizativa criptogénica (NOC)
- . Neumonía intersticial aguda (NIA)
- . Neumonías intersticiales idiopáticas raras
- . Neumonía intersticial linfoidea idiopática (NIL)
- . Fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática
- . Neumonías intersticiales idiopáticas no clasificables

Aunque la mayoría de entidades clínicas permanecen en la nueva clasificación, se introdujeron importantes cambios: a) se elimina el término de alveolitis fibrosante criptogénica en la definición de la FPI; b) la neumonía intersticial no específica (NINE) idiopática se acepta como entidad clínica bien definida, con supresión del término “provisional”; c) las principales NII se distinguen de las NII raras y de las NII no clasificables; d) los cuadros histológicos de neumonía organizativa aguda fibrinosa y neumonía intersticial con distribución bronquiocéntrica son nuevas entidades reconocidas; e) las principales NII se han agrupado en 1) enfermedades crónicas fibrosantes (FPI y NINE); 2) enfermedades relacionadas con el tabaco (BR-EPID, NID); 3) NII agudas/subagudas, NOC y NIA. En el apartado de NII raras se han incluido la NIL idiopática y la fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática.

El diagnóstico de las NII plantea dificultades, ya que las características clínicas, funcionales respiratorias y radiológicas pueden ser similares. Además, los hallazgos anatomopatológicos son, en ocasiones, difíciles de atribuir a una entidad clínica determinada. Es por ello, que el diagnóstico es un proceso dinámico en el que debe intervenir un equipo multidisciplinar, compuesto por neumólogos, radiólogos y anatomopatólogos.

7.1. Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)

La FPI constituye la forma más frecuente de las EPID, es una enfermedad progresiva de causa desconocida, debida en parte a una anormal respuesta de las células del epitelio bronquial a diferentes lesiones. Es una de las enfermedades más complejas para los neumólogos, por la dificultad diagnóstica, que exige una estrecha colaboración con distintos especialistas. El pronóstico casi siempre sombrío, pues la supervivencia a los 5 años alcanza el 20% (68). Tiene una mortalidad superior a la de muchos tipos de cáncer, por lo que no se debe banalizar, ni considerar como una enfermedad benigna, ver la figura 10.

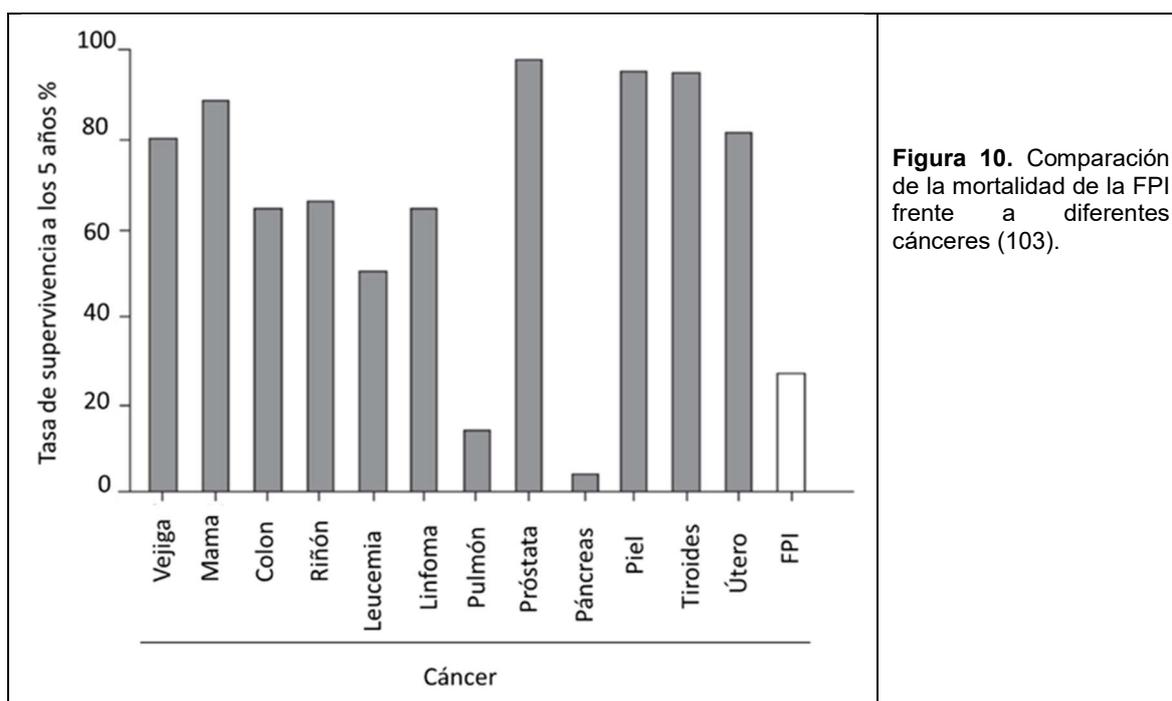


Figura 10. Comparación de la mortalidad de la FPI frente a diferentes cánceres (103).

Se caracteriza por un patrón radiológico y anatomopatológico de neumonía intersticial usual (NIU). Se produce una sustitución difusa y progresiva del parénquima pulmonar por depósito de matriz extracelular que lleva a una fibrosis irreversible (103). La FPI tiene predominio por el sexo masculino, con una prevalencia estimada de 12 casos por cada 100.000 mujeres y 20 casos por cada 100.000 hombres. Se estima que en España hay

entre 5525 y 7500 pacientes con FPI (104). Aparece sobre los 50 años, aunque puede presentarse en edades más tempranas en las formas familiares.

Con relación a su fisiopatología la evidencia científica ha propuesto factores moleculares y celulares que vinculan la FPI con el envejecimiento, tales como: inestabilidad genómica, desgaste de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, detección desregulada de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de células madre y comunicación intercelular alterada. (105)

El desarrollo de FPI se vincula fuertemente al sustrato genético. Se han descrito polimorfismos en moléculas que se correlacionan con mecanismos de reparación del epitelio bronquial como proteínas A2 y C surfactante (relacionadas con el aumento del estrés oxidativo del neumocito II) y mucina MUC5B (componente defensivo, interfiere en la reparación tisular). Igualmente se relaciona con el complejo telomerasa TERC y TERT y el acortamiento de telómeros y dificultad en la reparación tisular, con aumento del daño del ADN. El acortamiento anormal de los telómeros ha sido asociado con varios fenotipos progresivos de la enfermedad (106), alteraciones que se ven con más frecuencia en las formas familiares. Las formas familiares suponen entre el 0,3 al 3,7%. Se considera que es familiar si afectan a 2 o más miembros de la familia directa, se transmite de forma autosómica dominante con penetrancia variable y el debut ocurre a edades tempranas. Los mecanismos por los cuales los defectos de los telómeros contribuyen a la FPI son inciertos. Se ha propuesto que mutaciones de la telomerasa (FPI familiar) o respuesta proliferativa exagerada (FPI esporádica) contribuyen al acortamiento de los telómeros en el epitelio alveolar y que esto es crítico para el desarrollo de la enfermedad (105)

Modelos murinos en los que se generaron ratones nulos de telomerasa mediante la eliminación del factor 2 de unión a repeticiones telomérico (Trf2) apoyan esta hipótesis. En este modelo la disfunción de los telómeros se restringió a células epiteliales alveolares tipo 2 (AEC2), la función de las células madre de esta subpoblación se vio afectada, lo que llevó a la senescencia. Además, cuando se indujo disfunción de los telómeros en AEC2 adultas, las células *ex vivo* sobreviven pero permanecieron senescentes (105). Estos resultados indican que la disfunción de los telómeros fue dependiente de AEC2 y la reparación limitada del alveolo senescente y puede generar anomalías mesenquimales, se muestra en la figura 11.

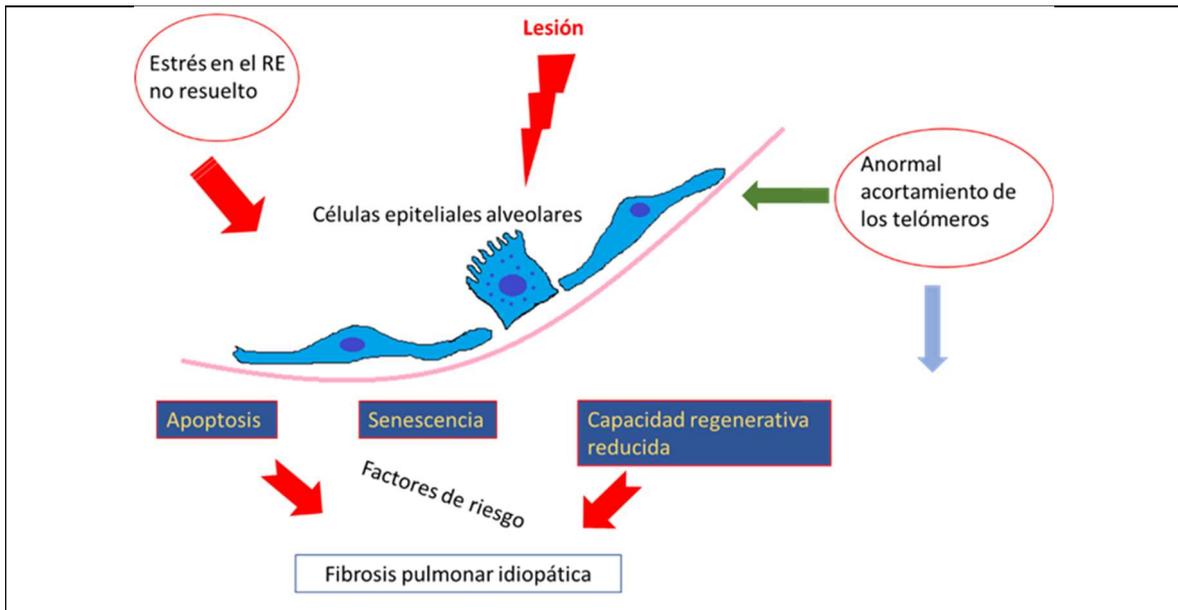


Figura 11. Patogénesis de la Fibrosis pulmonar idiopática. Las células epiteliales alveolares desempeñan un papel crítico en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática. El estrés del retículo endoplásmico no resuelto y el acortamiento extremo de los telómeros pueden conducir a la muerte celular epitelial o senescencia, y el fenotipo secretor asociado a la senescencia caracterizado por la regulación positiva de genes que codifican una respuesta transcripcional proinflamatoria y profibrótica compleja. RE: retículo endoplasmático (Moisés Selman et al., 2013).

Según la “teoría de la reparación anómala”, la aparición de microlesiones repetidas en el epitelio alveolar desencadenan la cascada fisiopatológica de la FPI. Estas microlesiones afectarían a la homeostasis de la unidad epitelio-mesenquimal y se iniciaría el proceso de daño e inflamación aséptica. En condiciones normales estas microlesiones se repararían, pero esto no ocurre en la FPI. Los continuos procesos de denudación alveolar y disrupción de las capas del epitelio alveolar conllevarían una destrucción de la membrana basal, se produciría entonces una activación de la cascada de la coagulación intraalveolar, con un desbalance entre las proteasas (metaloproteasas) y antiproteasa con activación de los miofibroblastos. Durante la fase inicial aguda de la lesión se activan las células del epitelio alveolar y se reclutan células de inflamación (macrófagos y neutrófilos) que producen importantes factores de crecimiento de fibroblastos (TGF-beta, TNF-alfa, factor derivado de crecimiento de plaquetas) que perpetúan el ciclo de daño epitelial, fallo en la reparación y fibrosis. Entre estos factores destaca el TGF-beta que se relaciona con la apoptosis de las células del epitelio alveolar, activación, invasión y resistencia a la apoptosis de los fibroblastos. Estos procesos conllevan un incremento del depósito de matriz extracelular dando la fibrosis típica de la FPI.

La senescencia celular ha sido considerada un evento crítico en el envejecimiento biológico. Se refiere a un permanente arresto del estado de crecimiento celular y la liberación de una variedad de factores inflamatorios, reguladores del crecimiento y de remodelación de tejidos (108,109). Desde 2010 aproximadamente, estudios han revelado que la senescencia de las células del epitelio alveolar conduce a fibrosis pulmonar (110). El envejecimiento pulmonar biológico se caracteriza por cambios y pérdida progresiva de la integridad fisiológica, lo que conduce a una función deteriorada. El envejecimiento implica cambios pulmonares, tanto estructurales como funcionales: Disminución de la respuesta fisiológica a las agresiones y deterioro en la calidad de la respuesta inmunitaria, obteniendo como resultado mayor susceptibilidad a la enfermedad. Con la edad se produce acúmulo de mutaciones y disminución de la capacidad de reparación de estas. Esta relación se sustenta en el hecho de que en la FPI se observan cambios y alteraciones relacionadas con el envejecimiento (107). Entre ellos, inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, disfunción mitocondrial, senescencia celular, alteraciones epigenéticas y la presencia de las STEM CELL exhaustas. También se han descrito alteraciones sugestivas de EPID en mayores de 75 años, asintomáticos, en zonas de mayor alteración mecánica al estiramiento como son las más afectas por la NIU. Aunque no existe una etiología clara, se han descrito factores predisponentes para el desarrollo de la FPI.

- Factores extrínsecos o ambientales
- Tabaco: 2/3 pacientes
- Inhalación de polvo mineral, de metal, sílice, latón, acero, plomo, polvo de madera (pino), actividades Laborales (carpintería de madera, agricultura y ganadería)
- Reflujo gastroesofágico (hasta 75%).
- Virus (virus del epstein-baar, citomegalovirus, virus herpes simple)

La senescencia del sistema inmunitario o la senescencia del sistema endocrino puede contribuir al desarrollo o progresión de la FPI. Por ejemplo, se ha encontrado una marcada regulación a la baja de CD28 en las células T CD4 circulantes en pacientes con FPI al compararlos con individuos sanos de la misma edad (111).

Aunque la FPI constituye la forma más frecuente de las EPID, para su **diagnóstico** se deben de excluir otras causas de EPID, principalmente de aquellas que pueden cursar con un patrón histológico de NIU, como la NH crónica, EPID-ETC (principalmente en la artritis reumatoide), asbestosis y en EPID asociadas a fármacos. El diagnóstico debe ser

dinámico, integrado y multidisciplinar, lo que permite aumentar la precisión diagnóstica, especialmente en los casos en los que existen discrepancias.

Los datos surgidos en los últimos años han permitido perfeccionar los criterios diagnósticos de la FPI. Los primeros esfuerzos de colaboración en el año 2000, desde la reunión ATS/ERS de la cual surgió la declaración consensuada para el diagnóstico de la FPI (68). Esta declaración, formulada sobre la base de la opinión de expertos y la interpretación de la investigación existente en aquel momento, sostenía que, para el diagnóstico definitivo de la FPI, se precisaba una biopsia pulmonar abierta que demostrara un patrón NIU de lesión pulmonar y los tres criterios siguientes: 1) exclusión de otras causas de EPID, como toxicidad medicamentosa, exposición ambiental o enfermedades del colágeno; 2) anomalías en las pruebas de función respiratoria o en el intercambio gaseoso, y 3) signos de las pruebas de imagen compatibles con el diagnóstico. Si no se disponía de una biopsia pulmonar abierta para diagnosticar una probable FPI se exigían los cuatro criterios mayores siguientes: 1) exclusión de otras causas de EPID; 2) anomalías en las PFR o en el intercambio gaseoso; 3) anomalías reticulares bibasales con mínimas opacidades en vidrio esmerilado en la TACAR y, 4) biopsia pulmonar transbronquial o muestra de LBA sin ningún dato que respalde un diagnóstico alternativo, junto con al menos tres de los cuatro criterios menores (edad > 50 años, comienzo insidioso de la disnea, duración de los síntomas mayores de 3 meses y crepitantes inspiratorios bibasales), ver figura 12.

Desde entonces, la evidencia adicional ha revelado la utilidad de la TACAR para el diagnóstico de la FPI: si un radiólogo experimentado afirma, con una confianza elevada, que el patrón de la TACAR es compatible con un patrón histológico de NIU, la NIU es el patrón histológico que se detecta en más del 90% de los casos (112). A partir de éstos y otros datos complementarios que corroboran la exactitud de la TACAR, ya no se exige la biopsia pulmonar abierta para el diagnóstico definitivo de la FPI cuando se detecta un patrón radiológico característico de NIU en la TACAR y la presentación clínica es compatible. De hecho, se han establecido criterios histológicos que permiten a los anatomopatólogos clasificar los hallazgos de las muestras de la biopsia abierta como NIU definitiva (tabla 14) posible, probable o no NIU, ya que la sensibilidad de la TACAR para el diagnóstico de la FPI es significativamente menor que su valor predictivo positivo.

Tabla 14. Criterios radiológicos del patrón NIU

	Patrón NIU	Probable NIU	Indeterminado para NIU	Hallazgos de diagnóstico alternativo
Distribución en TACAR	1. Basal y subpleural 2. Distribución a veces heterogénea	1. Basal y subpleural 2. Distribución a veces heterogénea	Variable o difusa	1. Predominio en LLSS 2. Preservación subpleural 3. Extenso patrón en mosaico
Hallazgos en TACAR	1. Panalización 2. Patrón reticular con bronquiectasias 3. Bronquioloectasias de tracción 4. Ausencia de hallazgo de no-NIU	1. Patrón reticular con bronquiectasias y bronquioloectasias de tracción 2. No Panalización 3. Ausencia de hallazgo de no-NIU	Evidencia de fibrosis con algunos hallazgos sugestivos de no-NIU	

Tomado de (8,68)

En la figura 12 se describe el algoritmo diagnóstico para FPI, en pacientes con sospecha de FPI (infiltrados pulmonares bilaterales sintomáticos o asintomáticos inexplicables en una radiografía de tórax o TAC de tórax, crepitantes inspiratorios bibasales y edad superior a 60 años), disnea de esfuerzo inexplicable y/o tos con evidencia de EPID deben ser evaluados cuidadosamente en busca de causas potenciales y/o identificables de EPID, como exposiciones ambientales domésticas y ocupacionales, AES) o toxicidad farmacológica. Los adultos de mediana edad (entre 40 y 60 años), especialmente los pacientes con riesgo de fibrosis pulmonar familiar, rara vez presentan el mismo cuadro clínico que el típico paciente mayor de 60 años. Si se identifica una causa potencial de EPID, el paciente debe someterse a una evaluación exhaustiva para confirmar o excluir otras causas conocidas, como NH, ETC, neumoconiosis y causas iatrogénicas (por ejemplo, toxicidad farmacológica, irradiación). Si no se establece un diagnóstico específico o no se identifica ninguna causa potencial de EPI, la evaluación posterior se ve influida por los patrones de las imágenes de la TACAR del tórax y los hallazgos clínicos de apoyo que surgen en el curso de la discusión multidisciplinaria para determinar o excluir el diagnóstico de FPI. La FPI se diagnostica si se da la combinación adecuada de patrones de TACAR y patrones histopatológicos. La biopsia pulmonar quirúrgica no está indicada en pacientes con alto riesgo de complicaciones intra, peri o postoperatorias (por ejemplo, hipoxemia grave en reposo y/o hipertensión pulmonar grave con una capacidad de difusión inferior al 25% tras corregir el hematocrito). La biopsia pulmonar quirúrgica puede ser innecesaria en algunos casos familiares. El panel no tiene ninguna recomendación a favor o en contra de

la biopsia transbronquial convencional y/o la criobiopsia. Sin embargo, si se realiza, la histopatología puede ser suficiente en pacientes seleccionados (113).

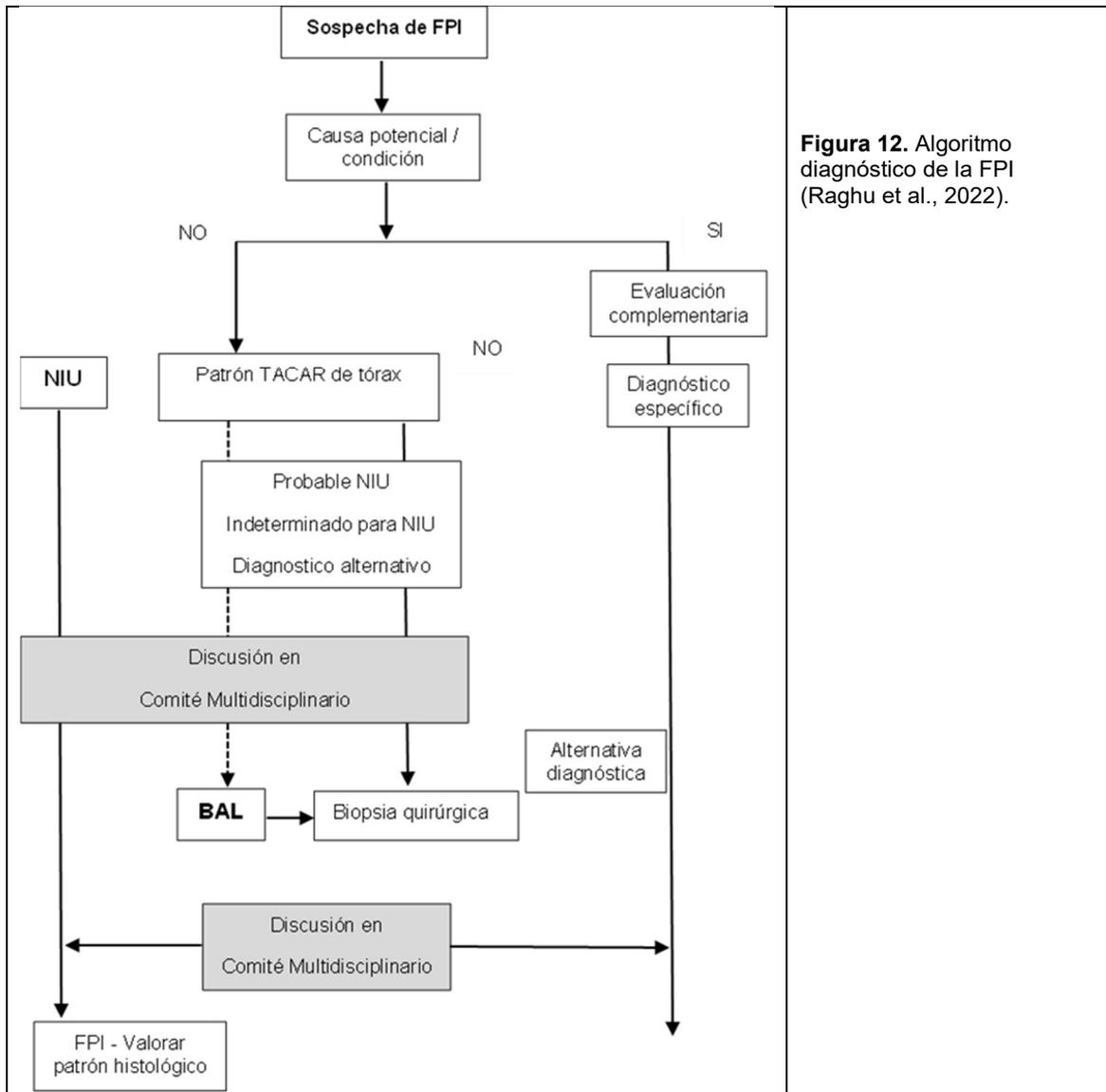


Figura 12. Algoritmo diagnóstico de la FPI (Raghu et al., 2022).

La historia natural de la enfermedad es muy variable y la evolución individual de cada paciente es difícil de pronosticar. Algunos pacientes presentan y progresión rápida, otros progresan mucho más lentamente y otros presentan periodos de estabilidad intercalados con episodios agudos. Una vez se produce una exacerbación aguda la recuperación es muy difícil. Es recomendable establecer el pronóstico en el momento del diagnóstico: disnea, PFR (FVC y DLCO), SatO2 final tras el 6MM, extensión del panal en el TACAR,

signos de hipertensión pulmonar en la ecocardiografía y la incorporación de un Score. Los factores que se han asociado con aumento de la mortalidad son: edad elevada, varón, severidad de la disnea, DLCO: < 35-40%, SatO₂ en 6MM < 88%, extenso panal de abeja y la presencia de hipertensión pulmonar.

Antes de iniciar el tratamiento en pacientes diagnosticados de FPI se deben valorar siempre el estadio de la enfermedad, los factores pronósticos y las comorbilidades. El abanico terapéutico incluye: a) evaluar el uso de antifibróticos (Pirfenidona y Nintedanib); b) evaluar las causas agravantes de la enfermedad (reflujo gastroesofágico, infecciones respiratorias, hipertensión pulmonar, tabaquismo); c) tratar los síntomas, principalmente la tos y la disnea; d) considerar siempre el trasplante pulmonar en casos que cumplan criterios; e) ofrecer terapia paliativa en la fase final de la enfermedad. En el apartado de tratamiento farmacológico se expone, más adelante en esta memoria, la acción de los dos antifibróticos disponibles en España.

7.2. Neumonía intersticial aguda (NIA)

La NIA es una NII muy severa y progresiva. Se caracteriza por un cuadro agudo (1-3 semanas) inicialmente, como un cuadro vírico de vías altas, con tos, fiebre, expectoración mucopurulenta que evoluciona a disnea progresiva con insuficiencia respiratoria que precisa ventilación mecánica ($pO_2/FiO_2 \leq 200$). Presenta mal pronóstico con una mortalidad del 50% a los 2 meses y del 60% a los 6 meses. Los pacientes que sobreviven pueden presentar curación completa, también pueden presentar recidivas o desarrollar una EPID crónica. Histológicamente se caracteriza por un daño alveolar difuso, en el que se distinguen dos fases (114): 1) fase aguda o exudativa, corresponde con la primera semana, se caracteriza por edema intersticial y la presencia de membranas hialinas; y 2) fase proliferativa u organizativa, a partir de la segunda semana, se caracteriza por una proliferación de fibroblastos, hiperplasia de los neumocitos tipo 2 y atipia celular. También pueden encontrarse trombos en las arterias de pequeño calibre y metaplasia escamosa del epitelio bronquial.

Radiológicamente es indistinguible de un SDRA, apareciendo opacidades bilaterales. En el TACAR se objetiva zonas difusas bilaterales de vidrio deslustrado con algunas zonas de consolidación en la fase exudativa. En la fase proliferativa se observa engrosamientos septales, bronquiectasias por tracción y panal de abeja.

En el LBA suele presentar un incremento de la celularidad y predominio de neutrófilos.

7.3. Neumonía intersticial no específica (NINE)

Los criterios diagnósticos de la NINE están recogidos en un consenso ATS. De acuerdo con los conocimientos actuales, la NINE es aceptada como una entidad clínica bien diferenciada, y se ha suprimido el término “provisional”. Además de la forma idiopática, la NINE puede asociarse con ETC, NH, toxicidad por fármacos y fibrosis pulmonar familiar.

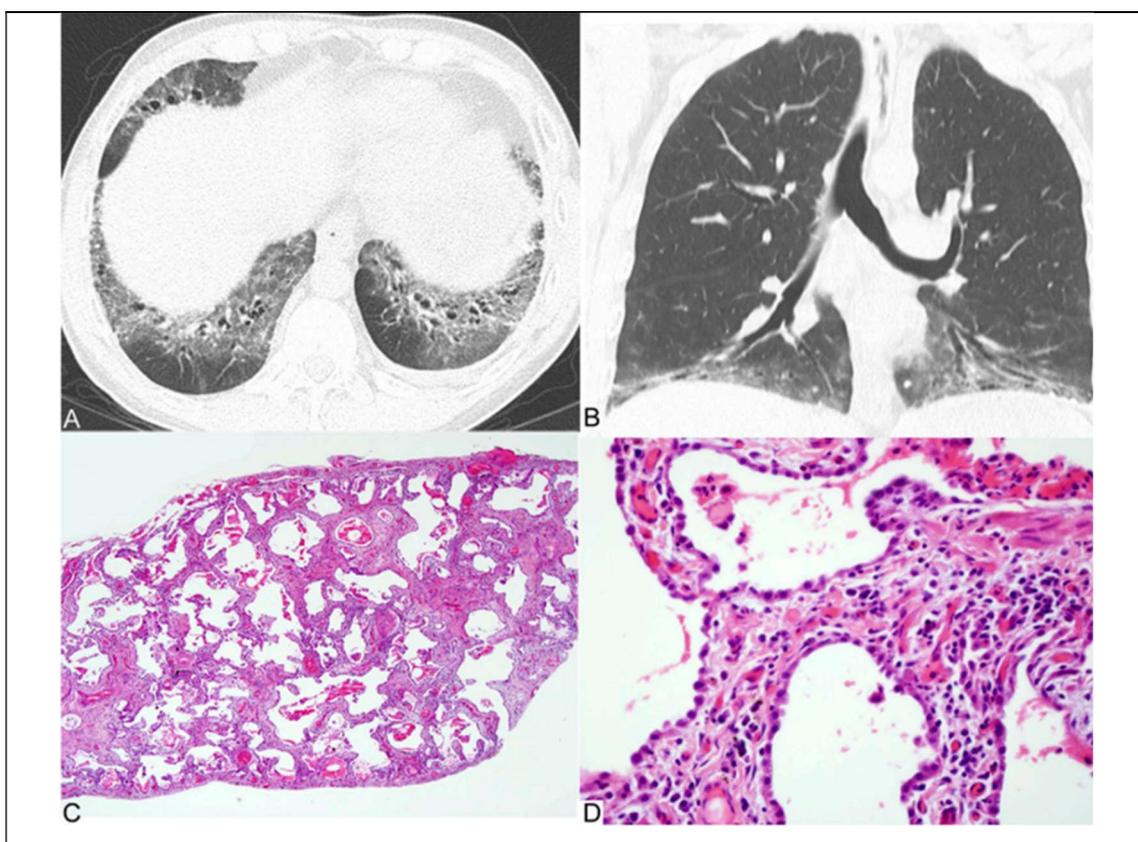


Figura 13. Neumonía intersticial no específica (NINE). Características en la tomografía computarizada TACAR e histología: (A) Las reconstrucciones axial y coronal de TAC muestran opacidades en vidrio deslustrado bilaterales confluentes en el lóbulo inferior con marcada bronquiectasias de tracción y pérdida de volumen del lóbulo inferior. En predominio peribroncovascular con preservación subpleural en la imagen axial. (C y D) Características histológicas: La biopsia pulmonar muestra engrosamiento difuso de la pared alveolar por fibrosis uniforme. La arquitectura alveolar está preservada y no hay nido de abeja ni focos fibroblásticos. La inflamación intersticial es leve.

An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. Travis W, Costabel

En las imágenes radiológicas las características más comunes son, opacidades en vidrio deslustrado relativamente simétricas y bilaterales con reticulaciones finas asociadas y pérdida de volumen pulmonar, lo que da lugar a bronquiectasias de tracción. Ejemplo en la figura 13. Cuando existe una pérdida de volumen subpleural inmediata, se considera muy

específica de la NINE. Los principales hallazgos en la TACAR son las imágenes en vidrio deslustrado bilaterales, opacidades reticulares con bronquiectasias de tracción y bronquiolectasias de predominio basal. Las imágenes en panal suelen estar ausentes en el momento del diagnóstico, pero pueden aparecer durante la evolución. Las características histológicas incluyen diversos grados de inflamación y fibrosis. La mayoría de los casos de NINE tienen un cuadro fibrótico predominante (115).

La NINE es el segundo patrón morfológico y patológico más común entre las EPID, tiene dos subtipos principales: 1) Tipo fibrótico: el más frecuente, con un pronóstico más desalentador; 2) Tipo celular: menos común, pero conlleva un mejor pronóstico debido a una muy buena respuesta al tratamiento.

Suele presentarse en adultos de mediana edad, entre 40 y 50 años. Es frecuente en la población blanca-europea. La prevalencia global es mayor en las mujeres debido a una alta asociación con la ETC, pero la prevalencia es similar en ambos sexos (19). Se trata de una entidad diferente a la FPI, ya que clínicamente es más insidiosa, con tos y disnea de esfuerzo. No presenta relación con el humo de tabaco, ni predominio de sexo, más prevalente en población menor de 40 años, a diferencia de la FPI. En la mayoría de los casos es insidiosa, es la forma más frecuente asociada a las ETC, también puede observarse en NH, EPID asociadas a la administración de fármacos o en pacientes con antecedentes de un Síndrome de Distrés Respiratorio del Adulto (SDRA). En la exploración física presenta estertores basales en el inicio que se pueden generalizar y acropaquias en hasta el 35% de los casos. El grado de fibrosis es variable.

7.4. EPID asociadas al tabaquismo

El humo del tabaco es una mezcla compleja de más de 4.000 sustancias químicas, muchas de las cuales tienen efectos tóxicos sobre la función celular. Además de EPOC y cáncer, los fumadores pueden desarrollar EPID. Actualmente se acepta de forma generalizada que el humo del tabaco es la principal causa de determinadas EPID, como la BR-EPID, la NID y la HPCL(84)

El tabaco también es un factor de riesgo en relación con el desarrollo de FPI y la EPID asociada a artritis reumatoide (AR) (115). También, es causante de algunos casos de

neumonía eosinófila aguda(116) y síndromes hemorrágicos pulmonares. Paradójicamente, el humo del tabaco puede proteger del desarrollo de NH(117)

7.4.1. Bronquitis respiratoria asociada a EPID (BR-EPID) y Neumonía Intersticial Descamativa (NID).

Niewoehner describió la BR como un hallazgo histopatológico consistente en una acumulación de macrófagos pigmentados centrada en los bronquios respiratorios y los alvéolos vecinos, un hallazgo omnipresente en la necropsia de los fumadores. (118). Basándose en la descripción original de Myers et al., otros trabajos han descrito más detalladamente las características clínicas y radiológicas de la BR-EPID como un proceso bronquiolar e intersticial específico que afecta a los fumadores y se caracteriza por la presencia de BR como la única anomalía patológica definible presente en la biopsia pulmonar (84).

La NID y la BR-EPID(21,119) se relacionan en el 90% de los casos con el consumo de tabaco, y se han considerado como distintos grados de afectación del pulmón por el humo de tabaco. Afecta a fumadores con un índice acumulado de tabaco medido por el índice de paquetes/año mayor de 30. La NID se ha encontrado también en casos asociados a conectivopatías o a la toma de fármacos, e incluso se ha descrito en fumadores pasivos. Hay una forma familiar asociada al déficit de la proteína C del surfactante.

Clínicamente se caracterizan por tos seca y disnea de esfuerzo de semanas y meses de duración. La NID afecta más a hombres entre la cuarta y quinta década de la vida. El 50% de los casos presenta acropaquías en la exploración. La BR-EPID se puede asociar con el enfisema centrolobulillar, es más frecuente en varones en la quinta década de la vida. En general presenta un buen pronóstico con mejoría tras el cese del consumo de tabaco y buena respuesta al tratamiento, con una supervivencia del 70% a los 10 años. En el TACAR muestra patrón en vidrio deslustrado de predominio periférico y basal con algunas líneas reticulares en la NID, y un patrón de vidrio deslustrado con engrosamiento de la pared bronquial y nódulos centrolobulillares en la BR-EPID.

7.4.2. Histiocitosis pulmonar de células de Langerhans (HPCL)

La enfermedad pulmonar intersticial asociada al hábito de fumar se ha correlacionado con diversos trastornos que afectan no solo a las vías respiratorias, también la pleura y el parénquima pulmonar, mostrando diversos patrones radiológicos. La historia clínica, los

hallazgos radiológicos y de anatomía patológica son importantes para distinguir estas enfermedades poco frecuentes, requieren de un enfoque multidisciplinar para el diagnóstico y el tratamiento adecuado

En varias series se han podido observar antecedentes de tabaquismo en la mayoría de los pacientes con BR-EPID (120) y HPCL. (121,122). Lo vuelvo a poner, ya me habías dicho que no interesaba este tema y que no profundizara en el:

En la población adulta diagnosticada de Histiocitosis pulmonar de células de Langerhans (HPCL) conocida también como; granulomatosis pulmonar de Langerhans o granuloma eosinófilo pulmonar, determinada por la exposición al humo de cigarrillo, y caracterizada por la acumulación de células de Langerhans CD1a, marcador de superficie celular en ocasiones detectable en otros órganos y sistemas.(123). La HPCL adulta van desde procesos relativamente benignos, como la histiocitosis de células de Langerhans (HCL) unifocal que afecta a los huesos, hasta formas multiorgánicas diseminadas (más frecuentes en los niños), con una morbilidad y mortalidad significativas (124). A diferencia de la NID y la BR-EPID, que afectan exclusivamente a los pulmones, aproximadamente el 15% de los pacientes adultos con HPCL pueden desarrollar la enfermedad fuera de la cavidad torácica. (123,125)

Se han identificado en la HCL mutaciones somáticas que conducen a una activación constitutiva de la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos, se trata de un regulador fundamental de muchas funciones celulares, como el crecimiento y la proliferación.(126,127). A su vez, se han identificado mutaciones parecidas en casos de HPCL adulta, como las mutaciones de BRAF (habitualmente BRAF-V600E), MAP2K1 y NRAS. (128)(129). En general, estos datos parecen sugieren que algunos casos de HPCL adulta representan neoplasias mieloides, más que un proceso reactivo inducido por la exposición al humo del tabaco. Esta observación plantea la posibilidad de un tratamiento dirigido (como el uso de vemurafenib en los casos positivos para BRAF-V600E) en pacientes con un proceso progresivo a pesar de haber dejado de fumar, lo que constituye la piedra angular del tratamiento para la HPCL adulta. (130,131)

7.5. Neumonía organizada criptogénica (NOC)

Se caracteriza por la existencia de tejido de granulación en la luz de los alveolos o conductos alveolares, constituido por miofibroblastos y tejido conectivo. Puede también afectar a la luz de los bronquiolos asociándose a bronquiolitis obliterante. Se trata de un cuadro inflamatorio no específico, que puede ser el resultado de múltiples causas: neumonías, abscesos de pulmón, empiemas, cáncer de pulmón, bronquiectasias, broncolitiasis, fibrosis pulmonar crónica, neumonías por aspiración, síndrome de lóbulo medio, infarto pulmonar, trasplante de pulmón o alogénicos de médula, procesos hematológicos, poliarteritis nodosa, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis reumática, síndrome de Sjögren, granulomatosis de Wegener, secundaria a fármacos o SDRA, entre otros (132).

Se presenta con un cuadro clínico subagudo con mialgias, fiebre, anorexia, tos y disnea que hace que, en la mayoría de los casos, sea diagnosticado erróneamente como neumonía o infección del tracto respiratorio inferior. La disnea es moderada. No presenta relación con el tabaco, aunque podría darse más en no fumadores. En la exploración podemos encontrar crepitantes estertores a la auscultación, no suele asociar acropaquias. No hay predominio de sexo, se da más frecuentemente entre los 50-60 años. Buen pronóstico, ya que suele responder al tratamiento.

El diagnóstico se suele realizar a las 2 semanas de inicio del cuadro, cuando el tratamiento antibiótico no ha sido efectivo. El patrón histológico es de neumonía organizada. Radiológicamente la forma más frecuente de presentación es como múltiples opacidades alveolares migratorias de distribución periférica y bilateral. El tamaño de los infiltrados varía desde centímetros hasta todo un lóbulo. Otras formas de presentación incluyen infiltrado bilateral difuso, asociado habitualmente con opacidades intersticiales y alveolares y lesión focal solitaria asociada a una enfermedad inflamatoria subaguda o crónica, en la que hay que hacer diagnóstico diferencial con un cáncer de pulmón (falso positivo en el PET). Las formas menos frecuentes incluyen áreas de vidrio deslustrado múltiples, masas o nódulos cavitadas, dilataciones bronquiales con neumatocelos, bandas irregulares subpleurales y aunque raro en algunas series se han descrito hasta un 22% de derrames pleurales. Es la EPID en la que con menos frecuencia aparecen adenopatías. En la figura 14 se esquematiza un ejemplo radiológico al TACAR de la NOC (2).

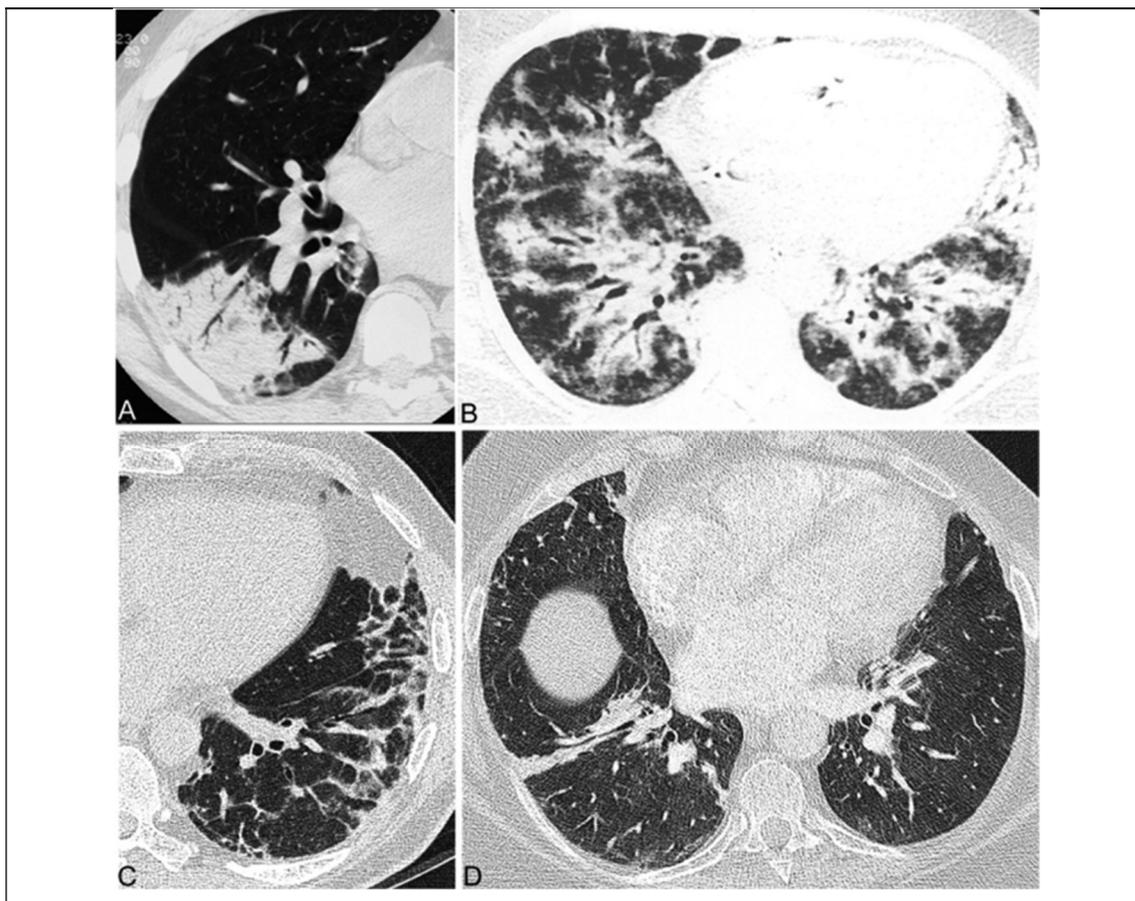


Figura 14. Neumonía organizada criptogénica. Características de la TACAR con (A) consolidación periférica y broncogramas aéreos, (B) distribución broncocéntrica, (C) patrón perilobular que muestra consolidación focal del lóbulo inferior derecho, con opacidad en vidrio deslustrado más central, correspondiente a una neumonía invertida central, que corresponde al signo del halo invertido, y halo invertido, y (D) consolidación bandas. *American Thoracic Society Documents. (2)*

La biopsia transbronquial puede ser diagnóstica, en el caso de no serlo la biopsia por videotoracoscopia es de elección. Presenta buena respuesta al tratamiento con corticoides.

7.6. Neumonía intersticial linfoide (NIL)

Es una forma poco frecuente de EPID. Se describió inicialmente como un proceso linfoproliferativo circunscrito al pulmón, aunque se ha visto que esta asociación es excepcional (133). Aparece asociado con frecuencia a otras enfermedades, sobre todo a enfermedades autoinmunes: síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, anemias autoinmunes, miastenia gravis, cirrosis biliar primaria o tiroiditis de Hashimoto, entre otras. También se ha visto involucrado en procesos de inmunodeficiencias primarias (algunos casos de inmunodeficiencia variable común) y secundarias (como la infección por VIH).

Clínicamente se caracteriza por un cuadro subagudo, con tos, disnea de esfuerzo y otros síntomas asociados como artralgias, fiebre o febrícula y pérdida de peso. En la exploración encontramos crepitantes estertores en la auscultación y raramente presentan acropaquias. Predominio en mujeres. Suele presentar buena respuesta al tratamiento con corticoides, aunque en hasta 1/3 de los casos evoluciona a fibrosis. Radiológicamente suele presentarse con un patrón de vidrio deslustrado, aunque se puede encontrar quistes perivasculares o panal de abeja. Patrón miliar se ha descrito en pacientes con SIDA. Histológicamente presenta un patrón de NIL.

7.7. Fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática

Se caracteriza por presentar fibrosis, de predominio en los lóbulos superiores, a lo largo de la superficie de la pleura y del parénquima pulmonar subpleural. Radiológicamente muestra un engrosamiento de la pleura apical con pequeñas consolidaciones pulmonares subpleurales. El diagnóstico se establece mediante la biopsia pulmonar. Presenta mal pronóstico, ya que es progresiva y carece de tratamiento específico. Se ha asociado a la toma de fármacos citostáticos y al síndrome de enfermedad de injerto contra huésped en el trasplante de médula.

7.8. Neumonías intersticiales idiopáticas no clasificables.

En la última actualización del 2013 se incluyó dentro de las NII, ya que en ocasiones no es posible incluir algunos casos en ninguno de los grupos clínico-patológicos descritos. El comité multidisciplinar determina un factor importante en la toma de decisiones diagnóstica o terapéuticas. Suponen el 10% de las EPID en algunas series, atribuyéndose la dificultad del diagnóstico a la imposibilidad de realizar una biopsia quirúrgica que permita establecer el diagnóstico definitivo, como consecuencia del alto riesgo quirúrgico en estos pacientes (134).

8. EPID de causa conocida, o asociadas a entidades bien definidas

8.1. EPID asociada a enfermedad enfermedades del tejido conectivo (EPID-ETC)

Las EPID también puede ser la primera manifestación de una ETC en un paciente previamente sano. Antes de realizar un diagnóstico de NII, es necesaria una evaluación cuidadosa de una posible ETC. Aunque los hallazgos radiológicos (Tabla 4) y la apariencia histopatológica de la EPID-ETC se asemejan mucho a los de las NII, ciertas características pueden ofrecer indicios de un diagnóstico previamente desconocido de ETC subyacente. Algunos pacientes no encajan en una ETC bien definida, pero se sospecha enfermedad reumatológica por los síntomas y las anomalías analíticas. La afección de estos pacientes se ha denominado de varias formas, como «EPID-ETC indiferenciada», «ETC pulmonar-dominante» y «EPID con características de autoinmunidad»(1,135). Más recientemente, la ERS y la ATS le dieron el nombre de «neumonía intersticial con características autoinmunitarias» (136).

La información sobre este grupo de pacientes está evolucionando.(34) El seguimiento a largo plazo de estos pacientes debe incluir una evaluación reumatológica repetida a medida que aparecen nuevos síntomas. Pocos estudios controlados abordan el tratamiento primario dirigido contra la enfermedad pulmonar, aunque a menudo se utilizan corticoesteroides y otros inmunosupresores. La respuesta al tratamiento y el pronóstico varían en función de la ETC subyacente, así como del patrón histopatológico, aunque se necesitan estudios adicionales sobre estas cuestiones, ya que los datos son limitados.

El pronóstico de los pacientes con EPID-ETC ha mejorado significativamente en los últimos años, pero la EPID-ETC sigue siendo una afección refractaria, que constituye una de las principales causas de mortalidad. Dado que se trata de un factor pronóstico importante, se han realizado muchos estudios observacionales y de intervención. Sin embargo, la ETC es un grupo heterogéneo de afecciones, lo que hace que el curso clínico, las respuestas al tratamiento y el pronóstico sean extremadamente diversos (6).

Los pacientes con EPID-ETC a menudo no muestran síntomas respiratorios al inicio de la enfermedad y los síntomas son generalmente inespecíficos. Muchos pacientes presentan disnea de esfuerzo, fatiga o tos. Sin embargo, la EPID-ETC en un paciente asintomático

se puede descubrir incidentalmente por anomalías radiográficas. Una vez que la función respiratoria se deteriora de forma importante, se desarrolla con frecuencia disnea progresiva. Con el transcurso del tiempo, los defectos de difusión conducen a la hipoxemia durante el esfuerzo. El aumento de la ventilación del espacio muerto también puede contribuir a la disnea. En última instancia, la fibrosis progresiva conduce a un aumento del trabajo respiratorio debido al elevado retroceso elástico de los pulmones (137). El diagnóstico de EPID-ETC puede retrasarse si los pacientes atribuyen la disnea leve a la mala forma física y a la edad. El estado funcional limitado en pacientes con enfermedad articular grave o debilidad muscular importante también puede contribuir a retrasos del diagnóstico. Por el contrario, el inicio temprano de la tos puede conducir a una evaluación pulmonar más precoz. Otros síntomas relacionados con el sistema respiratorio son dolor torácico pleurítico secundario a serositis y otras afecciones pleurales, o de forma infrecuente por el desarrollo de un neumotórax (33). Con la fibrosis pulmonar avanzada, puede desarrollarse hipertensión pulmonar, lo que da lugar a síntomas de *cor pulmonale*, como edema de los miembros inferiores y molestias torácicas o síncope durante el ejercicio.

Distinguir la FPI de la EPID-ETC es clínicamente importante, sobre todo a medida que surge nueva información sobre el tratamiento de la FPI. En concreto, el tratamiento inmunosupresor con corticoesteroides y azatioprina se utiliza a menudo en la EPID-ETC, pero actualmente se piensa que está contraindicado en los pacientes con FPI debido al aumento de la mortalidad (138). Los nuevos fármacos antifibróticos están indicados en el tratamiento de la FPI. (139).

Cuando se lleva a cabo una evaluación detallada de las características en la anamnesis y la exploración física, se estima que al menos el 15% de los pacientes presentarán pruebas de la ETC subyacente (32). Casi una cuarta parte de los pacientes de una serie que presentaba NII y ANA negativos tenían hallazgos clínicos del síndrome antisintetasa (32). A menudo se utilizan análisis complementarios en la búsqueda de manifestaciones sistémicas de ETC: enzimas musculares (creatinina cinasa y aldolasa), electromiografía (EMG), resonancia magnética de los músculos esqueléticos proximales y la biopsia muscular en la evaluación de posibles polimiositis, así como el esofagograma con bario y otras pruebas de motilidad en la búsqueda de pruebas de insuficiencia de la motilidad en la esclerosis sistémica y la ETC. Aunque fundamentado en pequeñas series de casos, muchos centros que se especializan en la evaluación de pacientes con EPI realizan pruebas rutinariamente de autoanticuerpos anti-Ro (anti-SSA) y La (anti-SSB), anticuerpos contra la topoisomerasa

(anti-Scl-70), anticuerpos antisintetasa, anticuerpos antirribonucleoproteína y anticuerpos anti-CCP, además de ANA y FR (tabla 15) (140). Los paneles extendidos de anticuerpos de la miositis en algunos centros pueden incluir anti-MDA5 (también conocido como CADM-140 y asociado con la dermatomiositis amiofálica), PMScl (asociado con la superposición de PM/ES) y Ro-52 (asociado con una enfermedad pulmonar más agresiva) (141,142).

Tabla 15. Análisis de autoanticuerpos para la evaluación de EPID-ETC		
Autoanticuerpo	Tipo	Asociación con ETC
ANA	Acs. Anti-nucleares	LES, ES, SS, PM/DM. Patrón nucleolar: ES
ADNbc	Acs. Anti-ADN bicatenario	Específicos de LES
SS-A	Acs. Anti-Ro	LES, SS, asociado a miositis
SS-B	Acs. Anti-La	Frecuente en SS, 15% en LES
Scl-70	Acs. Anti-topoisomerasa 1	Frecuente en ES (70% prevalencia); alta asociación con EPID
FR	Factor reumatoide	Sensibilidad del 60-80% y especificidad del 60-85% para AR
CCP	Acs. Anti-peptido citrulinado cíclico	Sensibilidad 68%, especificidad del 96% para AR
RNP	Acs. Anti-ribonucleoproteína pequeña nuclear U1	EMTC
JO-1, EJ, PL7, PL12, OJ	Acs. Anti-ARNt sintetetasas	DM/PM/Síndrome anti-sintetasa

Las anomalías típicas de las pruebas de función respiratoria son un patrón restrictivo y deterioro de la difusión. Este último precede a menudo a otros defectos. La prueba de esfuerzo constituye una modalidad importante, aunque poco utilizada para los pacientes con EPID, ya que con frecuencia desenmascara la desaturación de esfuerzo en un paciente con una saturación arterial normal en reposo (143,144).

El primer indicio de EPID subyacente en ETC puede surgir de una radiografía de tórax anómala, que normalmente muestra opacidades basales, reticulares periféricas o reticulonodulares (145). Sin embargo, especialmente al inicio de la enfermedad, la radiografía de tórax puede ser normal (146). Otros signos torácicos de las ETC también pueden indicar el diagnóstico subyacente, como derrames pleurales y pericárdicos o engrosamiento y dilatación esofágica. En algunos casos de EPID-ETC, el patrón y la distribución de las anomalías radiológicas observadas en la TACAR predicen con exactitud los hallazgos anatomopatológicos (147). Entre las características frecuentes que pueden estar presentes en la TACAR están las opacidades en vidrio deslustrado, la formación de retículas, las bronquiectasias y los nódulos centrolobulillares (148). Las anomalías en la EPID-ETC crónica fibrótica ocurren predominantemente en la periferia y en las bases pulmonares y se asocian a menudo con distorsión estructural, bronquiectasias por tracción y patrón en panel. Con frecuencia, los hallazgos de la TACAR en la FPI-ETC son

indistinguibles de los de las NII (149). El diagnóstico diferencial radiológico con mayor frecuencia incluye NIU, NINE, NID y NOC, así como la atenuación pulmonar heterogénea, en mosaico, debida al atrapamiento aéreo de la enfermedad obstructiva de las vías respiratorias pequeñas, como se observa en la bronquiolitis obliterante. Los patrones mixtos o inclasificables son frecuentes y deben sugerir un diagnóstico de EPID-ETC si no se sospechaba previamente (tabla 16) (150,151).

Tabla 16. Características de los patrones radiológicos y anatomopatológicos comunes observados en EPID-ETC.

	Distribución en la TCAR	Características radiológicas habituales	Características anatomopatológicas habituales
NIU	Periférica, subpleural Basal Bilateral	Marcas reticulares Bronquiectasias por tracción Patrón en panal Opacidades en vidrio esmerilado mínimas	Fibrosis con patrón en panal microscópico Focos de fibroblastos Afectación pulmonar heterogénea Distribución subpleural Ausencia de características que indiquen un diagnóstico alternativo
NINE	Periférica, subpleural Basal Bilateral	Opacidades en vidrio esmerilado Marcas reticulares «Línea NINE» Patrón en panal mínimo o ausente	Fibrosis y/o inflamación intersticial homogénea Patrón en panal infrecuente
NO	Difusa A menudo periférica y parcheada Ocasionalmente peribroncovascular	Opacidad y consolidación parcheada en vidrio esmerilado A veces nodular	Tapones de tejido conectivo en las vías respiratorias pequeñas Distribución parcheada Fibrosis escasa o ausente Preservación de la estructura pulmonar Inflamación crónica intersticial leve
DAD	Difusa	Opacidades en vidrio esmerilado Consolidación del espacio aéreo	Membranas hialinas Edema Distribución difusa Aspecto temporal uniforme
NIL	Difusa	Opacidades en vidrio esmerilado Nódulos centrolobulillares Engrosamiento septal y broncovascular Quistes de paredes delgadas	Infiltración intersticial difusa por linfocitos T, células plasmáticas, macrófagos Distribución septal alveolar Hiperplasia linfoide

DAD, daño alveolar difuso; NIL, neumonía intersticial linfoide; NINE, neumonía intersticial no específica; NIU, neumonía intersticial usual; NO, neumonía organizada; TCAR, tomografía computarizada de alta resolución.

Tomado de: American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165(2):277–304.

A pesar de la incapacidad de predecir claramente la histología mediante el uso de TACAR en todos los casos, muchos pacientes con ETC no se someten a una biopsia pulmonar quirúrgica, ya que se cree que el diagnóstico histopatológico es poco probable que cambie el tratamiento.(152).

En la figura 15 se ilustra el patrón radiológico al TACAR de una mujer diagnosticada de esclerodermia.

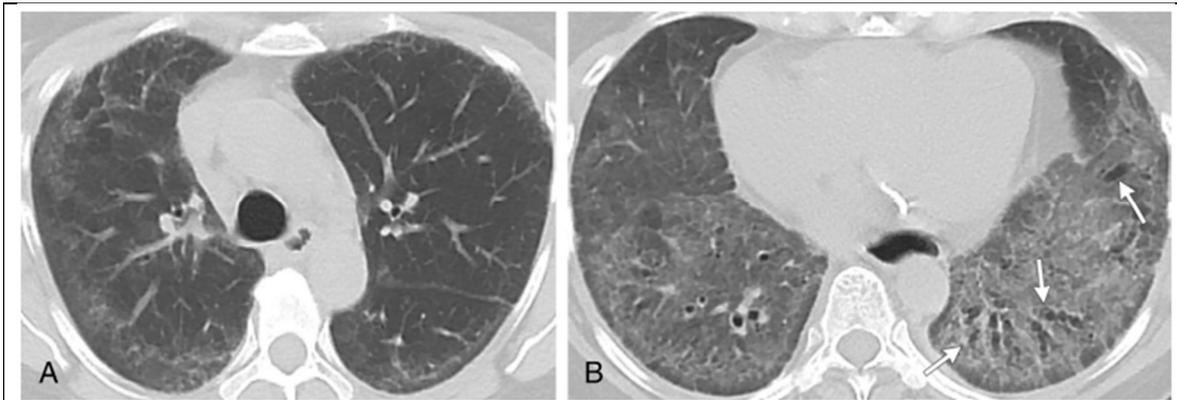


Figura 15. NINE – Esclerodermia. imágenes de TACAR (cortes de 1,25 mm de grosor) obtenidas de las partes media (A) e inferior (B) del tórax de una mujer de 57 años con esclerodermia que presentó tos y disnea. Existen áreas bilaterales de opacidad en vidrio deslustrado con distribución periférica (A) y predominio en el lóbulo inferior (B), así como marcas reticulares y bronquiectasias por tracción (flechas), todas ellas compatibles con un patrón de neumonía intersticial no específica. (Ancochea B. J. & De Miguel Díez.J., 2008).

La EPID en AR es considerada como una complicación multifactorial para la cual existen diferentes hipótesis sobre su patogénesis, que incluye los factores ambientales (relacionados con la exposición al humo del cigarro o al sílice), factores epidemiológicos (más frecuente en hombres >65 años), factores genéticos (asociación con HLA-DRB1*15, HLA-DRB1*16 y HLA-DRB1*17)(115,153), factores relacionados con autoinmunidad (mayor frecuencia de anticuerpos anti-CCP, altos títulos de factor reumatoide (154), incremento en la concentración de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e interferón γ (INF- γ), así como un posible rol de la interleucina 33 (IL33) (154). Una forma de EPID más rara está relacionada con efectos adversos de algunos fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, usados para el tratamiento de la AR, como metotrexate, leflunomida, sales de oro y sulfasalazina, o anti-TNF (etanercept, adalimumab), rituximab y tocilizumab (155).

La sintomatología general se caracteriza por tos no productiva y disnea progresiva de esfuerzo; la disnea puede aparecer tardía por la inactividad física secundaria a la poliartritis que tienen estos individuos. El examen físico muestra estertores bibasales finos, dedos en palillo de tambor y, en casos avanzados, «*cor pulmonale*» (156). En las pruebas funcionales los enfermos presentan un patrón restrictivo, con disminución de la CPT o de la CVF, con un FEV normal o incrementado en el primer segundo (FEV1).

La radiografía de tórax puede ser normal a pesar de existir afección intersticial. Muchas veces, las radiografías suelen ser indistinguibles, exhibiendo infiltrados reticulares

predominantemente en el lóbulo inferior de manera bilateral y opacidades en imagen de vidrio despulido consistentes con NH (157). La imagen radiográfica de tórax es suficiente sólo en algunos casos. Sin embargo, esta prueba tiene una baja sensibilidad y especificidad, por lo que deja sin diagnóstico a una gran cantidad de sujetos con NII en fases iniciales (112)

La TACAR suele ser anormal en más del 80% de los pacientes con sospecha clínica de NII asociada con AR y revela anomalías en pacientes con radiografías normales (155,158). La TACAR es generalmente suficiente para confirmar el diagnóstico de EPID, aunque en una minoría de los enfermos es necesaria la biopsia de pulmón. Chen y colaboradores describieron un incremento del 61% en el diagnóstico de EPID usando la combinación de TACAR y PFP (159).

En la figura 16 se muestra un patrón radiológico (radiografía de tórax y TACAR) NIU en el contexto de una artritis reumatoide.

En muchas EPID-ETC, la neutrofilia en el LBA parece correlacionarse con una peor función respiratoria, pero no siempre se ha demostrado su utilidad para el diagnóstico o la evaluación del pronóstico y para la respuesta al tratamiento (160–162).

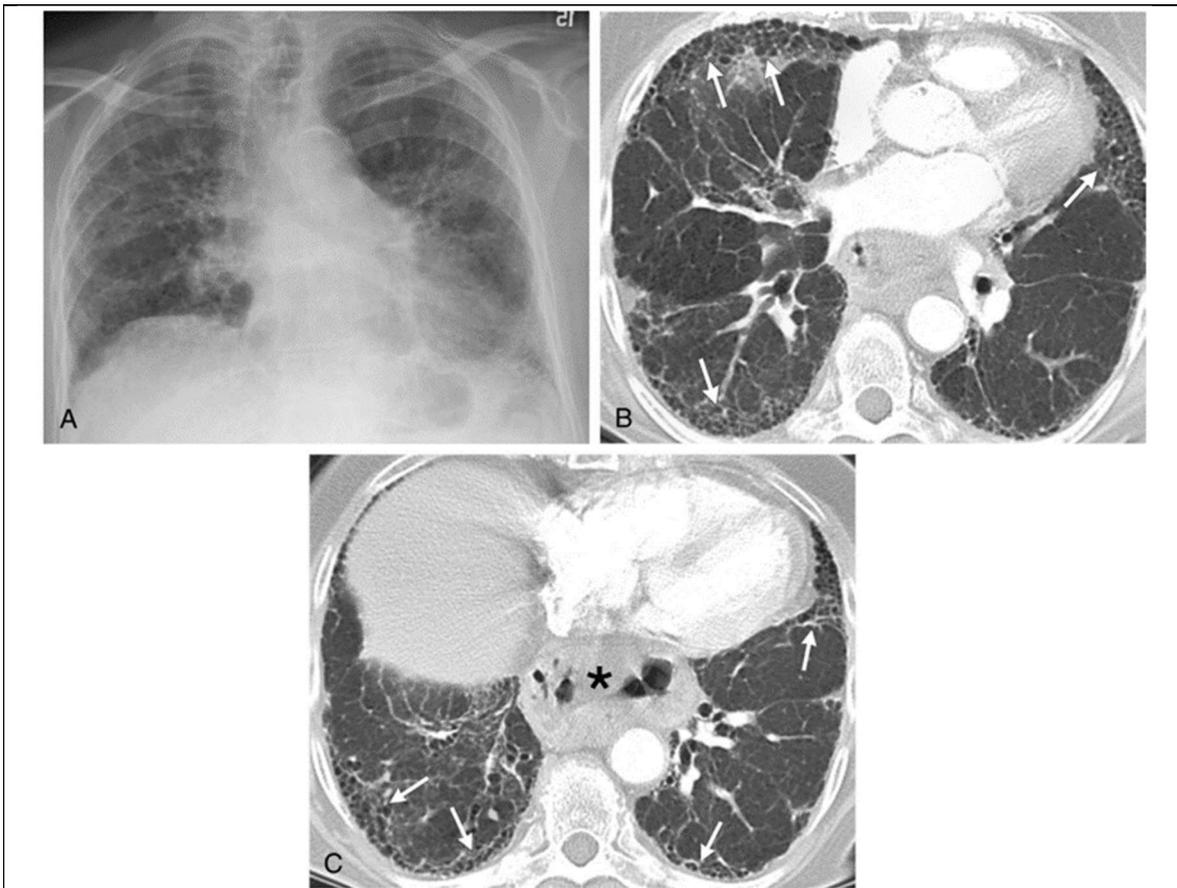


Figura 16. Caso clínico, patrón radiológico artritis reumatoide . Mujer de 73 años con artritis reumatoide y patrón radiológico de neumonía intersticial usual. La radiografía anteroposterior de tórax (A) muestra una reducción de los volúmenes pulmonares con marcas intersticiales gruesas predominantes en los lóbulos inferiores, compatibles con fibrosis pulmonar. Las imágenes de TACAR (cortes de 1,25 mm de grosor) de las partes media (B) e inferior (C) del tórax muestran marcas reticulares periféricas con distorsión de la estructura y pequeños quistes subpleurales/patrón en panal (flechas). La paciente también tiene una gran hernia de hiato (asterisco). (*Ancochea B. J. & De Miguel Díez.J., 2008*).

8.2. EPID por inhalación de polvos (neumoconiosis)

Las neumoconiosis engloban un grupo muy amplio de enfermedades pulmonares causadas por la inhalación de polvo inorgánico en concentraciones altas y muchas veces de origen ocupacional. Esta característica, que las convierte en enfermedades prevenibles, no ha tenido como consecuencia su erradicación, ni siquiera en países con legislatura laboral avanzada y siguen siendo causa de abundante morbimortalidad. La aparición y descubrimiento continuo de nuevas sustancias tóxicas y exposiciones de riesgo hace necesario que el conocimiento de sus cuadros clínicos siga siendo imprescindible para el neumólogo y médico en general.

La fibrosis pulmonar secundaria se consideró durante muchos años la respuesta patológica a la inhalación de polvo por parte de sujetos susceptibles. Se excluían por tanto otras alteraciones parenquimatosas o de las vías aéreas, causantes de alteraciones funcionales significativas consecuentes a la toxicidad de las partículas inhaladas. El término de neumoconiosis se definió en la 4ª Conferencia Internacional de neumoconiosis (163) como “la acumulación de polvo en los pulmones y las reacciones tisulares a su presencia” y suelen conllevar alteraciones histológicas del tipo de las fibrosis intersticiales (sílice y carbón), o la presencia de agregados de macrófagos cargados de partículas con reacciones fibrosas acompañantes menos evidentes (hierro, estaño, bario).

En este grupo de enfermedades debe establecerse siempre una relación causal entre la exposición ocupacional y la patología pulmonar, tanto en términos de tiempo y niveles de exposición como de latencia. Se distinguen de las fibrosis pulmonares causadas por inhalación de sustancias orgánicas precisamente por sus largos periodos de latencia. Es por tanto de gran importancia el recoger una historia laboral detallada que analice todos los pormenores de la vida laboral del enfermo, incluyendo descripciones del ambiente general del lugar de trabajo.

La **silicosis** es una de las más representativas y es producida por la sílice, material ubicuo compuesto por moléculas de dióxido de silicio y que se presenta en forma cristalina (cuarzo, tridimita, cristobalita), microcristalina (pedernal, sílex) y amorfo (kieselgur/tierra diatomea). La exposición en concentraciones que pueden causar enfermedad respiratoria es típica de ciertas profesiones (tabla 17), no sólo por exposición directa a esta sustancia, sino también en aquellas ocupaciones donde la sílice no es la materia buscada o manipulada, sino que actúa como contaminante(164) abrasivo o relleno(165). Sigue siendo una causa significativa e incluso creciente(165,166) de morbilidad y mortalidad pese a ser prevenible y su incidencia tiende a ser subestimada. La silicosis mantiene una relación dosis-respuesta casi estricta, siendo los factores más importantes en su aparición la intensidad y la duración de la exposición a la forma cristalina de la sílice. Se requieren tiempos de exposición prolongados para la aparición de silicosis (10-20 años) y una exposición similar va a producir lesiones comparables en la mayoría de los trabajadores expuestos.

La forma de presentación de la silicosis se relaciona con la duración, intensidad de la cantidad de sílice inhalada. Las formas crónicas son las más frecuentes. En general aparecen después de más de 15 años de exposición. Las formas aceleradas se presentan después de exposiciones más breves, pero más intensas. La silicosis aguda es

consecuencia de inhalaciones masivas. Esta última tiene mal pronóstico, con elevada mortalidad y una presentación similar a las proteinosis alveolar. La silicosis crónica se caracteriza por la presencia de un patrón intersticial nodular difuso, bilateral de predominio en lóbulos superiores. Se denomina silicosis simple, cuando el tamaño de los nódulos es inferior a 1 cm y complicada cuando la conglomeración de varios nódulos forma masas de fibrosis masiva progresiva superiores a 1 cm. Las formas simples no suelen producir afectación de la función pulmonar. Las formas complicadas se acompañan de alteración ventilatoria de predominio obstructivo. La disnea de esfuerzo es el síntoma más habitual y su intensidad se relaciona con el grado de afectación funcional. En los casos avanzados se asocia insuficiencia respiratoria con menos frecuencia. La silicosis se manifiesta con características clínicas, funcionales y radiológicas muy similares a la FPI (167).

Tabla 17. Exposición profesional a sílice y asbesto	
Sílice	Asbesto
Canteras de granito y pizarra...	Astilleros
Talleres de manipulación de piedra	Construcción y demoliciones
Construcción, arquitectura de interiores	Industria del automóvil
Fabricación y manipulación de conglomerados artificiales de cuarzo	Aislamientos acústicos y térmicos
Limpieza con chorro de arena	Fabricación textil
Excavaciones, perforación de túneles	Ferrocarriles
Minería de interior y a cielo abierto	Fabricación y uso de fibrocemento

El diagnóstico de certeza se alcanza con los hallazgos de partículas de sílice y nódulos de colágeno en el parénquima pulmonar. Sin embargo, excepto en los casos de presentación atípica, no es necesaria la biopsia pulmonar y se puede establecer el diagnóstico con la presencia de 3 criterios: 1) historia clínica de exposición a inhalación de sílice, 2) presencia de un patrón radiológico característico con opacidades nodulares difusas, bilaterales y/o masas de fibrosis masiva progresiva; y 3) exclusión de otras causas.

En cuanto al diagnóstico por imagen, los hallazgos típicos son un patrón intersticial nodular difuso, bilateral de predominio en lóbulos superiores, adenopatías, pilares y mediastínica, con frecuencia, calcificadas parcialmente en cáscara de huevo. En casos de silicosis complicadas, se observan masas fibrosis masiva progresiva habitualmente bilaterales y en los lóbulos superiores. La TACAR aporta una mayor sensibilidad, pero su uso se reserva para unas indicaciones precisas, como presentaciones atípicas, casos dudosos o para excluir otras patologías.

No hay tratamiento para evitar o frenar la progresión de la silicosis la actuación clave es la prevención los síntomas derivados del defecto ventilatorio obstructivo, tienen el mismo tratamiento que la EPOC. Los pacientes con silicosis tienen mayor riesgo de tuberculosis en aquellos con infección latente está indicada la profilaxis con isoniazida.

La **asbestosis**, es causada por la inhalación de asbesto, que se utiliza como un término genérico para denominar a un grupo de minerales formados por silicatos, que se fragmentan en forma de fibras. Debido a sus efectos sobre la salud, una directiva de la Unión Europea prohíbe su uso desde el año 2002. Con anterioridad a esta fecha, ha sido ampliamente utilizado y debido a su largo periodo de latencia, a pesar de la prohibición actual, estas enfermedades tienen plena actualidad. La exposición puede ser ocupacional (trabajadores expuestos), doméstica (familiares trabajadores, vehiculada por ropas) o ambiental (tabla 17).

La inhalación de fibras de asbesto puede producir enfermedad pleural benigna (derrame pleural, engrosamiento y placas pleurales), neumoconiosis (asbestosis, similar a la fibrosis pulmonar idiopática) y enfermedad neoplásica (mesotelioma y cáncer de pulmón). La clave para el diagnóstico es la identificación de la exposición, los hallazgos radiológicos característicos (placas pleurales calcificadas, atelectasia redonda, bandas parenquimatosas), y la identificación de cuerpos de asbesto en muestras biológicas. (167).

8.3. Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) o Alveolitis Alérgica Extrínseca

La NH representa una serie de enfermedades granulomatosas intersticiales que afectan al parénquima pulmonar como consecuencia de la inhalación mantenida en el tiempo de distintas sustancias orgánicas. Una pequeña proporción puede deberse a la inhalación de productos inorgánicos de bajo peso molecular. Esta inhalación condiciona la aparición de una respuesta inmunitaria exagerada, siendo necesario que exista predisposición genética (aproximadamente solo el 5-10% del total de pacientes expuestos tiene la enfermedad) asociada a factores ambientales favorecedores para su aparición (168).

Se han identificado más de 300 antígenos como desencadenantes de NH. Las actividades agrícolas, la manipulación de aves y la contaminación del agua determinan cerca del 75% de los casos.

Las sustancias orgánicas suelen clasificarse según el tipo y la ocupación: el pulmón de granjero, causado por la inhalación de polvo de heno que contiene actinomicetos termófilos, es el prototipo. El trastorno parece representar una reacción de hipersensibilidad de tipo IV, en la que la exposición repetida al antígeno en personas genéticamente susceptibles conduce a la alveolitis neutrofílica y mononuclear, seguida por infiltración linfocítica intersticial y reacción granulomatosa. Con la exposición continua, se produce fibrosis con obliteración bronquiolar. Las precipitinas circulantes (anticuerpos inducidos por el antígeno) no parecen tener una participación etiológica primaria. El antecedente clínico de alergia (como asma y alergias estacionales) no es un factor predisponente. El consumo de cigarrillo parece retrasar o impedir el desarrollo de NH, quizá a través de la inhibición de la respuesta inmunitaria del pulmón a los antígenos inhalados. Sin embargo, el hábito de fumar puede exacerbar la enfermedad una vez establecida.

La NH tiene similitudes clínicas con otros trastornos que tienen fisiopatologías diferentes.

El síndrome tóxico por polvo orgánico (micotoxicosis pulmonar, fiebre por granos), por ejemplo, es un síndrome que consiste en fiebre, escalofríos, mialgias y disnea que no requiere sensibilización previa y se cree que es causada por la inhalación de toxinas producidas por hongos u otros contaminantes del polvo orgánico. La enfermedad de los llenadores de silos puede conducir a la insuficiencia respiratoria, la bronquitis y la bronquiolitis obliterante o a SDRA, pero es causada por la inhalación de óxidos de nitrógeno, tóxicos producidos por el ensilaje del maíz o la alfalfa recién fermentados.

El asma ocupacional provoca disnea en personas sensibilizadas previamente a un antígeno inhalado, pero ciertas características como obstrucción del flujo de aire, eosinofilia de las vías respiratorias y diferencias en los antígenos desencadenantes permiten diferenciarla de la NH.

El diagnóstico de NH requiere un alto índice de sospecha en pacientes con síntomas compatibles, así como antecedentes de exposición ocupacional, como pasatiempos o doméstica que puedan estar relacionados. Debe considerarse la NH en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial recién diagnosticada. De manera sistemática, se realizan TACAR y pruebas de la función pulmonar. Puede ser necesaria la realización de biopsia pulmonar y LBA si los resultados no son concluyentes. Los diagnósticos diferenciales incluyen enfermedades pulmonares medioambientales, sarcoidosis, bronquiolitis obliterante, ETC y otras EPID.

Los indicios en la anamnesis incluyen: neumonías atípicas recurrentes, inicio de los síntomas después de ocupar un nuevo puesto de trabajo o vivienda, una bañera de hidromasaje, sauna, piscina u otras fuentes de agua estancada o daños causados por el agua, tener aves como mascotas, la exacerbación y el alivio de los síntomas en determinados ámbitos específicos y fuera de ellos. El examen físico a menudo no ayuda al diagnóstico, aunque puede haber ruidos pulmonares anormales e hipocratismo digital. Los signos y síntomas tienden a depender de si la aparición es aguda, crónica, subaguda. Solo una pequeña proporción de personas expuestas presenta síntomas y en la mayoría de los casos sólo después de semanas a meses de exposición y sensibilización.

Las PFP deben indicarse como parte de la evaluación convencional de casos presuntos de NH. El síndrome puede causar un patrón obstructivo, restrictivo o mixto de las vías aéreas. Con mayor frecuencia, la enfermedad avanzada causa un defecto restrictivo (volúmenes pulmonares reducidos), una capacidad disminuida de difusión del monóxido de carbono (DLCO) e hipoxemia. La obstrucción de las vías aéreas es inusual en la enfermedad aguda, pero puede desarrollarse en la enfermedad crónica.

Los pacientes con NH pueden clasificarse en NH no fibrótica o fibrótica. La presencia de fibrosis se asocia a peores resultados. Una proporción de pacientes con NH fibrótica desarrollan un fenotipo progresivo, caracterizado por el empeoramiento de la fibrosis, el deterioro de la función pulmonar y la mortalidad precoz.

Los resultados del LBA rara vez son específicos para la NH. La linfocitosis (> 50%) con relación CD4/CD8 < 1 es característico de la enfermedad. Otros hallazgos pueden incluir mastocitos > 1% (después de la exposición aguda) y aumento de neutrófilos y eosinófilos.

La biopsia pulmonar quirúrgica está indicada cuando las pruebas no invasivas no resultan concluyentes. Los hallazgos varían, pero típicamente incluyen metaplasia peribronquiolar, granulomas no necrosantes poco formados y neumonía organizada. La fibrosis intersticial puede estar presente en los casos crónicos.

No existen directrices establecidas para el tratamiento de la NH. Siempre que sea posible, debe evitarse la exposición a antígenos. Los inmunosupresores se utilizan habitualmente en pacientes con NH, pero no se ha demostrado que ralenticen el empeoramiento de la enfermedad fibrótica. El nintedanib, un inhibidor de la tirosina cinasa, ha sido aprobado por la FDA para ralentizar la progresión de las enfermedades pulmonares intersticiales fibrosantes crónicas con un fenotipo progresivo, incluida la NH fibrótica progresiva. Las

intervenciones no farmacológicas, como la oxigenoterapia, la rehabilitación pulmonar y los cuidados de apoyo, pueden ser componentes importantes del tratamiento general de los pacientes con NH progresiva (169).

El tratamiento habitual de la NH aguda o subaguda es con corticoides, en general prednisona, 60 mg por vía oral 1 vez al día durante 1 a 2 semanas, luego se disminuye gradualmente en las siguientes 2 a 4 semanas con 20 mg 1 vez al día, seguido por disminuciones semanales de 2,5 mg hasta interrumpir el fármaco.

El tratamiento de la NH crónica es por lo general con cursos más largos de prednisona en dosis de 30 a 40 mg por vía oral 1 vez al día con disminución en función de la respuesta clínica. Algunos pacientes requieren agentes ahorradores de corticosteroides (p. ej., micofenolato, azatioprina) para el tratamiento a largo plazo.

8.4. EPID inducidas por fármacos y radioterapia

La enfermedad pulmonar inducida por fármacos es un problema clínico que se desarrolla en pacientes sin enfermedad pulmonar previa. Desarrollan síntomas respiratorios, cambios en las radiografías de tórax, deterioro de la función pulmonar, cambios histológicos o varios de estos hallazgos en asociación con el tratamiento farmacológico o radioterápico.

Se ha informado que más de 150 medicamentos o categorías de fármacos como causa desencadenante de la enfermedad pulmonar. Sin embargo, no se conoce el mecanismo fisiopatológico, pero se cree que muchos de ellos provocan una respuesta de hipersensibilidad. Más adelante (tabla 18) se describen los principales fármacos responsables.

Algunos fármacos (p. ej., nitrofurantoína) pueden causar patrones de lesión diferentes en distintos pacientes, también esto se puede ser influenciado y observar variabilidad clínica, en el contexto de la situación basal de cada individuo.

Los síndromes inducidos por fármacos pueden causar fibrosis intersticial, según el fármaco desencadenante; neumonía organizada, asma, edema pulmonar no cardiogénico, derrames pleurales, eosinofilia pulmonar, hemorragia pulmonar o enfermedad venoclusiva (véase tabla 18).

Tabla 18. Sustancias con efectos tóxicos en el pulmón y entidades clínicas relacionadas.	
Entidad Clínica	Fármaco o agente desencadenante
Asma	Ácido acetilsalicílico, betabloqueantes, cocaína, dipiridamol, hidrocortisona IV (rara vez en pacientes con asma sensible al ácido acetilsalicílico), IL-2, metilfenidato, nitrofurantoína, protamina, sulfasalazina, alcaloides de la vinca (con mitomicina-C)
Neumonía organizada	Amiodarona, bleomicina, cocaína, ciclofosfamida, metotrexato, minociclina, mitomicina C, penicilamina, sulfasalazina, tetraciclina
Neumonitis por Hipersensibilidad	Azatioprina más 6-mercaptopurina, busulfán, fluoxetina, radiación
Neumonía o fibrosis intersticial	Anfotericina B, bleomicina, busulfán, carbamazepina, clorambucilo, cocaína, ciclofosfamida, difenilhidantoína, flecainida, heroína, melfalán, metadona, metotrexato, metilfenidato, metisergida, aceite mineral (a través de la microaspiración crónica), nitrofurantoína, nitrosoureas, procarbazona, silicona (inyección subcutánea), tocainida, alcaloides de la vinca (con mitomicina-C)
Edema de pulmón no cardiogénico	Agonistas betaadrenérgicos (p. ej., ritodrina, terbutalina), clordiazepóxido, cocaína, citarabina, aceite etiodado (IV y a través de microaspiración crónica), gemcitabina, heroína, hidrocortisona, metadona, mitomicina C, fenotiazinas, protamina, sulfasalazina, agentes tocolíticos, antidepresivos tricíclicos, factor de necrosis tumoral, alcaloides de la vinca (con mitomicina-C)
Hemorragia parenquimatosa	Anticoagulantes, azatioprina más 6-mercaptopurina, cocaína, aceite mineral (a través de la microaspiración crónica), nitrofurantoína, radiación
Derrame pleural	Amiodarona, anticoagulantes, bleomicina, busulfán, bromocriptina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IL-2, metotrexato, metisergida, mitomicina C, nitrofurantoína, ácido para-aminosalicílico, procarbazona, radiación, tocolíticos drogas (p. ej., terbutalina)
Infiltrado pulmonar con eosinofilia	Amiodarona, anticoagulantes, bleomicina, busulfán, bromocriptina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IL-2, metotrexato, metisergida, mitomicina C, nitrofurantoína, ácido para-aminosalicílico, procarbazona, radiación, tocolíticos drogas (p. ej., terbutalina)
Enfermedad Vascular Pulmonar	Amiodarona, anticoagulantes, bleomicina, busulfán, bromocriptina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IL-2, metotrexato, metisergida, mitomicina C, nitrofurantoína, ácido para-aminosalicílico, procarbazona, radiación, tocolíticos drogas (p. ej., terbutalina)

9. EPID asociadas a otros procesos no bien conocidos

9.1. Sarcoidosis

La sarcoidosis es un trastorno inflamatorio sistémico caracterizado por la presencia de granulomas no caseificantes e inflamación linfocitaria(170,171). La enfermedad afecta con mayor frecuencia a los pulmones y los ganglios linfáticos torácicos, aunque puede afectar a cualquier sistema orgánico (tabla 19). Las manifestaciones y el curso clínico de la

sarcoidosis son muy variables (172). Se estima que un 30-60% de los pacientes con sarcoidosis son asintomáticos, generalmente con adenopatías hiliares bilaterales aisladas. Las manifestaciones sintomáticas afectan con mayor frecuencia al sistema respiratorio, con síntomas de tos, disnea y molestias torácicas. El síndrome de Löfgren es una forma distinta de presentación de la sarcoidosis aguda, con poliartritis, adenopatías hiliares bilaterales, eritema nodoso y, a menudo, uveítis. Esta forma de sarcoidosis suele resolverse por completo. Otras manifestaciones clínicas dependen del alcance y la extensión de la afectación extrapulmonar. Más de un tercio de los pacientes presentarán una enfermedad crónica activa, que se asocia a un riesgo considerable de morbilidad a largo plazo, derivada de la disfunción orgánica progresiva y las complicaciones del tratamiento inmunosupresor. Dada la falta de biomarcadores validados de la actividad de la enfermedad, el tratamiento de la sarcoidosis implica la evaluación seriada de los síntomas, las imágenes radiográficas y la medición objetiva de la función orgánica.

Una mayor concordancia entre gemelos monocigóticos que entre gemelos dicigóticos y una agrupación familiar en el 5-16% de los pacientes se relaciona con la predisposición al desarrollo de sarcoidosis. Un estudio multicéntrico realizado en Estados Unidos comparó 706 casos recién diagnosticados de sarcoidosis comprobada mediante biopsia con familiares de la misma edad, sexo y raza, y halló un riesgo relativo aproximadamente cinco veces mayor en hermanos y padres de individuos con sarcoidosis (173). HLA-DR3 se asocia con un mayor riesgo de sarcoidosis en poblaciones escandinavas y europeas, mientras que HLA-DR1 y HLA-DR4 se asocian con protección. Se encontró una asociación significativa con HLA-DRB1*11:01 en afroamericanos y caucásicos, mientras que HLA-DRB1*15:01 fue un factor de riesgo sólo en caucásicos. HLA-B*07 y HLA-A*03 también confieren riesgo de sarcoidosis, independientemente de los alelos HLA de clase II (174).

Tabla 19. Sarcoidosis sistémica. Afectación por órganos y sistemas.

Órgano/Sistema comprometido	Características Clínicas principales
Pulmón (90%)	Adenopatías hiliares bilaterales, enfermedad restrictiva y obstructiva, enfermedad fibroquística, bronquiectasias, micetomas.
Vía aérea alta (5-10%)	Ronquera, obstrucción laríngea o traqueal, congestión nasal, sinusitis, deformidad de la nariz en silla de montar.
Ocular (25%)	Uveítis anterior y posterior, coriorretinitis, conjuntivitis, neuritis óptica, glaucoma, agrandamiento de la glándula lagrimal
Piel (20-30%)	Nódulos y placas cutáneas y subcutáneas, eritema nodoso, lupus pernio, máculas hipopigmentadas
Hepático (10%)	Hepatomegalia, prurito, ictericia, cirrosis
Cardíaco (10-15%)	Arritmias, bloqueo cardíaco, cardiomiopatía, muerte súbita
Sistema Nervioso central (5-10%)	Neuropatías craneales (por ejemplo, parálisis de Bell), meningitis aséptica, masa encefálica, convulsiones, hidrocefalia obstructiva, mielopatía, polineuropatía, mononeuritis múltiple, neuropatía de fibras pequeñas.
Glándulas salivares y parotídeas (< 10%)	Agrandamiento de las glándulas salivales y parótidas, síndrome seco
Hematológico (30-50%)	Linfadenopatía, esplenomegalia, hiperesplenismo, anemia, linfopenia, trombocitopenia
Articular /musculoesquelético (10-20%)	Poliartritis, quistes óseos, tendinitis aquilea, dactilitis, dolor de talón, miopatía
Endocrino (< 10 %)	Hipercalciuria (más frecuente), hipercalcemia, hipopituitarismo, diabetes insípida
Renal (< 5%)	Cálculos renales, nefrocalcinosis, insuficiencia renal, epididimitis, masa testicular

El HLA también se asocia a la evolución clínica. HLA-DRB1*03:01 y DQB1*02:01 se asocian a una evolución favorable, mientras que DR14 y DR15 se asocian a una enfermedad grave y crónica en poblaciones europeas y japonesas, al igual que DRB1*15:01:01 y DQB1*06:02, estrechamente relacionados. (174)

Cada vez hay más pruebas de que la inmunidad innata, en concreto los TLR y otros receptores de la inmunidad innata pueden estar implicados en la sarcoidosis. Se han observado respuestas mejoradas a la estimulación de TLR2, incluida la inducción de TNF, en las células pulmonares y sanguíneas de pacientes con sarcoidosis (175).

Un reto conceptual importante en la sarcoidosis es comprender cómo se produce la fibrosis pulmonar en un entorno dominado por IFN- γ , que se sabe que inhibe la síntesis de colágeno. Los macrófagos activados tipo M2 se han asociado histológicamente con la miofibrosis en muestras de biopsia de sarcoidosis muscular (176). Aunque un fenotipo de macrófago M2 se asocia a menudo con un entorno de citocinas Th2 (que nunca se ha

identificado en la sarcoidosis, ni siquiera en la enfermedad fibrótica tardía), un fenotipo de macrófago M2 promotor de la fibrosis podría ser inducido por IL-10 o CCL18, que están presentes en los tejidos de la sarcoidosis. Los macrófagos M2 pueden promover el reclutamiento de fibrocitos mediante la expresión de TGF-beta, CCL18 y CXCL12; los macrófagos M2 también son capaces de diferenciarse a células similares a los fibrocitos que expresan colágeno. Aún no está claro si los macrófagos M2 son el resultado de mecanismos inherentes a la sarcoidosis o de respuestas generalizadas de cicatrización de heridas.(176)

Los síntomas más frecuentes de la sarcoidosis pulmonar son tos, disnea progresiva y molestias torácicas mal definidas de gravedad variable (véase la tabla 19). La producción crónica de esputo y la hemoptisis son más frecuentes en la enfermedad fibroquística avanzada. Típicamente hay pocos hallazgos físicos. Los crepitantes pulmonares se oyen en menos del 20% de los pacientes y el hipocratismo es raro. La hipertensión pulmonar y el *cor pulmonale* son complicaciones importantes, pero poco reconocidas, asociadas a tasas de mortalidad más elevadas.

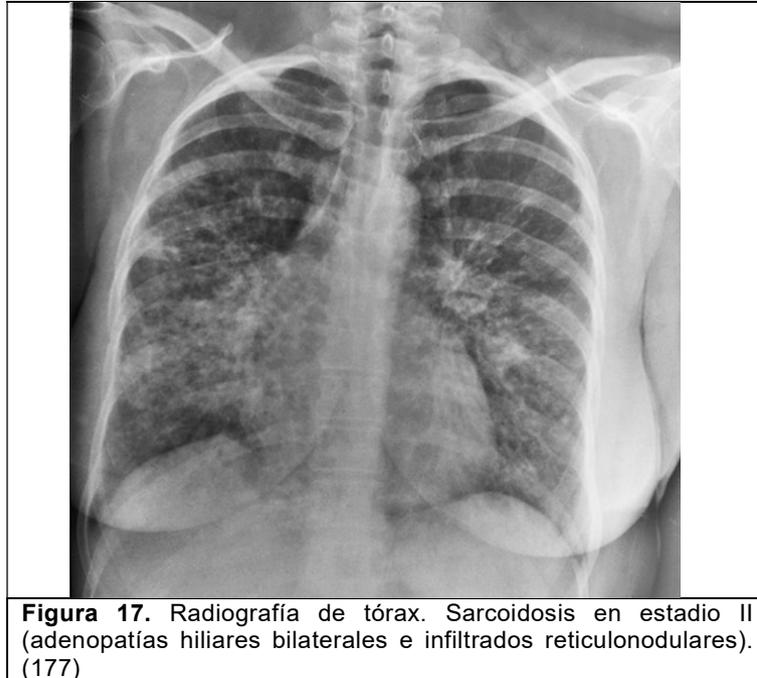
Los resultados de la radiografía de tórax son anormales en más del 90% de los pacientes con sarcoidosis. Según las imágenes la sarcoidosis se puede dividir en los siguientes estadios:

Estadio 0. No hay alteraciones en la radiografía de tórax

Estadio I. Se observa inicialmente en el 40-50% de los casos. Típicamente, la adenopatía hiliar es discreta, simétrica y a menudo acompañada de adenopatía paratraqueal derecha. El único hallazgo son adenopatías hiliares bilaterales. Las adenopatías se asocian con un agrandamiento de la cadena paratraqueal derecha de los grupos ganglionares de la ventana aortopulmonar (50%) y de los de la región subcarinal (20%). No hay afectación parenquimatosa pulmonar. Es posible su calcificación en forma de cáscara de huevo. En el 75% de los casos se produce una regresión de la enfermedad en los 3 años siguientes, mientras que en el 10% de los casos el agrandamiento ganglionar persiste durante más de 10 años

Estadio II. Adenopatías hiliares bilaterales junto con una afectación parenquimatosa. El patrón más frecuente es el intersticial reticulonodulillar, de predominio en los campos medios y superiores en el 20-30% de los casos, ver figura 17. Esta forma de presentación

se da en el 25% de los casos. De ellos, dos tercios evolucionan hacia la resolución espontánea, mientras que el resto se mantiene estable o progresa lentamente



Estadio III. Existe una afectación parenquimatosa intersticial sin afectación ganglionar. La afectación pulmonar es bilateral y simétrica, de predominio en los campos superiores. Se produce por la ocupación del intersticio peribroncovascular y los tabiques interlobulillares y subpleurales por conglomerados de granulomas. Los patrones radiográficos que aparecen más habitualmente son el nodulillar (30-60%) y el reticulonodulillar (25-50%). Con menos frecuencia se observa un patrón reticular (15-20%) u opacidades en vidrio deslustrado (2%). En ocasiones los nódulos pueden aparecer como múltiples opacidades redondeadas, compactas, con bordes bien delimitados y mayores de 1 cm, que se asemejan a metástasis. Esta forma de presentación se suele denominar sarcoidosis nodular.

Estadio IV o de fibrosis pulmonar: Se caracteriza por la existencia de una fibrosis pulmonar, con pérdida de volumen, áreas en panal de abejas con bronquioloectasias de tracción, quistes y áreas de enfisema. También aparecen conglomerados nodulares y una cierta retracción hiliar por la fibrosis, ver figura 18.

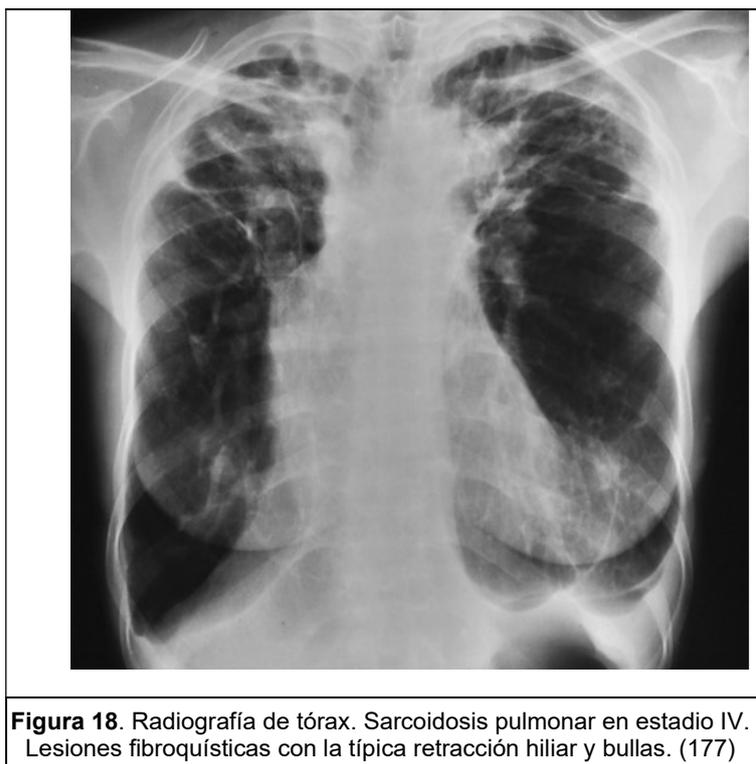


Figura 18. Radiografía de tórax. Sarcoidosis pulmonar en estadio IV. Lesiones fibroquísticas con la típica retracción hiliar y bullas. (177)

El tratamiento de la sarcoidosis se describe más adelante.

9.2. Eosinofilia pulmonares.

Las eosinofilia pulmonares constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que responden bien, habitualmente de forma completa y sin secuelas, a los esteroides sistémicos en la mayoría de los casos. Las eosinofilia se clasifican en primarias o idiopáticas y secundarias, siendo las infecciones y fármacos las principales causas conocidas de eosinofilia pulmonar.

En cuanto al diagnóstico, debe sospecharse en cualquier individuo que presente infiltrados pulmonares y una eosinofilia en sangre periférica ($> 1.000 \text{ mm}^3$) y/o un recuento de eosinófilos en el BAL $> 25\%$. En el LBA se considera anormal una cifra de eosinófilos mayor de 5%. Una eosinofilia pulmonar de entre 5 y 25% se puede encontrar en múltiples patologías no específicas, por lo que el punto de corte para el diagnóstico de estas enfermedades se ha fijado en el 25%.

La historia clínica debe recoger la información relacionada con la ingesta de fármacos en los últimos meses. Es excepcional recurrir a la biopsia pulmonar para llegar al diagnóstico.

9.3. Histiocitosis pulmonar de células de Langerhans (HPCL)

La histiocitosis pulmonar de células de Langerhans es la proliferación de células de Langerhans monoclonales en el intersticio pulmonar y los espacios aéreos. Se desconoce la etiología, pero el hábito de fumar desempeña un papel primordial. La HPCL tiene una presentación clínica muy variable, que va desde una lesión única hasta una enfermedad diseminada potencialmente mortal. Los síntomas son disnea, tos, astenia y dolor torácico pleural. El diagnóstico se basa en los antecedentes y los estudios por la imagen, en los hallazgos del LBA y la biopsia. El tratamiento consiste en dejar de fumar. En muchos casos se administran corticoides, pero se desconoce la eficacia. El trasplante de pulmón generalmente es curativo cuando se combina con el abandono del tabaquismo. La supervivencia a 5 años es de alrededor del 74%. Los pacientes tienen un riesgo mayor de cáncer. (121).(178,179)

Es una enfermedad en la que las células de Langerhans monoclonales CD1a+ (histiocitos) infiltran los bronquiolos y el intersticio alveolar, acompañadas por linfocitos, plasmocitos, neutrófilos y eosinófilos. La enfermedad puede afectar a muchos órganos, sobre todo pulmones, piel, huesos, hipófisis y ganglios linfáticos en forma aislada ($\geq 85\%$) o simultánea. (179)

Se desconoce la etiología, pero la enfermedad se presenta casi con exclusividad en la raza blanca, entre los 20 y 40 años, fumadores. Los varones y las mujeres son afectados por igual. Las mujeres desarrollan la enfermedad más tarde, pero las diferencias en la edad de inicio por sexo pueden representar diferencias en la conducta del hábito de fumar. La fisiopatología puede implicar el reclutamiento y la proliferación de células de Langerhans en respuesta a las citocinas y los factores de crecimiento secretados por los macrófagos alveolares en respuesta al humo del cigarrillo. Existen dudas de si la HPCL es una enfermedad reactiva o neoplásica. (121).(180)

El tratamiento estándar actual de la HPCL multisistémica es quimioterapia empírica con vinblastina y prednisona. Cura a menos del 50% de los pacientes. Además, las terapias óptimas para la recaída y la enfermedad neurodegenerativa siguen siendo inciertas. Recientes avances en investigación apoyan un modelo en el que la histiocitosis de células de Langerhans surge debido a la activación patológica de la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) en precursores mieloides. La redefinición de la HPCL como un trastorno neoplásico mielóide impulsado por una ERK hiperactiva respalda el potencial

de la quimioterapia con eficacia contra células mieloides inmaduras, así como la terapia dirigida específica contra mutaciones (121).

9.4. Linfangioleiomiomatosis (LAM)

La LAM es una enfermedad rara de los pulmones y los linfáticos, que puede aparecer esporádicamente o asociada a la esclerosis tuberosa. Afecta casi exclusivamente a las mujeres y suele aparecer antes de la menopausia, se caracteriza por cambios quísticos pulmonares progresivos, neumotórax recurrente, colecciones pleurales quilosas y en la mayoría de los casos, insuficiencia respiratoria progresiva.

Las manifestaciones abdominales incluyen linfadenopatía, masas linfáticas quísticas (linfangioleiomiomas), ascitis quilosa y angiomiolipoma (un tumor benigno). La supervivencia de la LAM es de aproximadamente el 70% a los 10 años, aunque es muy variable, ya que se han descrito supervivientes a largo plazo.

El diagnóstico se realiza mediante una combinación de características clínicas y tomografía computarizada o, en caso de duda, biopsia pulmonar. En pacientes con enfermedad rápidamente progresiva, el tratamiento es hormonal, predominantemente progesterona, aunque no hay pruebas sólidas que apoyen su uso. Por lo demás, el tratamiento se dirige a las complicaciones, como neumotórax, colecciones quilosas y manifestaciones extrapulmonares. En la actualidad, el único tratamiento para la LAM grave es el trasplante de pulmón(181,182).

9.5. Otras enfermedades pulmonares menos frecuentes

Las enfermedades hereditarias con afectación pulmonar, la proteinosis alveolar, la microlitiasis alveolar y la amiloidosis con afectación pulmonar, son enfermedades poco frecuentes que no han sido objeto de estudio de este trabajo de tesis.

10. Tratamiento de la EPID

10.1. Tratamiento no Farmacológico

El tratamiento no farmacológico de pacientes con EPID consiste en terapias de rehabilitación pulmonar, oxigenoterapia o, en algunos casos, el trasplante pulmonar.

La rehabilitación pulmonar es importante en los pacientes con EPID ya que es útil para disminuir la sintomatología, reduce los días de estancia hospitalaria e incrementa la

tolerancia al ejercicio. Las últimas guías de tratamiento sugieren que para que la rehabilitación sea efectiva, es necesario que el paciente pierda peso (si lo amerita), adopte una rutina de ejercicio, aprenda técnicas de respiración y cumpla con el tratamiento farmacológico y la oxigenoterapia (183).

A pesar de que la hipoxemia es frecuente en personas con EPID, no existen estudios que recomienden formalmente el uso de oxígeno estas enfermedades. Clark y col. estudiaron 50 sujetos con alveolitis criptogénica fibrosante, de los cuales siete (14%) tenían AR; a estos individuos se les midió la oximetría de pulso durante el día y durante la noche, y se observó que la hipoxemia nocturna era más frecuente. Así mismo, concluyeron que el mejor estudio fisiológico predictor de hipoxemia nocturna era la saturación de oxígeno durante el día, lo cual estaba asociado con un menor nivel de energía. Estos efectos eran independientes de la CVF, por lo que se aconseja suplementación con oxígeno (184).

Los cuidados paliativos y terminales en la fibrosis pulmonar, tiene como propósito tratar los síntomas, prevenir y aliviar el sufrimiento y apoyar la mejor calidad de vida posible, independientemente del estadio de la enfermedad o de la necesidad de otros tratamientos. Los cuidados paliativos, integrados en una fase temprana, pueden reducir los síntomas en los pacientes con FPI.

10.2. Tratamiento farmacológico

El tratamiento que ha prevalecido durante décadas incluye la administración de corticoides, cuyas dosis y tiempo de administración varían considerablemente entre diferentes autores y de acuerdo con la patología que se deba tratar, manteniéndose como primera línea de tratamiento en la gran mayoría de EPID.

La respuesta a los corticoides es variable según el patrón histológico, el grado de inflamación y fibrosis y otros factores tal vez inherentes a cada paciente.

Se observan curaciones o mejorías espontáneas, al evitar contacto con el antígeno desencadenante, suspender el tabaco, otros pacientes mejoran o se estabilizan con el tratamiento, mientras que otros progresan y mueren a pesar del tratamiento. Se han realizado ensayos con otros tratamientos como citotóxicos, principalmente con ciclofosfamida, metotrexate y azatioprina, antifibrosantes como colchicina, d-penicilamina

y pirfenidona. También se han empleado otras sustancias, pero a nivel de investigación y en animales(90,185–187).

10.2.1. Corticoides

El tratamiento con corticoides ha demostrado utilidad en las personas con EPID. Sin embargo, estos fármacos presentan importantes efectos secundarios y recidivas, por lo que se ha optado por el uso de otros inmunosupresores. A pesar de esto, no hay evidencia suficiente que confirme el estándar de tratamiento en la EPID asociada con AR. La respuesta al tratamiento depende de diferentes factores de severidad. En el caso de un individuo asintomático en quien la EPID se detecta incidentalmente, no siempre es necesario iniciar tratamiento, ya que podría presentar severos efectos secundarios; no obstante, representa una ventana de oportunidad para detener la enfermedad. Es por lo que los pacientes deben ser monitorizados inicialmente cada semana y, en caso de deterioro, se debe considerar la terapia inmunosupresora.

En el caso de un sujeto con síntomas y signos clínicos de EPID y un diagnóstico confirmado por pruebas de funcionamiento pulmonar y TACAR, debe ser iniciada la terapia inmunosupresora. Cuando ésta ha fallado o existe fibrosis pulmonar severa, debe comenzarse el tratamiento con corticoesteroides e inmunosupresores, y si la persona tiene un rápido deterioro en la CVF, la capacidad de difusión de la PaO₂ o en los parámetros clínicos, debe ser considerado el trasplante pulmonar. Rojas-Serrano y colaboradores evaluaron el efecto de los corticoides en la EPID en AR, tratando los sujetos con prednisona a dosis de 1 mg/kg/ día durante seis semanas, y luego, a una dosis de 10 mg/día durante aproximadamente 6-8 meses; con esta dosis observaron una mejora significativa en la CVF. Pero la falta de un grupo de control y el hecho de que la mayoría de estos individuos con EPID recibieron concomitantemente metotrexato, azatioprina o leflunomida limitaron la utilidad del estudio para comprender el verdadero efecto de los corticoides en estos sujetos (188).

Se ha detectado que una cuarta parte de los pacientes con enfermedades pulmonares intersticiales en algunos estudios, consultaron en atención primaria debido a la tos, y aproximadamente un tercio de ellos recibieron una receta para tratar las causas potencialmente subyacentes de la tos. Revelan que se necesitan más estudios para explorar el efecto de los medicamentos prescritos, fueron los corticoides en diferentes formatos los más prescritos, encontrando a los corticoides nasales y los antihistamínicos

se encuentran entre los tratamientos menos eficaces. Se necesita más investigación para comprender las causas y el tratamiento óptimo de la tos en pacientes con enfermedades pulmonares intersticiales. (189)

10.2.2. Otros tratamientos inmunosupresores

La **azatioprina** es un antimetabolito purínico derivado imidazólico de la 6-mercaptopurina, al que se le atribuye un efecto citotóxico e inmunosupresor. Actúa también en los linfocitos T, alterando su función y su activación (190). En ocasiones se ha usado en diversas EPID como terapias ahorradoras de corticoides.(191)

La **ciclofosfamida** es un agente alquilante capaz de bloquear la replicación del ADN y ARN celular. La ciclofosfamida intravenosa es el «estándar de oro» para el tratamiento de la EPID, más adelante, otros grupos investigaron la que la toxicidad era superior a los beneficios proporcionados, planteando otras terapias inmunosupresoras alternativas por sus menores efectos tóxicos. (192), (193)

El **micofenolato de mofetilo** (MFM) ha sido evaluado en series de casos de EPID-ETC, pero los estudios son escasos. En un estudio en el que trataron 10 casos los síntomas mejoraron en 10 de ellos y cuatro de cinco suspendieron la oxigenoterapia. Hubo mejoría en las lesiones observadas por TACAR en 8 de 8 ocho y sólo uno de nueve empeoró. Aparentemente el MFM es, más seguro y al menos tan efectivo como la ciclofosfamida y debería ser considerado como primera línea de tratamiento de mantenimiento después de la terapia con ciclofosfamida (194).(191).(193)

La terapia combinada con **metilprednisolona y ciclofosfamida** ha sido evaluada en individuos con esclerosis sistémica asociada con EPID. Yiannopoulos y colaboradores evaluaron 13 pacientes y observaron que el 66.6% tenían parámetros de funcionamiento pulmonar estables o mejorados. Sin embargo, la EPID empeoró en algunos de ellos tras suspender el tratamiento. Aparentemente la combinación de ambos fármacos es efectiva, con una buena tolerancia y ayuda a estabilizar la función respiratoria en EPID(195) Asimismo, Rojas Serrano y su grupo observaron que sus pacientes con EPID secundario a AR presentaron mejoría del CVF después del tratamiento con altas dosis de corticosteroides (1 mg/kg/día) y FAME (metotrexate y leflunomida)(188). Aunque los corticoides han sido el medicamento central para el tratamiento de la EPID en AR, las tasas de respuesta favorables a estos agentes han sido reportadas menores del 40% (196).

Otros autores sugieren el uso de la combinación de altas dosis de corticoesteroides asociada con un inmunosupresor como ciclofosfamida, azatioprina, MFM o ciclosporina, en individuos con EPID asociada con AR con enfermedad moderada o severa, considerando su acción adicional en los fibroblastos, células endoteliales y células musculares lisas (196). Existen algunos medicamentos como la D-penicilamina y colchicina que han sido utilizados en la EPID; sin embargo, no han demostrado eficacia significativa (193)

El **Metotrexato** (MTX) y **leflunomida** (LEF) no aumentan la incidencia, complicaciones ni mortalidad por EPID. Aunque los resultados no son uniformes, los **anticuerpos anti-TNF** han tenido con frecuencia peores resultados en incidencia, progresión y mortalidad por EPID que MTX, LEF, abatacept (ABA) y rituximab (RTX). La evidencia encontrada es escasa para los **inhibidores de JAK** quinasa y **antifibróticos**, y controvertida para los **inhibidores de la IL-6** (197) .

10.3. Tratamiento de la Sarcoidosis

Las terapias actuales son inespecíficas y en gran medida no están probadas.(70) Si no hay afectación orgánica en el momento de la presentación, suele indicarse un periodo de observación para evaluar si la enfermedad remite espontáneamente.

Los **corticoides** siguen siendo la base del tratamiento de las manifestaciones progresivas de la sarcoidosis. Las dosis y la duración óptimas del tratamiento con corticoides no se han establecido mediante estudios clínicos rigurosos. Para la enfermedad pulmonar y cutánea, el tratamiento inicial suele consistir en no más de 20-40 mg/día de prednisona durante 2-4 semanas, seguido de un régimen de disminución lenta durante varios meses hasta una dosis de mantenimiento de 5-15 mg/día. Se ha sugerido el tratamiento en días alternos, aunque puede resultar ineficaz en un subgrupo de pacientes que posteriormente responden a la dosis diaria. Normalmente, el tratamiento se mantiene durante al menos 6-12 meses, ya que una reducción prematura puede provocar una recaída. La enfermedad pulmonar recurrente y progresiva se produce en el 16-74% de los pacientes a medida que se reduce el tratamiento con corticoides. (11). Los pacientes con recaídas repetitivas suelen necesitar un tratamiento supresor crónico para minimizar la pérdida de función pulmonar. El aumento de peso, la hipertensión, la hiperglucemia, el glaucoma y la osteoporosis son complicaciones potenciales graves. Se recomienda la terapia con **bifosfonatos** para los pacientes en tratamiento crónico con corticosteroides. Los

corticoides inhalados pueden ayudar a reducir los síntomas de tos o irritabilidad de las vías respiratorias, pero no son útiles como agentes únicos en la sarcoidosis pulmonar.(11)

En la tabla 20 se mencionan las principales indicaciones para el uso de corticosteroides en pacientes con Sarcoidosis.

Tabla 20. Indicaciones de la terapia con corticosteroides en pacientes con sarcoidosis.

- Afectación pulmonar
- Enfermedad pulmonar sintomática moderada, grave, o progresiva
- Infiltrados pulmonares persistentes o función pulmonar anormal durante 1-2 años con síntomas leves para evaluar la reversibilidad
- Enfermedad fibroquística avanzada
- Afectación extrapulmonar
- Insuficiencia orgánica amenazada: enfermedad ocular, cardíaca o del sistema nervioso central (SNC) grave
- Uveítis posterior o uveítis anterior que no responden a esteroides locales
- Hipercalcemia persistente
- Disfunción renal o hepática persistente
- Enfermedad hipofisaria
- Miopatía
- Esplenomegalia palpable o evidencia de hiperesplenismo, como trombocitopenia
- Fatiga intensa y pérdida de peso
- Linfadenopatía dolorosa
- Enfermedad cutánea desfigurante

Las terapias ahorradoras de corticoides se utilizan con frecuencia en la sarcoidosis crónica progresiva cuando los efectos adversos de este grupo de fármacos degradan significativamente la calidad de vida (198,199) Se recomiendan dosis bajas semanales de **metotrexato** (10-20 mg/semana) para la sarcoidosis pulmonar, cardíaca, ocular (panuveítis), cutánea y neurológica, que requiere dosis más altas de corticoides. Las tasas de éxito oscilan entre el 50% y el 70%, pero puede tardar ≥ 6 meses en ser eficaz. Las posibles complicaciones graves incluyen hepatotoxicidad, infecciones oportunistas, supresión de la médula ósea y toxicidad pulmonar. La **azatioprina** también puede ser útil en la sarcoidosis con tasas de respuesta similares a las del metotrexato, pero con un riesgo ligeramente mayor de infección. El MMF y la leflunomida se han utilizado en pequeñas series (200,201). Las toxicidades potenciales de estos fármacos incluyen la supresión de la médula ósea, síntomas gastrointestinales, erupciones cutáneas y un mayor riesgo de malignidad. La **ciclofosfamida** se ha utilizado en la sarcoidosis recalcitrante a esteroides, en particular en la neurosarcoidosis refractaria, pero su uso está muy limitado debido a su potencial oncogénico. Los **inhibidores de la calcineurina** suprimen la activación de las células T, pero no funcionan en la sarcoidosis.

Los ensayos clínicos respaldan la eficacia de los agentes biológicos dirigidos a vías inmunológicas específicas en la sarcoidosis. **Infliximab** (anti-TNF) tuvo un pequeño impacto en la función pulmonar durante 6 meses, pero fue eficaz para muchas manifestaciones extrapulmonares. Algunas series de casos han sugerido que el **adalimumab** también puede ser eficaz en algunos pacientes con sarcoidosis. El **etanercept**, golimumab (anti-TNF) y **ustekinumab** (anti-IL12/IL23) no fueron eficaces en la sarcoidosis pulmonar. Curiosamente, se han descrito algunos casos de uso satisfactorio de **rituximab** en la sarcoidosis refractaria al tratamiento, en particular la neurosarcoidosis, aunque sigue sin estar claro cómo puede funcionar. Se necesitan más estudios para definir el papel de los agentes biológicos en la sarcoidosis, sobre todo porque estas terapias conllevan riesgos de infecciones graves y potencialmente mortales y de malignidad.

10.4. Antifibróticos como tratamiento de la FPI

Los antifibróticos comercializados en España son pirfenidona y nintedanib. **Pirfenidona** es un fármaco pleiotrópico, con propiedades antifibróticas y antiinflamatorias, que inhibe la síntesis de factores de crecimiento profibrogénicos, como el TGF-beta y el PDGF, así como la proliferación de fibroblastos y la formación de colágeno. Las autoridades sanitarias europeas admitieron la molécula para uso comercial en la FPI leve-moderada (FVC > 50, DLCO > 35%). Pirfenidona ha demostrado una reducción en la proporción de pacientes con caída de la FVC \geq 10% o muerte (43,8%) y un incremento en la proporción de casos con estabilidad en la FVC (59,3%). La dosis de pirfenidona recomendada es de 2.403 mg/día dividido en 3 tomas coincidentes con las comidas. La dosis plena se alcanza a las 3 semanas, al ir incrementando de forma progresiva la dosificación: la primera semana, un comprimido de 267 mg/8 h; la segunda semana, 2 comprimidos de 267 mg/8h y la tercera semana, 3 comprimidos de 267 mg/8h. Los efectos adversos más relevantes son los gastrointestinales (náuseas, dispepsia, anorexia y pérdida de peso), seguidos de rash, fotosensibilidad y, en menor proporción, alteraciones de la función hepática.

Nintedanib es un inhibidor triple de los receptores de la tirosina cinasa que presenta actividad anti-PDGF, antifactor de crecimiento de los fibroblastos y antifactor de crecimiento vascular endotelial, relacionados con los mecanismos patogénicos de la fibrosis. Los 2 estudios INPULSIS, con un total de 1.066 pacientes, objetivaron un enlentecimiento en la progresión de la enfermedad (caída de la FVC) independiente- mente de la edad (mayores

y menores de 65 años), de la FVC en el momento del inicio terapéutico (inferior y superior al 70 y al 90%) y de la existencia o no de enfisema asociado. La dosis recomendada es de 150 mg cada 12h, se podrá descender a 100 mg cada 12h en caso de efectos secundarios. Nintedanib disminuye significativamente la pérdida de función pulmonar, alarga el tiempo hasta la primera exacerbación aguda y mejora los índices de calidad de vida. El efecto adverso más frecuente de nintedanib, que llega a presentarse hasta en el 60% de los casos, es la diarrea, la cual suele ser de leve a moderada intensidad. Solo en aproximadamente un 4-5% llega a ser lo suficientemente intensa o recurrente como para obligar a la retirada definitiva del fármaco. Otros efectos adversos menos frecuentes son las náuseas y vómitos, la anorexia, la pérdida de peso y las alteraciones en la función hepática.

10.5. Trasplante de Pulmón

El trasplante de pulmón continúa siendo el único tratamiento que puede alargar la vida de los pacientes con FPI avanzada (202). Un porcentaje significativo de los pacientes hospitalizados con FPI avanzada o una exacerbación aguda de la EPID sufrirán insuficiencia respiratoria. Sin discutir un plan de asistencia anticipado, la consecuencia de este resultado puede ser el ingreso en UCI y la ventilación mecánica. De ser así, la mortalidad es elevada y pocos pacientes sobrevivirán (203).

Es muy poca la experiencia de trasplante pulmonar en EPID asociada con AR. Algunos datos sugieren que sujetos con esclerosis sistémica tienen después del trasplante pulmonar, rangos similares de supervivencia a los de pacientes que se trasplantan como consecuencia de FPI o de hipertensión arterial pulmonar idiopática (204).

Hay que considerar el trasplante de pulmón en pacientes seleccionados con una EPID que no responda al tratamiento médico y muestran una caída de la función pulmonar que les sitúa en un mayor riesgo de muerte. El trasplante de pulmón es una intervención médica/quirúrgica compleja que exige un receptor y un equipo médico motivados. La frecuencia del trasplante bipulmonar está aumentando.

JUSTIFICACION

Las EPID difieren entre sí respecto a su prevención, diagnóstico, tratamiento y pronóstico, aunque la mayoría suelen ser enfermedades crónicas y debilitantes que deterioran la calidad de vida y reducen la supervivencia global de los pacientes. Que la eficacia de las pruebas diagnósticas permita establecer un diagnóstico rápido y preciso es de vital importancia, teniendo en cuenta que algunas pueden degenerar en fibrosis. Actualmente el proceso diagnóstico involucra una inestimable suma de esfuerzos por parte de neumólogos, radiólogos y anatomopatólogos y los comités involucrados.

Si bien, la investigación de las causas involucradas en la aparición de las múltiples EPID sigue siendo un tema mayormente por esclarecer, ya sea por la diversidad clínica, radiológica y citológica, en las últimas décadas se han invertido grandes esfuerzos en encontrar marcadores biológicos que puedan incrementar el valor diagnóstico y pronóstico de ciertas pruebas séricas y citológicas realizadas en el LBA. A pesar de los esfuerzos y avances en la investigación en inmunología, los escasos estudios en los que se utiliza la citometría de flujo para la caracterización linfocitaria y leucocitaria del LBA presentan carencias metodológicas y de diseño, lo que sin lugar a duda le resta valor a esta técnica y, le otorga a la citometría de flujo un valor diagnóstico meramente orientativo.

Aunque en la práctica, la citometría de flujo se ha convertido en los últimos años en el “gold” estándar para la caracterización y monitorización del tratamiento de numerosas patologías, hasta ahora, las aportaciones científicas y los esfuerzos por esclarecer y mejorar la utilidad diagnóstica y pronóstica de la citometría de flujo del LBA en la EPID han sido muy limitados. En el ámbito Nacional los únicos estudios disponibles, realizados por Jara-Palomares en 2009 y más tarde por Rodríguez-Martin en el Hospital Universitario Virgen Macarena en Sevilla en 2021, involucran un grupo limitado de patologías pulmonares en las que se evalúa la citometría de flujo como parámetro independiente sin tener en cuenta parámetros radiológicos ni de función pulmonar. El segundo estudio, aunque integra la comparación de estos parámetros, el número de pacientes es muy limitado. Ambos estudios utilizan el recuento de poblaciones linfocitarias (no leucocitarias) para el estudio por citometría de flujo del LBA. El recuento de poblaciones leucocitarias, sobre el recuento de poblaciones linfocitarias, ofrece información más completa acerca de

procesos inmunológicos, inflamatorios e infecciosos que tienen lugar en el bronquio y el alvéolo.

Este estudio de tesis doctoral analiza retrospectivamente el contenido de células inmunitarias del LBA (linfocitos y sus subtipos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células dendríticas) determinadas mediante citometría de flujo, en relación a los parámetros clínicos, radiológicos y funcionales, en una serie amplia de pacientes representativos de patologías EPID (NII, EPID de causa conocida y EPID de causa desconocida), no-EPID (EPOC, asma, TBC, nódulos pulmonares) y sin patología pulmonar, para obtener una visión más objetiva del papel de cada población celular en las diferentes patologías pulmonares. Junto a esto, la inclusión de un grupo de población general nos permitirá establecer el impacto de las diferentes patologías pulmonares sobre la supervivencia global de los pacientes e investigar su correlación a nivel pronóstico, diagnóstico y terapéutico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A pesar de que las sociedades científicas mantienen dudas de la utilidad del análisis citológico del LBA, el estudio del contenido leucocitario del LBA mediante citometría de flujo se ha establecido en nuestra CCAA como un estudio estandarizado en los pacientes con patología pulmonar, que todos los grupos de neumólogos solicitan para el apropiado manejo clínico de sus pacientes. Esto nos hace hipotetizar que los resultados puedan tener utilidad en el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes. Para verificar esta hipótesis, se proponen los siguientes objetivos.

Objetivo general: analizar retrospectivamente el contenido leucocitario del LBA determinado mediante citometría de flujo en los pacientes remitidos a la Unidad de Citometría del HCUVA entre los años 2000 y 2018, en relación con la información clínica, radiológica y anatomopatológica, para evaluar la utilidad de la citometría del LBA en el diagnóstico de las patologías pulmonares más prevalentes y su valor en el pronóstico y monitorización del tratamiento.

Para ello, se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar mediante citometría de flujo multiparamétrica el contenido leucocitario del LBA (linfocitos y sus subtipos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células dendríticas) de pacientes con enfermedad pulmonar en la Región de Murcia entre 2000 y 2018.
2. Revisar las historias clínicas de los pacientes para recoger variables clínicas, de exposición, radiológicas, anatomopatológicas, funcionales y de supervivencia, que puedan resultar relevantes para el diagnóstico y evolución de los pacientes.
3. Correlacionar los parámetros inmunológicos y clínicos para evaluar la utilidad de la citometría de flujo del LBA en el diagnóstico de las patologías pulmonares EPID y no-EPID y determinar las diferencias entre los distintos grupos de patologías.
4. Evaluar el impacto de las diferentes patologías pulmonares en la supervivencia global de los pacientes, para poder establecer marcadores celulares del LBA determinados mediante citometría de flujo, que tengan utilidad pronóstica en el manejo clínico y terapéutico de los pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y muestras, variables de estudio y grupos de estudio

1.1. Pacientes y muestras

A partir de un listado de muestras de LBA analizadas en la Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) entre los años 2000 y 2018, se recolectó información retrospectiva a partir de los datos demográficos y clínicos disponibles en las bases informáticas del Servicio Murciano de salud (Agora y Selene) durante un periodo de tiempo comprendido entre marzo de 2019 hasta marzo de 2023. Se revisaron 2349 muestras de LBA procedentes de diversos hospitales de la Región de Murcia: 1) HCUVA; 2) Hospital Universitario Reina Sofía (HURS); 3) Hospital Virgen del Rosell de Cartagena (HVR); 4) Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena; 5) Hospital Universitario de Los Arcos del Mar Menor (HULAM); 6) Hospital Virgen del Castillo de Yecla (HVC); 7) Hospital Comarcal del Noroeste de Caravaca de la Cruz y 8) Hospital de la Vega Lorenzo Guirao. Durante el periodo de tiempo seleccionado (2000-2018), no se recibieron muestras para el estudio del LBA en el laboratorio de Inmunología HCUVA procedentes del Hospital Universitario Morales Meseguer (HUMM), por este motivo, dicho centro no participó en este estudio.

La información recolectada se obtuvo tomando como referente las recomendaciones ATS/ERS. Se incorporaron variables acordes con estas guías consenso, en una base de datos en Excel que permitiera clasificar la información, cuyos criterios de inclusión se fundamentaban en la tenencia de un diagnóstico definitivo o claro a partir de un consenso multidisciplinar hospitalario, contar radiología de tórax y/o TCAR. Se incluyeron las siguientes variables: tiempo de evolución y supervivencia, edad, sexo, antecedentes familiares, hábito tabáquico, historia ocupacional y ambiental, utilización de fármacos, radioterapia, quimioterapia, ETC (grupo afectado por la escasa información disponible en las historias clínicas y falta de TCAR). Se recolectó la información demográfica y códigos postales de la totalidad de los pacientes, y dicha información se obtuvo a partir de las plataformas informáticas del servicio murciano de salud (SMS): Selene y Ágora plus.

Las especialidades peticionarias fueron: neumología, medicina Interna, reumatología, medicina intensiva y urgencias hospitalarias. El número de muestras por hospital fue

equiparable a la media de la población del área, aunque se observó una llamativa reducción en el número de las muestras procedentes del Hospital Universitario Morales Meseguer, ya que este centro hasta fechas recientes se ha analizado sus propias muestras.

1.2. Criterios de exclusión

De las 2349 muestras extraídas inicialmente, 838 fueron excluidas del estudio después de una minuciosa búsqueda, por los siguientes motivos:

1. Mala calidad de la muestra en el análisis de citometría.
2. No disponer de la información mínima requerida: número de historia clínica o número de identificación que mediante las herramientas informáticas del SMS (Ágora, Selene) permitiera su búsqueda.
3. Pacientes sin información disponible en Ágora considerado por su contenido y generalidad el más completo, o, que las competencias y permisos no permitieran acceder a programas de los hospitales locales y realizar búsquedas en “notas”, en resumen, sujetos en quienes no fue posible acceder a su historia y obtener la mínima información necesaria.
4. Pacientes presuntamente desplazados con un único episodio clínico que, al no completar los datos necesarios, sin posibilidad de realizar seguimiento.
5. El paciente si dispone de información clínica en Agora, pero no de historia clínica de especialidades que permitan obtener la información adecuada o contrastar los resultados del LBA.
6. No disponer de estudio radiológico (radiografía o TACAR)
7. La falta de pruebas funcionales no fue motivo de exclusión ya que estas se solicitan con muy poca frecuencia, especialmente en especialidades diferentes a neumología.

De las 2349 muestras de LBA analizadas se pudo obtener información de 1511, con las que se han realizado todos los estudios descritos en este estudio de tesis.

1.3. Variables de estudio.

La información recogida de los diferentes sistemas de información se registró en una ficha individual por paciente (Ver en Anexo, tabla 35), cuyos datos se trasladaban a una tabla Microsoft Excel que incorporaba las variables de estudio:

1. **Especialidad clínica y hospital solicitante del estudio:** las muestras como se comentó anteriormente se obtuvieron de todos los hospitales de la Región, excepto del Área VI de Salud (Hospital Morales Meseguer). Las especialidades peticionarias fueron neumología, medicina Interna, reumatología, medicina intensiva y urgencias.
2. **Información de la muestra y del paciente:** fecha de nacimiento, edad, sexo, supervivencia, código de Identificación (CIPA y NHA), número y fecha de citometría.
3. **Demográficos:** ciudad, dirección y código postales.
4. **Parámetros celulares** obtenidos en el estudio citológico del LBA: porcentaje y cifras absolutas de leucocitos totales, linfocitos totales, macrófagos alveolares, neutrófilo, eosinófilos, células dendríticas CD1a+, linfocitos T (CD3+), linfocitos Th (CD3+CD4+), linfocitos Tc (CD3+CD8+), linfocitos B (CD19+), así como los cocientes CD4/CD8 y Neutrófilo/Linfocito.
5. **Patrón radiológico:** patrones radiológicos comunes de las enfermedades intersticiales, patrones radiológicos especiales y distribución/localización radiológica. Los parámetros radiológicos fueron obtenidos a partir la TCAR, y/o la radiografía de tórax.
6. **Datos histopatológicos:** si el diagnóstico de certeza así lo precisaba, se contrastó el diagnóstico clínico con el resultado de la biopsia de tejido.
7. **Tratamiento:** la variable tratamientos, incluyó principalmente terapias inmunosupresoras inhaladas y orales. Los tratamientos orales fueron separados en corticoesteroides y otras terapias inmunosupresoras (azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato mofetilo, agentes biológicos). Así mismo se registró el uso de radioterapia y/o quimioterapia.
8. **Antecedentes familiares:** por su frecuencia e importancia en los datos de la historia clínica neumológica, el cáncer de pulmón como antecedente familiar fue recogido en toda la serie en la que éste dato estuvo disponible. Así mismo, se tuvo en cuenta los antecedentes familiares de EPID.
9. **Hábito tabáquico:** fumador, exfumador o no fumador

10. **Parámetros de las pruebas de función pulmonar (PFP):** volumen espiratorio forzado (% FEV1), capacidad vital forzada, (% FVC) y difusión pulmonar de monóxido de carbono (% DLCO).
11. **Agentes etiológicos, incluida exposición a tóxicos inhalantes:**
 - Inhalación de polvos o químicos.
 - Convivencia o trabajo con pájaros y/o palomas.
 - Toxicidad por fármacos
 - Enfermedad autoinmune sistémica o autoinmunidad
 - Enfermedad oncohematológica
12. **Diagnóstico principal:** diagnóstico de certeza, patología pulmonar a estudio o que motivó la inclusión en el estudio.
13. **Diagnóstico secundario:** patologías asociadas, patologías concomitantes.
14. **Supervivencia:** fecha de fallecimiento o de último acto clínico (para la recolección de este dato, fue preciso la revisión periódica de las historias clínicas).

1.4. Grupos de estudio.

Los pacientes se distribuyeron en los grupos de estudio en función de su origen y patología.

- 1.4.1. **Grupo control poblacional de supervivencia:** pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS, del inglés *monoclonal gammopathy of uncertain significance*) con marcadores de buen pronóstico. Este grupo se ha extraído de la serie de pacientes incluidos en trabajos de investigación del grupo de Inmunología del IMIB (205), incorporándolos en este trabajo como grupo control para establecer la supervivencia de una población sin patología pulmonar, a la que comparar la supervivencia de los pacientes con afectaciones pulmonar parenquimatosa.
- 1.4.2. **Grupo control LBA no patológicos:** se incluyó un grupo control LBA no patológico cuyas muestras procedían de pacientes que a lo largo de varios años de seguimiento no presentaron evidencias clínicas de enfermedad EPID u otro tipo de patología pulmonar. La indicación de la broncoscopia y LBA en estos casos fue ocasionada por condiciones clínicas que motivaron la realización del LBA con fines diagnósticos. Entre los motivos de estudio más frecuentes se encontraron AOS, o la hemorragia pulmonar que en todos los casos fue descartada. Este grupo se incluyó en la serie por su utilidad para establecer las

cifras de normalidad mediante citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones leucocitarias en LBA normales.

1.4.3. **Grupo de patologías no-EPID:** pacientes con enfermedad pulmonar con patrones espirométricos mixtos obstructivos/restrictivos, pero principalmente patologías pulmonares No-EPID, como EPOC o asma (1). También se han incluido en este grupo muestras de pacientes diagnosticados de TBC pulmonar, en cuyo LBA no se detectan células compatibles con patología infecciosa aguda. Al no tratarse de infecciones activas, no se incluyeron en el grupo de patologías infecciosas. Por último, se incluyeron con nódulos pulmonares en los análisis de imagen de tórax, que posteriormente no evolucionaron a alguna patología pulmonar.

1.4.4. **Grupo de patologías EPID:** comprende un grupo complejo de trastornos que hemos clasificado siguiendo las recomendaciones consenso de la ATS/ERS (Travis et al., 2002). En este grupo se incluyeron las siguientes patologías:

- Sarcoidosis
- Neumonitis por hipersensibilidad (NH)
- Neumonía organizada criptogénica (NOC)
- Neumonía intersticial linfocitaria (NIL)
- Neumonía intersticial usual (NIU): los pacientes con fibrosis pulmonar no encuadrable en otras entidades clínicas se recogieron en esta entidad, siguiendo las recomendaciones científicas (Travis et al., 2002)(Lynch et al., 2018).
- Bronquiolitis con enfermedad pulmonar intersticial (BR-EPID)
- Neumonía intersticial descamativa (NID)
- Neumonía intersticial no específica (NINE)
- Neumoconiosis
- Histiocitosis pulmonar de células de Langerhans (HPCL)
- EPID eosinófila
- EPID-Inclasificables
- Enfermedades pulmonares asociadas al tejido conectivo (EPID-ETC): estos pacientes no pudieron constituir un grupo propio y se distribuyeron según la clasificación otorgada por el comité clínico o el neumólogo.

1.4.5. **Grupo con patologías agudas:** pacientes que presentando de base una enfermedad pulmonar intersticial o no, se tomó la muestra del LBA en algún momento de su evolución asociado a un episodio agudo, como una infección respiratoria aguda (con aislamiento microbiológico) o una neumonía intersticial aguda (NIA) causada por fármacos (206,207)

1.4.6. **Grupo con cáncer:** siguiendo las recomendaciones de la ATS/ERS (3) se incluyeron los pacientes con cáncer al tratarse de pacientes inmunocomprometidos y con tendencia a infecciones atípicas. En este trabajo hemos diferenciado entre:

- Cáncer de pulmón: casos con sintomatología variable que, además planteaban dudas diagnósticas en estadios iniciales, se realizó seguimiento de los mismos, finalmente fueron diagnosticados de neoplasia pulmonar sin otras patologías pulmonares(208) (122), (3) .
- Otros cánceres: pacientes inmunosuprimidos por el tratamiento quimioterápico y citorreductor por neoplasias extrapulmonares que se asociaron a patología pulmonar. Las más frecuentes fueron las neoplasias hematológicas.

2. Pruebas radiológicas

La radiografía de tórax es un estudio imagenológico muy comúnmente utilizado como prueba radiológica de primera línea para evaluar patologías del tórax. Además de proporcionar imágenes de estructuras del interior del tórax y las estructuras adyacentes, son más útiles para identificar alteraciones cardíacas, del parénquima pulmonar, la pleura, la pared torácica, el diafragma, el mediastino y el hilio. Suelen ser la prueba inicial realizada para evaluar los pulmones.

La radiografía de tórax estándar se obtiene desde la parte posterior a la anterior (proyección posteroanterior) para minimizar la dispersión de los rayos X, que puede aumentar artificialmente la silueta cardíaca, y desde el costado del tórax (proyección lateral). Las proyecciones lordóticas u oblicuas pueden obtenerse para evaluar nódulos pulmonares o para aclarar alteraciones que pueden deberse a estructuras superpuestas, aunque la TACAR brinda más información y ha sustituido en gran medida a estas proyecciones. Las proyecciones en decúbito lateral pueden utilizarse para diferenciar el

derrame pleural, que fluye libremente, del tabicado, pero la TACAR o la ecografía proporcionan más información. Las imágenes al final de la espiración pueden utilizarse para detectar neumotórax pequeños.

La TACAR proporciona imágenes transversales de 1 mm de espesor y es particularmente útil en la evaluación de EPID (p. ej., carcinomatosis linfangítica, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática). Las imágenes durante la espiración pueden documentar el atrapamiento de aire, que es típico de la bronquiolitis obliterante y de otras enfermedades de la vía aérea. Las imágenes obtenidas con el paciente en decúbito prono pueden ayudar a diferenciar atelectasia dependiente (que cambia con las modificaciones en la posición del cuerpo) debido a trastornos pulmonares que causan atenuación en "vidrio deslustrado" en las partes posteroinferiores de los pulmones, que persiste a pesar de los cambios en la posición del paciente (p.ej., fibrosis pulmonar idiopática, asbestosis o esclerosis sistémica).

Para su correcta interpretación clínica, hace falta contrastar los resultados obtenidos a partir de las pruebas de laboratorio y la exploración física.

3. Pruebas funcionales.

Las pruebas de función respiratoria son un procedimiento básico en la evaluación de las EPID. En las lesiones histopatológicas llevan a una disminución de los volúmenes pulmonares en estas enfermedades, que se reflejan en la aparición de un patrón restrictivo en las pruebas de función respiratoria, con una disminución de la capacidad pulmonar total (TLC) y de la capacidad vital forzada (FVC), con flujos espiratorios normales y un incremento del cociente FEV1/FVC. Además de a una alteración del intercambio gaseoso, con reducción de la capacidad de difusión de CO (DLCO), hipoxemia o incremento del gradiente alveolo-arterial de O₂, que aumentan con el ejercicio. Las alteraciones en el intercambio gaseoso y en la oxigenación durante el esfuerzo, puede verse en fases tempranas de la enfermedad, incluso cuando la espirometría y los volúmenes pulmonares son todavía normales. También puede aparecer un patrón restrictivo por afectación de la musculatura respiratoria en algunas ETC como la polimiositis y el lupus. En algunos casos en que están afectadas las pequeñas vías aéreas, también se puede encontrar un aumento del volumen residual (VR) como en la NH y las neumoconiosis. En otras enfermedades como la sarcoidosis que pueden también afectar a los bronquios, incluso puede aparecer un patrón obstructivo con una disminución del cociente FEV1/FVC.

Las pruebas de función respiratoria tienen aplicaciones clínicas en el manejo de las EPID asociadas a las conectivopatías. Ayudan en el diagnóstico de la enfermedad pulmonar, aunque no son específicas, pueden utilizarse para establecer la gravedad de la afectación y establecer un pronóstico. También sirven para monitorizar la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad. Los pacientes con EPID deben someterse a pruebas de función respiratoria exhaustivas, dentro de ellas la medida de la capacidad de difusión pulmonar del monóxido de carbono (DLCO) usando monóxido de carbono como trazador en el método de respiración única., la medida de la distensibilidad puede ser útil para objetivar el aumento de la rigidez en el pulmón (210). Las pruebas de función respiratoria no pueden en general apoyar un diagnóstico específico de la EPID, pero son necesarias para evaluar las limitaciones respiratorias y vigilar la enfermedad durante el seguimiento (8,38).

Estas pruebas se realizaron de acuerdo a los procedimientos utilizados por los servicios de neumología en nuestra Región. Se incluyeron los parámetros volumen espiratorio forzado (FEV1), capacidad vital forzada (FVC), y capacidad de difusión pulmonar del monóxido de carbono (DLCO).

4. Obtención, transporte y análisis citométrico de las muestras LBA

Las muestras de LBA se obtuvieron mediante broncoscopia, siguiendo las recomendaciones de la ATS/ERS (3). Las muestras se remitieron por los diferentes equipos de neumólogos de la región a la Unidad de Citometría en solución salina, transportadas en neveras para protegerlas de las temperaturas extremas.

Las muestras LBA se procesaron inmediatamente tras su recepción, para ello se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Anotar el volumen recibido del LBA (en ml) y el aspecto (claro, turbio, muy turbio, hemático, mucoso, otros).
- 2) Centrifugar el LBA (5min a 1800 rpm), retirar el sobrenadante.
- 3) Resuspender el pellet y lavar con 12ml de PBS-BSA-1%.
- 4) Centrifugar 5 min a 2000 rpm, retirar sobrenadante, resuspender el pellet en 500µl de PBS-BSA-1%.

- 5) En tubo *TrueCount* (Becton Dickinson, BD) añadir 50µl de la muestra lavada y los AcMo indicados en el panel (tabla 21). Si se trata de un “cóctel” de AcMo congelados, agitarlo antes de añadir la muestra.
- 6) Agitar enérgicamente en el vortex (3-4 veces, pulsos breves).
- 7) Incubar 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 8) Lisar, con 1 ml de lisante-1X de cloruro de amonio, sin fijador. El lisante 1X se hace a diario, diluyendo el 10X del kit BD PharmLyse (*Lysing Buffer/ 100 ml, 10X, conc.*) con agua destilada. Mantener el 1X a temperatura ambiente.
- 9) Agitar en vortex (3 golpes breves) e incubar durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 10) Una vez lisadas adquirir en el citómetro antes de 30 minutos.
- 11) Comprobar que el número de lote y el número de beads del tubo *TrueCount* utilizado coincide con lo programado en el software de adquisición.

Tabla 21. Detalle de los anticuerpos monoclonales utilizados para el marcaje del LBA

Anticuerpo	Fabricante, referencia	Clon
CD1a PE	Becton Dickinson ,555807	34225X
CD3 BV510	Becton Dickinson,563109	SK7
CD4 APC	Becton Dickinson,345771	SK3
CD4 PE-Cy7	Becton Dickinson,348809	SK3
CD8 PerCP	Becton Dickinson,341050	SK1
CD8 BV605	Becton Dickinson,564116	SK1
CD11c APC-R700	Becton Dickinson,566610	3.9 (RUO)
CD14 APC	Becton Dickinson,345787	MΦP9
CD16 BV421	Becton Dickinson, 558122	3G8
CD19 APC	Becton Dickinson, 345791	SJ25C1
CD20 FITC	Becton Dickinson, 345792	L27
CD56 PE-Cy7	Becton Dickinson, 335826	NCAM16.2
CD45 APC-H7	Becton Dickinson, 641417	2D1
CD66 FITC	Dako, F7112	Kat4c
CD80 BV786	Becton Dickinson, 564159	L307.4
CD117 BV711	Becton Dickinson, 740791	BV711
HLA-DR PerCp	Becton Dickinson, 339216	L243

Los citómetros utilizados para la adquisición de los datos fueron un FACSCanto-II de 8 fluorescencias (BD) entre 2006 y 2019 y un FACSLyric de 12 fluorescencias (BD) a partir de 2020. Los paneles de anticuerpos utilizados en ambos equipos se muestran en la (tabla 21), Figuras 19 y 20. Ambos equipos fueron ajustados diariamente utilizando las CS&T beads (BD) adecuadas para cada equipo. Además, la compensación de las fluorescencias se ajustó finamente a diario utilizando los eventos negativos para cada fluorescencia como

referencia para cada fluorocromo. Para cada muestra se adquirieron entre 100.000 y 500.000 eventos, para hacer un análisis estadístico adecuado.

Tras la adquisición, los ficheros generados fueron analizados en DIVA Software (BD). Para ello se realizaron tanto gráficos de puntos (dotplots) como fueron necesarios. En los dotplots adecuados se dibujaron las ventanas de análisis (*gates*) necesarias para discriminar las diferentes subpoblaciones celulares, ver figura 19. Los gates se combinaron jerárquica y lógicamente para estimar el porcentaje de cada subpoblación celular, figura 20. Además, el número de eventos de cada subpoblación celular fue utilizado junto al número de eventos detectados de las beads *TrueCount* para hacer un recuento en cifras absolutas de las diferentes subpoblaciones celulares, incluido el recuento de leucocitos totales. Para ello se usó la siguiente fórmula:

Células/ul x 10³ = (Beads del tubo Truecount x eventos subpoblación) / (Beads leídas x 50 ul de muestra) x factor de concentración.

Factor de concentración = 1 / 2 x volumen del LBA; (2 porque concentramos el LBA a 0.5 ml, en lugar de en 1 ml).

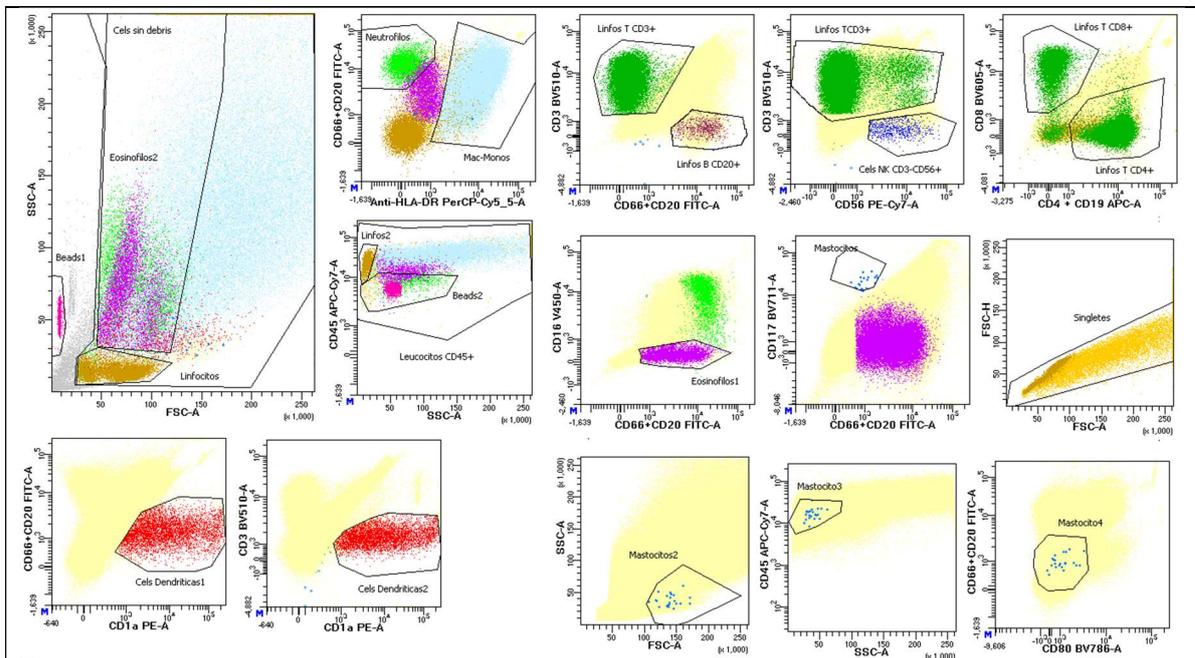


Figura 19. Análisis de citometría de flujo de las subpoblaciones celulares contenidas en el LBA. Las subpoblaciones celulares se colorearon de la siguiente manera: en marrón claro linfocitos (CD45++ SSC^{bajo}), en cian los macrófagos (DR+ SSC^{alto}), en verde claro los neutrófilos (CD66+ CD16+ DR-), en magenta los eosinófilos (CD16- CD66^{débil}), en rojo las células dendríticas (CD1a+), en azul claro los mastocitos (CD117+), en verde oscuro los linfocitos T (CD3+), en marrón oscuro los linfocitos B (CD19+ CD20+) y azul oscuro las células NK (CD3- CD56+). Además, se detectaron las subpoblaciones T CD3+CD4+ y CD3+CD8+. Igualmente se identificaron las *Beads* contenidas en el tubo *TrueCount* con color rosa, que se utilizaron para el cálculo del recuento absoluto de células por microlitro de muestra.

Population	#Events	%Parent	%Total				
All Events	489,985	####	100.0	<input checked="" type="checkbox"/>	Linfos B CD20+	22,972	6.6 4.7
Cels sin debris	374,474	76.4	76.4	<input checked="" type="checkbox"/>	Linfos T CD4+	180,597	51.7 36.9
Singlets	445,561	90.9	90.9	<input checked="" type="checkbox"/>	Linfos T CD8+	9,807	2.8 2.0
Beads1	36,087	7.4	7.4	<input checked="" type="checkbox"/>	Cels NK CD3-CD56+	4,291	1.2 0.9
Beads2	81,560	16.6	16.6	<input checked="" type="checkbox"/>	CD3-16/56+ NK (%)	660	0.2 0.1
Beads (%)	35,968	7.3	7.3	<input checked="" type="checkbox"/>	NOT(CD3+ (%))	301,974	86.5 61.6
LEUCOSviables (%)	370,179	75.5	75.5	<input checked="" type="checkbox"/>	CD19+ (%)	1,510	0.4 0.3
Leucocitos CD45+	349,092	94.3	71.2	<input checked="" type="checkbox"/>	Eosinofilos1	44,843	12.8 9.2
Linfocitos	60,355	17.3	12.3	<input checked="" type="checkbox"/>	NOT(Eos1)	304,249	87.2 62.1
Linfos2	53,681	15.4	11.0	<input checked="" type="checkbox"/>	Neutrofilos (%)	17,714	5.1 3.6
Linfocitos (%)	52,237	15.0	10.7	<input checked="" type="checkbox"/>	CD3+CD4+ (%)	37,513	10.7 7.7
NOT(Linfocitos (%))	296,855	85.0	60.6	<input checked="" type="checkbox"/>	CD3+CD8+ (%)	8,775	2.5 1.8
Cels Dendriticas1	5,761	1.7	1.2	<input checked="" type="checkbox"/>	Mastocitos	69	0.0 0.0
Cels Dendriticas2	5,987	1.7	1.2	<input checked="" type="checkbox"/>	CD80+	125,225	35.9 25.6
CD1a+ (%)	5,134	1.5	1.0	<input checked="" type="checkbox"/>	CD1a+CD80+ (%)	3,549	1.0 0.7
NOT(CelsDendriticas)	343,958	98.5	70.2	<input checked="" type="checkbox"/>	Eosinofilos2	130,298	37.3 26.6
Mac-Monos	237,987	68.2	48.6	<input checked="" type="checkbox"/>	NOT(Monocitos (%))	117,083	33.5 23.9
Neutrofilos	23,479	6.7	4.8	<input checked="" type="checkbox"/>	Eosinofilos (%)	25,026	7.2 5.1
Monocitos (%)	232,009	66.5	47.4	<input checked="" type="checkbox"/>	Mastocitos2	36,104	10.3 7.4
Linfos T CD3+	78,217	22.4	16.0	<input checked="" type="checkbox"/>	Mastocito3	104,290	29.9 21.3
Linfos TCD3+	306,093	87.7	62.5	<input checked="" type="checkbox"/>	Mastocito4	120,623	34.6 24.6
CD3+ (%)	47,118	13.5	9.6	<input checked="" type="checkbox"/>	Mastocitos (%)	22	0.0 0.0

Figura 20. Jerarquía de las ventanas de análisis utilizadas para la estimación de las diferentes subpoblaciones celulares del LBA.

5. Análisis estadísticos

Los datos de citometría fueron extraídos del sistema de información de laboratorio (programa Leucemias, de desarrollo propio) y los datos clínicos de la aplicación clínica Selene y Agoralab. Todos los datos se incluyeron en una base de datos Excel (Excel2003; Microsoft Corporation, Seattle, Washington) con la identidad de los pacientes anonimizada mediante el identificador del estudio LBA. Para el análisis estadístico los datos se migraron y analizaron en el programa SPSS v21.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Con el apoyo de Fernando Pérez Sanz, Bioinformática del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Pascual Parrilla (IMIB), para el análisis de *Clustering* en la aplicación “R”. Los estudios comprendieron las muestras de LBA remitidas a nuestro laboratorio entre 2001 y 2018 no cumplieron criterios de exclusión.

Para el estudio descriptivo, las variables numéricas se resumieron como media, desviación o error típicos de la media. Las variables cualitativas se describieron en forma de frecuencias absolutas y porcentuales.

Para la aplicación del contraste de hipótesis en variables continuas, se valoró inicialmente la normalidad de la muestra mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff y las condiciones de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. En función de estos resultados, se aplicó la comparación de medias de T-Student para dos factores o ANOVA para más de dos factores, con aplicación del test de diferencia honestamente significativa (HSD, del inglés Honestly Significant Difference) de Tukey para detectar diferencias entre subgrupos, cuando la distribución de la variable fue normal. Cuando no se demostró la

normalidad en la variable usamos el test no paramétrico U de Mann-Whitney para dos grupos y el test de Kruskal-Wallis para tres o más grupos. Para la comparación de variables continuas de muestras relacionadas se utilizó la prueba T-Student para muestras relacionadas o la prueba de Wilcoxon cuando la distribución no era normal.

Para la comparación de variables cualitativas se aplicó el test de la Chi-Cuadrado (χ^2) de Pearson's con la corrección de Yates y la prueba exacta de Fisher en caso de ser necesario.

Se utilizó el procedimiento de curva característica operativa del receptor (ROC, del inglés receiver operating characteristic) para determinar la capacidad de predicción de las variables a estudio, obteniendo un área bajo la curva (ABC) y su intervalo de confianza del 95 % (IC 95 %) junto con su sensibilidad y especificidad y el índice de Youden (IY) para calcular el punto de corte óptimo.

Para esta tesis se ha considerado la supervivencia global (SG) como el tiempo desde el análisis de la primera muestra LBA del paciente hasta la muerte (de cualquier etiología) o hasta el último control realizado que nosotros establecimos como la fecha del 20 de marzo de 2023. El análisis de SG se realizó mediante el método de estimación de Kaplan-Meier. El análisis univariante de la influencia de las diferentes variables en las curvas de supervivencia se realizó mediante el test de Log-Rank (Mantel-Cox) o con el test de Breslow si el factor estudiado acumulaba casos con poco tiempo de supervivencia censurados en los diferentes grupos. Debido a que no todos los grupos de pacientes alcanzaron la mediana de supervivencia (50 % de supervivencia), se ha utilizado la media más/menos el error típico para comparar la supervivencia de los diferentes grupos de estudio, a pesar de que no todos los pacientes tenían el mismo tiempo de evolución y por tanto hubo casos censurados.

Para conocer la asociación de los factores estudiados se realizó un análisis multivariante de regresión logística de Cox (riesgos proporcionales) con los factores que en el análisis univariante se mostraron asociados de forma significativa. De este análisis se obtuvo la razón de probabilidades (OR, del inglés Odds Ratio) con su intervalo de confianza del 95%.

Todos los resultados se consideraron significativos para un nivel $\alpha < 0,05$.

El análisis de clusters (o grupos) es una técnica de análisis de datos que explora los grupos que se producen de forma natural dentro de un conjunto de datos, conocidos como

“Cluster”. El análisis de clusters no necesita agrupar los datos en ningún grupo predefinido, lo que significa que es un método de aprendizaje no supervisado.

En nuestro estudio, el objetivo de este análisis fue hacer un agrupamiento de los datos basado en los valores de los parámetros de citometría, para ver posteriormente como se distribuían las patologías dentro de dichos grupos.

En un análisis de clusters es necesario: 1) escalar y centrar los datos, ya que es imprescindible que ninguna variable pese más que otra, y 2) buscar el número óptimo de grupos. Para ello, existen diferentes métodos, en nuestro caso se utilizaron los métodos silhouette (silueta) y el de gap.

El valor de la silueta es una medida de cuán similar es un objeto a su propio grupo (cohesión) en comparación con otros grupos (separación). El valor de la silueta va de -1 a +1, donde un valor alto indica que el objeto está bien emparejado con su propio grupo y mal emparejado con los grupos vecinos.

El estadístico gap compara, para diferentes valores de k , la varianza total intra-cluster observada frente al valor esperado acorde a una distribución uniforme de referencia. La estimación del número óptimo de clusters es el valor k con el que se consigue maximizar el estadístico gap. Es decir, encuentra el valor de k con el que se consigue una estructura de clusters lo más alejada posible de una distribución uniforme aleatoria.

RESULTADOS

1. Características biológicas, clínicas y evolutivas de los grupos de estudio

En la (tabla 22) se muestran las características demográficas de supervivencia global (SG) de los pacientes incluidos en el estudio de acuerdo con su distribución por grupos de patologías (se indica igualmente el número de muestras LBA estudiadas en cada caso).

Tabla 22. Características demográficas y de supervivencia de los pacientes (y muestras analizadas).						
	Pacientes (N)	Muestras (N) ³	Sexo (% hombre)	Edad (Media±DS)	SG-20 (%) ⁴	Años seguimiento
Grupos control	343	350	53.2%	61.2±13.5	85.9%	6.5 ± 3.3
Control poblacional ¹	243	243	53.1%	67.9±12.3	87.0%	6,1 ± 3,5
LBA control ²	100	107	53.3%	53.5±16.65	84%	7,1 ± 3,1
Patologías no-EPID	206	216	50.9%	54.1±18.6	81.5	7.87 ± 3.3
EPOC	73	79	77.2%	64.0±12.0	72.2%	6,6 ± 3,4
Asma	83	86	26.7%	46.8±21.4	91.8%	8,4 ± 3,6
TBC	28	29	62.1%	51.0±17.3	86.2%	8,8 ± 3,3
Nódulos pulmonares	22	22	63.6%	51.2±11.9	90.9%	9,2 ± 2,2
Patologías EPID	671	726	58.7%	58.8±16.4	66.9%	6.4 ± 3.2
Sarcoidosis	79	83	48,2%	55.6±14.8	88 %	7,2 ± 3,4
N. Hipersensibilidad	42	48	50.0%	49.7±17.6	79.2%	8 ± 3,2
NOC	40	44	47.7%	62.3±17.4	77.3%	6,2 ± 2,6
NIL (NIL-HIV)	38	40	70.0%	53.2±15.9	79.5%	7,3 ± 3,5
NIU (fibrosis)	152	165	71,5%	65.8±12.3	44.2%	4,8 ± 3,6
BR-EPID	22	25	40.0%	53.3±22.8	80 %	7 ± 3,5
NID	31	36	52.8%	54.4±20.8	80.6%	7,2 ± 3,2
NINE	138	154	48.1%	59.3±15.5	74.7%	6,5 ± 3,5
Neumoconiosis	27	27	96.3%	56.5±16.0	74.1%	6,3 ± 2,6
H.de Langerhans	9	9	66.7%	36.7±15.8	77.8%	6,8 ± 2,5
EPID-Eosinofilia	14	15	80.0%	48.4±22.7	86.7%	7,5 ± 2,7
EPID-Inclasificable	79	80	60.0%	61.3±12.4	88.8%	6,2 ± 3,1
Patología pul. aguda	235	253	58.5%	61.8±16.4	54.5%	6.0 ± 3.8
Infección pulmonar	210	228	58.8%	62.2±15.6	56.8%	6,1 ± 4,1
NIA	25	25	56.0%	57.5±21.9	60.0%	5,7 ± 4,5
Cáncer	199	208	55.6%	25.5±14.5	36.5%	4.1 ± 3.9
Cáncer de pulmón	53	55	60.0%	60.4±11.1	27.3%	3,6 ± 3,5
Otros cánceres	146	153	51.9%	56.4±19.0	40.3%	5,3 ± 4,3
Total	1411	1511	56.0%	59,4 ±16.8	70%	6,3 ± 3,7

¹ pacientes con gammopatías monoclonales de buen pronóstico (sin alteraciones citogenéticas, ni células plasmáticas aberrantes circulantes en sangre periférica). Se incluyen para tener una referencia de supervivencia poblacional. Datos disponibles en el Servicio de Inmunología (Vasco-Mogorrón). (H. Chen et al., 2023).

² muestras de pacientes sometidos a broncoscopia y LBA para filiación etiológica, aunque durante su seguimiento ulterior no se evidenció patología EPID.

³ A 92 pacientes se les extrajeron 2 LBAs y a 12 pacientes 3 LBAs.

⁴ SG-20, supervivencia global a 20 años.

Las muestras proceden de todos los hospitales de la región de Murcia (excepto el hospital Morales Meseguer), la broncoscopia para obtención del LBA precisó en todos los casos de la intervención de un especialista en Neumología, aunque no se tratara de la especialidad al cargo. No todos los pacientes presentaron seguimiento por parte de Neumología. En 92

de los 1411 pacientes se obtuvieron varias muestras, correspondiente a actos clínicos diferentes, en otros casos, durante el mismo ingreso. El seguimiento de cada paciente, según hay constancia en las historias clínicas revisadas, se mantiene a cargo de la especialidad responsable del ingreso al alta en la mayoría de los casos.

Por su trascendencia e impacto en las enfermedades pulmonares, se analizó la prevalencia de las ETC en los pacientes de nuestro grupo de estudio, distribuida por patologías (tabla 23). Aunque la información no estuvo disponible en todos los casos, la prevalencia de las ETC en los 724 casos en los que se pudo obtener la información fue del 5.8% (42 de 724 casos) y por tanto en el rango de los descrito en la población geriátrica (212). Es posible que los escasos de pacientes con ETC en la serie, se deba a que, en la práctica clínica, una vez se diagnostica la enfermedad, no se realizan técnicas invasoras.

	Enfermedades del tejido conectivo (ETC)		
	No	Si	%
BAL-Control	24	0	0.0
EPOC	10	1	10.0
Asma	18	0	0.0
Nódulos pulmonares	6	0	0.0
Sarcoidosis	65	0	0.0
NH (N. Hipersensibilidad)	35	0	0.0
NOC	37	3	8.1
NIL (NIL-HIV)	10	0	0.0
NIU	128	7	5.5
BR-EPID	22	1	4.5
NID	27	1	3.7
NINE	93	24	25.8
Neumoconiosis	20	1	5.0
HPCL (H. Langerhans)	9	0	0.0
EPID-Eosinofílica	14	0	0.0
EPID-Inclasificable	72	0	0.0
Infeciosas	53	0	0.0
NIA	22	3	13.6
Cáncer de pulmón	6	1	16.7
Otros cánceres	11	0	0.0
Total	682	42	6.2

ETC: AR (n=12), LES (n=7), Esclerodermia (n=5), Vasculitis (n=4), S. Sjögren (n=4), Sd. Antisintetasa (n=2), EMTc (n=1), Art. psoriásica (n=1), Dermatomiositis (n=1), Espondilitis (n=1) o Miopatía (n=1).

1.1. Epidemiología de las EPID en la Región de Murcia.

El conocimiento de la epidemiología de las EPID es fundamental en la comprensión de los factores de riesgo y la patogenia, además permite establecer planes de prevención y tratamiento a partir de los datos demográficos a nivel regional. En nuestra serie se ha obtenido un acercamiento a los datos epidemiológicos de las EPID en la región de Murcia. Estos datos no incluyen los casos de EPID estudiados mediante LBA en el Hospital Morales Meseguer ya que hasta 2023 no han remitido estas muestras a nuestra unidad de citometría. Los grupos más prevalentes son las patologías fibrosantes NIU (23%) y NINE (21%), Sarcoidosis (12.0%) y EPID-INCLASIFICABLES comparten una prevalencia del 12% para ambos grupos, el resto de los grupos se distribuyen según se muestra en la figura 21.

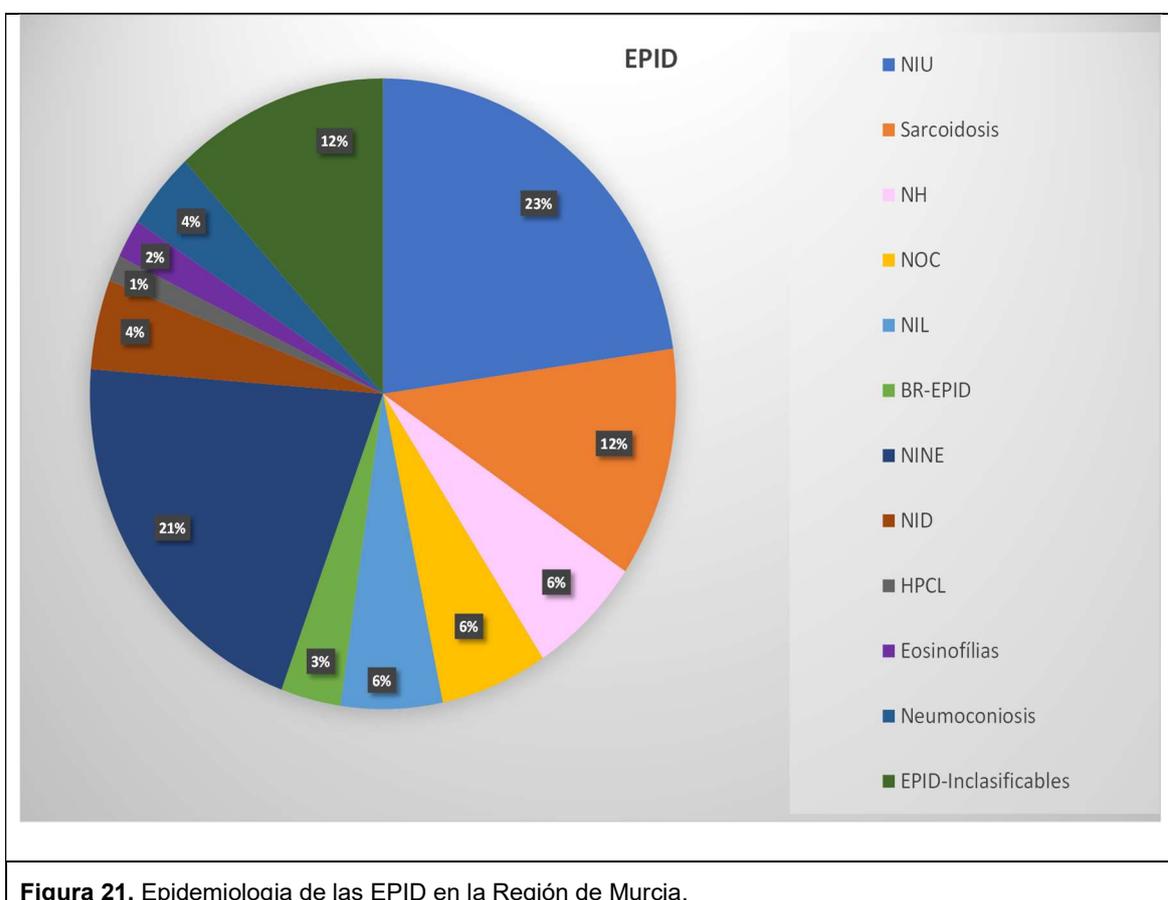


Figura 21. Epidemiología de las EPID en la Región de Murcia.

1.2. Patrones y localizaciones radiológicas.

En este apartado se recogen, por grupos de enfermedades pulmonares, tanto los patrones radiológicos como su distribución/localización en el pulmón (tabla 24), los datos se han obtenido de las historias clínicas de los pacientes. El diagnóstico en general, y especialmente en las NII y la Sarcoidosis, fue sometido en algún momento puntual al

criterio del comité multidisciplinar del hospital de referencia desde el cual se derivó la muestra del LBA. Siguiendo las recomendaciones consenso ATS/ ERS, la Rx de tórax es la prueba de imagen inicial, pero el diagnóstico se basa en el TACAR, p. ej., en la FPI detecta alteraciones más precoces.

En lo que respecta a los patrones radiológicos, teniendo en cuenta la diversidad, simultaneidad y la presencia de patrones comunes a las EPID (reticular, reticulonodulillar, Nodulillar, noduloquistico, quístico) y patrones radiológicos especiales de las EPID (adenopatías perihiliares, infiltrados perihiliares, infiltrados periféricos, infiltrados parcheados migratorios), fueron divididos en primarios y secundarios. Igualmente, su localización se diferenció en primaria y secundaria.

La prevalencia de los patrones radiológicos y su distribución en los diferentes grupos de enfermedades, a los que se hace mención como patrones radiológicos primarios se describe a continuación:

- **Reticular:** predominó en la NIU y la NINE.
- **Panal:** el panal fue predominante en la NIU. En los casos en los cuales se describe patrón en vidrio deslustrado en el contexto de la NIU, se corresponde con episodios de infección sobre la base de una FPI establecida, se desconoce el número de casos en los cuales pueda tratarse de FPI en fase inicial de alveolitis.
- **Fibrosis:** principalmente observado en NH (lóbulos superiores), NIU y NINE.
- **Nodulillar:** presente en la mayoría de las patologías tanto no-EPID (EPOC, asma y nódulos pulmonares), EPID (sarcoidosis, NH, BR-EPID, NID, NINE, neuromoconiosis y EPID-inclasificables), patología infecciosa aguda y cáncer de pulmón.
- **Adenopatías:** no destacaron dentro de la serie, más bien un hallazgo infrecuente, tampoco se mencionan como hallazgo radiológico común, únicamente algunos casos aislados de sarcoidosis en estadios I y II.
- **Alveolo intersticial:** al tratarse de un patrón inespecífico se encontró asociado a todas las patologías: NO-EPID, LBA-control, Asma y las patologías EPID sarcoidosis, NH, NOC, NIL, NIU, BR-EPID, NID, NINE, EPID-eosinofílica y EPID-inclasificables. También en patologías infecciosas y cáncer de pulmón.
- **Vidrio deslustrado:** se observó distribución homogénea e inespecífica a través de casi todos los grupos, inferior al patrón alveolo intersticial y frecuente dentro del

grupo EPID para NH, NOC, NIL, NID, NINE y EPID-inclasificables. También en el grupo de patología infecciosa y neoplasia extrapulmonar.

- **Mosaico:** con menor frecuencia se observó en NH y NINE.
- **Infiltrados parcheados:** menos frecuente, se observó en NOC y NINE.

En cuanto a los patrones radiológicos secundarios, los más frecuentes fueron:

- **Nodulillar:** en NINE y EPID-inclasificables.
- **Quístico:** en NIU e HPCL.
- **Vidrio deslustrado:** en NIU y NINE.
- **Panal y bronquiectasias:** en la NIU. No se observó un predominio de panal en la NH en fase crónica como lo describe la casuística.
- **Alveolo intersticial:** predominante en la NINE y EPID inclasificables.
- **Enfisema:** en la NID.

La localización/distribución radiológica primaria más frecuente se observó de la siguiente manera:

- **Difuso:** en sarcoidosis, NH, NOC, NIL, NIU, NINE y EPID-inclasificables.
- **Lóbulos inferiores:** prevalente dentro de la serie en NIU, NINE y EPID-inclasificables, menos frecuente observado en sarcoidosis y NH.
- **Lóbulos superiores:** más prevalentes dentro de la serie en NINE, EPID-inclasificables, sarcoidosis, no se estableció una correlación entre los casos asociados a ETC, en menor proporción se observó en los casos de NH, NOC, BR-EPID y NID.
- **Multifocal:** predominio en NIU (FPI), en menor proporción en BR-EPID y NID.
- **Bilateral:** llama la atención que se observó en el grupo LBA-control que además presentaban patrón en vidrio deslustrado y alveolo intersticial. Observado frecuentemente en patología infecciosa aguda. En el grupo EPID, predominante en NIU y NINE, menos en sarcoidosis, y en menor proporción observado en NH, NOC, BR-EPID, y neumoconiosis,

En cuanto a la distribución de los hallazgos radiológicos secundarios más frecuentes se observó el compromiso bilateral en la NIU.

Por patologías, los datos de nuestra serie muestran los siguientes patrones y localizaciones radiológicas predominantes:

Patologías no-EPID:

- **EPOC:** patrón nodulillar, sin distribución definida comúnmente asociado a exacerbaciones o procesos infecciosos.
- **Asma:** patrones alveolo intersticial y nodulillar, con una distribución predominante en los lóbulos superiores, generalmente vinculada a episodio de infección aguda.
- **Nódulos pulmonares:** los nódulos pulmonares estudiados como entidad aislada; mostraron asociación ocasionalmente al patrón quístico, adenopatías bilaterales ocasionales y distribución predominante en los lóbulos superiores y bilateral.

Patologías EPID:

- **Sarcoidosis:** patrón predominante nodulillar, la distribución difusa, de preferencia en los lóbulos inferiores y superiores, con afectación bilateral.
- **NH:** aunque en menor proporción al anterior, se obtuvo una distribución equitativa de los patrones nodulillar, alveolo intersticial con distribución difusa en lóbulos inferiores y superiores y afectación bilateral. Aunque en menor proporción, se observó fibrosis.
- **NOC:** patrón alveolo intersticial bilateral, que se puede distribuir indistintamente tanto en lóbulos superiores como inferiores.
- **NIL:** predominio del patrón alveolo intersticial localizado en las bases y bilateral.
- **NIU:** el patrón predominante es la fibrosis, distribuida en los lóbulos superiores e inferiores y bilateral, seguido de los patrones panal y reticular. En menor proporción algunos casos que muestran exacerbaciones con patrón radiológico alveolo intersticial.
- **BR-EPID:** escaso número de exploraciones radiológicas en la serie, se muestran patrones nodulillar con distribución bilateral en lóbulos superiores, también multifocal, con algunas exacerbaciones asociadas a patrón alveolo intersticial.
- **NID:** escaso número de exploraciones radiológicas en la serie, predominante patrón nodulillar.
- **NINE:** los patrones más frecuentes son reticular y alveolo intersticial con distribución basal, a veces heterogénea. Llama la atención, que de los casos de la serie diagnosticados de NINE, 33 mostraron una distribución posiblemente atípica para este patrón en los lóbulos superiores, lo que llevaría a suponer que se trata de otras EPID.

- **Neumoconiosis:** patrón nodulillar, con localización en lóbulo superior y afectación bilateral.
- **HPCL:** patrón quístico, con localización en lóbulo superior.
- **EPID-eosinofílica:** aunque no se recoge en la tabla, la evaluación radiológica de las eosinofilias pulmonares mostró dos clases de patrones; 1) infiltrados bilaterales perihiliares y migratorios, asociados a neumonías eosinófilas agudas. 2) infiltrados bilaterales y periféricos, casos menos frecuentes y asociados a neumonías eosinófilas crónicas. No se han separado estos casos debido a la baja casuística.
- **EPID-inclasificable:** no se encontró un patrón radiológico definido en este grupo.

Tabla 24. Patrones y localizaciones radiológicas de las patologías pulmonares.																																						
Número de casos	Patrón Radiológico primario														Localización radiológica primaria																							
	Reticular	ReticuloNodular	Nodular	Quístico	Vidrio deslustrado	Mosaico	Aden. Perifiliares	Infiltr. Perifiliares	Infiltr. Parcheados	Panaral	Bronquiectasias	Consolidación	Fibrosis	Alveolo intersticial	Emfisema	Arbol en brote	Sin P. radiol. Sec.	Difuso	Lóbulo inferior	Lóbulo superior	Lingula	Apicobasal	Broncovascular	Multifocal	Lóbulo medio	Migratorio	Periferia	Pul. derecho	Pulm. Izquierdo	Bilateral	Seg. Anteriores	Seg. Posteriores	Subpleural	Bronquiolar	Centroacinar	Centrolobulillar	Sin L. radiol. Sec.	
BAL-Control	2	0	6	2	1	2	0	0	1	0	0	0	7	1	0	0	0	5	0	2	0	2	1	1	0	0	3	0	0	6	0	0	0	1	0	0	0	1
Patologías no-EPID																																						
EPOC	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
Asma	0	2	5	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	4	0	0	0	1	3	7	0	0	2	0	0	1	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	
TBC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Nódulos pulmonares	0	0	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
Patologías EPID																																						
Sarcoidosis	2	3	32	0	3	3	4	0	2	2	1	0	3	9	0	2	0	7	12	12	0	0	6	4	0	2	4	0	15	0	0	3	0	0	0	0		
N. Hipersensibilidad	4	1	9	0	2	3	0	0	0	1	0	0	6	9	0	0	0	6	9	9	0	1	2	0	0	0	2	0	4	0	0	0	0	0	0	2	0	
NOC	6	2	2	0	5	2	0	0	3	1	2	1	2	14	3	0	0	1	10	8	0	3	4	5	0	1	0	2	2	6	0	0	1	0	1	0	0	
NIL (NIL-HIV)	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	0	0	2	5	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
NIU (fibrosis)	22	4	12	2	6	1	0	1	25	0	0	0	38	23	5	1	0	10	38	27	5	9	3	13	0	0	6	4	1	22	0	1	2	0	0	0	0	
BR-EPID	0	0	10	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	4	1	3	0	1	6	0	1	0	7	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	
NID	0	1	10	0	5	2	0	0	1	0	1	0	1	7	0	0	0	4	3	5	0	1	1	5	1	0	0	1	1	2	0	0	4	0	0	0	0	
NINE	18	5	19	5	7	4	0	0	3	13	0	1	11	28	9	1	0	16	29	31	0	1	3	8	1	1	0	3	2	20	1	0	5	1	1	0	0	
Neumoconiosis	0	2	16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	1	6	0	1	1	0	2	0	0	1	1	5	0	0	1	0	0	0	1	
Histic. Langerhans	2	0	1	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	3	4	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EPID-Esosinofilia	0	0	3	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	7	1	0	0	2	1	3	0	0	0	4	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
EPID-Inclasificable	5	5	22	0	9	1	0	0	0	3	1	0	1	26	4	0	0	10	18	18	1	0	0	5	1	1	2	4	6	9	0	0	1	0	0	0	0	
Patologías agudas																																						
Infecciosas	0	1	15	2	4	3	0	0	0	0	0	2	3	10	2	1	0	3	11	10	0	1	1	3	0	0	1	3	0	10	0	0	0	1	0	0	0	
NIA	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cáncer																																						
Cáncer de pulmón	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
Otros cánceres	1	0	3	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
Patrón Radiológico secundario																																						
BAL-Control	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	16																					
Patologías no-EPID																																						
EPOC	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1																					
Asma	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	12																					
TBC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																					
Nódulos pulmonares	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4																					
Patologías EPID																																						
Sarcoidosis	1	0	0	0	0	1	1	1	0	2	0	0	1	2	0	56																						
N. Hipersensibilidad	1	0	0	2	3	1	0	0	0	2	1	0	0	1	1	22																						
NOC	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	1	3	0	1	35																						
NIL (NIL-HIV)	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	8																						
NIU (fibrosis)	0	0	0	6	9	2	0	0	1	20	8	1	4	4	2	83																						
BR-EPID	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	1	0	1	0	1	17																						
NID	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	5	0	21																						
NINE	1	0	5	1	5	2	0	0	1	1	5	1	2	5	1	94																						
Neumoconiosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	20																						
Histic. Langerhans	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5																						
EPID-Esosinofilia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	11																						
EPID-Inclasificable	1	0	4	0	1	0	0	0	0	2	4	0	3	1	2	57																						
Patologías agudas																																						
Infecciosas	0	0	1	0	3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	35																					
NIA	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4																						
Cáncer																																						
Cáncer de pulmón	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2																						
Otros cánceres	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7																						
Localización radiológica secundario																																						
BAL-Control																																						
Patologías no-EPID																																						
EPOC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4		
Asma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	12																					
TBC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																					
Nódulos pulmonares	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4																					
Patologías EPID																																						
Sarcoidosis	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	2	0	0	1	2	0	64																					
N. Hipersensibilidad	1	0	0	2	3	1	0	0	0	2	1	0	0	1	1	22																						
NOC	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2	1	3	0	1	35																						
NIL (NIL-HIV)	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	8																						
NIU (fibrosis)	0	0	0	6	9	2	0	0	1	20	8	1	4	4	2	83																						
BR-EPID	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	1	0	1	0	1	17																						
NID	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	5	0	21																						
NINE	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	5	1	2	5	1	94																						
Neumoconiosis	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	20																						
Histic. Langerhans	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5																						
EPID-Esosinofilia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	11																						
EPID-Inclasificable	1	1	0	0	0	1	1	0	0	2	4	0	3	1	2	57																						
Patologías agudas																																						
Infecciosas	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	35																					
NIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4																						
Cáncer																																						
Cáncer de pulmón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2																						
Otros cánceres	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7																						

1.3. Pruebas de función pulmonar (PFP)

De forma simultánea con el episodio clínico que motivó el estudio del LBA, ya sea una exacerbación o simplemente con el propósito de monitorizar, fueron recogidos los datos relacionados con las PFP, teniendo en cuenta los parámetros: la difusión pulmonar de

monóxido de carbono (DLCO %), el volumen espiratorio forzado (FEV1 %) y la capacidad vital forzada (FVC %).

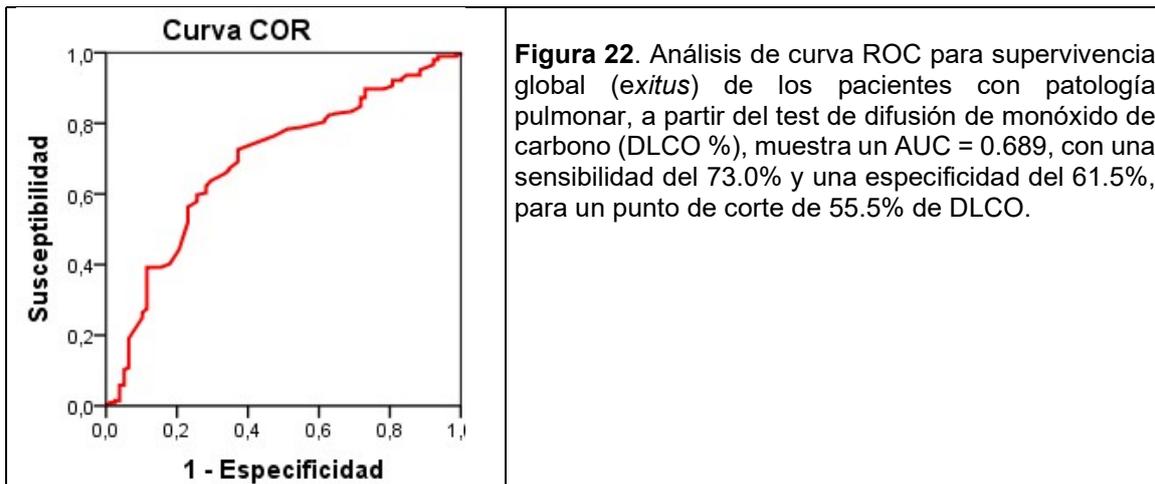
Estos parámetros se han obtenido de un número limitado de pacientes, 182 de los 1411 pacientes incluidos (12.9% de casos), ya que: 1) no todos los pacientes sometidos a broncoscopia y obtención de LBA contaban con PFP o difusión; 2) para la mayoría de los casos cuyas muestras procedían de hospitales externos al área del HCUVA, no había constancia en la historia clínica acerca de la realización de estas pruebas. En la (tabla 25) se exponen los datos que fueron recolectados y relacionados con la población a estudio.

Con los datos disponibles se aprecia una disminución de los volúmenes pulmonares DLCO y la FVC reflejo de un defecto restrictivo más avanzado, especialmente en la NH y la NIU dentro de la serie. El resto de las EPID muestran variables grados de compromiso.

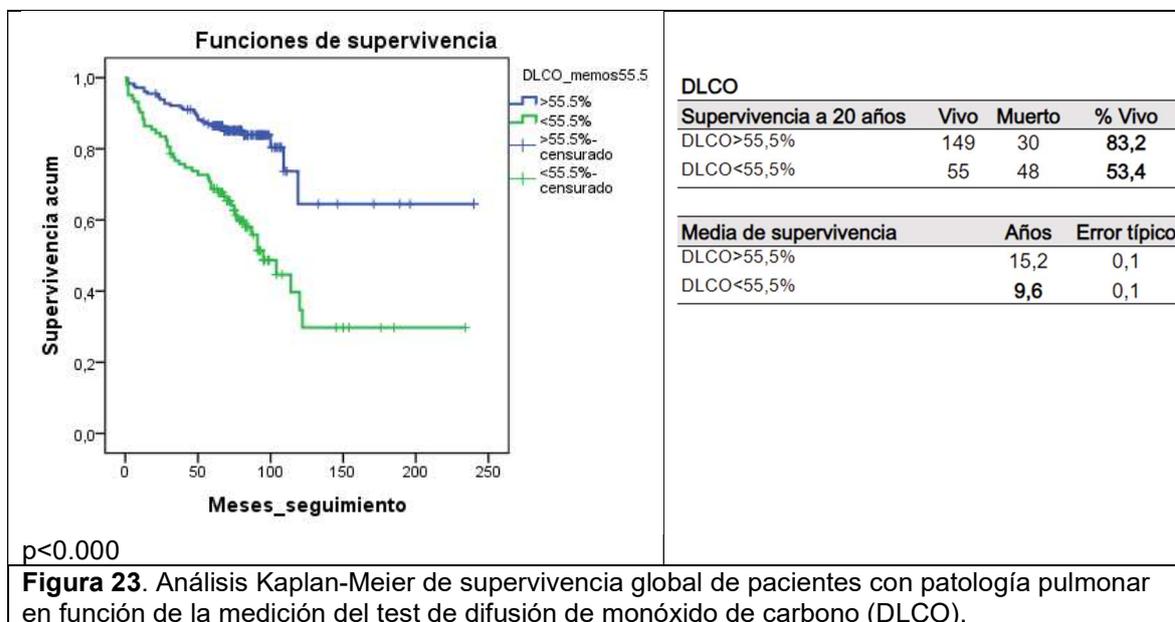
Tabla 25. PFP, volumen (DLCO), relación de supervivencia.				
Supervivencia a 20 años	N	DLCO	FEV1	FVC
Sarcoidosis	22	78,8 ± 4,4	82,4 ± 3,8	85,2 ± 6,6
N. Hipersensibilidad	16	54,4 ± 6,9**	71,1 ± 7	68 ± 7,4**
NOC	11	76,6 ± 4,6	79,3 ± 5,8	78,3 ± 7,8
NIL (NIL-HIV)	4	60,8 ± 12,3*	86,8 ± 7,3	
NIU	57	55,3 ± 2,8**	73 ± 2,9	70,6 ± 2,9**
BR-EPID	5	67,4 ± 4,1	89,8 ± 7,9	97 ± 9,6
NID	10	73,9 ± 6,4	83,3 ± 5,1	91,8 ± 6,2
NINE	52	64,7 ± 2,9	82 ± 3,1	86,2 ± 3,5
Neumoconiosis	5	82 ± 6	81,2 ± 7,5	

* p<0,05; NIL; ** p>0,01; NH, NIU.

Con los datos recolectados, se pudo establecer un valor de corte del test de difusión de monóxido de carbono (DLCO) en 55.5%, con alto valor predictivo sobre la supervivencia de los pacientes, en la figura 22.



De esta forma, los pacientes con DLCO < 55.5% presentaban una tasa de supervivencia media a 20 años del 53.4% frente al 83.2% del resto de los sujetos ($p < 0.001$), acortando la supervivencia media de 15.2 años a 9.6 años, desde la toma de la muestra del LBA, ver figura 23.



1.4. Supervivencia de pacientes con patología pulmonar

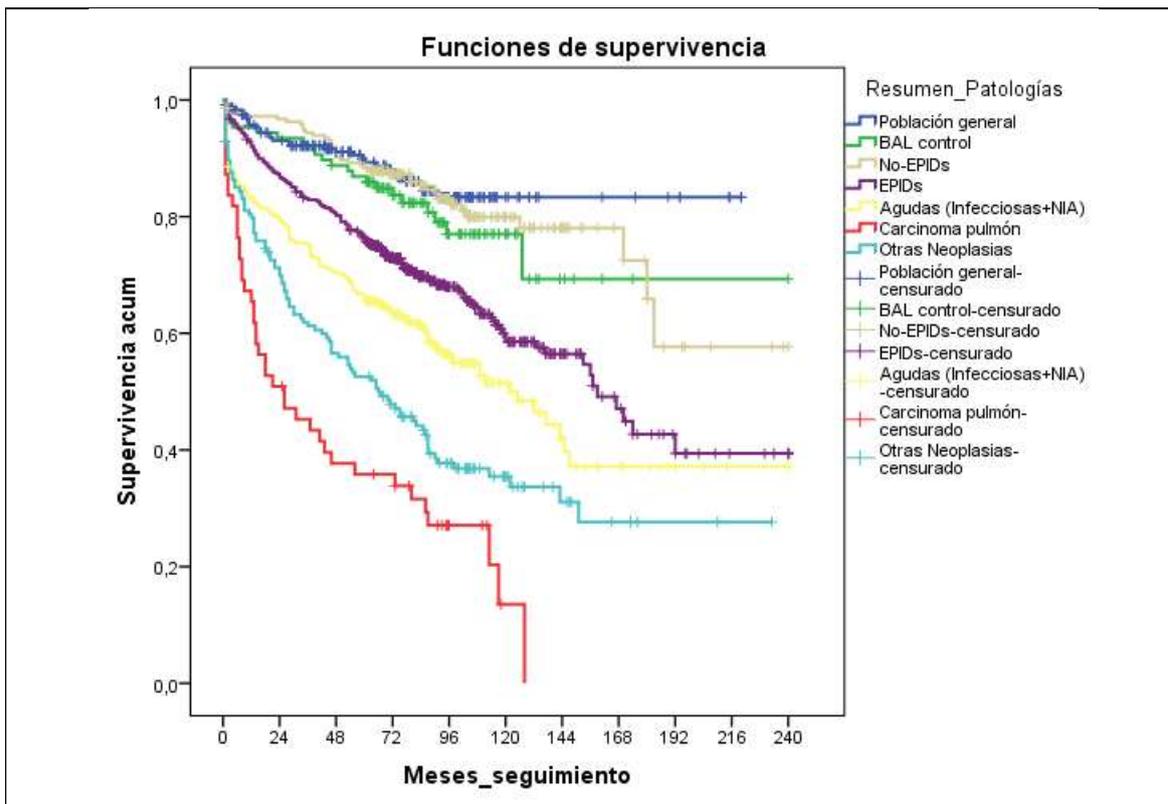
En primer lugar, se estimó la probabilidad de supervivencia de los pacientes de los diferentes grupos de patologías y se comparó con la de la población general, representada en una serie de pacientes con gammapatías monoclonales de significación incierta (MGUS) sin marcadores de mal pronóstico, que tienen una supervivencia estimada similar a la población general (vasco-Mogorrón et al., 2021).

Como se muestra en la figura 24, los pacientes sometidos a broncoscopia y LBA sin patología definida y el grupo no-EPID (EPOC, asma, TBC y nódulos pulmonares) presentaban supervivencias similares a la población general. Dentro del grupo No-EPID, los pacientes con EPOC destacaron por presentar supervivencias mucho más reducidas que las otras patologías del grupo (asma, nódulos pulmonares y TBC). No obstante, no se muestran dichos resultados ya que la EPOC no pertenece al grupo EPID y tampoco es objeto de estudio de esta tesis.

El grupo de pacientes sin patología pulmonar, utilizado para la estimación de los valores de normalidad del contenido leucocitario del LBA, presentó curvas y tasas de supervivencias semejantes a la población general.

Muy importante fue comprobar que los pacientes EPID presentaban una supervivencia global a 20 años más reducidas que la población general (66.9% vs. 87.0%, $p < 0.00001$), y por tanto una esperanza de vida un 22.1% inferior a la de la población general. La media de supervivencia de los pacientes EPID fue de 12.4 ± 0.5 , frente a los 15.9 ± 0.4 años de la población general, ver figura 24.

La tasa de supervivencia se fue acortando progresivamente en pacientes que sufrieron procesos agudos como infecciones y NIA (54.5%), neoplasias diferentes al carcinoma pulmonar (37.0%) y carcinoma pulmonar (23.6%). De igual manera se acortaron los periodos medios de supervivencia, que fueron de 10.7 ± 0.6 , 8.2 ± 0.7 y 4.1 ± 0.6 años, respectivamente.



Supervivencia a 20 años	Vivo	Muerto	% Vivo
Población general	208	31	87,0
BAL control	85	22	79,4
No-EPIDs	176	40	81,5
EPIDs	486	240	66,9
Agudas (Infecciosas+NIA)	138	115	54,5
Carcinoma pulmón	13	42	23,6
Otras Neoplasias	57	97	37,0
Total	1163	587	66,5

Media de supervivencia	Años	Error típico
Población general	15,9	0,4
BAL control	15,6	1,0
No-EPIDs	15,7	0,7
EPIDs	12,4	0,5
Agudas (Infecciosas+NIA)	10,7	0,6
Carcinoma pulmón	4,1	0,6
Otras Neoplasias	8,2	0,7
Total	12,6	0,3

Figura 24. Análisis Kaplan-Meier y log-rank de supervivencia global de pacientes a los que se les realizó estudio de LBA. Se incluye la supervivencia de una población control "sana" sin patología pulmonar y un control poblacional (pacientes con MGUS de buen pronóstico, con supervivencia equiparable a la población sana).

Las patologías EPID por tanto tienen un claro impacto en la supervivencia de los pacientes en comparación con la población general, por eso nos interesó hacer un estudio por grupos de edad. En la figura 25 se muestra la supervivencia de los pacientes EPID en comparación con la de la población general para los grupos de edad <55, 55-65, 65-75 y >75 años. Se puede comprobar como los pacientes EPID de 55 años tienen curvas de supervivencia comparables a la población general de 65-75 años (tasas de supervivencia global de 88.2%

y 87.1%, respectivamente), o como los pacientes EPID de 55-65 años tienen curvas de supervivencia comparables a la población general de >75 años (tasas de supervivencia global de 74.0% y 77.5%, respectivamente). Por tanto, padecer una enfermedad EPID puede llevar a reducir la supervivencia entre 10 a 15 años con relación a la población general.

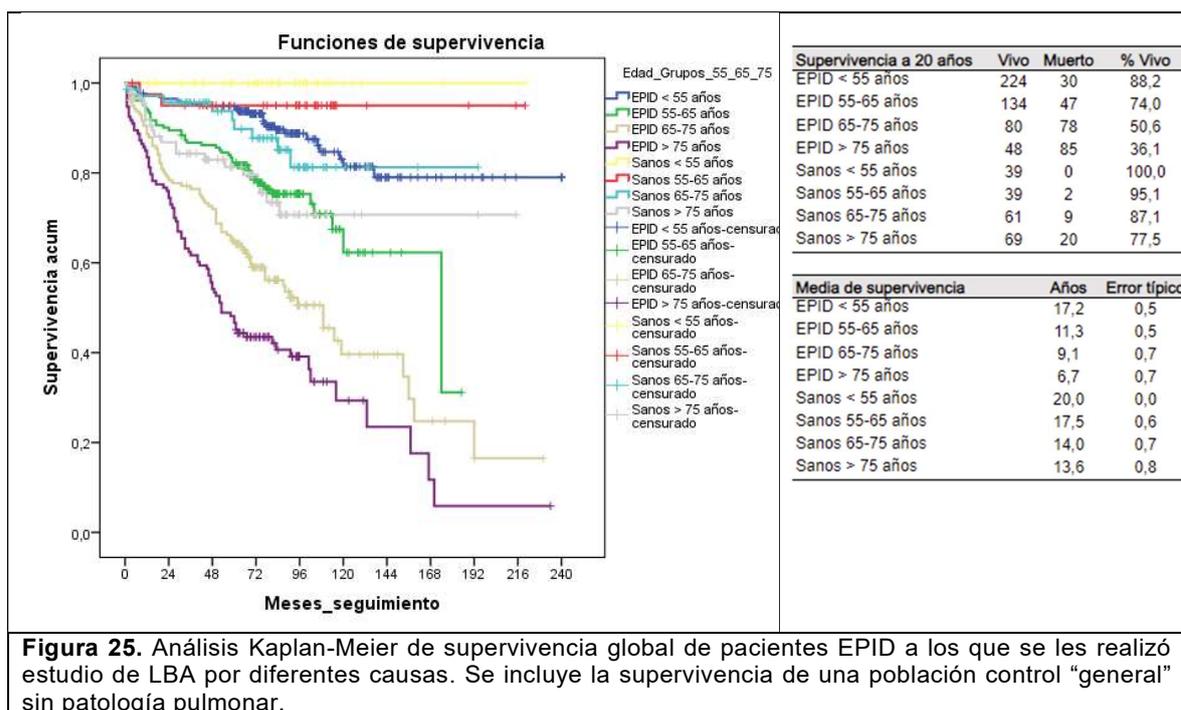
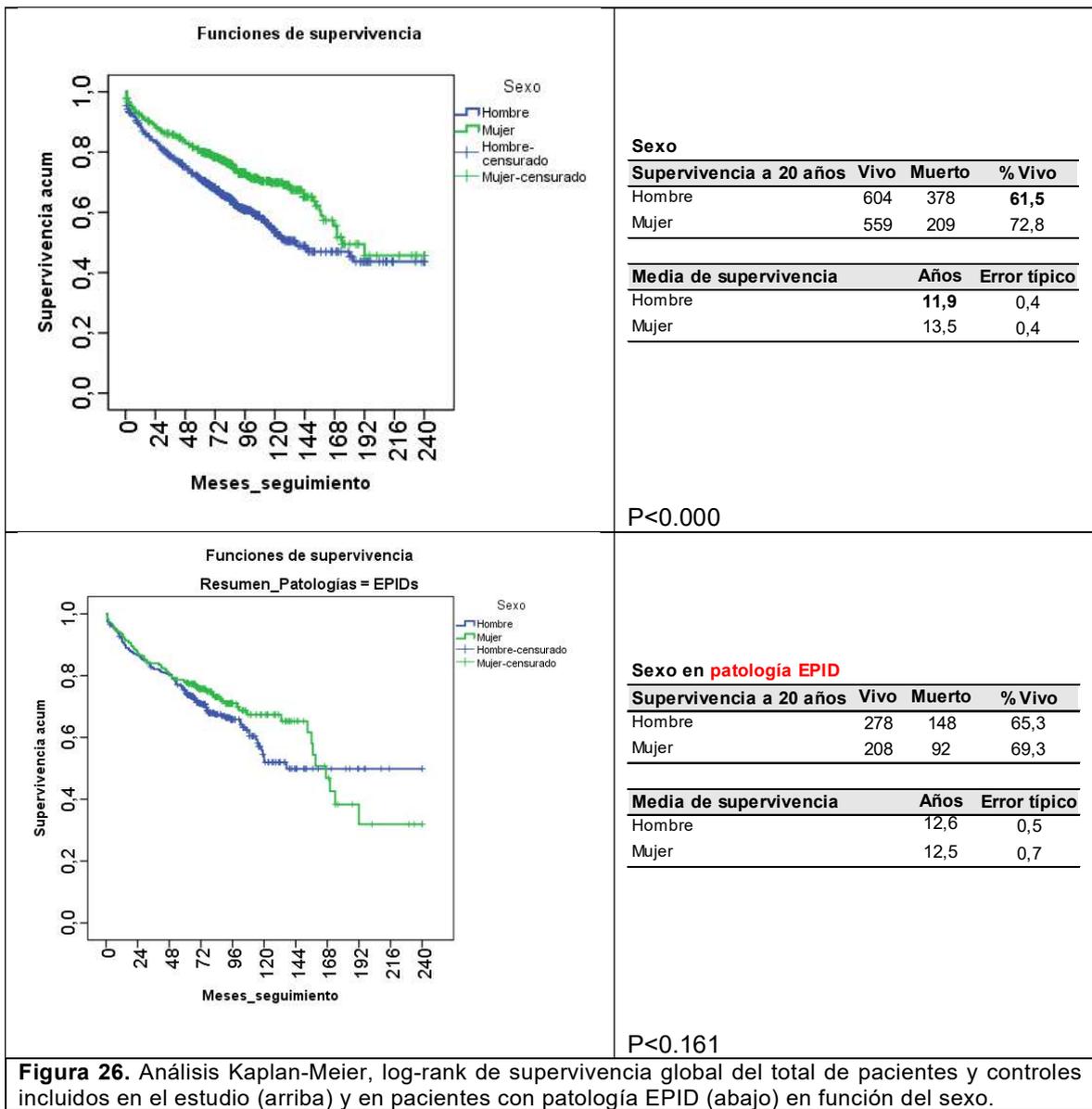


Figura 25. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes EPID a los que se les realizó estudio de LBA por diferentes causas. Se incluye la supervivencia de una población control "general" sin patología pulmonar.

En relación con el sexo, los hombres presentaron menor tasa de SG a 20 años (61.5% vs. 72.8%, $p < 0.000$) al compáralo con las mujeres, y también una supervivencia más corta (11.9 vs. 13.5 años). Esta diferencia se mantuvo en todos los grupos de estudio, tanto controles como en el resto de las patologías, incluidas ambos tipos de cáncer. Sin embargo, la diferencia entre mujeres y hombres se atenuaba mucho y se perdía la significación estadística en los pacientes con patologías EPID, ver figura 26.



Entre las EPID no se encontraron grandes diferencias de supervivencia salvo en los pacientes con NIU, quienes mostraron tasas de supervivencia global inferiores al total de las EPID (38.2% vs 66.9%, $p < 0.0001$), con periodos medios de supervivencia inferiores 7.5 ± 0.8 vs. 12.4 ± 0.5 años, figura 27.

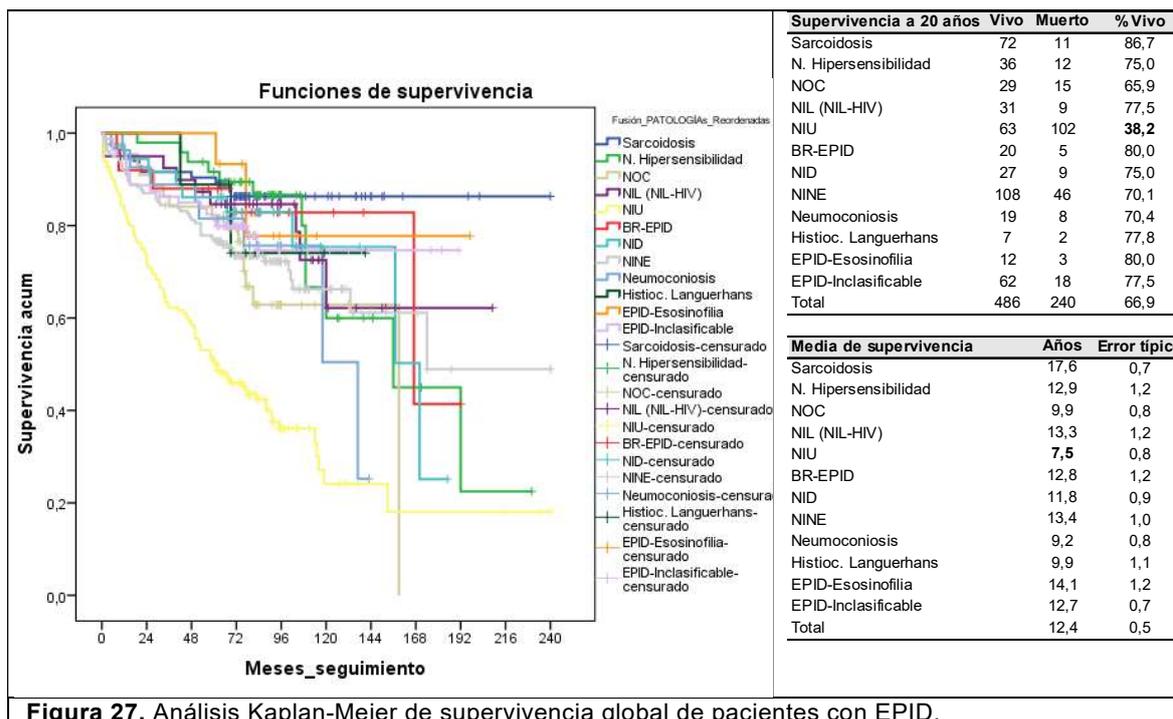


Figura 27. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con EPID.

1.5. Impacto de parámetros clínicos y factores de riesgo en la supervivencia

En este apartado analizaremos el impacto en la supervivencia de pacientes con patología pulmonar que tienen diversos factores de riesgo o condiciones clínicas asociadas.

1.5.1. Patrón y localización radiológicos

Para realizar este estudio se seleccionaron los patrones radiológicos más prevalentes dentro del grupo EPID. Los patrones reticulares (56.9%), panal (54.5%) y fibrosis (39.7%) presentaban tasas de supervivencia global a 20 años muy inferiores, al compararlos con los patrones nodulillar (81.5%), alveolo intersticial (73.4%) y el resto de los patrones (76.6%). Como se ha descrito en el apartado anterior, los patrones asociados a menor supervivencia se presentaban principalmente en la NIU y la NINE, y con menor frecuencia en la NH, figura 28.

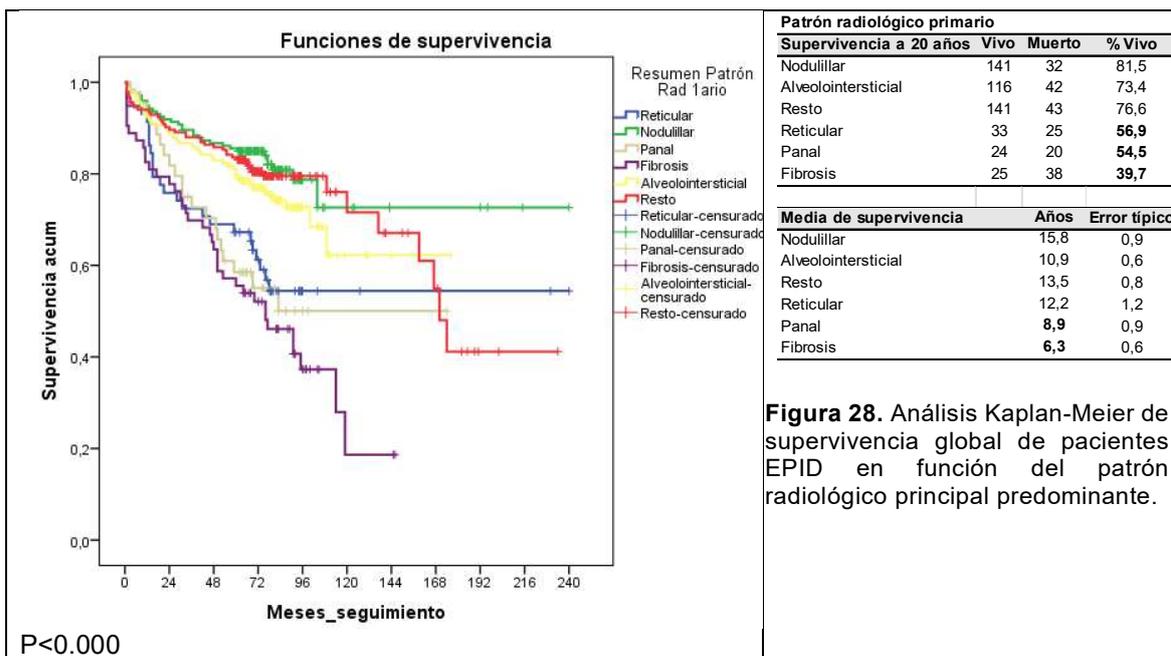


Figura 28. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes EPID en función del patrón radiológico principal predominante.

Por el contrario, no se apreció impacto sobre la supervivencia de los pacientes con EPID de la localización de la afectación pulmonar, ver figura 29.

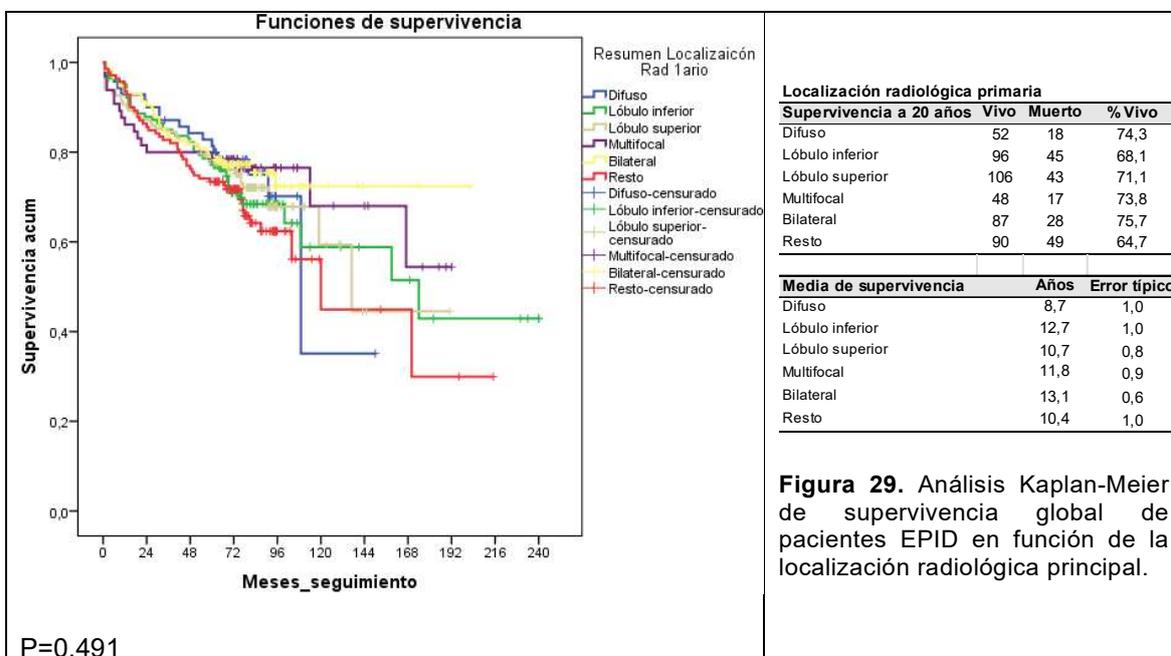
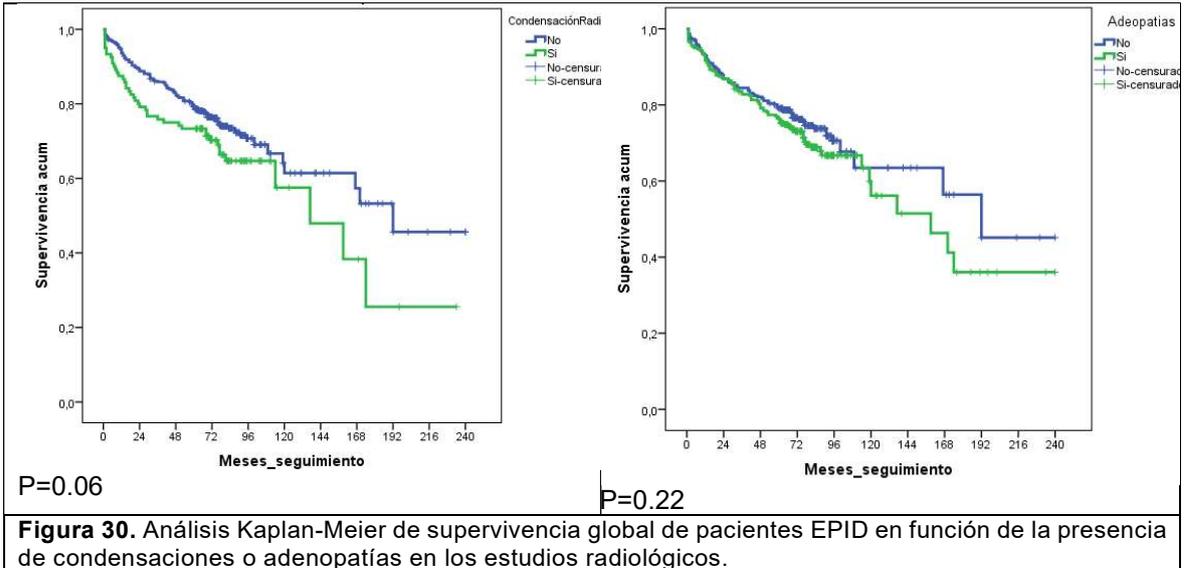
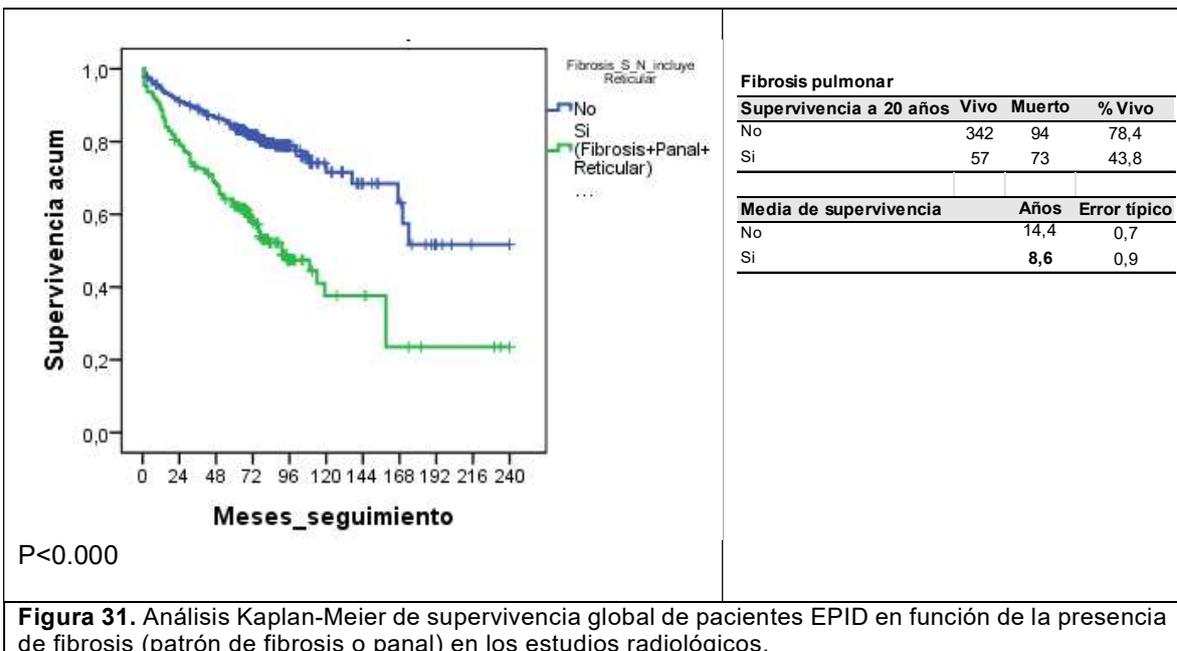


Figura 29. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes EPID en función de la localización radiológica principal.

También se analizó la presencia de condensaciones o adenopatías en los pacientes EPID, encontrando que ninguno de dichos parámetros impactó de forma significativa en la supervivencia global de los pacientes, ver figura 30.



En la figura 31, claramente el parámetro radiológico que presentó mayor impacto en la supervivencia global de los pacientes fue la presencia de fibrosis pulmonar (patrones de fibrosis, panal y reticular), con una tasa de supervivencia media a 20 años del 43.8% frente al 78.4% del resto de pacientes, acortando la supervivencia media de 14.4 años a 8.6 años, desde la toma de la muestra del LBA.

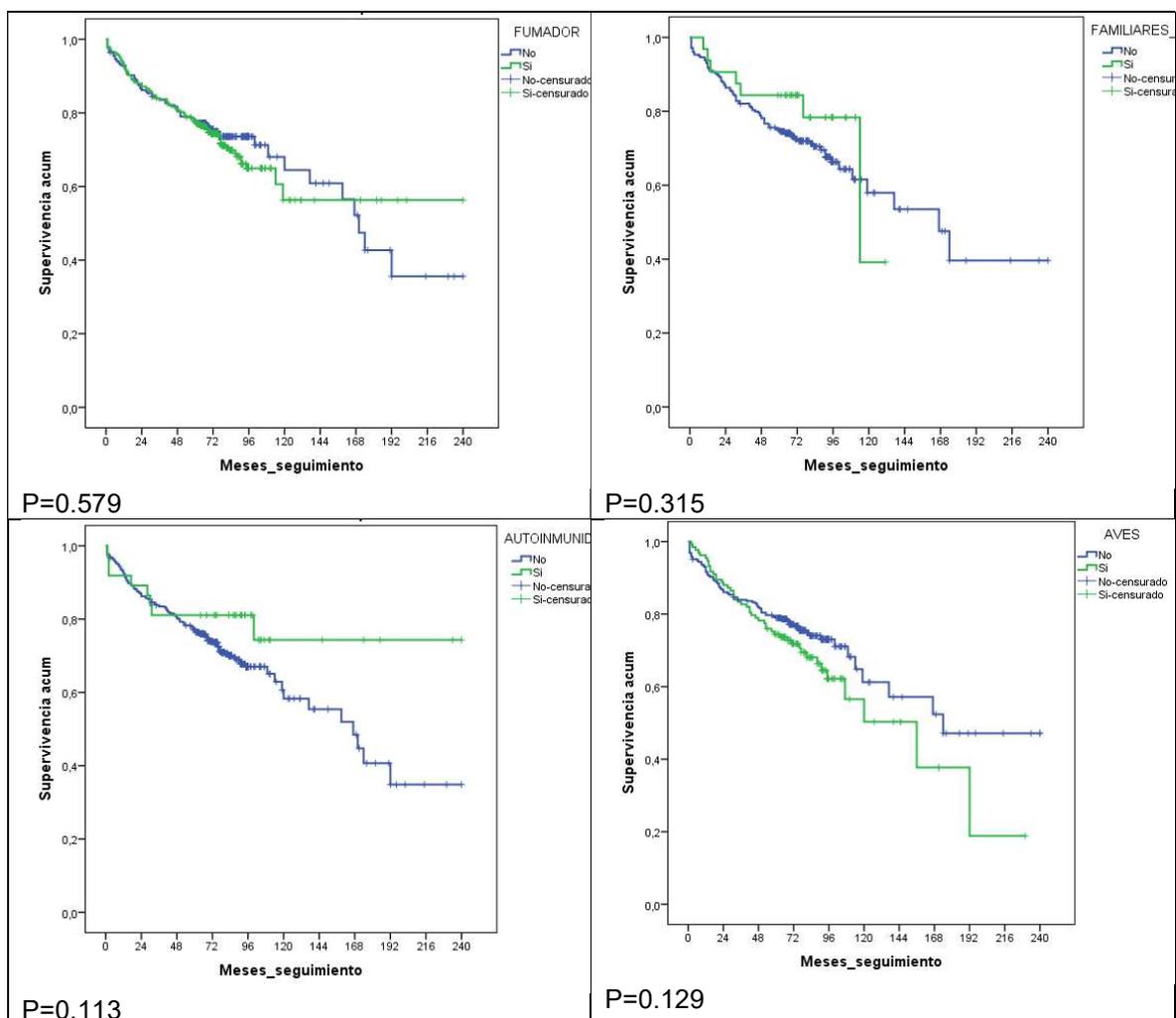


Fibrosis pulmonar			
Supervivencia a 20 años	Vivo	Muerto	% Vivo
No	342	94	78,4
Si	57	73	43,8

Media de supervivencia	Años	Error típico
No	14,4	0,7
Si	8,6	0,9

1.5.2. Otros factores de riesgo

En este apartado se analiza el impacto de diversos factores como el ser fumador, los antecedentes familiares de EPID, la presencia de ETC, el contacto con aves, la inhalación de polvos o sustancias orgánicas o inorgánicas o la toxicidad pulmonar inducida por fármacos. En ningún caso se encontró que cualquiera de estos parámetros de forma aislada tuviera impacto significativo negativo sobre la supervivencia global de los pacientes. Aunque los pacientes con EPID-ETC parecían tener mejor supervivencia global, este resultado no alcanzó la significación estadística y será necesario comprobarlo en series más amplias para confirmarlo, figura 32.



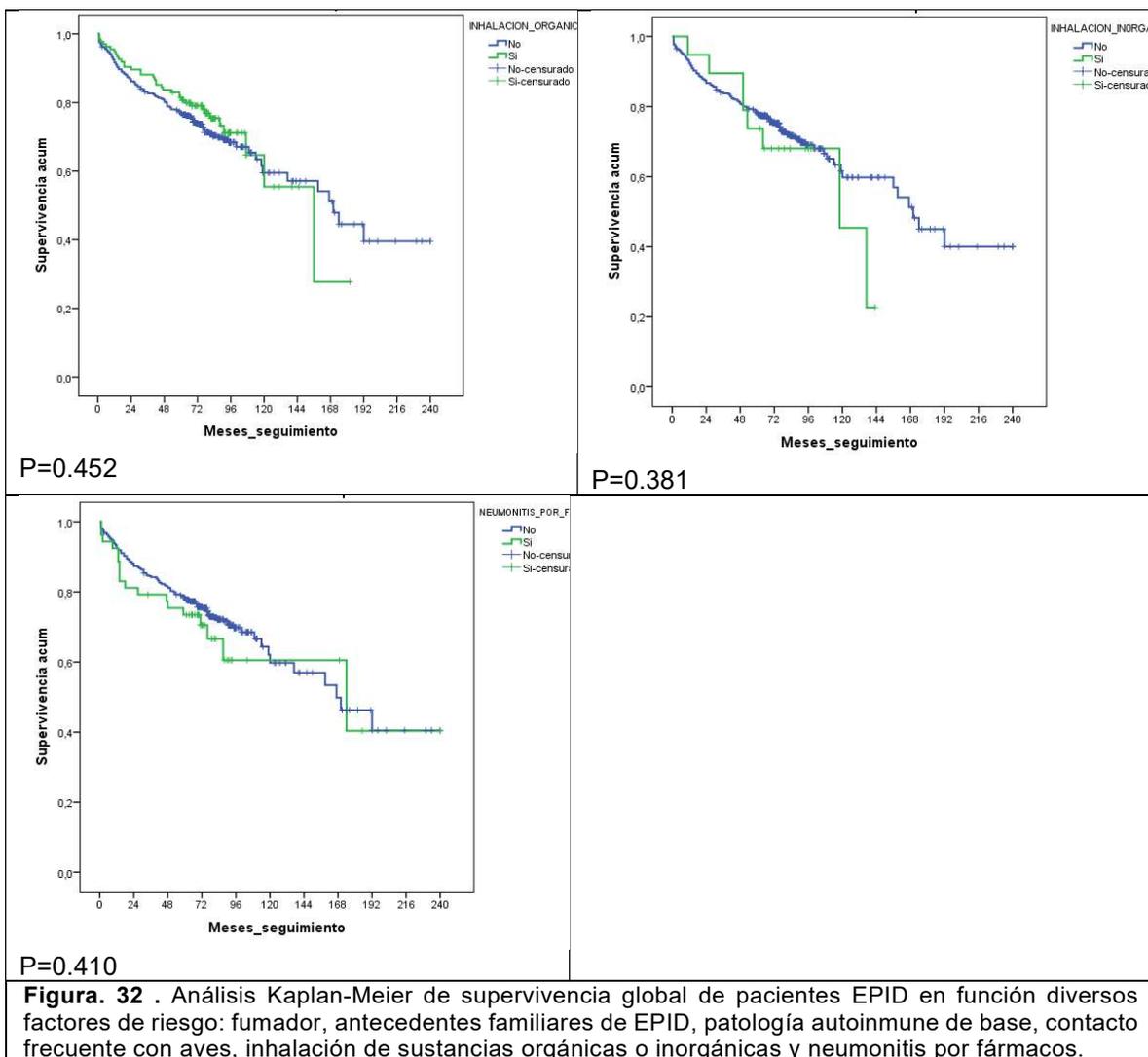


Figura. 32 . Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes EPID en función diversos factores de riesgo: fumador, antecedentes familiares de EPID, patología autoinmune de base, contacto frecuente con aves, inhalación de sustancias orgánicas o inorgánicas y neumonitis por fármacos.

Por su especial relevancia, su connotación de epidemia e impacto para la salud pública, conforme a las declaraciones de la OMS, también se evaluó el efecto del tabaquismo en los pacientes con cáncer de pulmón. Se pudo comprobar que los pacientes con cáncer de pulmón que fumaban tuvieron supervivencias más cortas que los que no fumaban. Sin embargo, este dato no alcanzó la significación estadística y será igualmente necesario confirmarlo en series más largas, ver figura 33.

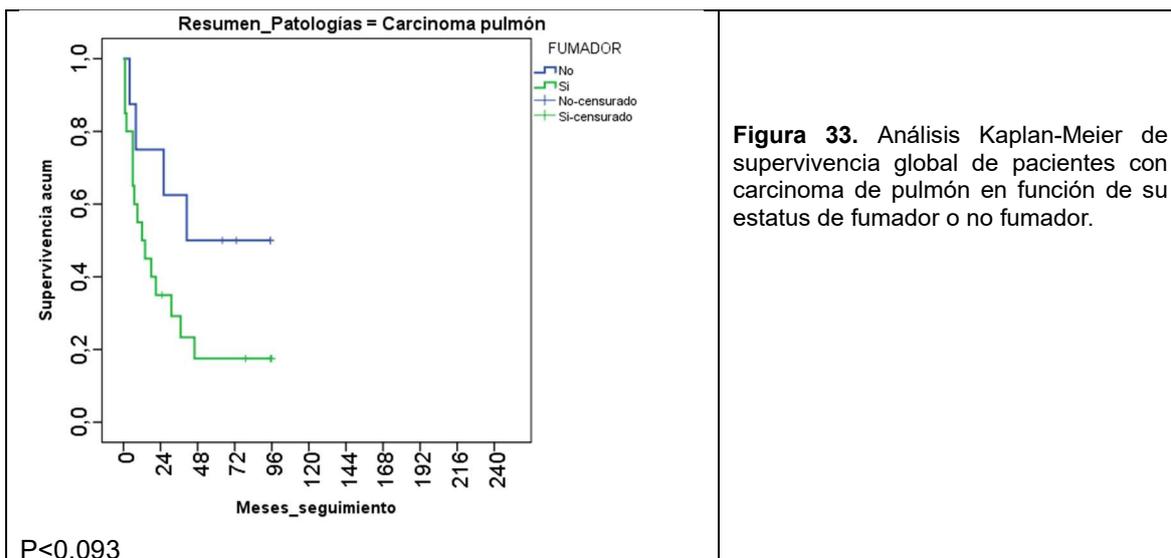


Figura 33. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con carcinoma de pulmón en función de su estatus de fumador o no fumador.

1.6. Tratamientos en patología EPID

Se recogió el tratamiento inmunosupresor establecido para las diferentes patologías EPID (tabla 26), clasificándolo en:

Sin tratamiento inmunosupresor, en el 29.6% de los pacientes con patologías EPID, en quienes no se consideró la necesidad de tratamientos inmunosupresores.

Corticoide inhalado, se detectó el uso de este fármaco por su actividad antiinflamatoria en el 18.2% de los pacientes con patología EPID. También se observó la indicación durante episodios de exacerbación aguda concomitante a bronquitis, y en asociación con agonistas B2 inhalados de acción corta y larga. No se estimó la mortalidad que por causa de los corticoides inhalados se pueda presentar y tampoco se ha contado con suficiente evidencia para conocer los efectos perjudiciales o graves a corto o largo plazo. Se utilizó con mayor frecuencia en la neumoconiosis (40.9%) y menos frecuentemente en la NOC (7.5%), la NINE (8.5%) y la histiocitosis de Langerhans (11.1%).

Corticoide sistémico, se detectó el uso de este fármaco en el 32.5% de los pacientes:

- En el 51.4% de la NH, uno de los conceptos clave en el tratamiento de la NH aguda o subaguda son los corticoides.
- En el 52.5% de la NOC.

- En el 71.4% de la EPID-Eosinófila.
- En el 33.3% de la sarcoidosis se utilizó en de casos, posiblemente porque en nuestra serie se aprecia un predominio de los casos de sarcoidosis en fases evolucionadas, en las que no está demostrado su beneficio.
- En el 36.6% de la NIU.
- Su uso fue menos frecuente en la NIL (18.8%), la NID (20%), la HPCL (11.1%) y la EPID-inclasificable (15.3%).

Otros inmunosupresores, en el 19.6% de los pacientes se observó la necesidad de terapias inmunosupresoras diferentes al corticoide oral. Al evaluar cada enfermedad, se encontró mayor tendencia en la NINE, patrón por lo general asociado a las ETC. En los casos de no respuesta al glucocorticoide, se añadió azatioprina, a las mismas dosis que las utilizadas en la FPI.

Aunque el uso de este tipo de terapias fue más frecuente en la NINE (37.3%) debido a la mayor asociación con patologías autoinmunes, también se observó, aunque con menor frecuencia en la NH (11.4%), la NIL (12.5%), BR-EPID (8.3%), neumoconiosis (4.5%), histiocitosis de Langerhans (11.1%), EPID-eosinofílica (7.1%) y EPID-inclasificables (6.9%).

Tabla 26. Administración de tratamientos en los grupos con patologías EPID				
	No inmunosupresión	Corticoide inhalado	Corticoide oral	Otros inmunosupresores
Sarcoidosis	22 (33,3%)	10 (15,2%)	22 (33,3%)	12 (18,2%)
N. Hipersensibilidad	4 (11,4%)	9 (25,7%)	18 (51,4%)	4 (11,4%)
NOC	7 (17,5%)	3 (7,5%)	21 (52,5%)	9 (22,5%)
NIL (NIL-HIV)	7 (43,8%)	4 (25%)	3 (18,8%)	2 (12,5%)
NIU	31 (23%)	28 (20,7%)	49 (36,3%)	27 (20%)
BR-EPID	9 (37,5%)	5 (20,8%)	8 (33,3%)	2 (8,3%)
NID	13 (43,3%)	5 (16,7%)	6 (20%)	6 (20%)
NINE	29 (24,6%)	10 (8,5%)	35 (29,7%)	44 (37,3%)
Neumoconiosis	7 (31,8%)	9 (40,9%)	5 (22,7%)	1 (4,5%)
Histioc. Langerhans	6 (66,7%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)
EPID-Esosinofilia	0 (0%)	3 (21,4%)	10 (71,4%)	1 (7,1%)
EPID-Inclasificable	37 (51,4%)	19 (26,4%)	11 (15,3%)	5 (6,9%)
Total	172 (29,6%)	106 (18,2%)	189 (32,5%)	114 (19,6%)

Igualmente se evaluó la supervivencia de los pacientes en los diferentes regímenes de tratamiento, ver figura 34. Los pacientes sin tratamiento inmunosupresor, ya sea porque la enfermedad no precisa tratamiento o porque se trataba de estadios iniciales que requerían únicamente observación, mostraron tasas de supervivencia a 20 años significativamente superiores (81.4%) con respecto al resto de grupos de tratamientos, que no superaron el 70% en ningún caso. No se observaron diferencias en la supervivencia de los tres tipos de tratamientos utilizados: corticoide inhalado o sistémico u otros tipos de inmunosupresores.

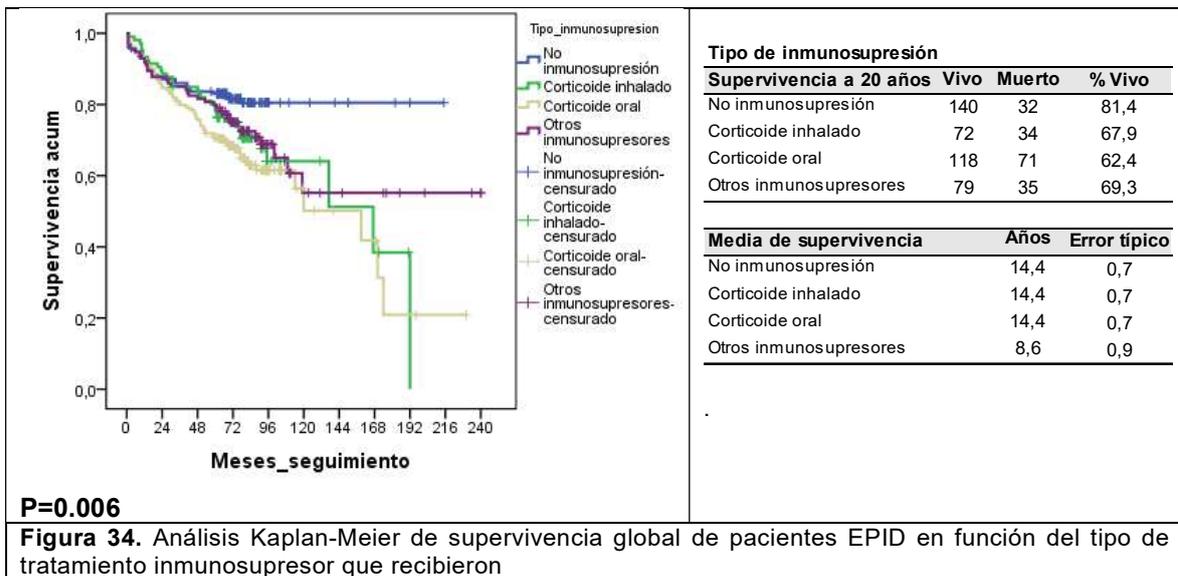


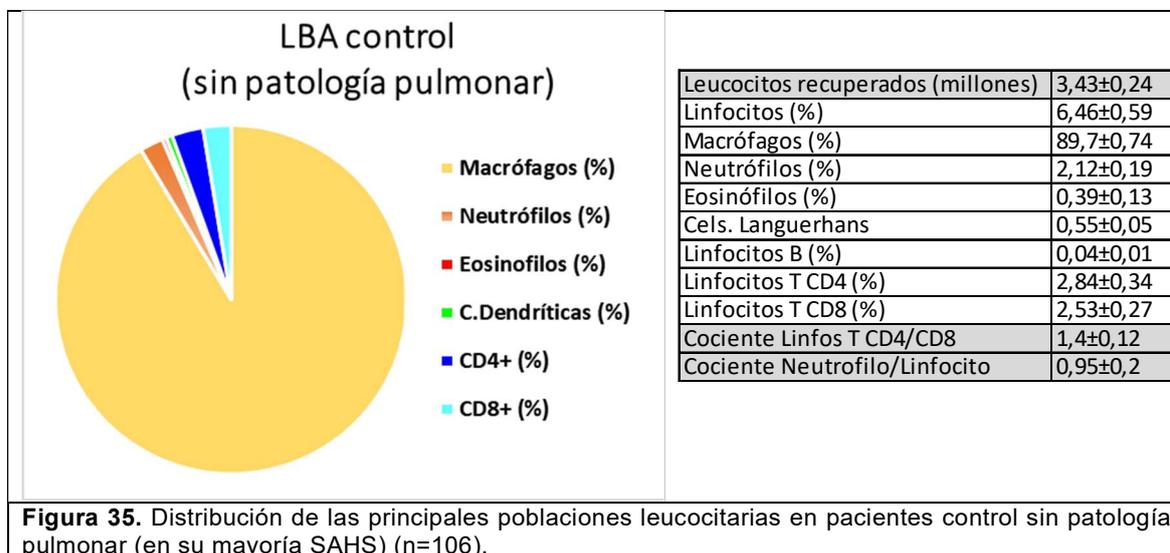
Figura 34. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes EPID en función del tipo de tratamiento inmunosupresor que recibieron

2. Composición leucocitaria del LBA por patologías

2.1. Pacientes sin patología pulmonar

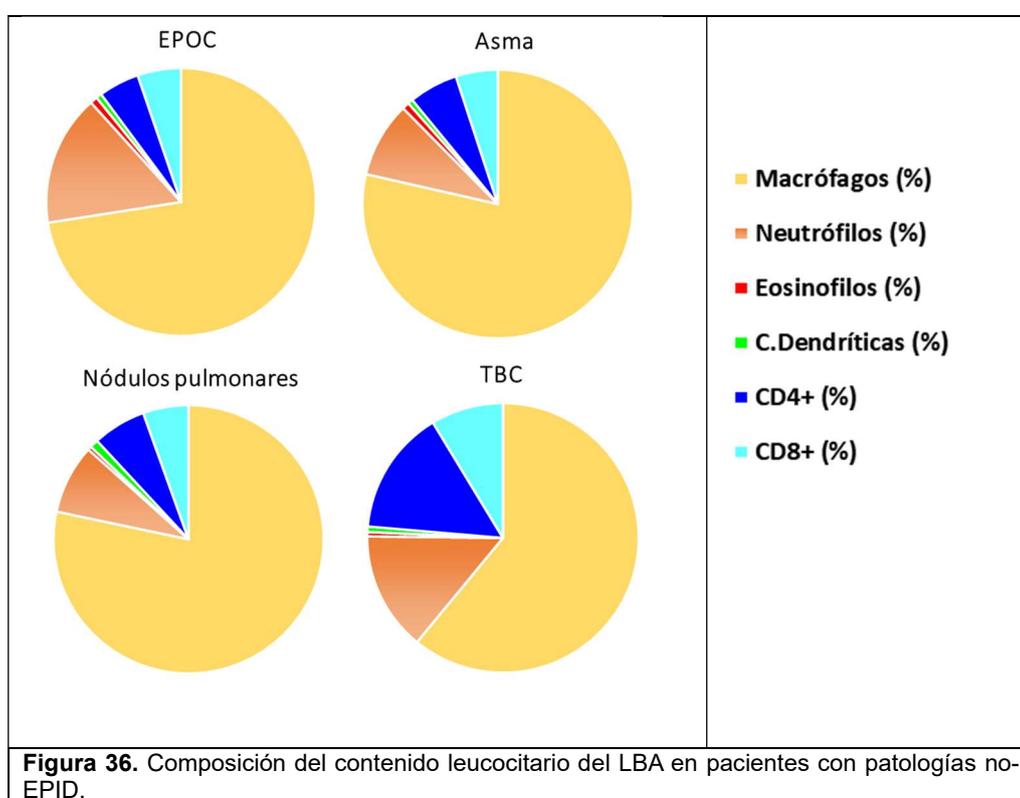
Para comprender mejor las alteraciones en la composición leucocitaria asociadas a las diferentes patologías pulmonares y en aprovechamiento de la información obtenida de toda la serie de pacientes, se analizó en primer lugar el contenido celular de muestras de LBA de pacientes sin patología pulmonar, mayoritario compuesto por SAHS y menos frecuentes hemorragias pulmonares, ver figura 35.

Como ha sido descrito en algunas publicaciones (213–217), los macrófagos alveolares son el componente mayoritario del LBA normal ($89.7\% \pm 0.74$), seguidos de los linfocitos ($6.46\% \pm 0.59$) y neutrófilos ($2.12\% \pm 0.19$), lo que normalmente ofrece un cociente Neutrófilo/Linfocito inferior a 1 (0.95 ± 0.2 , en nuestro caso). Las células dendríticas de Langerhans CD1a+ ($0.55\% \pm 0.05$), los eosinófilos ($0.38\% \pm 0.13$) y linfocitos B ($0.04\% \pm 0.01$) suelen ser subpoblaciones minoritarias inferiores al 1%. Entre los linfocitos, la población mayoritaria suelen ser los linfocitos TCD4+ ($2.84\% \pm 0.34$) y CD8+ ($2.53\% \pm 0.27$) que ofreció un cociente CD4/CD8 por encima de 1 (1.4 ± 0.12 en nuestra serie).



2.2. Patologías no-EPID

En la figura 36 se muestra la composición del contenido leucocitario del LBA en pacientes con patologías no-EPID. A excepción de la TBC que mostró evidente incremento de las subpoblaciones de linfocitos TCD4, TCD8 y de neutrófilos, la EPOC, el asma y el grupo nódulos pulmonares mostraron perfiles semejantes al grupo LBA control, con ligeros incrementos de dichas poblaciones, pero con un claro predominio de los macrófagos alveolares.



2.3. Composición leucocitaria del LBA en patologías EPID

En la figura 37, se muestra la composición del contenido leucocitario del LBA en pacientes con patologías EPID, agrupados según el predominio de algún tipo de célula inmunitaria.

2.3.1 Patologías EPID con predominio de eosinófilos o células dendríticas

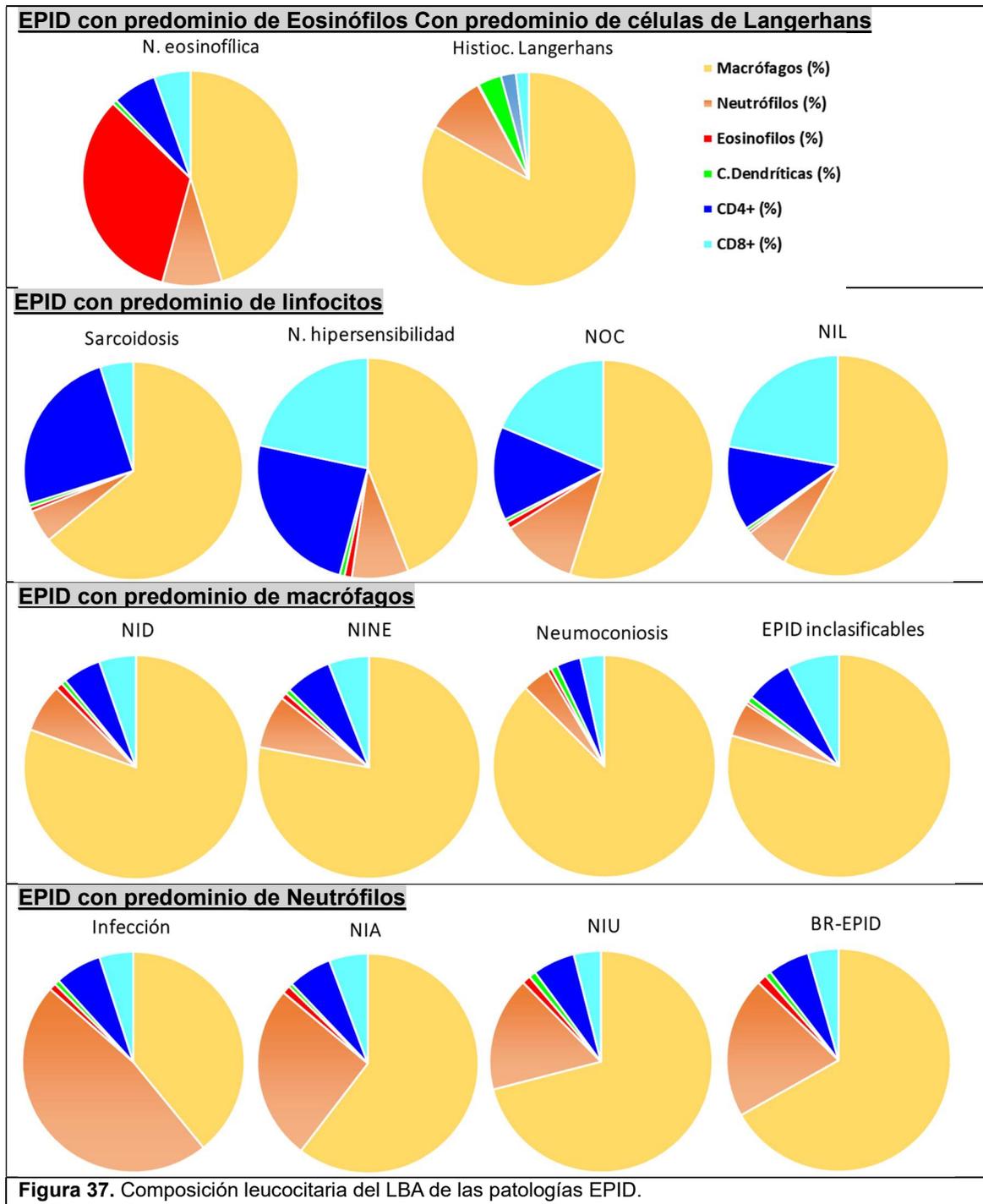
En primer lugar, se muestran las patologías que se caracterizan por el predominio de un tipo celular específico y definitorio. Las EPID-eosinófilas se presentaron con un claro predominio de los eosinófilos en el LBA, que en nuestra serie llegaron a representar el $31.5\% \pm 2.7$ del total de leucocitos en comparación a $0.38\% \pm 0.13$ de los LBA-control

($p < 0.001$) y a $1.56\% \pm 0.23$ en el resto de las patologías ($p < 0.001$). Por su parte, la HPCL presentaba cifras elevadas de células dendríticas CD1a+ que en nuestro caso llegaron al $3.5\% \pm 0.09$, cifras incrementadas al compararlas con el grupo LBA-control ($0.55\% \pm 0.05$, $p < 0.001$) y a las del resto de patologías ($0.65\% \pm 0.07$, $p < 0.001$), ver figura 36.

2.3.2 Patologías EPID con predominio de linfocitos

A continuación, destacamos un segundo grupo de patologías caracterizadas por un claro predominio de los linfocitos en el LBA:

- Sarcoidosis, cursa con cifras aumentadas de linfocitos T CD4+ ($23.8\% \pm 1.9$, $p < 0.001$) respecto a los BAL-control ($2.84\% \pm 0.34$) y resto de patologías ($8.08\% \pm 0.4$) y cifras relativamente mantenidas de linfocitos T CD8+ ($4.67\% \pm 0.36$), lo que llevó a cocientes CD4/CD8 muy aumentados en esta patología ($5.72\% \pm 0.38$, $p < 0.001$) comparados con los de los LBA-control (1.4 ± 0.12) y del resto de patologías ($1.78\% \pm 0.08$).
- NH, se caracteriza en líneas generales por un aumento de los linfocitos T CD4+ ($22.46\% \pm 1.79$) y CD8+ ($20.2\% \pm 2.45$), lo que llevó a cocientes CD4/CD8 relativamente mantenidos ($2.5\% \pm 0.38$).
- NOC, se presenta también con aumentos de linfocitos T CD4+ ($13.0\% \pm 1.5$) y CD8+ ($17.5\% \pm 2.06$), lo que llevó a cocientes CD4/CD8 relativamente mantenidos ($1.55\% \pm 0.59$). No obstante, el incremento en el porcentaje de linfocitos totales fue inferior en la NOC al observado en la NH ($34.1\% \pm 3.1$ vs. $48.6\% \pm 3.1$, $p < 0.01$).
- NIL, presentaba incrementos de linfocitos totales similares a la NOC ($34.1\% \pm 3.1$ vs. $36.9\% \pm 3.9$), aunque con una tendencia a predominar los linfocitos T CD8 ($20.9\% \pm 2.8$) sobre los CD4 ($11.6\% \pm 2.3$), lo que llevó a cocientes CD4/CD8 promedio ligeramente inferiores ($1.09\% \pm 0.22$, $p = 0.083$) al resto de patologías que cursaban con linfocitosis en el LBA ($2.06\% \pm 0.35$).



2.3.3 Patologías EPID con predominio de macrófagos

En este grupo se incluyen patologías que cursan con un claro predominio de macrófagos alveolares sobre el resto de los leucocitos en el LBA. Aunque las cifras de macrófagos fueron sensiblemente inferiores a las de los LBA sin patología ($89.7\% \pm 0.74$), en la NID

(78.5%±2.59), NINE (75.03%±1.53), neumoconiosis (85.79%±2.07) y EPID-inclasificables (75.97%±2.44) los leucocitos predominantes en el LBA continuaban siendo los macrófagos alveolares.

2.3.4 Patologías EPID con predominio de neutrófilos

Las patologías que cursaba con las cifras de neutrófilos más incrementadas fueron las infecciones (45.75%±1.8, $p < 0.001$), comparadas a los LBA-control (2.12%±0.19) y el resto de las patologías (10.3%±0. 2.3.4 Patologías EPID con predominio de neutrófilos

44). Igualmente, se encontraron cifras elevadas de neutrófilos en pacientes con NIA (24.8%±5.14), BR-EPID (19.5%±4.13) y NIU (16.27%±1.46). Excluyendo las infecciones, tanto la NIA ($p < 0.001$) como la BR-EPID ($p < 0.001$) y la NIU ($p < 0.01$) presentaron cifras significativamente más elevada de neutrófilos que el resto de las patologías EPID y no-EPID.

2.4. Composición leucocitaria del LBA en patologías neoplásicas

El grupo de patologías neoplásicas fue separado en dos grupos, un grupo con cáncer primario de pulmón (n=53) y otro grupo de neoplasias no pulmonares (n=146), que por la inmunosupresión y efectos de los tratamientos asociaron patología pulmonar (119 de 146 casos, 76.0%) o hicieron metástasis a pulmón (35 de 146 casos, 24%). En general los pacientes con cáncer mostraron un perfil de predominio de macrófagos, aunque los pacientes con cáncer extrapulmonar mostraron mayor grado de infiltración que afectó a que tenían mayores cifras de todas las células inmunitarias, principalmente linfocitos y neutrófilos, ver figura 38.



3. Distribución de poblaciones leucocitarias en el LBA según patologías

3.1 Leucocitos totales recuperados en el LBA por patologías

Para estimar el número de leucocitos totales recuperados, se multiplicó el volumen del LBA remitido a citometría por el recuento leucocitario por microlitro estimado mediante conteo absoluto con bolitas TrueCount. Hay que tener en cuenta que las muestras obtenidas de LBA se suelen dividir en 3 alícuotas, que se distribuyen con destino a los laboratorios que realizan su estudio: microbiología, anatomía patológica y citometría de flujo, por lo que no podemos estimar la cifra total de leucocitos recuperados pues se desconoce el volumen remitido en las otras 2 alícuotas. No obstante, si consideramos que fueran 3 muestras alícuotas similares, las cifras de recuperación descritas en esta tesis habría que multiplicarlas x3.

La recuperación media del total de los pacientes incluidos en el estudio fue de 3.24 ± 0.07 millones. Por patologías, los pacientes con muestras LBA que contenían mayor concentración celular fueron los que padecían NH (4.59 ± 0.63 millones, $p < 0.001$), seguidas por las de pacientes con histiocitosis de Langerhans (4.25 ± 0.62 millones, $p < 0.05$), NOC (3.82 ± 0.37 millones, $p < 0.05$) y NIL (4.0 ± 0.39 millones, $p < 0.05$). Por el contrario, los que presentaron menor recuperación de leucocitos fueron las muestras de los pacientes con neumonía eosinofílica (1.6 ± 0.22 millones, $p < 0.05$). ver figura 39.

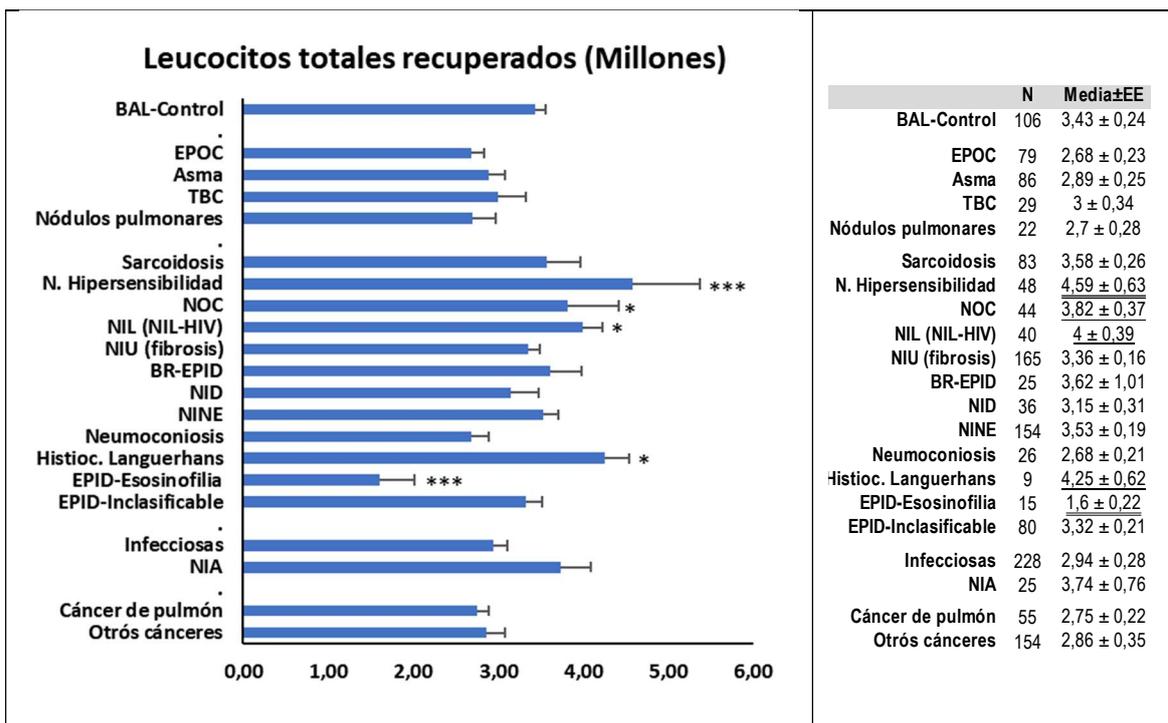


Figura 39. Recuperación de leucocitos del total de la muestra del LBA remitida a citometría. El recuento se estimó multiplicando las cifras de leucocitos/μl estimados mediante recuento absoluto con TrueCount, por el volumen total del LBA. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas estimadas en el análisis ANOVA: * p<0.05 en la HL; histiocitosis de langerhans; NOC; neumonitis obliterante críptogénica, NIL; neumonía intersticial linfocitaria, y ***p<0.001, en la N. Hipersensibilidad que presentó el mayor porcentaje de recuperación leucocitaria, al contrario de las EPID-eosinofílicas con el menor porcentaje.

3.2. Linfocitos totales en el LBA por patologías

Comparado las cifras de los LBA de pacientes sin patología pulmonar ($6.45\% \pm 0.58$), los pacientes con patología pulmonar presentaron cifras elevadas de linfocitos ($19.1\% \pm 0.49$). Sin embargo, la patología no-EPID TBC ($25.6\% \pm 4.04$, $p < 0.001$) y las patologías EPID sarcoidosis ($31.28\% \pm 2.27$, $p < 0.001$), NH ($48.6\% \pm 3.11$, $p < 0.001$), NOC ($34.1\% \pm 3.14$, $p < 0.001$) y NIL ($36.95\% \pm 3.99$, $p < 0.001$), presentaban cifras elevadas de linfocitos. El resto de las patologías presentaron cifras variables de linfocitos que no mostraron diferencias significativas como se observa en la figura 40.

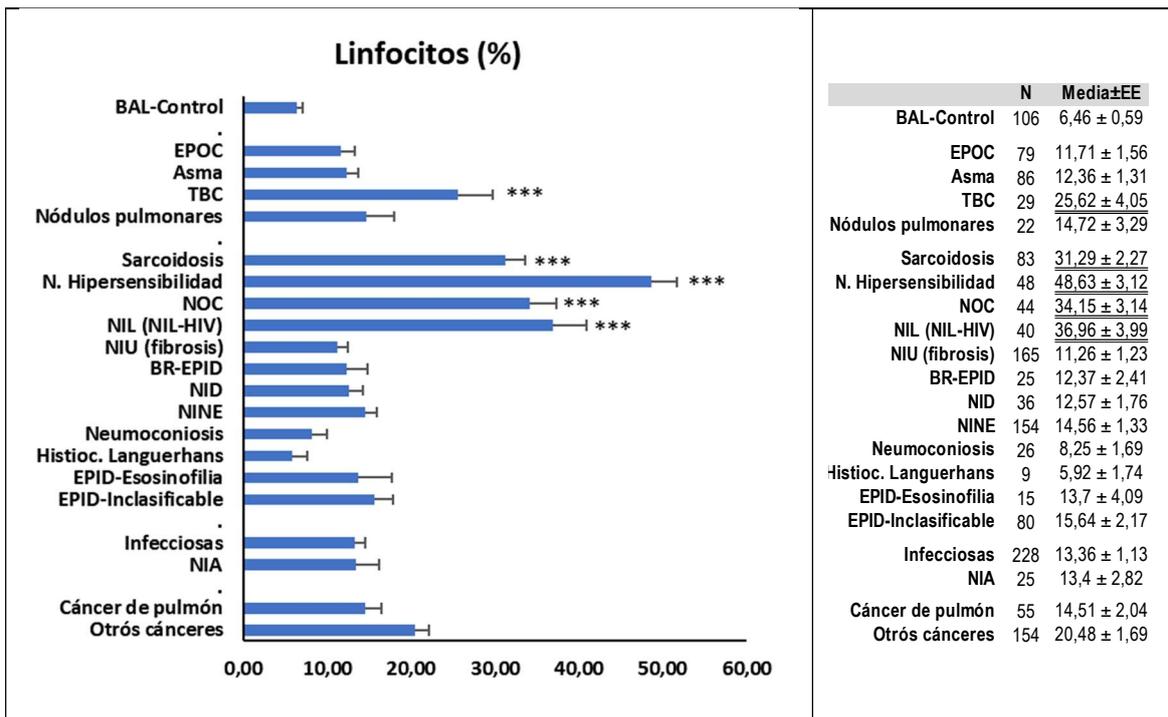
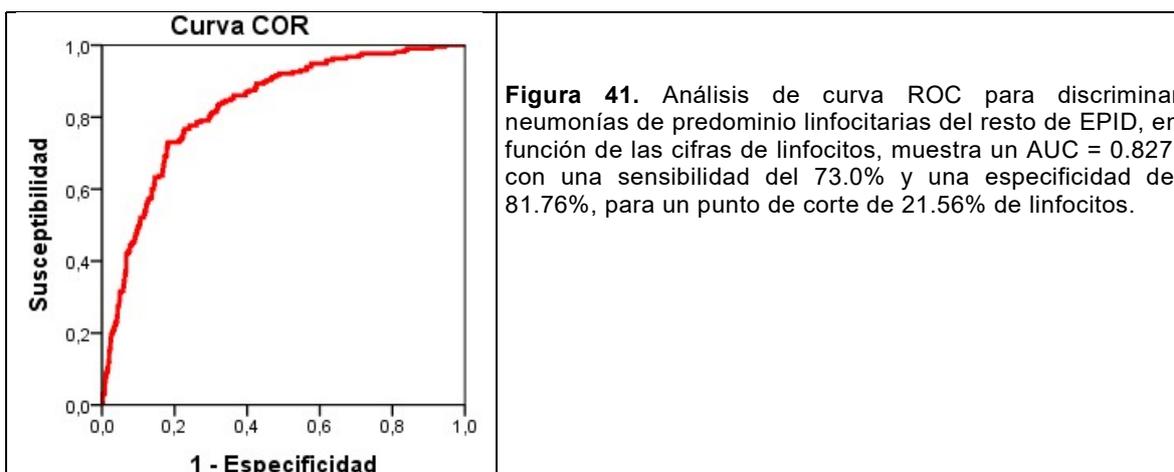


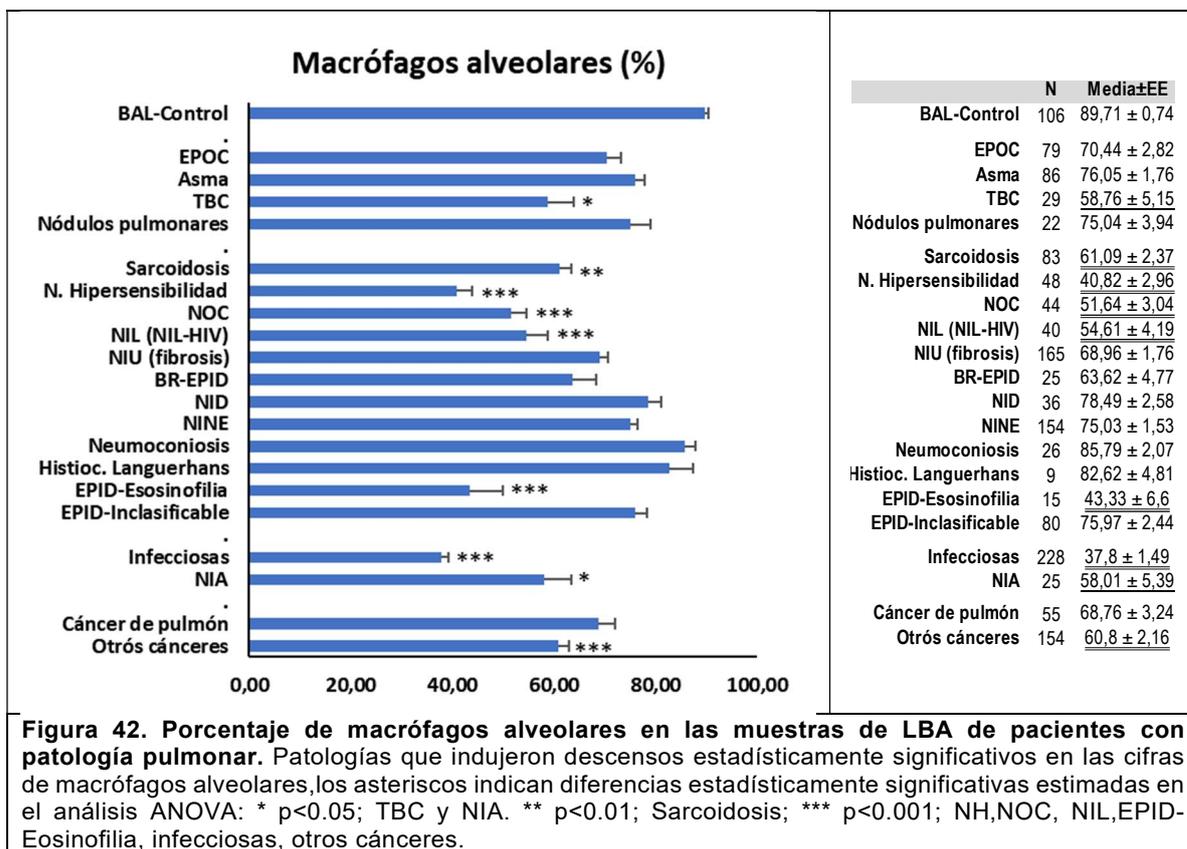
Figura 40. Porcentaje de linfocitos totales en las muestras de LBA de pacientes con patología pulmonar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas estimadas en el análisis ANOVA: *** $p < 0.001$ dentro del grupo EPID; N. hipersensibilidad, NIL, NOC, y sarcoidosis; por otra parte, con diferencias estadísticamente significativas fuera del grupo EPID, destacó la TBC

Como se muestra en la figura 41 la curva ROC permitió identificar un punto de corte de linfocitos totales en el 21.56% del total de células del LBA que permitía diferenciar neumonías de predominio linfocitarias (sarcoidosis, NH, NOC y NIL) del resto de EPID con una sensibilidad del 73.0% y una especificidad del 81.76%. Para alcanzar una especificidad del 95% que nos permita clasificar con seguridad estas patologías, las cifras de linfocitos deberían ser superiores al 48.2% (tabla 34).



3.3. Macrófagos en el LBA por patologías

Tal y como describimos en los LBA de pacientes sin patología pulmonar, la célula predominante en el pulmón sano son los macrófagos alveolares (89.7%±0.74), por lo que cualquier infiltración por otros tipos de leucocitos se manifestará con disminuciones más o menos marcadas en las cifras de dichas células. En la figura 42 se resumen las patologías que indujeron descensos estadísticamente significativos en las cifras de macrófagos alveolares, la patología no-EPID TBC (58.7%±5.1), las patologías EPID sarcoidosis (61.1%±2.3), NH (40.8%±2.96), NOC (51.6%±3.04), NIL (54.6%±4.19), EPID-eosinofílica (43.3%±6.6), Y a su vez las patologías infecciosas (37.8%±1.49), NIA (58.0%±5.3) y los cánceres extrapulmonares (60.8%± 2.16).



3.4. Neutrófilos en el LBA por patologías

El neutrófilo es un tipo de leucocito poco prominente en el pulmón y por ende en el LBA de pacientes sin patología pulmonar ($2.12\% \pm 0.19$). Sin embargo, en patologías como la NIU ($16.27\% \pm 1.47$, $p < 0.001$), la BR-EPID ($19.53\% \pm 4.13$, $p < 0.001$) y la NIA ($24.82\% \pm 5.14$, $p < 0.001$), y especialmente en los procesos infecciosos que afectan el pulmón ($45.75\% \pm 1.82$, $p < 0.001$) se observó predominio significativo de esta población de celular, respecto al resto de patologías pulmonares. Ver figura 43.

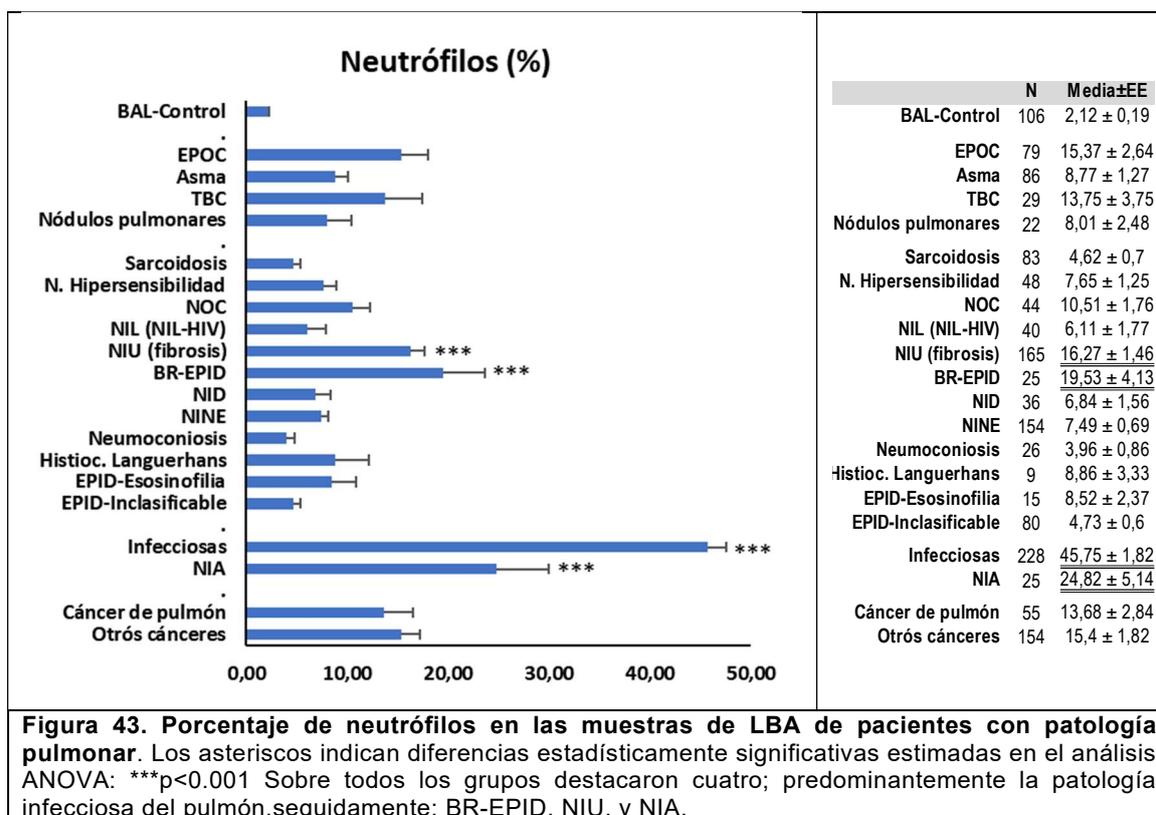
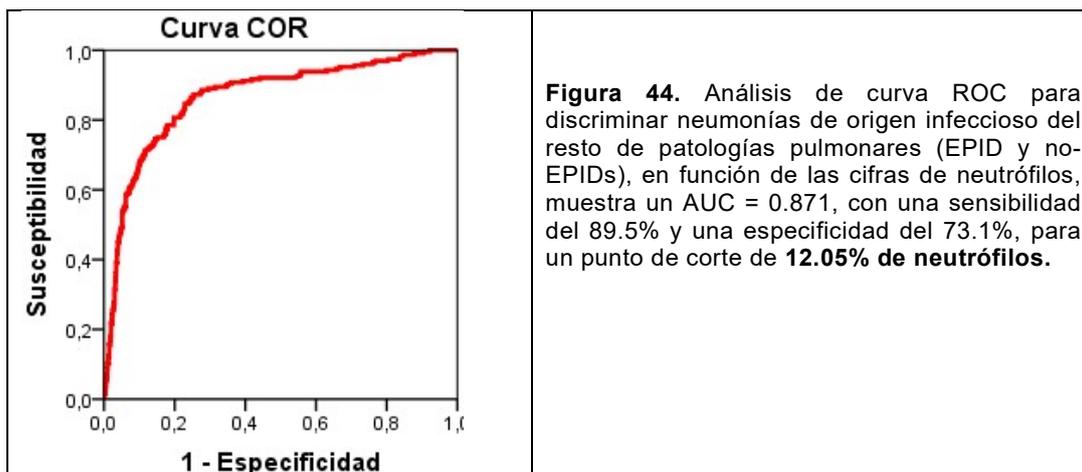


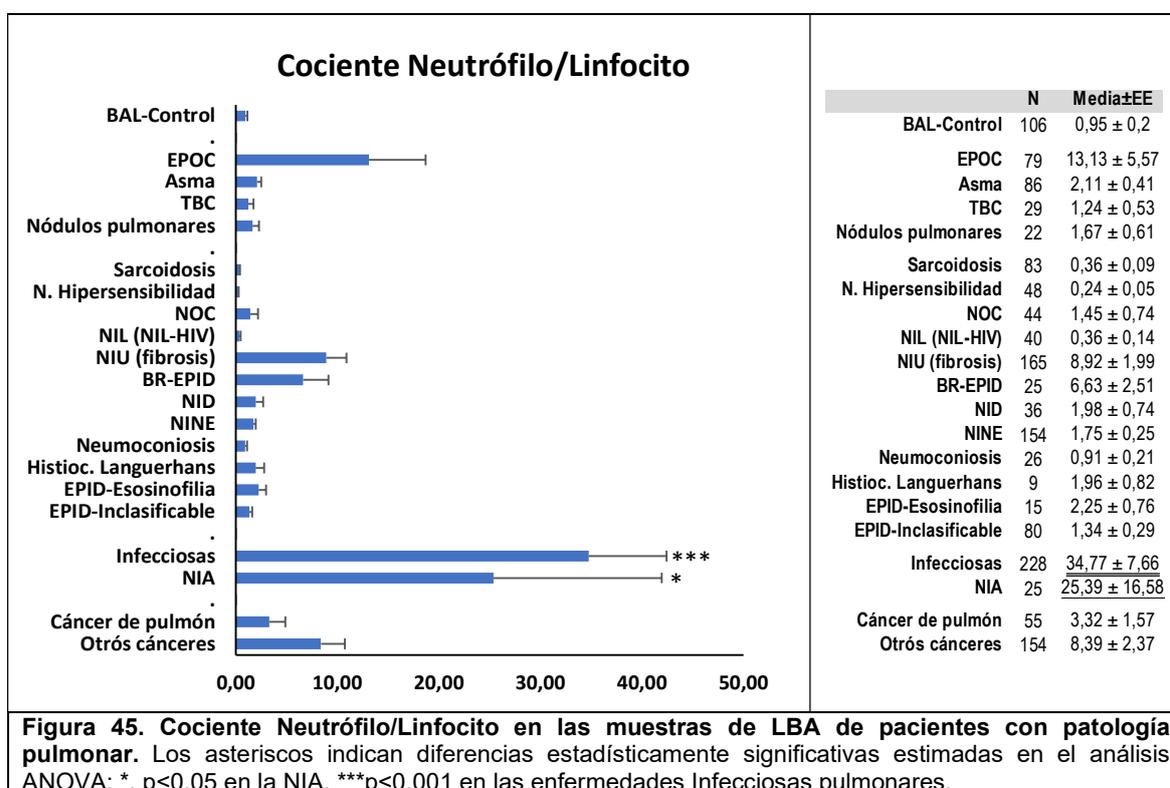
Figura 43. Porcentaje de neutrófilos en las muestras de LBA de pacientes con patología pulmonar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas estimadas en el análisis ANOVA: *** $p < 0.001$ Sobre todos los grupos destacaron cuatro; predominantemente la patología infecciosa del pulmón, seguidamente; BR-EPID, NIU, y NIA.

Como se muestra en la figura 44, la curva ROC identificó un punto de corte de neutrófilos en 12.05% del total de células del LBA que permitía diferenciar neumonías de origen infeccioso del resto de patologías pulmonares (EPID y no-EPID) con una sensibilidad del 89.5% y una especificidad del 73.1%. Para alcanzar una especificidad del 95% que nos permita clasificar con seguridad estas patologías, las cifras de neutrófilos deberían ser superiores al 45.0% (ver tabla 34).



3.5. Cociente Neutrófilo/Linfocito

El parámetro que mejor permitía discriminar las patologías agudas como la NIA y sobre todo las infecciosas, del resto de patologías pulmonares era el cociente Neutrófilo/Linfocito, en la figura 45. En condiciones normales dicho cociente es inferior a 1 (0.95 ± 0.2) ya que los linfocitos suelen predominar sobre los neutrófilos, mientras que en la NIA las cifras alcanzaron el 25.39 ± 16.58 ($p < 0.05$) y en las infecciones el 34.77 ± 7.66 ($p < 0.001$).



Como se muestra en la figura 46 la curva ROC identificó un punto de corte de cociente Neutrófilos/Linfocito en **1.635** que permitía diferenciar neumonías de origen infeccioso del resto de patologías pulmonares (EPID y no-EPID) con una sensibilidad del 77.6% y una especificidad del 74.6%. Para alcanzar una especificidad del 95% que nos permita clasificar con seguridad estas patologías, las cifras del cociente-N/L deberían ser superiores al 15.2% (ver tabla 34).

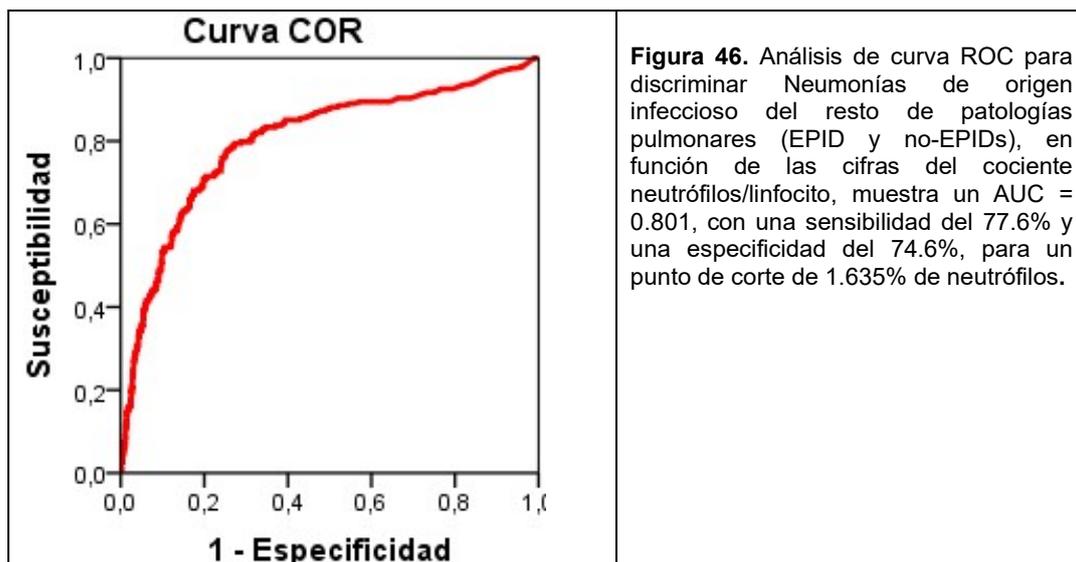
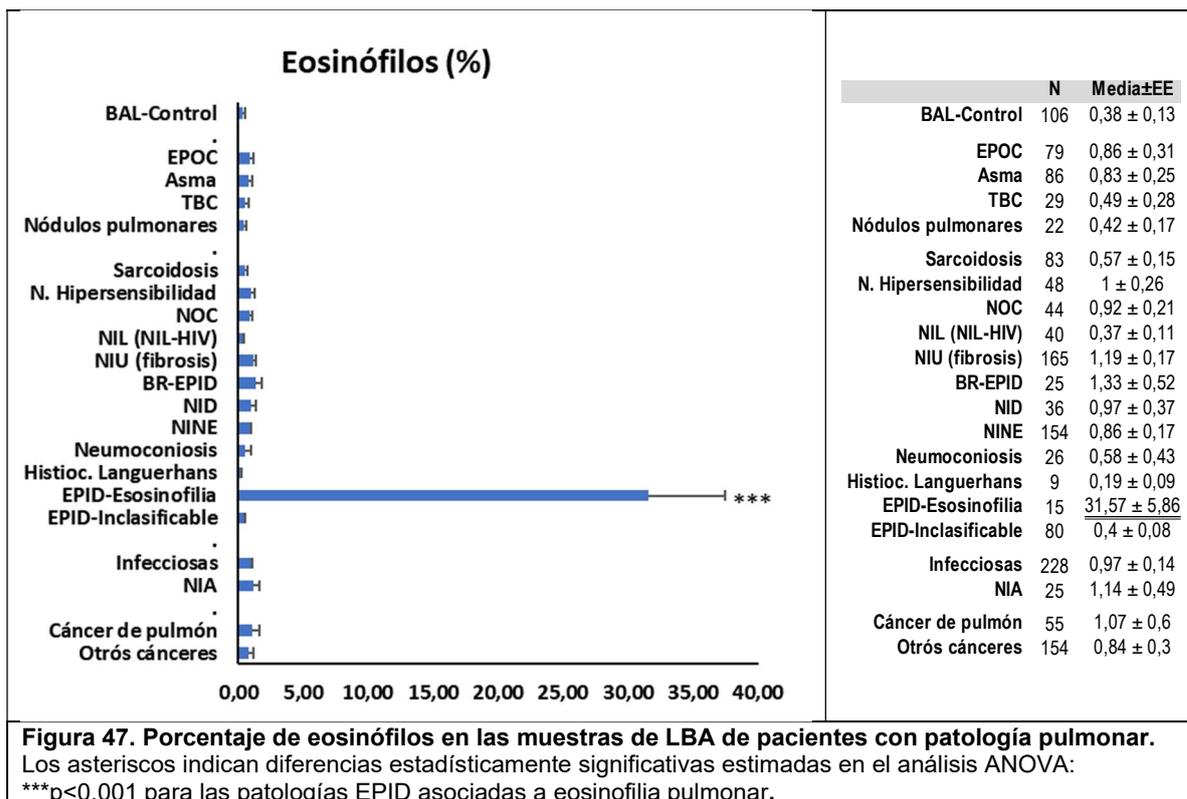


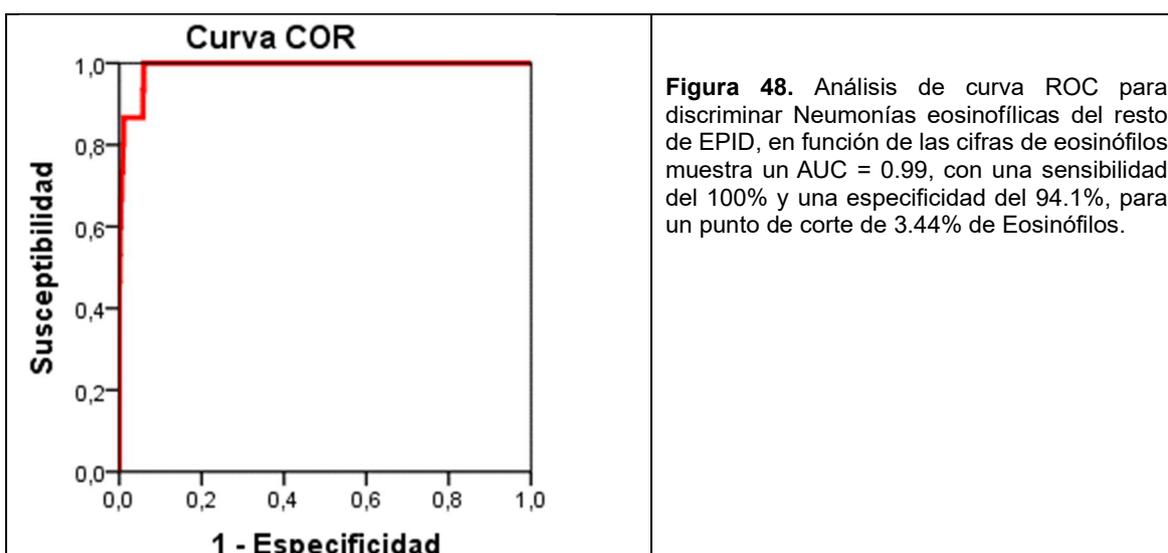
Figura 46. Análisis de curva ROC para discriminar Neumonías de origen infeccioso del resto de patologías pulmonares (EPID y no-EPIDs), en función de las cifras del cociente neutrófilos/linfocito, muestra un AUC = 0.801, con una sensibilidad del 77.6% y una especificidad del 74.6%, para un punto de corte de 1.635% de neutrófilos.

3.6. Eosinófilos en el LBA por patologías

El eosinófilo es un tipo de granulocito poco frecuente en el LBA, con cifras en los LBA de pacientes sin patología pulmonar de $0.38\% \pm 0.13$, se muestra en la figura 47 los valores que se mantiene estables en la mayoría de las patologías pulmonares, excepto en las patologías EPID asociadas a eosinofilia pulmonar, en las que las cifras de eosinófilos alcanzaron valores de $31.57\% \pm 5.86$ ($p < 0.001$)



Como se muestra en la figura 48 la curva ROC identificó un punto de corte de eosinófilos en el 3.43% del total de células del LBA que permitía diferenciar neumonías eosinofílicas del resto de EPID con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 94.1%. Para alcanzar una especificidad del 95% que nos permita clasificar con seguridad esta patología, las cifras de eosinófilos deberían ser superiores al 4.5% (ver tabla 34).



3.7. Células dendríticas en el LBA por patologías

Las células dendríticas de Langerhans CD1a+ estuvieron significativamente elevadas en los pacientes con HPCL ($3.5\% \pm 1.31$, $p < 0.001$) comparado con el resto de las patologías ($0.8\% \pm 0.09$) y los LBA de pacientes sin patología pulmonar ($0.55\% \pm 0.05$). En pacientes con NIU también se observaron valores ligeramente superiores a lo normal ($1.0\% \pm 0.1$, $p < 0.05$). Se muestra en la figura 49.

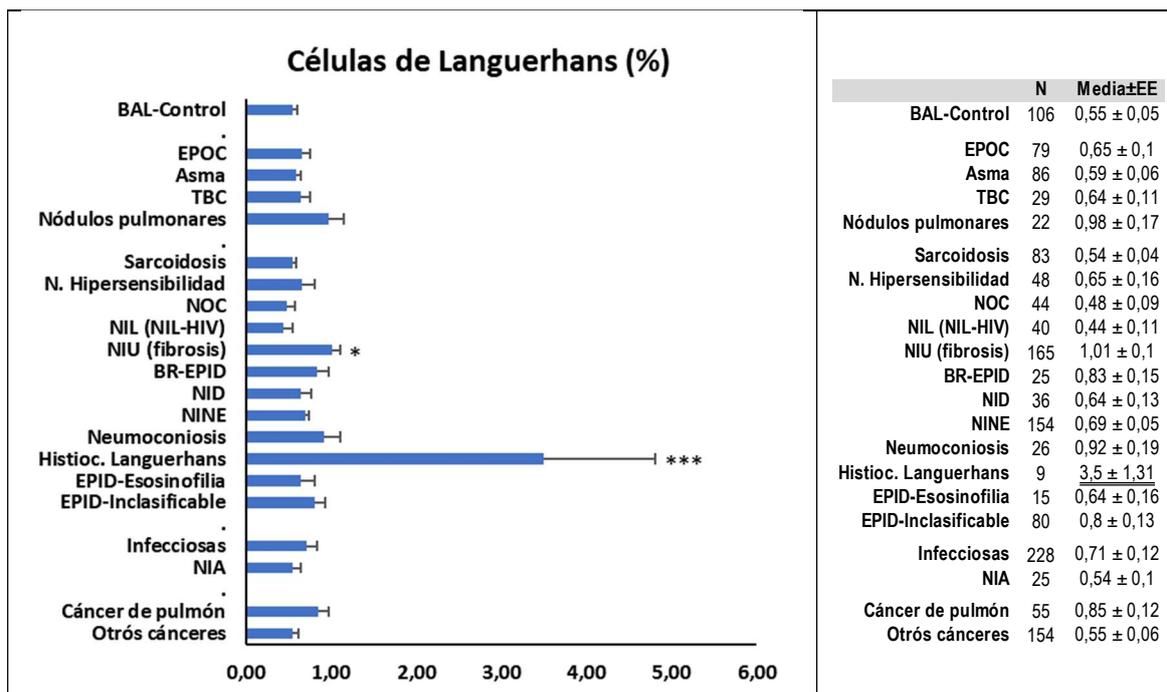


Figura 49. Porcentaje de células de Langerhans en las muestras de LBA de pacientes con patología pulmonar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas estimadas en el análisis ANOVA: * $p < 0.05$ NIU, muestra leve aumento de la población de células de Langerhans, *** $p < 0.001$; notable aumento de la población CD1a en el grupo Histiocitosis de Langerhans.

Debido al escaso número de pacientes que presentaron esta patología ($n=9$) el análisis de curva ROC no ofreció resultados. Por ello, se estimó manualmente la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de las cifras de células dendríticas de Langerhans para identificar pacientes con HPCL. Seis de los 9 casos clasificados como EPID por histiocitosis de Langerhans presentaron cifras superiores al 1.14% (sensibilidad del 67%), aunque también las presentaron 144 de los 726 casos sin esta patología (especificidad del 80%), y por tanto el valor predictivo positivo y negativo fueron de 0.04 y 0.995 respectivamente, en la figura 50.

EPID-Hist. Langerhans				EPID-Hist. Langerhans					
	Si	No			Si	No			
%CD1a > 1,14%	6	144	0,04	VPP	%CD1a > 4,5%	3	3	0,50	VPI
%CD1a < 1,14%	3	582	0,995	VPN	%CD1a < 4,5%	6	723	0,992	VPI
	0,67	0,80				0,33	0,996		
	Sensibilidad	Especificidad				Sensibilidad	Especificidad		

Figura 50. VPP y VPN de las cifras de células dendríticas de Langerhans para identificar pacientes con histiocitosis pulmonar de células de Langerhans.

Al incrementar la cifra de células CD1a+ hasta el 4.5% del total de células, la sensibilidad baja al 33%, pero la especificidad se incrementa hasta el 99.6%, y se consiguen VPP y VPN del 0.5 y 0.992, respectivamente.

3.8. Linfocitos B en el LBA por patologías

La presencia de linfocitos B CD19+ en el LBA es residual ($0.04\% \pm 0.01$), y en líneas generales se aproxima al límite de cuantificación de estos análisis, ya que el número de células adquirido raramente alcanza el medio millón. Sin embargo, se detectaron valores significativamente más elevados (aunque con gran variabilidad) de estos linfocitos en pacientes con nódulos pulmonares ($0.65\% \pm 0.5$, $p < 0.01$), con NH ($0.61\% \pm 0.34$, $p < 0.001$) y cánceres extrapulmonares ($0.43\% \pm 0.22$, $p < 0.001$) ver figura 51.

Por lo tanto, la cuantificación de linfocitos B no parece aportar información muy útil para la clasificación de las patologías pulmonares. Sin embargo, es un marcador que se mantiene en los paneles para descartar la aparición de síndromes linfoproliferativos crónicos B, relativamente frecuentes en pacientes de cierta edad.

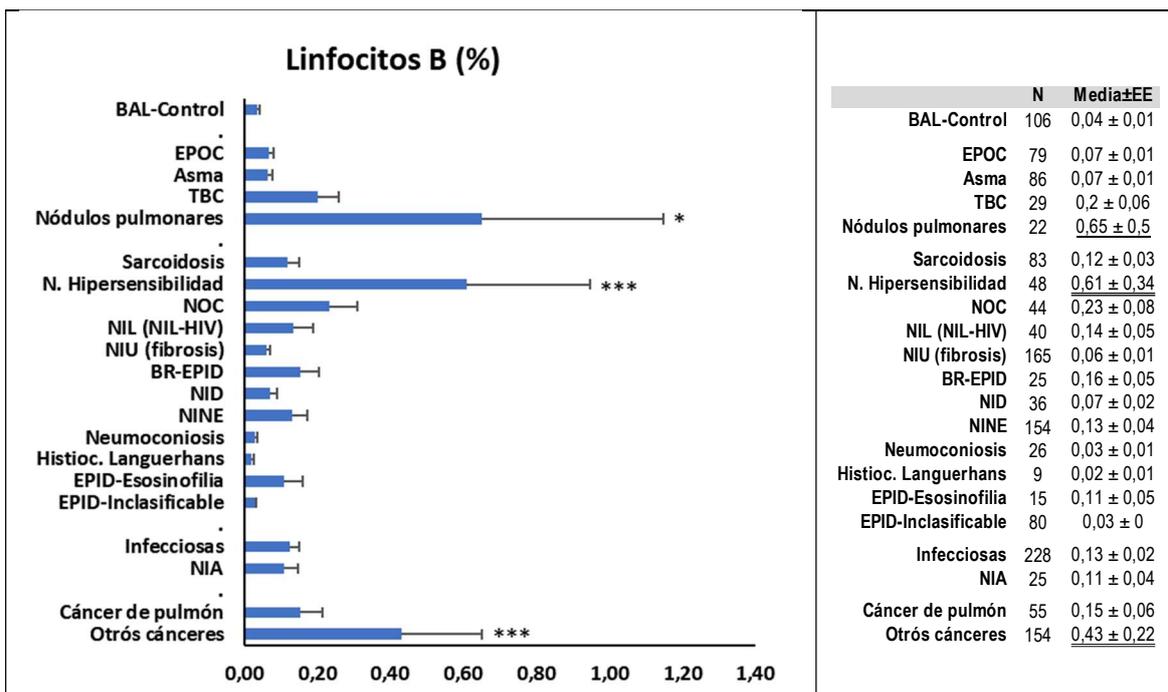


Figura 51. Porcentaje de linfocitos B CD19+ en las muestras de LBA de pacientes con patología pulmonar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas estimadas en el análisis ANOVA: *, $p < 0.05$ en el grupo Nódulos pulmonares, y *** $p < 0.001$, en los grupos N. hipersensibilidad y en menor proporción en Otros cánceres.

3.9. Linfocitos T CD4+, T CD8 y cociente CD4/CD8 por patologías

En la parte superior de la figura 52 se ilustra cómo los linfocitos T son una población predominante en el pulmón y el LBA sano, tanto TCD4+ (2.84%±0.34) como CD8+ (2.53%±0.27). En nuestra serie EPID, se observó que las cifras de linfocitos T CD4+ se incrementan en la TBC (14.47%±2.87, $p < 0.001$), la NOC (13.0%±1.54, $p < 0.001$) y la NIL (11.61%±2.34, $p < 0.001$), pero especialmente en la sarcoidosis (23.82%±1.9, $p < 0.001$) y la NH (22.46%±1.79, $p < 0.001$). En la parte inferior de la figura 52 se observa que los linfocitos TCD8+ aumentaban en la TBC (8.33%±1.31, $p < 0.01$), la NH (20.06%±2.48, $p < 0.001$), la NOC (17.53%±2.07, $p < 0.001$) y la NIL (20.88%±2.81, $p < 0.001$), pero no en la sarcoidosis (4.6%±0.37).

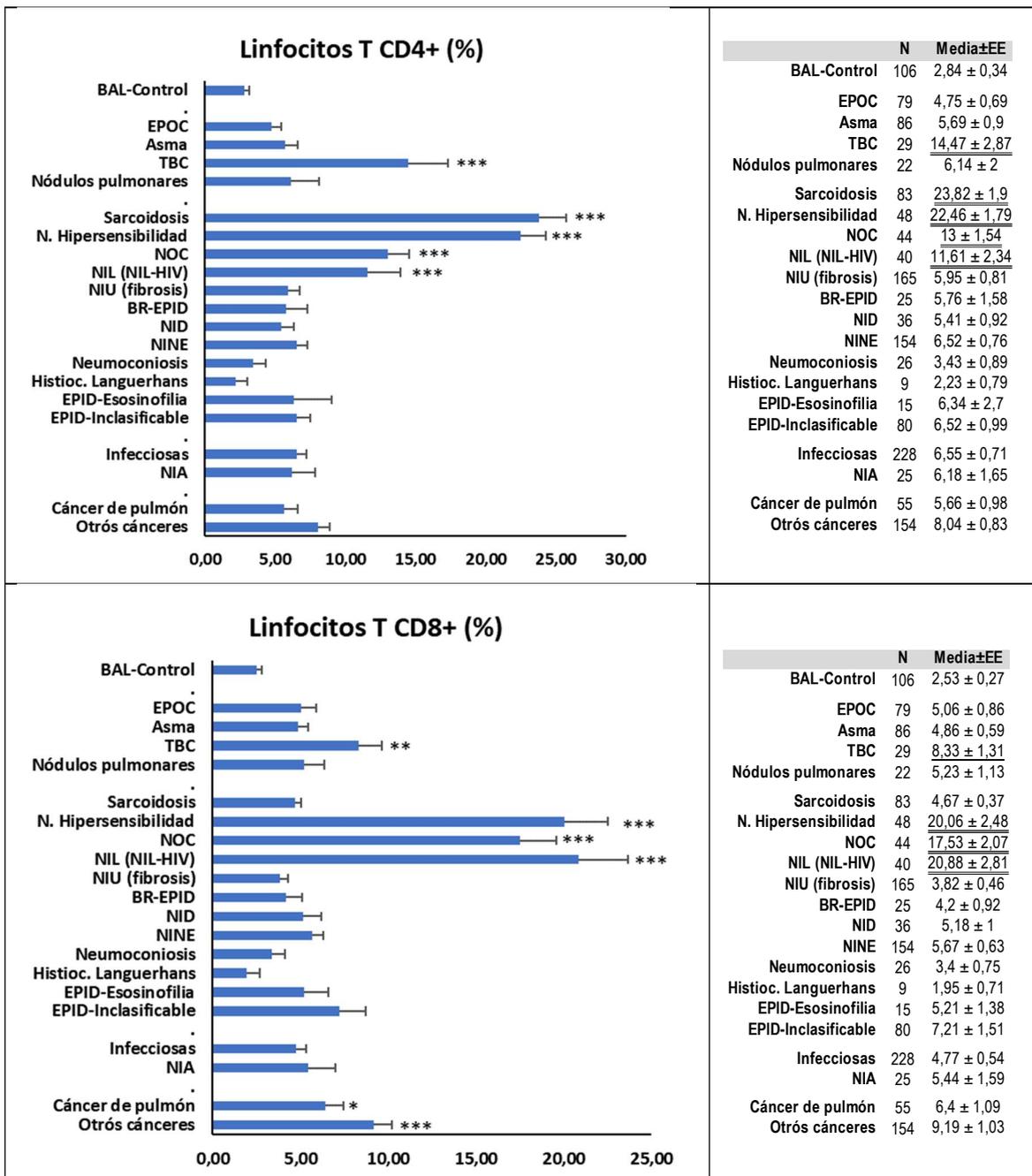
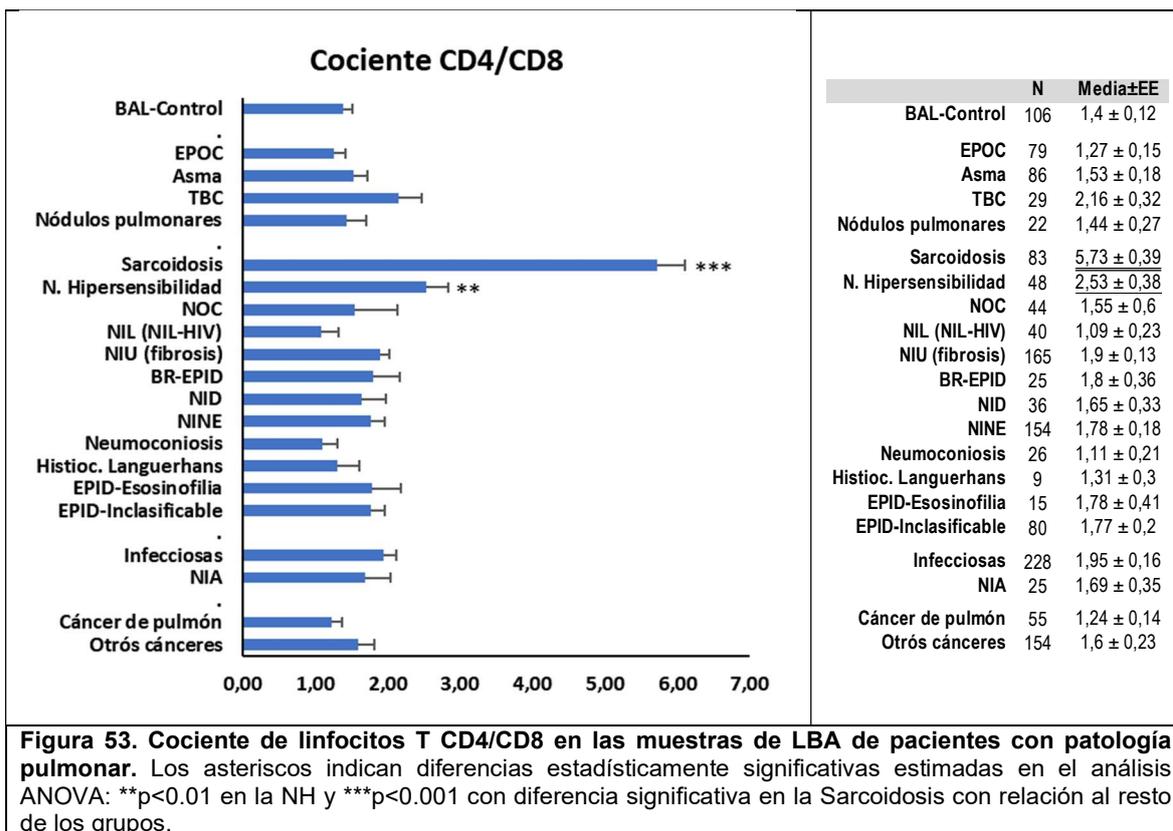
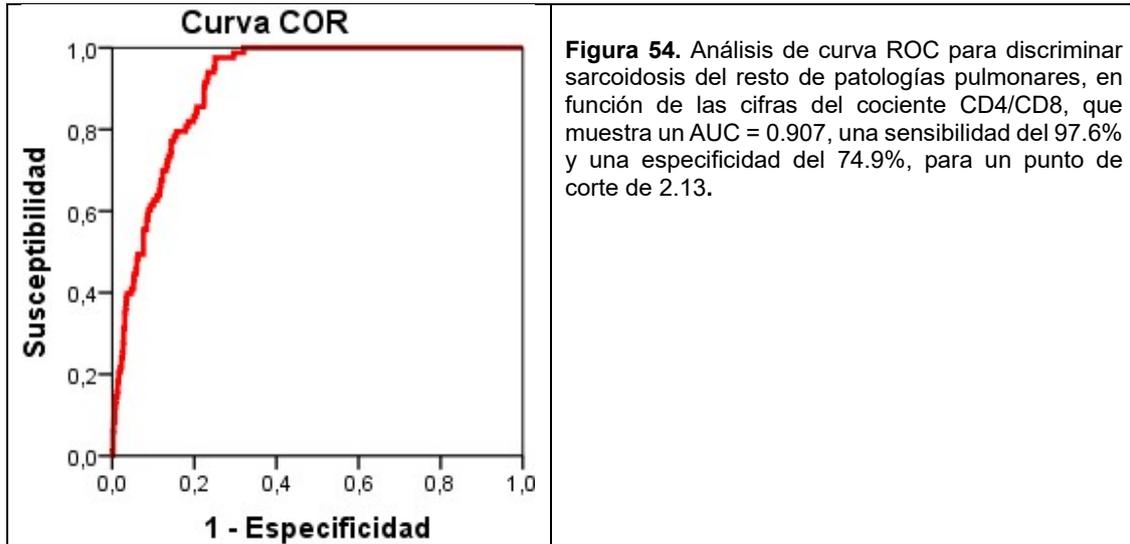


Figura 52. A. Arriba. Porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ en las muestras de LBA de pacientes con patología pulmonar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas estimadas en el análisis ANOVA: ***p<0.001 se incrementan en Sarcoidosis, NH, NOC, NIL, y la TBC. Abajo. Porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ en las muestras de LBA de pacientes con patología pulmonar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas estimadas en el análisis ANOVA: *, p<0.05 en el Cáncer de pulmón, **p<0.01 en la TBC y ***p<0.001 en la NH, NOC, NIL, otros cánceres.

Estos resultados arrojaron cocientes CD4/CD8 que permitieron diferenciar la sarcoidosis del resto de patologías (5.73±0.39 vs. 1.72±0.07, p<0.001) ver figura 53.



Entre las patologías EPID que cursan con cifras elevadas de linfocitos en el LBA (sarcoidosis, NH, NOC y NIL), cifras elevadas de CD4 y mantenidas de CD8 y, por tanto, con elevado cociente CD4/CD8 permiten diferenciar la sarcoidosis de cualquier otra patología pulmonar, EPID y no-EPID. Como se muestra en la figura 54, la curva ROC identificó un punto de corte del cociente CD4/CD8 en **2.013** que permitía diferenciar sarcoidosis del resto de patologías pulmonares con una sensibilidad del 97.6% y una especificidad del 74.9%. Para alcanzar una especificidad del 95% que nos permita clasificar con seguridad esta patología, las cifras de cociente-CD4/CD8 deberían ser superiores al 5.6% (ver tabla 34).



Las otras 3 patologías que cursan con aumento de linfocitos son más difíciles de diferenciar, ya que es necesario combinar los 3 parámetros (CD4, CD8 y cociente CD4/CD8) para poder identificarlas. Así, la NH muestra importantes aumentos tanto de CD4 ($22.46\% \pm 1.79$) como de CD8 ($20.06\% \pm 2.48$), por lo que el valor medio del cociente CD4/CD8 se mantiene ligeramente por encima del resto de patologías EPID, pero superior a 2.0, es decir en 2.53. Por el contrario, la NOC y la NIL se caracterizan por cifras medias elevadas de CD8 ($17.53\% \pm 2.07$ y $20.88\% \pm 2.81$, respectivamente) y más contenidas de CD4 ($13.0\% \pm 1.54$ y $11.61\% \pm 2.34$, respectivamente), por lo que el valor medio del cociente CD4/CD8 se mantiene en cifras cercanas a 1.0, concretamente 1.55 ± 0.6 y 1.09 ± 0.23 , respectivamente, se muestra en la figura 55.

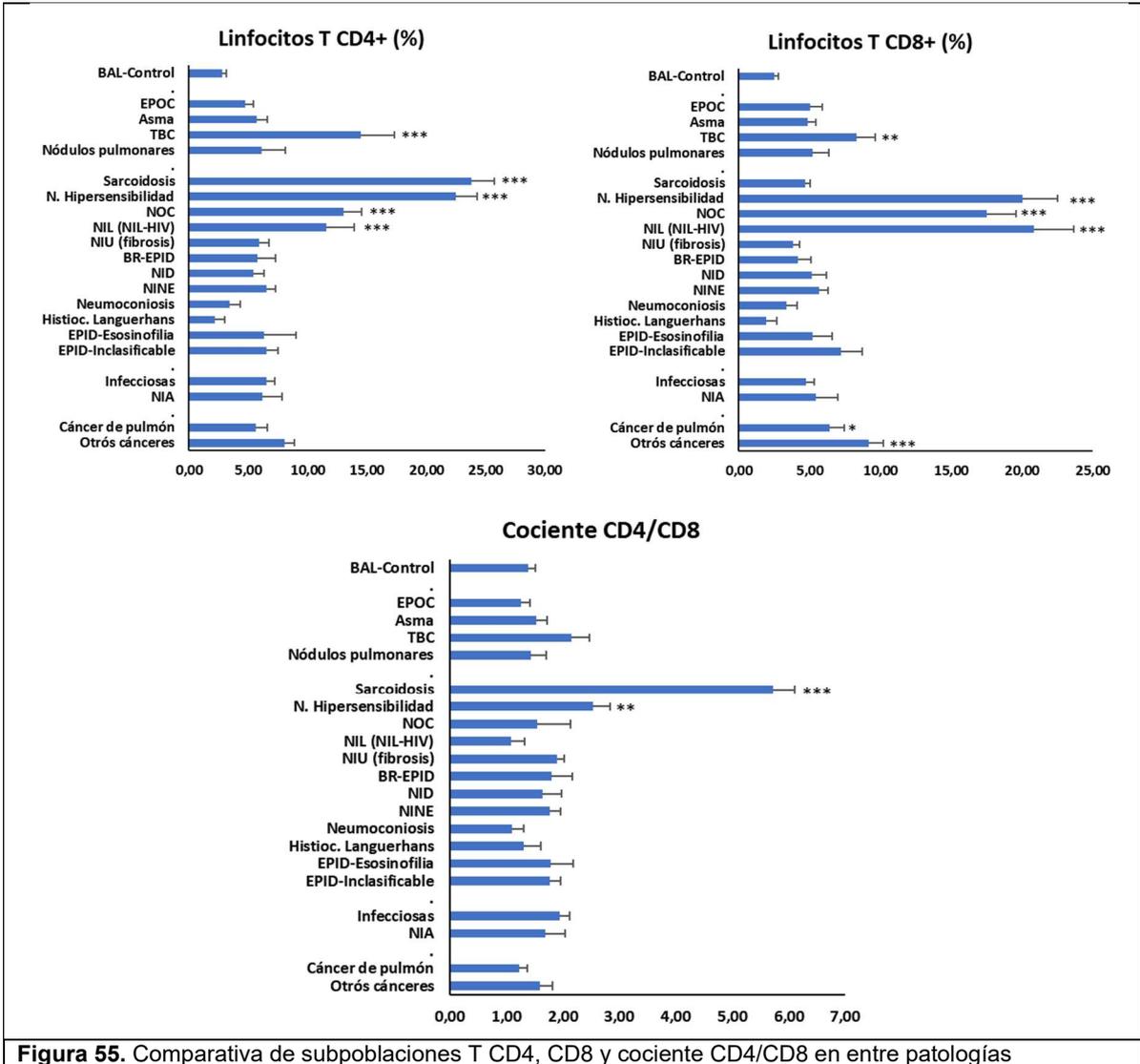
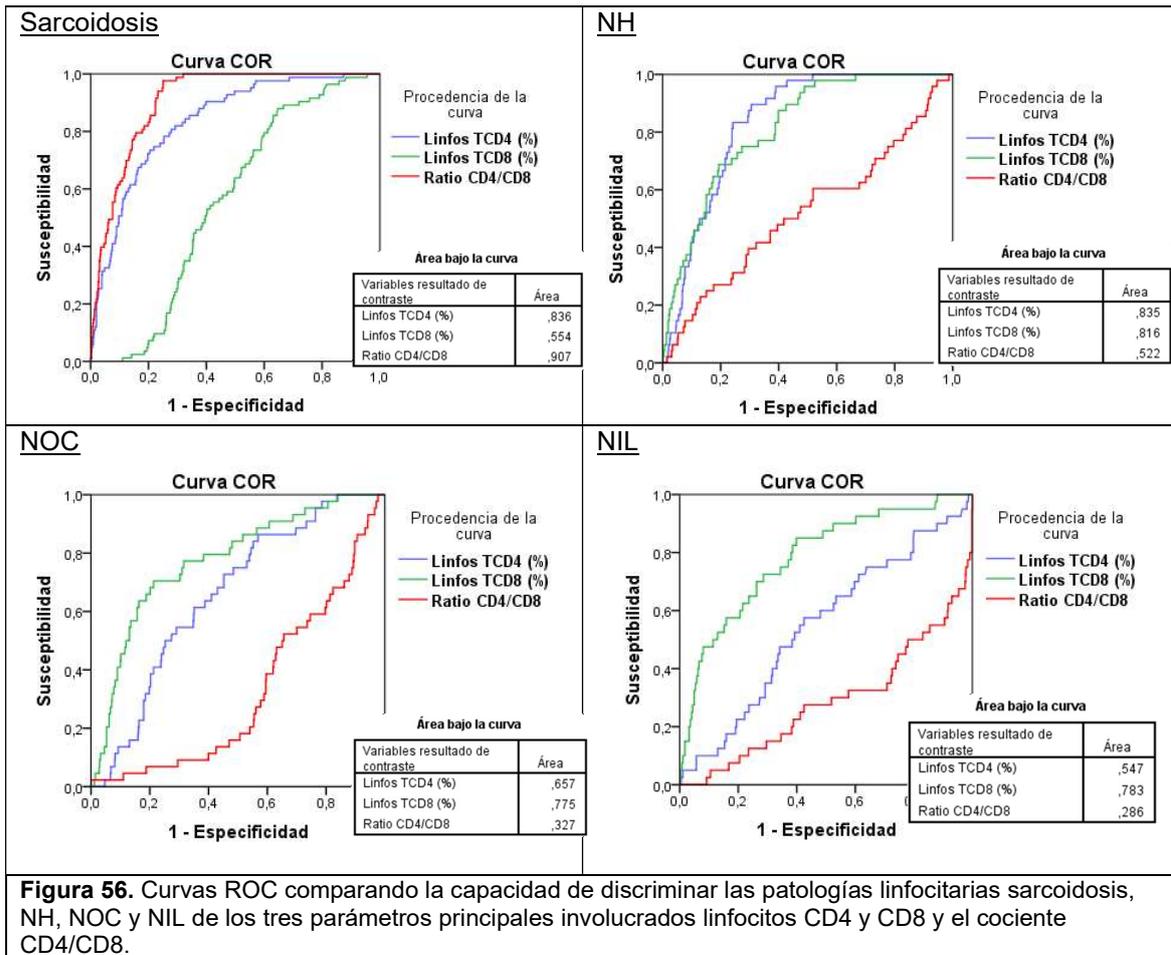


Figura 55. Comparativa de subpoblaciones T CD4, CD8 y cociente CD4/CD8 en entre patologías

Al comparar las curvas ROC de los tres parámetros principales para diferenciar las EPID que cursan con aumento de linfocitos, se puede apreciar como la sarcoidosis cursa con aumento de linfocitos T CD4 y del cociente CD4/CD8, la NH cursa con aumento de linfocitos TCD4 y TCD8 y cociente CD4/CD8 mantenido. Mientras, la NOC y principalmente la NIL cursan con incrementos de CD8 y menos de CD4, por lo que, para discriminar estas patologías, el cociente CD4/CD8 dará valores cercanos o inferiores a 1.0, ver en la figura 56.



Así, se pudieron establecer puntos de corte del cociente CD4/CD8 en 1.22 y 0.78 para la NOC y la NIL, respectivamente. Estos puntos de corte presentaron áreas bajo la curva de 0.32 y 0.28, con sensibilidades del 54.0% y 70.8%, y especificidades del 82.0% y 67.5%, respectivamente. Para alcanzar una especificidad del 95% que nos permita clasificar con seguridad los pacientes con NIL, las cifras de cociente-CD4/CD8 deberían ser inferiores al 0.27% (tabla 34).

4. Análisis de *clusters* de las patologías EPID en base a parámetros de citometría

En primer lugar, se realizó un análisis de *clusters* agrupando todas las variables de citometría analizadas en el LBA , figura 57), para pacientes con patologías EPID: porcentaje de linfocitos totales, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, subpoblaciones linfocitarias CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ y los cocientes CD4/CD8 y Neutrófilo/Linfocito. Las patologías se codificaron para facilitar su identificación durante todo el estudio como se ilustra en la (tabla 27).

Tabla 27. Codificación de las patologías EPID

Patología	Código
BAL-Control	0
Infecciones	1
TBC	2
NIA	3
EPOC	4
Asma	5
Nódulo pulmonar	6
Cáncer pulmón	7
Cáncer otros	8
Sarcoidosis	9
Hipersensibilidad	10
NOC	11
NIL	12
NIU	13
BR-EPID	14
NID	15
NINE	16
Neumoconiosis	17
Histiocitosis Langerhans	18
EPID-Eosinofilia	19
EPID-Inclasificables	20
MGUS	25

En la figura 58 se muestra, cómo para determinar el número óptimo de grupos sin que ellos se solapen, se utilizaron los métodos silueta y gap. El número de grupos lo determinó, la homogeneidad entre individuos o grupos.

El análisis de silueta estimó que el número óptimo de grupos sería 3, mientras que análisis de gap estimó que el número óptimo sería 4.

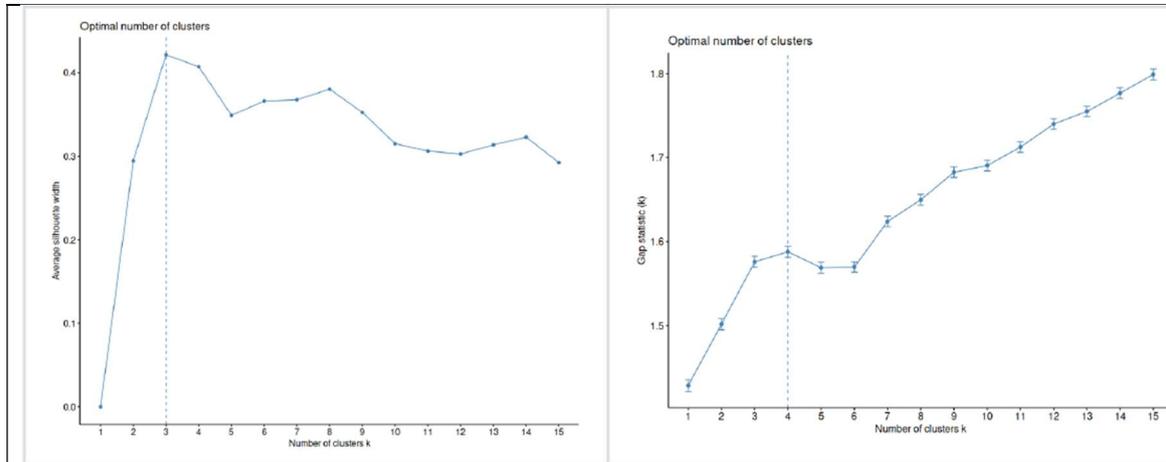


Figura 57. Número óptimo de grupos de patologías EPID en función de los resultados de citometría de flujo, en función de los métodos de *clustering* de silueta (izquierda) o de gap (derecha). Ese número fue de 3 o de 4, respectivamente.

En la figura 58, los grupos estimados por el método de silueta.

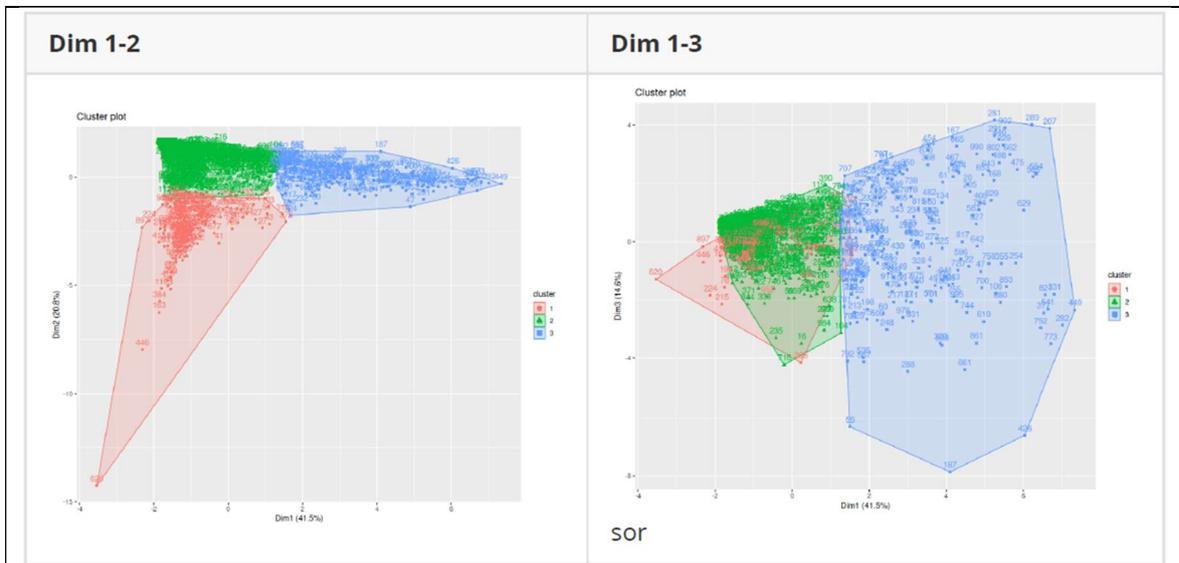


Figura 58. Análisis de *clusters* mediante método de silueta de pacientes EPID utilizando todos los parámetros de citometría.
 Dim 1-2 (dimensión lleva asociado el % de varianza de acumulación), 1-2 (análisis de componentes principales, componente 1 y 2)
 Dim 1-3 (dimensión lleva asociado el % de varianza de acumulación), 1-3 (análisis de componentes principales, componente 1 y 3)

En la (tabla 28) muestra la distribución de las diferentes patologías EPID entre los 3 grupos identificados en el análisis de *clusters* de siluetas. Básicamente, el grupo-1 engloba a

patologías con predominio de neutrófilos en el LBA, mientras que el grupo-2 y el grupo-3 comprenden los casos con predominio de macrófagos y linfocitos, respectivamente.

Patologías EPID	Grupo-1	Grupo-2	Grupo-3
BAL control (sin patología)	0	106	1
Nódulos pulmonares	1	20	1
Sarcoidosis	0	40	43
N. Hipersensibilidad	1	12	35
NOC	2	16	26
NIL (NIL-HIV)	1	17	22
NIU (fibrosis)	20	127	18
BR-EPID	4	19	2
NID	0	34	2
NINE	1	131	22
Histiocitosis de Langerhans	0	9	0
EPID-Eosinofilia	1	13	1
Infecciones pulmonares	133	64	31
NIA	7	14	4

Tabla 28. Distribución de las diferentes patologías EPID por grupos. Distribución de las diferentes patologías EPID entre los 3 grupos identificados en el análisis de clusters de silueta, utilizando todos los parámetros de citometría.

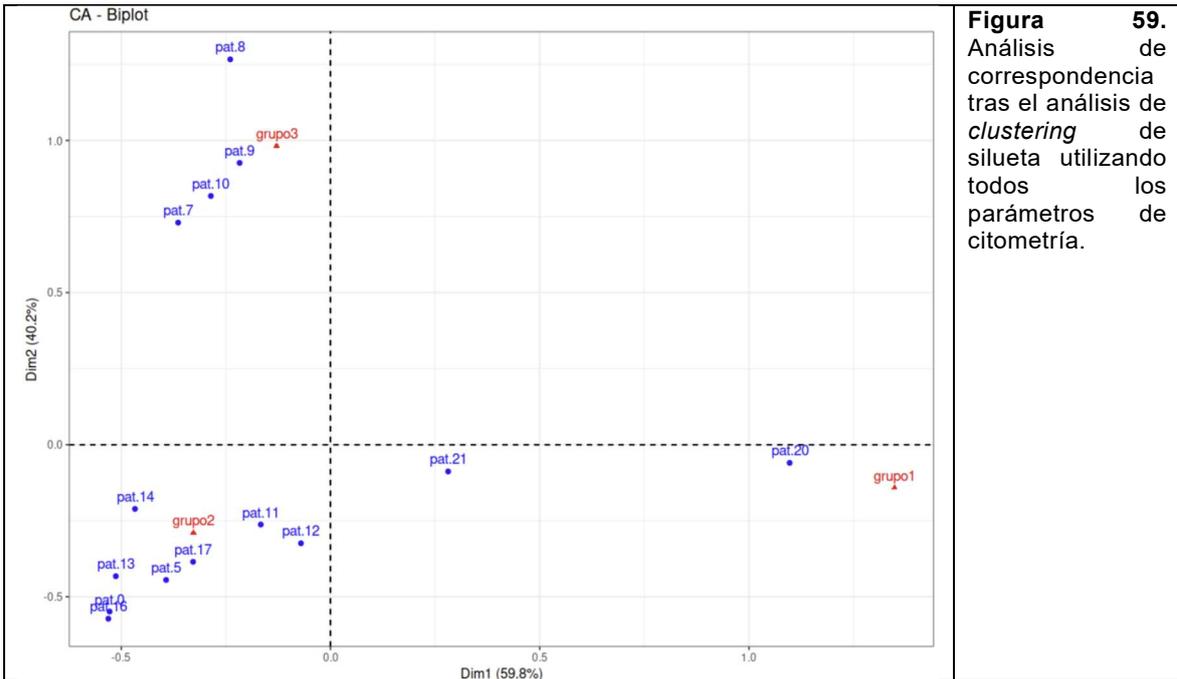
Grupo 1: predominio población de Neutrófilos

Grupo 2: predominio población de Macrófagos

Grupo 3: predominio población de linfocitos

En el análisis de correspondencia, como se muestra en la figura 59 la patología más cercana a cada grupo se correlaciona con éste, es decir, en el cuadrante inferior derecho, la patología 20 (infecciones) se correlaciona con el grupo 1 (predominio neutrófilos). En el cuadrante inferior izquierdo, y en el cuadrante superior izquierdo la patología 9 (Sarcoidosis) se correlaciona con el grupo 3 (predominio de linfocitos).

El análisis de correspondencias busca representar relaciones entre categorías incluye análisis chi cuadrado, equivalente al análisis de componentes principales para variables categóricas.



Los grupos estimados por el método de gap se muestran en la figura 60.

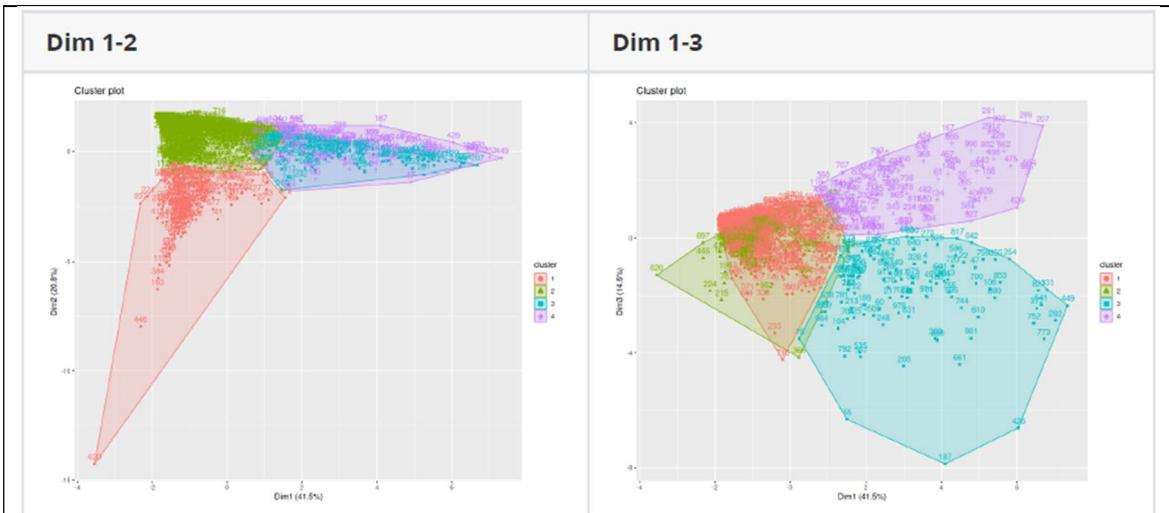


Figura 60. Análisis de *clustering* mediante método de *gap* de pacientes EPID utilizando todos los parámetros de citometría.

Dim 1-2 (dimensión lleva asociado el % de varianza de acumulación), 1-2 (análisis de componentes principales, componente 1 y 2)

Dim 1-3 (dimensión lleva asociado el % de varianza de acumulación), 1-3 (análisis de componentes principales, componente 1 y 3)

La distribución de las diferentes patologías EPID (tabla 29) entre los 4 grupos identificados en el análisis de *clusters* de gap. En líneas generales, el grupo-1 engloba patologías con predominio de neutrófilos en el LBA (infecciones y NIA), el grupo-2 comprende los casos

con predominio de macrófagos, el grupo-3 incluye a los pacientes con predominio de linfocitos (NH, NOC y NIL), excepto a la sarcoidosis que la separa en el grupo-4.

Patologías EPID	Grupo-1	Grupo-2	Grupo-3	Grupo-4
BAL control (sin patología)	0	106	0	1
Nódulos pulmonares	1	19	1	1
Sarcoidosis	0	36	1	46
N. Hipersensibilidad	1	11	22	14
NOC	2	16	23	3
NIL (NIL-HIV)	1	15	21	3
NIU (fibrosis)	20	127	7	11
BR-EPID	4	18	1	2
NID	0	32	3	1
NINE	1	130	15	8
Histiocitosis de Langerhans	0	9	0	0
EPID-Eosinofilia	1	12	1	1
Infecciones pulmonares	132	63	15	18
NIA	7	14	3	1

Tabla 29. Distribución de las diferentes patologías EPID - análisis de clusters de gap.

Distribución de las diferentes patologías EPID entre los 4 grupos identificados en el análisis de clusters de gap, utilizando todos los parámetros de citometría.

En el análisis de correspondencia en la figura 61, muestra mejor dicha distribución, aunque los pacientes con NIA (grupo-21) parece no estar bien representada por ningún grupo quedando entre los grupos 1 y 2, aunque localizado en el grupo 1 junto a las infecciones, como en el caso anterior. Aquí, los pacientes con sarcoidosis (código 7) se separan en un grupo a parte de las patologías con predominio de linfocitos.

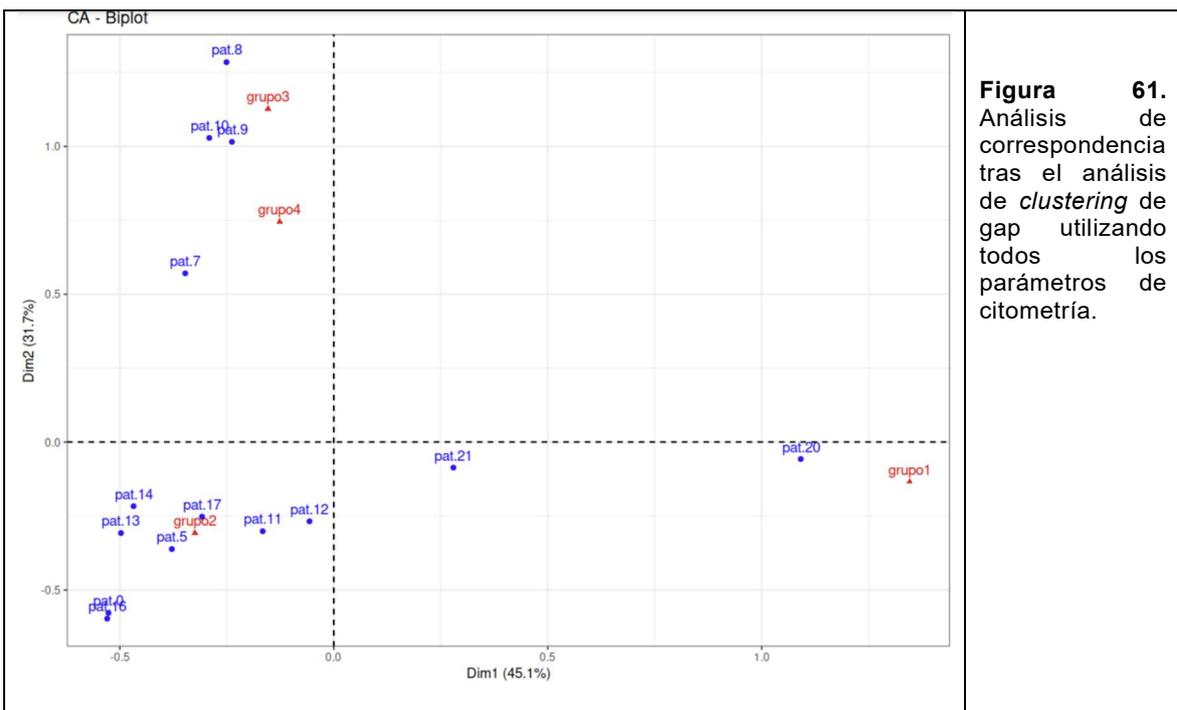


Figura 61. Análisis de correspondencia tras el análisis de *clustering* de gap utilizando todos los parámetros de citometría.

4.1 Análisis de *clusters* con parámetros de citometría seleccionados

Mediante regresión multinominal seguida de una selección de variables mediante un método de 4.2 Análisis de *clusters* con parámetros de citometría seleccionados

regresión múltiple de *stepwise backward and forward*, se seleccionaron las variables más explicativas. Las variables que han resultado más predictivas o que mejor ajustan a los datos son: el porcentaje de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas CD1a+, linfocitos totales, linfocitos T CD3+CD4+ y el cociente Neutrófilo/Linfocito.

En la figura 62 se hace análisis de *clusters* con esas variables tras escalar y centrar los datos, para determinar el número óptimo de *clusters* y hacer un análisis de correspondencias. En este caso, el análisis de silueta estimó que el número óptimo de grupos sería 4, mientras que análisis de gap estimó que el número óptimo era 3.

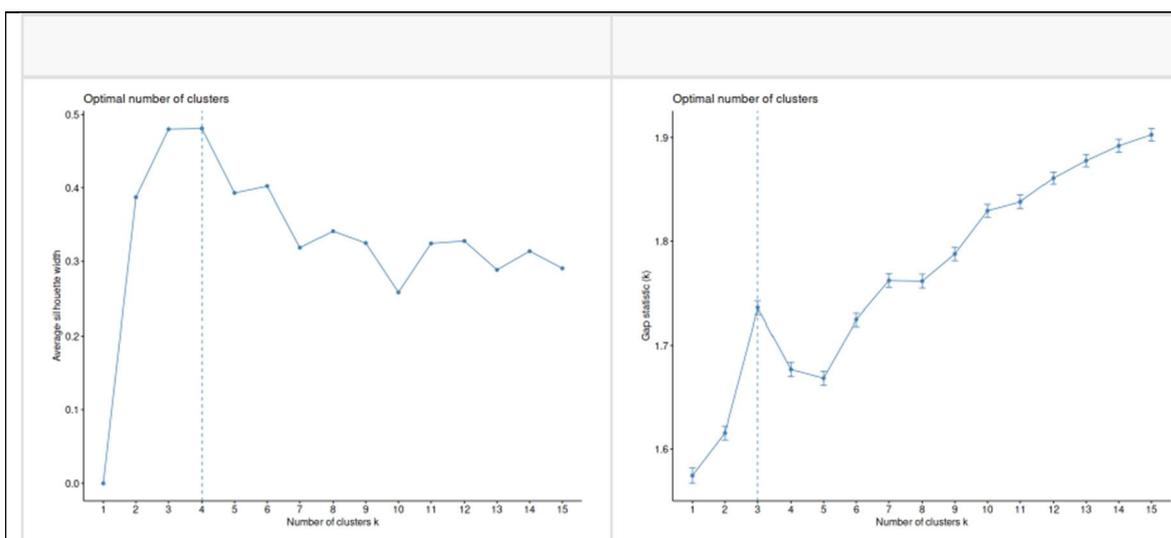


Figura 62. Número óptimo de grupos de pacientes EPID en función de los parámetros citométricos más predictivos estimados por los métodos de *clustering* de silueta (izquierda) o de gap (derecha). Ese número fue de 4 o de 3, respectivamente.

Los grupos estimados por el método de *clusters* de silueta se muestran en la figura 63.

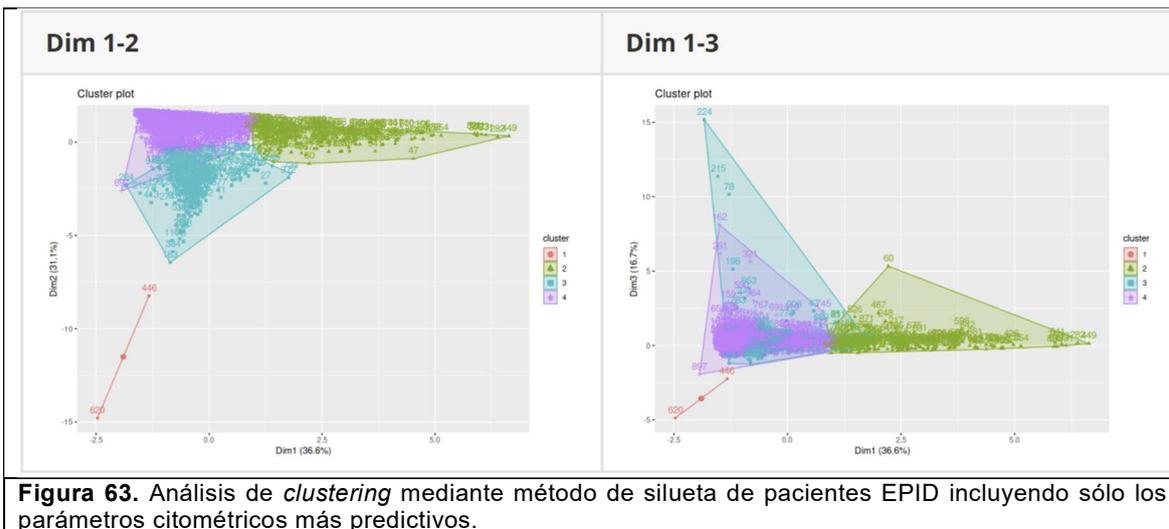


Figura 63. Análisis de *clustering* mediante método de silueta de pacientes EPID incluyendo sólo los parámetros citométricos más predictivos.

Sin embargo, los resultados no mejoraban la distribución de las patologías entre los diferentes grupos descritos en el análisis sin selección de variables.

En conclusión, el análisis con el método no guiado de *clusters* ofreció una distribución de grupos de patologías coincidente con los resultados que se habían descrito anteriormente en esta memoria mediante métodos convencionales:

- GRUPO-1 engloba a patologías con predominio de **neutrófilos** en el LBA (infecciones y NIA)
- GRUPO-2 comprende los casos con predominio de **macrófagos** (LBA control, nódulos pulmonares, NIU, BR-EPID, NID, NINE, HPCL, EPID-Eosinófilicas).
- GRUPO -3 incluye a los casos con predominio de **linfocitos** (NH, NOC y NIL)
- GRUPO-4 incluye a los pacientes con **sarcoidosis**, con predominio de linfocitos TCD4 y aumento del cociente CD4/CD8.

El reducido del número de casos y la elevada variabilidad de los pacientes con HPCL y EPID-eosinófila no permitió a este tipo de análisis separar dichas patologías en grupos independientes.

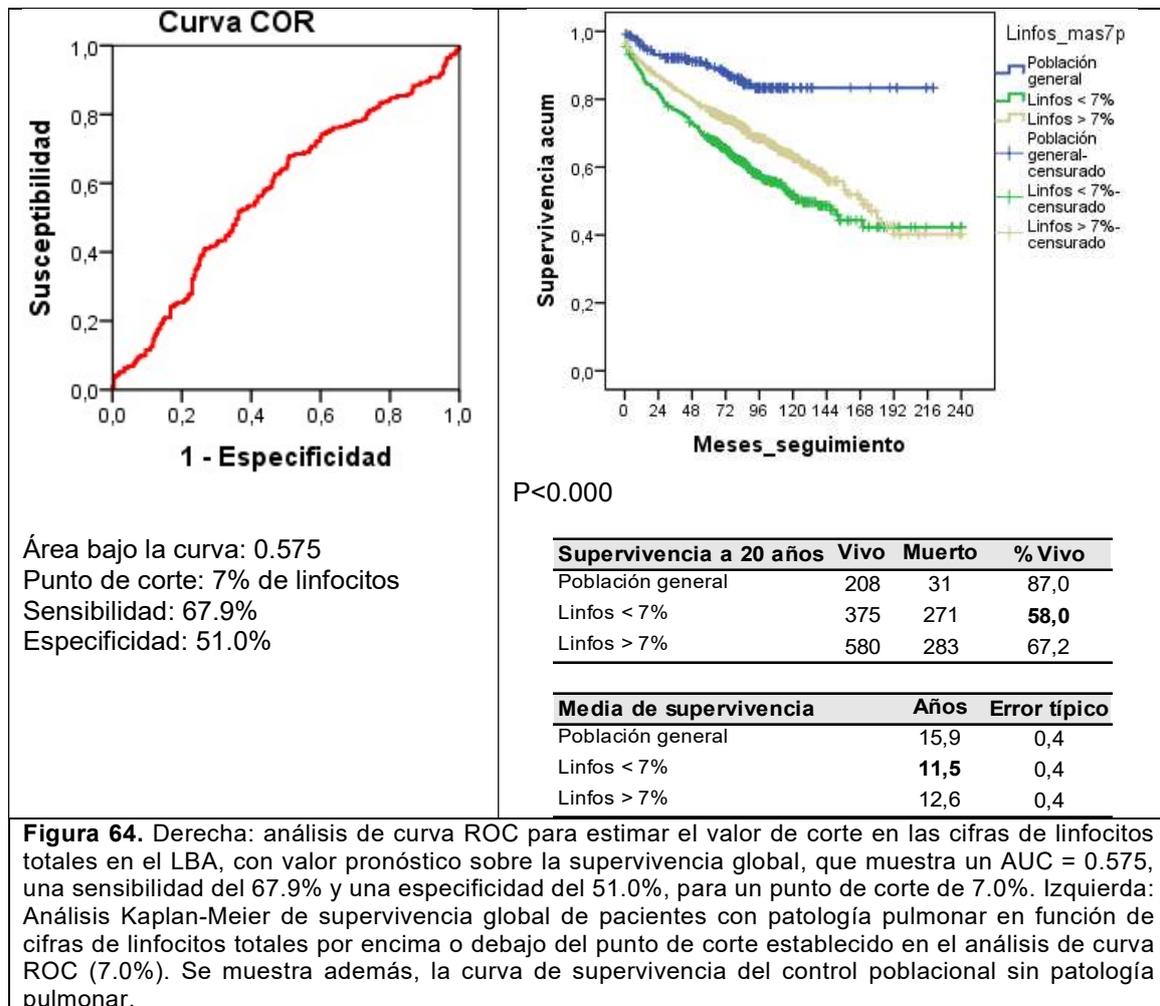
5. Valor pronóstico del análisis por citometría de flujo del LBA

Partiendo de la información relacionada con la supervivencia de todos los pacientes incluidos en este estudio, se pudo comparar esta información y evaluar los parámetros

celulares del LBA para determinar su capacidad pronóstica acerca de la supervivencia global (SG).

5.1. Valor pronóstico del porcentaje de linfocitos totales

En primer lugar, se estimó la capacidad pronóstica de las cifras de linfocitos totales del LBA sobre la SG de los pacientes. Para ello se hizo un estudio de curva ROC que ofreció un área bajo la curva pobre (0.575) pero que permitió establecer un punto de corte de linfocitos totales en el 7%, con una sensibilidad y especificidad del 67.9% y 51.0%, respectivamente en la figura 64. Cifras de linfocitos superiores al 7% se asociaron a SG a 20 años más elevadas (67.2% vs. 58.0, $p < 0.001$) y a periodos medios de supervivencia más largos (12.6 vs. 11.5 años). Sin embargo, en ambos casos los pacientes tenían SG a 20 años muy inferiores a la del control poblacional (87.0%).



Sin embargo, el impacto de las cifras de linfocitos fue desigual entre las diferentes patologías analizadas. La figura 65 revela que mientras que en los pacientes sin patología pulmonar o con patología pulmonar no-EPID parecía no tener impacto en la SG, cifras superiores al 7% de linfocitos se asociaron a mejores SG a 20 años en pacientes con EPID (72.9% vs. 57.5%, $p < 0.000$), patología aguda (62.2% vs. 48.1%, $p = 0.02$) y otros tipos de cáncer (44.1% vs. 23.5%, $p = 0.03$). Además, se asociaba a peores supervivencias en los pacientes con cáncer de pulmón (17.1% vs. 35.0%, $p = 0.123$).

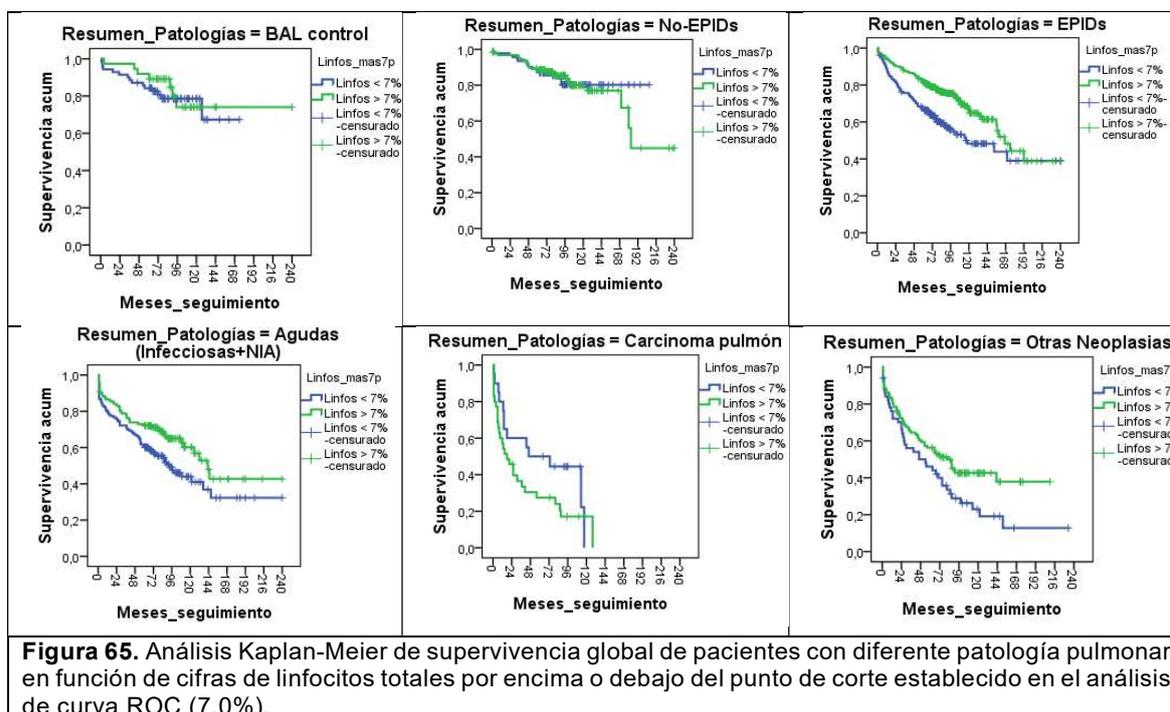
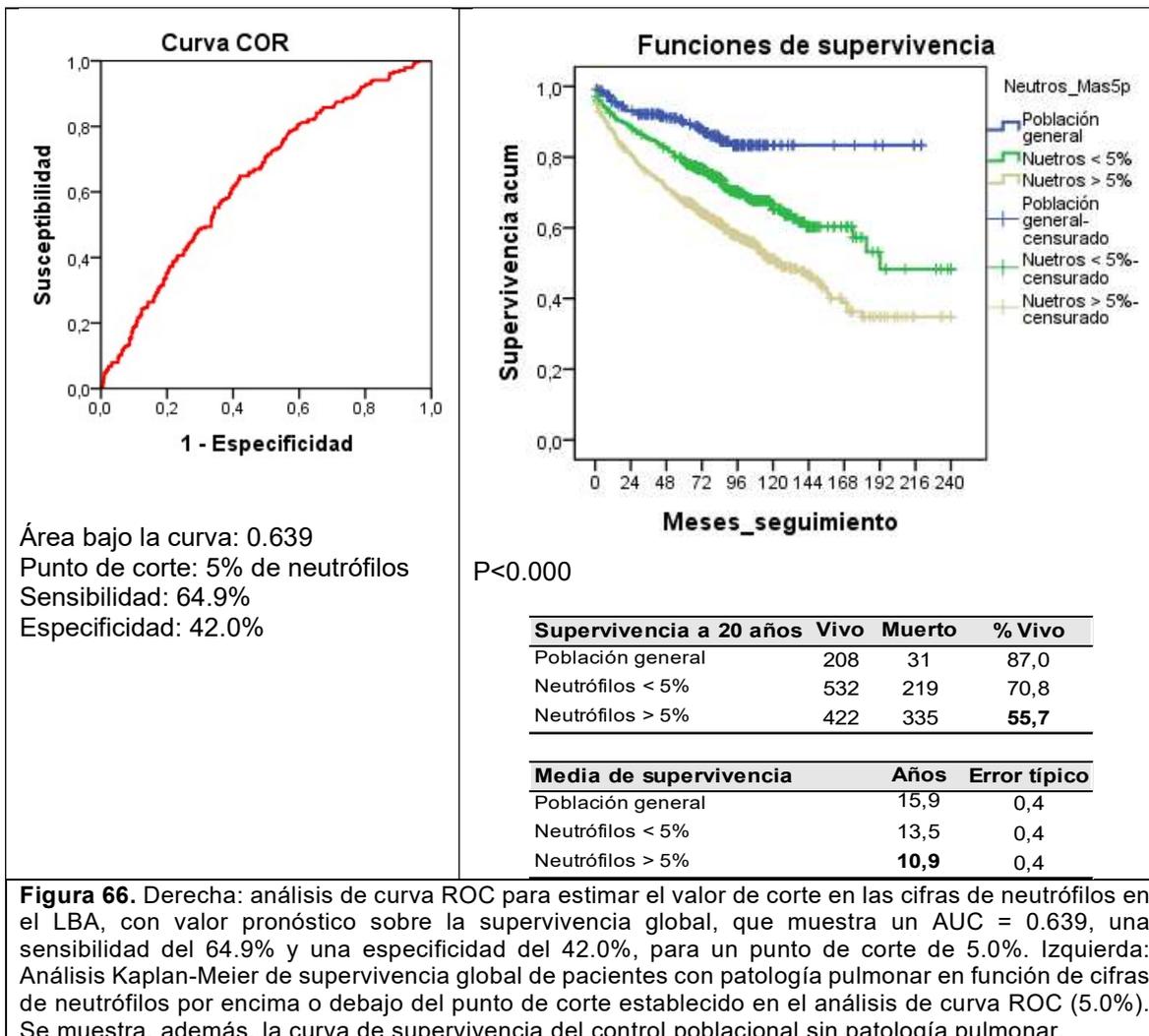


Figura 65. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con diferente patología pulmonar en función de cifras de linfocitos totales por encima o debajo del punto de corte establecido en el análisis de curva ROC (7.0%).

5.2. Valor pronóstico del porcentaje de neutrófilos

A continuación, se evaluó la capacidad pronóstica sobre la SG de las cifras de neutrófilos del LBA. Para ello se hizo un estudio de curva ROC que ofreció un área bajo la curva de 0.639 y permitió establecer un punto de corte de neutrófilos total en el 5.0%, con una sensibilidad y especificidad del 64.9% y 42.0%, respectivamente en la figura 66. Los pacientes que presentaban cifras de neutrófilos por encima de dicho valor de corte prestaban tasas de SG a 20 años inferiores al resto de pacientes (55.7% vs. 70.8%), y periodos medios de supervivencia más cortos (10.9 vs. 13.5 años).



De nuevo el impacto de las cifras de neutrófilos por encima del 5% entre las diferentes patologías fue desigual, ver en la figura 67. Mientras que, en los pacientes sin patología pulmonar ($p=0.723$), con patología pulmonar no-EPID ($p=0.523$), patologías agudas ($p=0.374$), cáncer de pulmón ($p=0.823$) u otros tipos de cáncer ($p=0.647$) las cifras de neutrófilos por encima del 5% no parecía tener impacto sobre la SG, cifras superiores al 5% de neutrófilos se asociaron a peores SG a 20 años en pacientes con EPID (57.6% vs. 74.4%, $p<0.001$).

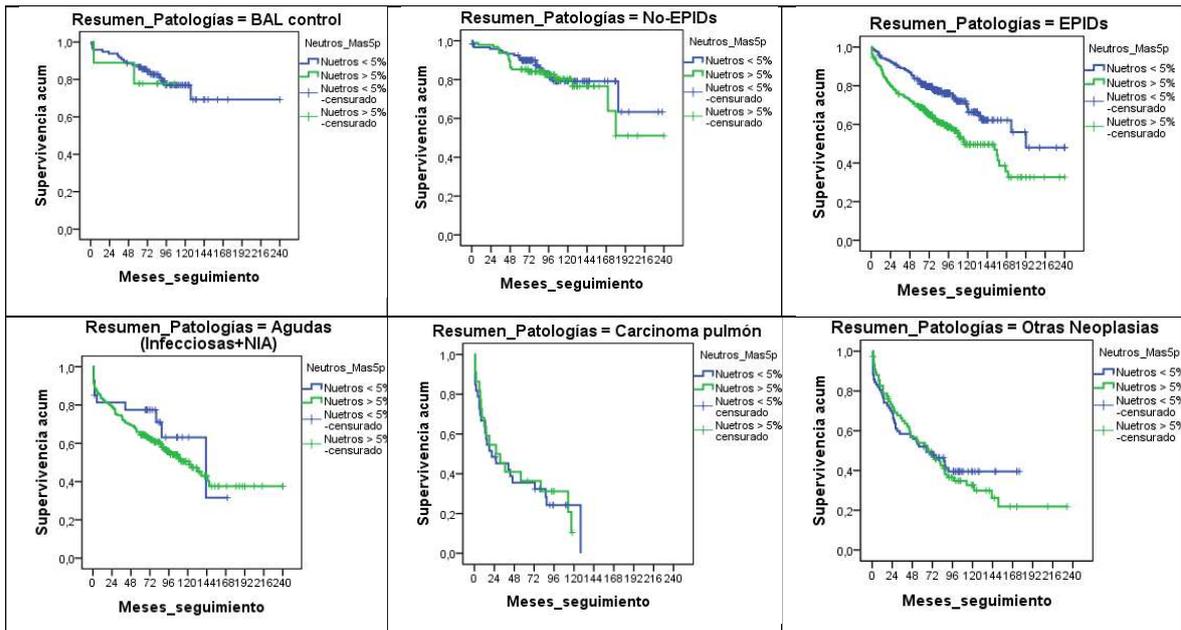
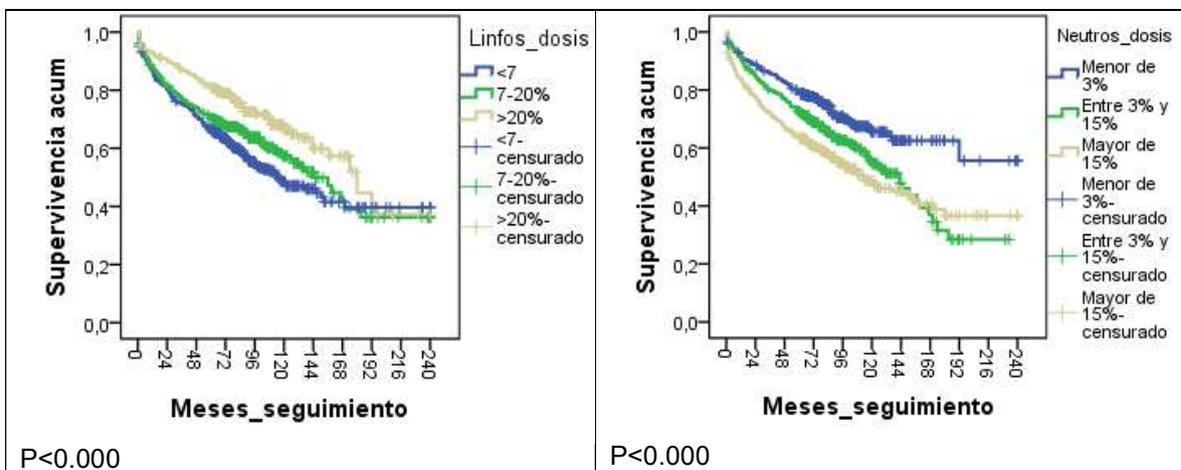


Figura 67. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con diferente patología pulmonar en función de cifras de neutrófilos por encima o debajo del punto de corte establecido en el análisis de curva ROC (5.0%).

5.3. Efectos dosis dependiente y contrapuestos de linfocitos y neutrófilos en la SG de los pacientes con patología pulmonar

Pudimos comprobar que, tanto el efecto protector de los linfocitos sobre la SG de los pacientes, como el efecto negativo de los neutrófilos, eran dosis dependiente, se muestra en la figura 68. De manera que la tasa de supervivencia a 20 años de los pacientes con cifras de linfocitos <7%, entre 7% y 20% y >20% eran de 55.4%, 61.1% y 71.6% ($p < 0.000$). Mientras que la de los pacientes con cifras de neutrófilos <3%, entre 3% y 15% y >15% fueron de 71.9%, 60.3% y 52.8% ($p < 0.000$), respectivamente.



$P < 0.000$

$P < 0.000$

Figura 68. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con diferentes patologías pulmonares en función de dosis de linfocitos o neutrófilos.

Igualmente se podía observar que el efecto protector de los linfocitos podía **COTRARRESTAR** el efecto negativo de los neutrófilos, también de manera dosis dependiente, pero hasta cierto límite, ya que con cifras de neutrófilos del 3-15% tanto los linfocitos entre el 7-20% y >20% (pero no los linfocitos <7%) pudieron contrarrestar el efecto negativo de los neutrófilos; pero si las cifras de neutrófilos superaran el 15%, sólo cifras de linfocitos >20% fueron capaces de contrarrestar el efecto adverso de los neutrófilos, ver figura 69.

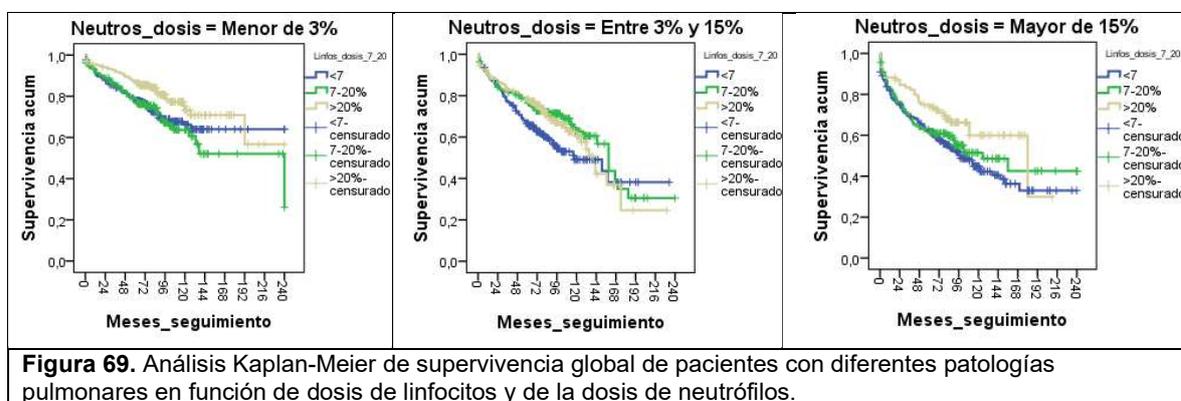


Figura 69. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con diferentes patologías pulmonares en función de dosis de linfocitos y de la dosis de neutrófilos.

5.4. Valor pronóstico de la Combinación-linfocito/neutrófilo en patología EPID

Fue la combinación de las cifras de linfocitos y neutrófilos superior a sus respectivos valores de corte, lo que mostró mayor capacidad pronóstica en los pacientes con EPID.

Así, se pudo identificar una combinación de **linfocitos >7% y de neutrófilos < 5%** (**Combinación-LN**) que detectaba pacientes EPID con SG a 20 años SIMILARES a la de la población general 79.1% vs. 87.0% y supervivencia media de 14.2±0.8 y 15.9±0.4 años, respectivamente. Por el contrario, los pacientes EPID que presentaban cifras de linfocitos <7% y de neutrófilos >5% tuvieron la peor SG, con cifras de SG a 20 años del 47.8% y una supervivencia media de 9.2±0.8 años, 6.7 años menos que la población general (un 42% menos de tiempo). Ver figura 70.

El resto de los pacientes con situaciones intermedias, linfocitos >7% y neutrófilos >5% así como linfocitos <7% y neutrófilos <5% mostraron SG similares, e intermedias a las de los dos grupos anteriormente descritos.

De estos resultados se desprende que basado en las cifras de linfocitos y neutrófilos presentes en los LBA de los pacientes EPID (excluyendo los pacientes con patologías agudas, infecciosas y NIA) se pueden establecer tres niveles de riesgo según la Combinación-LN:

- Riesgo de supervivencia **FAVORABLE**: linfocitos >7% y neutrófilos <5% (34.9% de pacientes EPID).
- Riesgo de supervivencia **DESFAVORABLE**: linfocitos <7% y neutrófilos >5% (19.0% de pacientes EPID).
- Riesgo de supervivencia **INTERMEDIO**: resto de pacientes (46.1% de pacientes EPID).

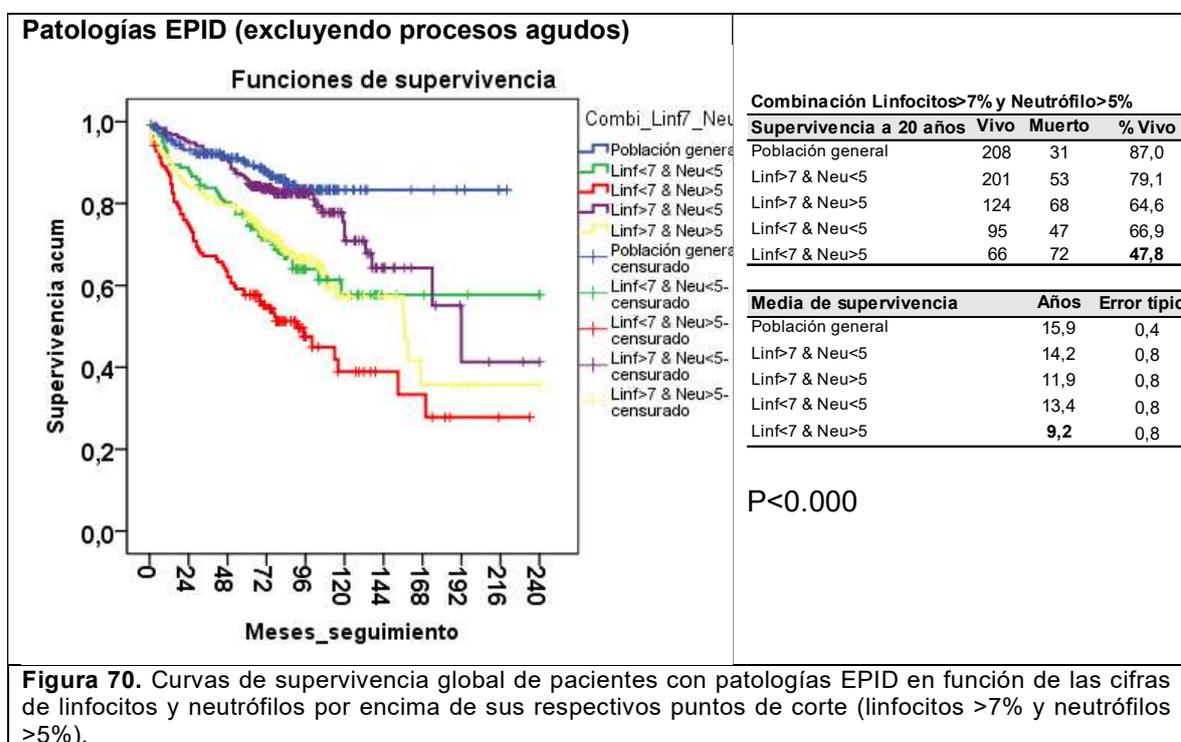


Figura 70. Curvas de supervivencia global de pacientes con patologías EPID en función de las cifras de linfocitos y neutrófilos por encima de sus respectivos puntos de corte (linfocitos >7% y neutrófilos >5%).

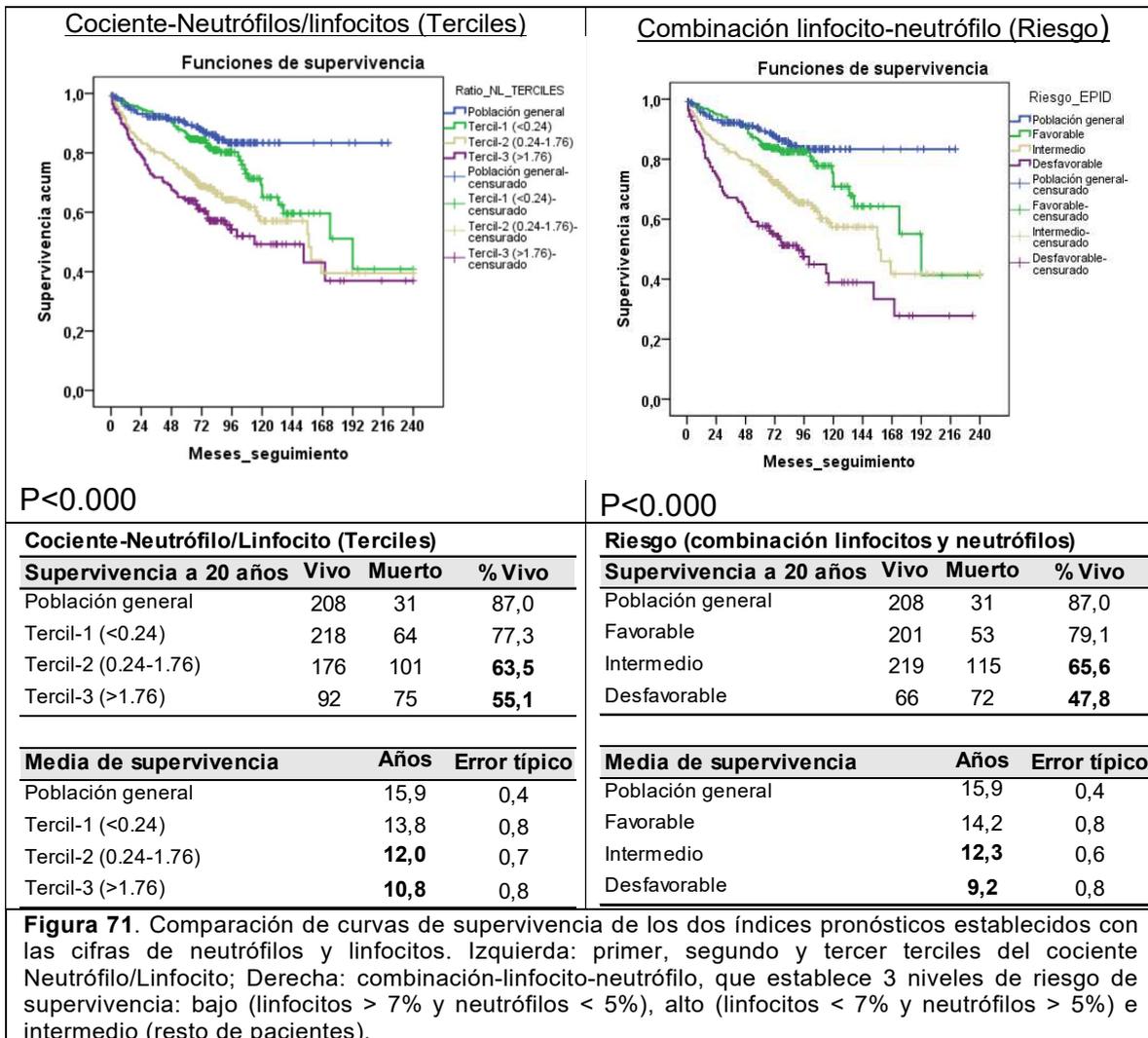
Estos resultados además revelan el carácter **PROTECTOR** de los linfocitos en el infiltrado pulmonar de los pacientes EPID, ya que son capaces de **CONTRARRESTAR** el efecto adverso que tiene la infiltración por neutrófilos. De hecho, los pacientes con cifras de neutrófilos >5% y linfocitos >7% tienen supervivencias comparables a los pacientes con cifras de neutrófilos <5% pero con bajas cifras de linfocitos (<7%).

En la (tabla 30) se aprecia como las patologías con predominio de linfocitos (sarcoidosis, NH, NOC y NIL) se concentran mayoritariamente entre los pacientes de buen pronóstico, mientras que los pacientes con NIU, BR-EPID, NINE, neumoconiosis, HPCL y EPID-eosinófila tienden a acumularse en el pronóstico desfavorable o intermedio.

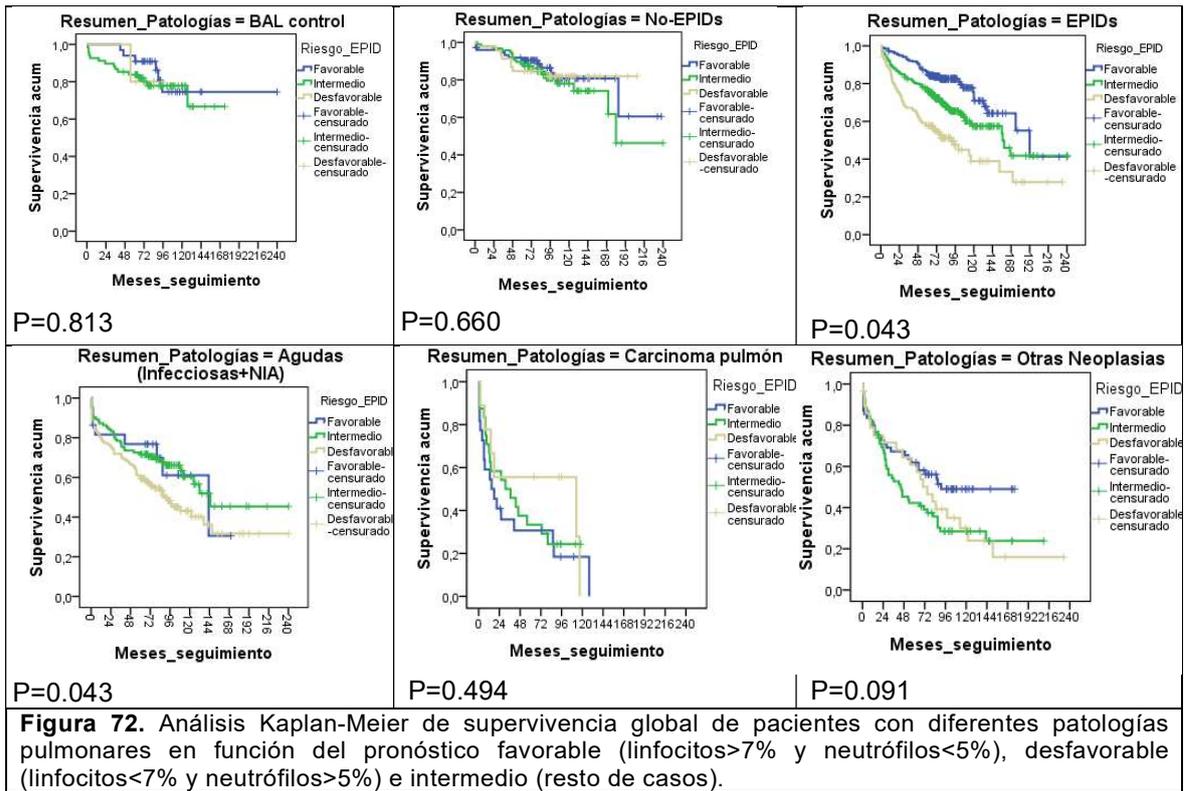
Tabla 30. Distribución del riesgo en la SG por patologías EPID			
Distribución del riesgo en la SG por patologías EPID			
	Favorable	Intermedio	Desfavorable
Sarcoidosis	54 (65,1%)	26 (31,3%)	3 (3,6%)
N. Hipersensibilidad	27 (56,3%)	21 (43,8%)	0 (0%)
NOC	19 (43,2%)	21 (47,7%)	4 (9,1%)
NIL (NIL-HIV)	28 (70%)	11 (27,5%)	1 (2,5%)
NIU	29 (17,6%)	66 (40%)	70 (42,4%)
BR-EPID	3 (12%)	15 (60%)	7 (28%)
NID	15 (41,7%)	18 (50%)	3 (8,3%)
NINE	40 (26%)	86 (55,8%)	28 (18,2%)
Neumoconiosis	7 (25,9%)	14 (51,9%)	6 (22,2%)
Histioc. Langerhans	0 (0%)	8 (88,9%)	1 (11,1%)
EPID-Esosinofilia	4 (26,7%)	6 (40%)	5 (33,3%)
EPID-Inclasificable	28 (35%)	42 (52,5%)	10 (12,5%)

Dado que el cociente Neutrófilo/Linfocito (cociente-NL) es parámetro que tiene valor pronóstico en patología pulmonar como FPI (218),(96), cáncer de pulmón (100), hemorragia alveolar difusa (97) o infección por *Mycobacterium avium* (101), se investigó la utilidad pronóstica del Ratio-N/L en nuestra serie de pacientes.

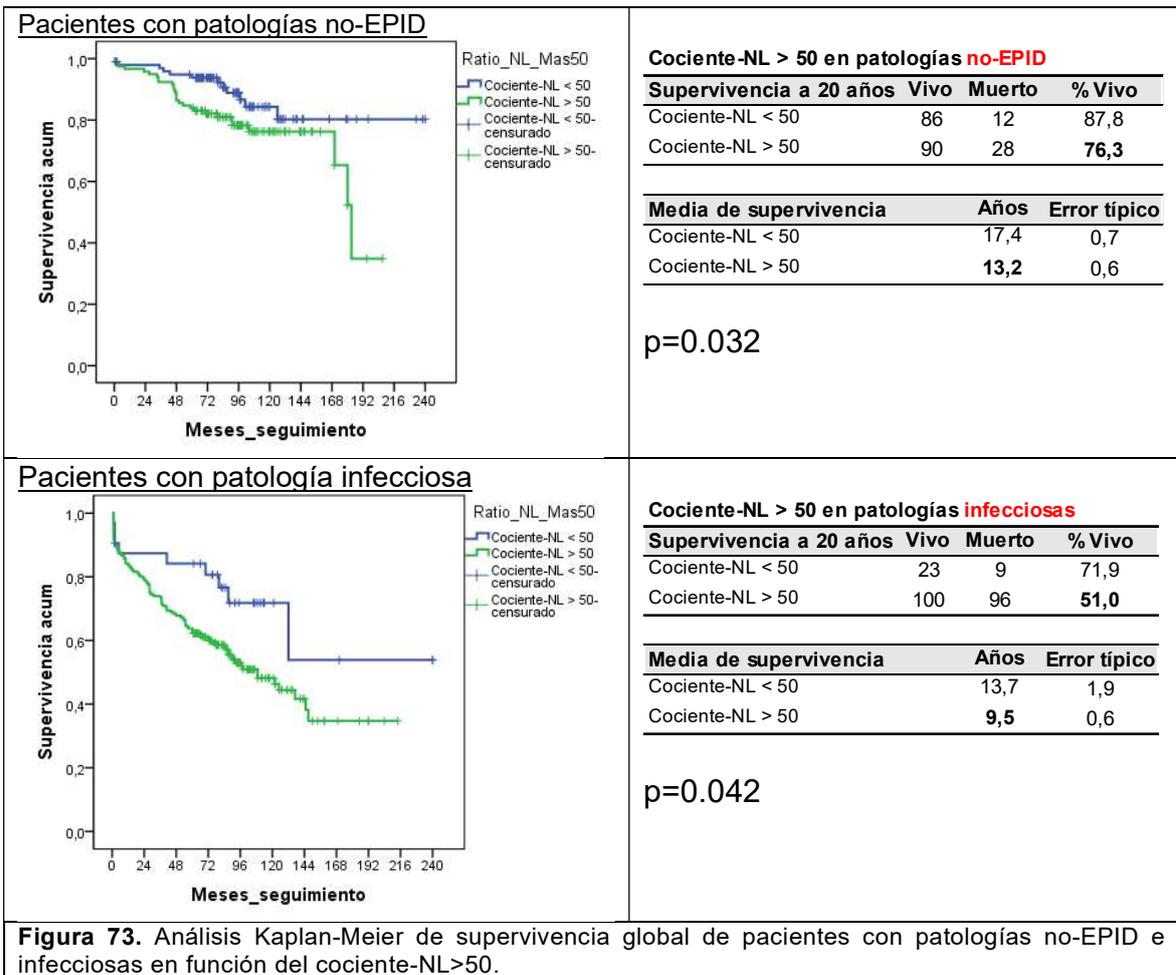
Nuestros resultados muestran, como se observa en la figura 71, que efectivamente el cociente-NL tiene un alto valor pronóstico, casi similar a la Combinación-LN de cifras de linfocitos>7% y neutrófilos>5%. Sin embargo, la Combinación-LN separa mejor los tres grupos de riesgo, en comparación con los terciles del cociente-NL, especialmente entre los pacientes del Tercil-3 del cociente-NL y el grupo de riesgo desfavorable que muestran SG a 20 años de 55.1% y 47.8% y supervivencias medias de 10.8±0.8 y 9.2±0.8 años, respectivamente. Por tanto, la combinación Linfocitos<7%-Neutrófilo>5% detecta un grupo de pacientes EPID con riesgo más desfavorable que el Tercil-3 del cociente-NL.



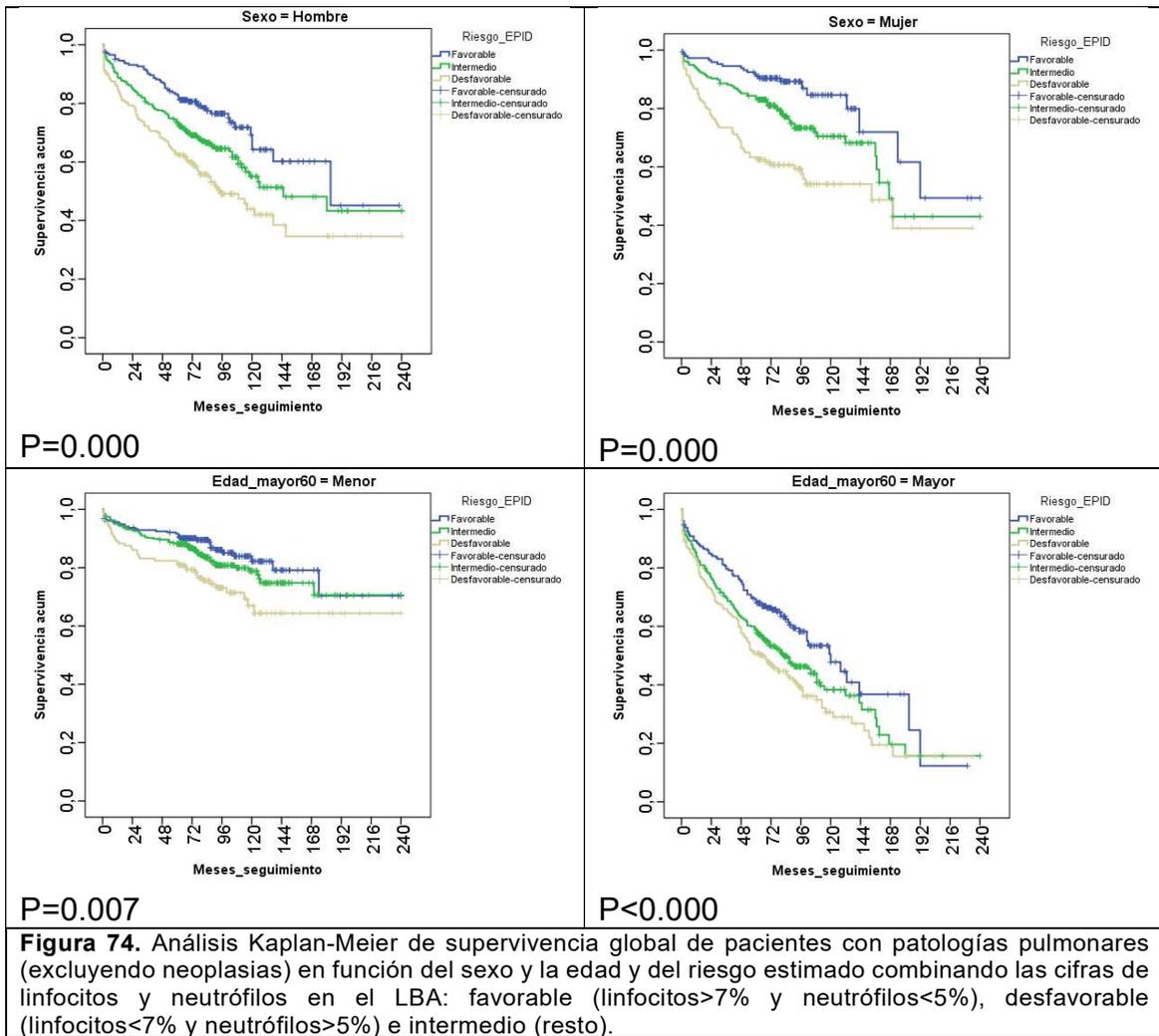
En el resto de las patologías, la combinación-LN ofreció una utilidad pronóstica desigual, ver figura 72. Mientras que entre los pacientes BAL-control, aquellos con patologías no-EPID o carcinoma de pulmón la combinación-LN no parecía tener ningún valor pronóstico, si lo tuvo en los pacientes con patología aguda ($p=0.043$) y con tumores diferentes al carcinoma de pulmón ($p=0.091$), además de en los pacientes EPID ($p>0.000$).



Teniendo en cuenta que algunas patologías cursaban con cifras muy elevadas de **neutrófilos**, se ensayó un cociente-NL>50 para valorar su capacidad pronóstica, ver figura 73, en patologías en las que los terciles del cociente-NL no ofrecían utilidad pronóstica. En este análisis se pudo comprobar que los pacientes con patología no-EPID (EPOC, asma, TBC o nódulos pulmonares) y los pacientes con patología infecciosa con cocientes-NL>50 presentaban tasas de SG más reducidas (76.3% vs 87.8%, $p=0.032$ y 51.0% vs. 71.9%, $p=0.042$, respectivamente), y supervivencias más cortas 13.2 ± 0.6 vs. 17.4 ± 0.7 años y 9.5 ± 0.6 vs. 13.7 ± 1.9 años, respectivamente, que los pacientes con cociente-NL<50.



Con relación al sexo, se ilustra arriba en la figura 73, o a la edad, ver parte inferior de la figura 74, la estimación del riesgo de SG de los pacientes utilizando la combinación linfocitos-neutrófilos, mantiene perfectamente su valor pronóstico.



5.5 Impacto del transporte del LBA desde otros hospitales en la capacidad pronóstica de la Combinación-NL

Por último, dado que la viabilidad de las células de la muestra LBA se puede ver alterada tanto por el tiempo de procesamiento como por las condiciones de almacenamiento y transporte, quisimos ver la utilidad de la estimación de riesgo de la combinación-LN para las muestras obtenidas en nuestro propio hospital (Arrixaca), respecto a las de otros hospitales. Como se puede ver en la figura 75, las curvas de supervivencia para los tres grupos de riesgo bajo, intermedio y alto son comparables. Por tanto, el método de análisis utilizado, que incluye las células muertas del LBA, lleva a valores comparables de linfocitos y neutrófilos de las muestras de los diferentes hospitales que remiten muestras a nuestra Unidad de Citometría, ver en la figura 76, en donde se muestra, que la elevada variabilidad

observada entre los diferentes hospitales se debe fundamentalmente al escaso número de muestras analizadas para algunos hospitales.

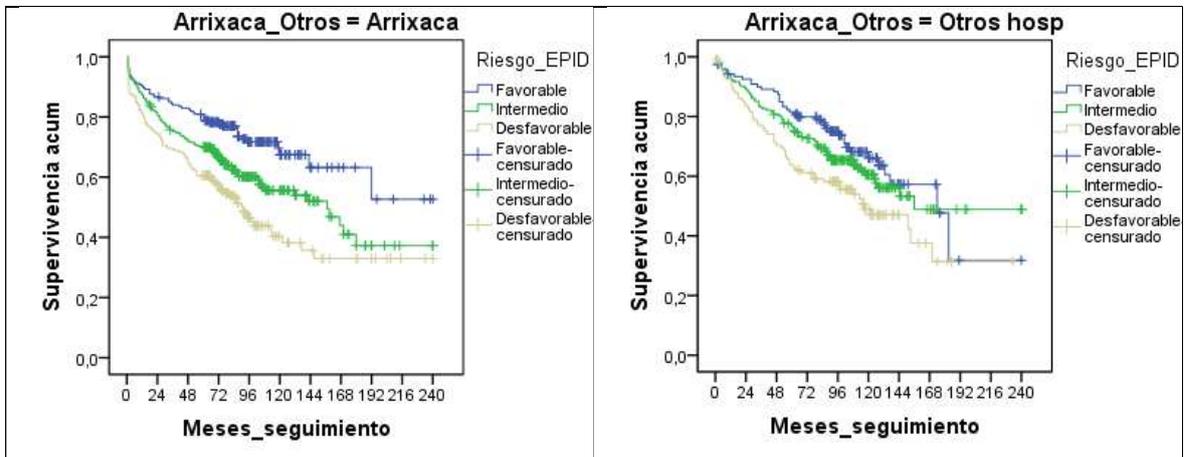


Figura 75. Comparación de curvas de supervivencia del índice pronóstico establecido con las cifras de neutrófilos y linfocitos, bajo (linfocitos > 7% y neutrófilos < 5%), alto (linfocitos < 7% y neutrófilos > 5%) e intermedio (resto de pacientes) para las muestras de LBA obtenidas en la Arrixaca y en el resto hospitales de la región.

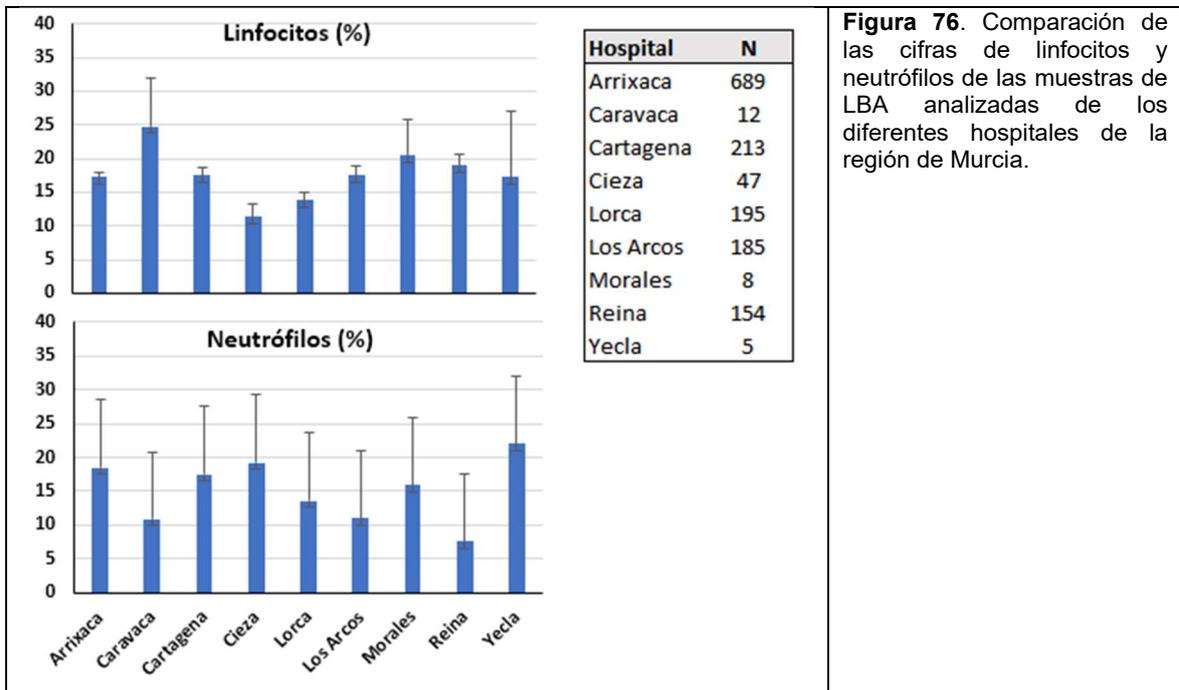
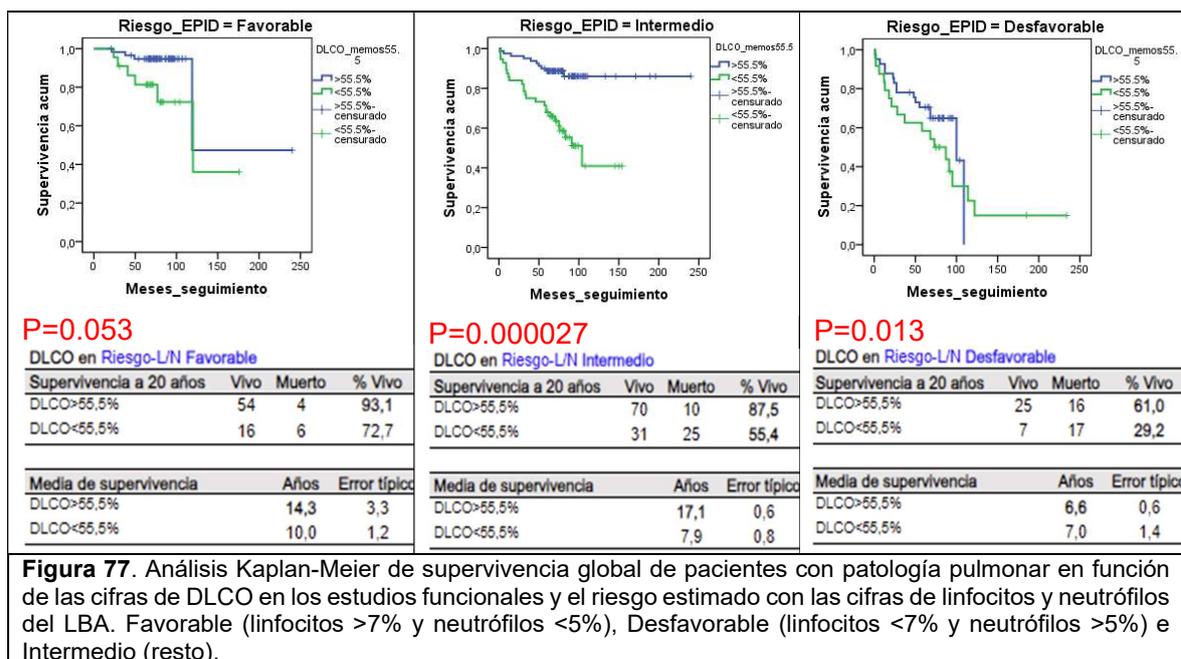


Figura 76. Comparación de las cifras de linfocitos y neutrófilos de las muestras de LBA analizadas de los diferentes hospitales de la región de Murcia.

5.6 La tasa DLCO complementa el valor pronóstico de la Combinación-Linfocito/Neutrófilo

Queremos destacar la complementariedad de estas dos pruebas, la tasa DLCO determinada en las pruebas funcionales y la combinación-LN determinada por citometría en el LBA. Como se ha visto en secciones anteriores un DLCO <55.5% se asociaba a peor SG. Sin embargo, la capacidad predictiva de las cifras de DLCO>55.5% se redujo de forma muy importante en los pacientes de pronóstico favorable y desfavorable. Por el contrario, se puede observar en la figura 77, cómo la capacidad predictiva del DLCO>55.5% se incrementó en los pacientes de riesgo intermedio en la combinación-NL, donde estas dos variables se complementaron para identificar a pacientes con supervivencias muy cortas, frente a los pacientes con supervivencias similares a la de la población normal.



Que estas dos variables son complementarias se debe a que son variables que aportan valor predictivo independiente sobre la SG de los pacientes con patología pulmonar. La edad (HR=1.061, p<0.000), el riesgo linfocito/neutrófilo (HR=1.78.4, p<0.000) y la tasa DLCO (HR=3.076, p<0.000) son variables con valor predictivo independiente y por tanto complementario. (tabla 31)

Tabla 31. Regresión de Cox para supervivencia global en función de parámetros predictivos.

	Hazard ratio	95% CI	P
Edad	1.061	1.039-1.084	0.000
Sexo	1.187	0.741-1.900	0.476
Riesgo-Linfocitos/Neutrófilos	1.784	1.292-2.462	0.000
DLCO<55.5%	3.076	1.924-4.916	0.000

Además, se evaluó la capacidad predictiva de la DLCO>55% en función de la presencia de fibrosis. Este parámetro mostró su mayor valor predictivo en los pacientes sin patrones de fibrosis ($p=0.0001$), mientras que en los pacientes con fibrosis su capacidad predictiva fue mucho más reducida ($p=0.041$), ver figura 78.

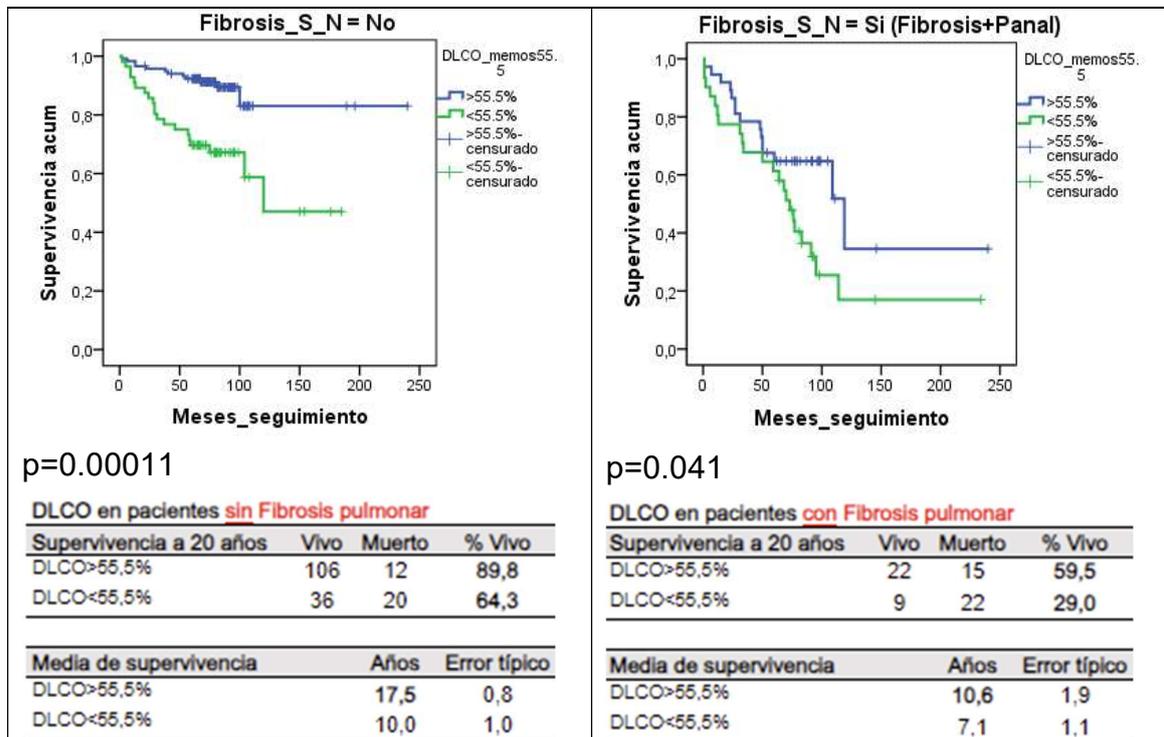
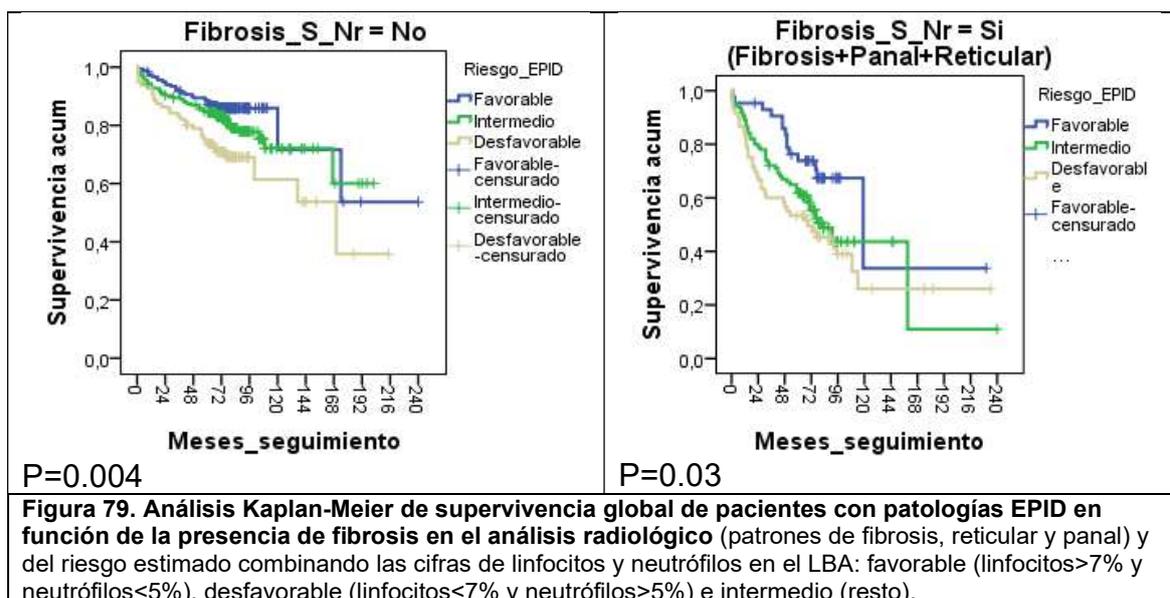


Figura 78. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con patología pulmonar en función de las cifras de DLCO en los estudios funcionales en relación con la presencia de fibrosis pulmonar, determinada por la presencia de patrones radiológicos compatibles de fibrosis (fibrosis o panal).

5.7. Asociación entre fibrosis y cifras elevadas de neutrófilos

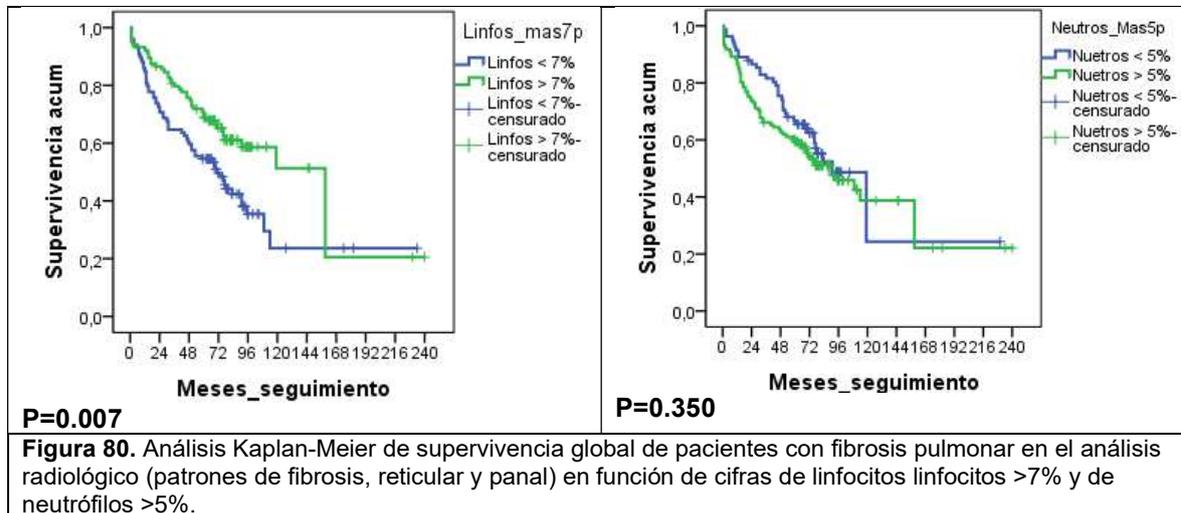
Como se ha descrito en secciones anteriores la aparición de fibrosis establecida en el patrón radiológico se asocia a peor supervivencia. Tal y como ha sido descrito (219), nuestros datos muestran cifras de neutrófilos más elevadas en los pacientes con fibrosis que en los que no presentan fibrosis ($14.58\% \pm 1.33$ vs, $7.82\% \pm 0.56$, $p < 0.000$). Por este motivo, quisimos descartar que, el mal pronóstico que implica la presencia elevada de neutrófilos, no se debiera a la presencia de fibrosis.

En la figura 79, se aprecia cómo la capacidad predictiva de la combinación de cifras de linfocitos y neutrófilos en el LBA mantiene su valor pronóstico tanto en pacientes EPID con fibrosis ($p < 0.05$) como sin fibrosis ($p = 0.008$). De hecho, presenta mayor capacidad predictiva en los pacientes sin fibrosis, probablemente porque las cifras elevadas de neutrófilos promoverán el desarrollo posterior de fibrosis y eso acortará la supervivencia.



Igualmente se investigó cuál de los dos tipos de células (linfocitos o neutrófilos) aportaba mayor valor pronóstico en los pacientes con fibrosis pulmonar. Como se puede ver en la figura 80, cifras de linfocitos >7% tenían un panel claramente protector ($p = 0.007$) en la supervivencia de los pacientes con fibrosis, mientras que el papel negativo de los neutrófilos no fue estadísticamente significativo ($p = 0.350$). Cifras de neutrófilos >10% o

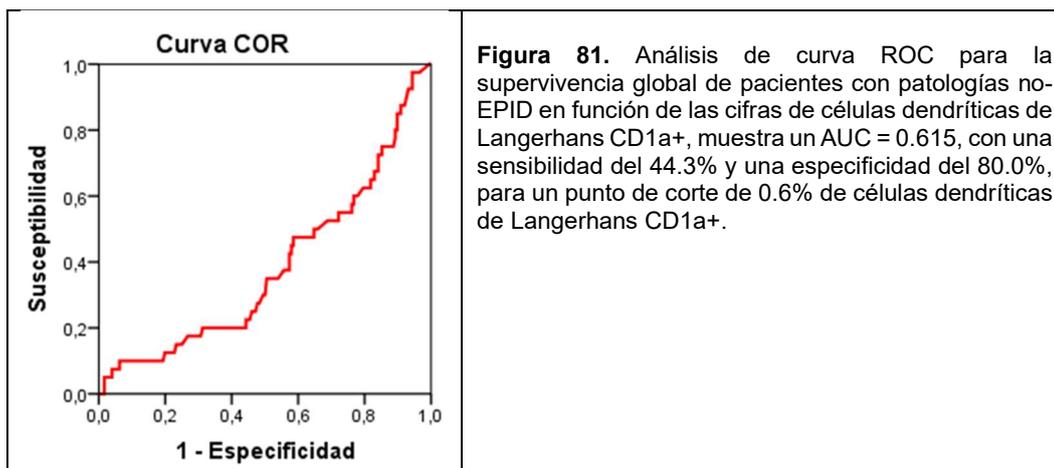
>15% mostraron resultados similares. Por tanto, las cifras de linfocitos del LBA tiene mayor valor pronóstico que las de los neutrófilos.



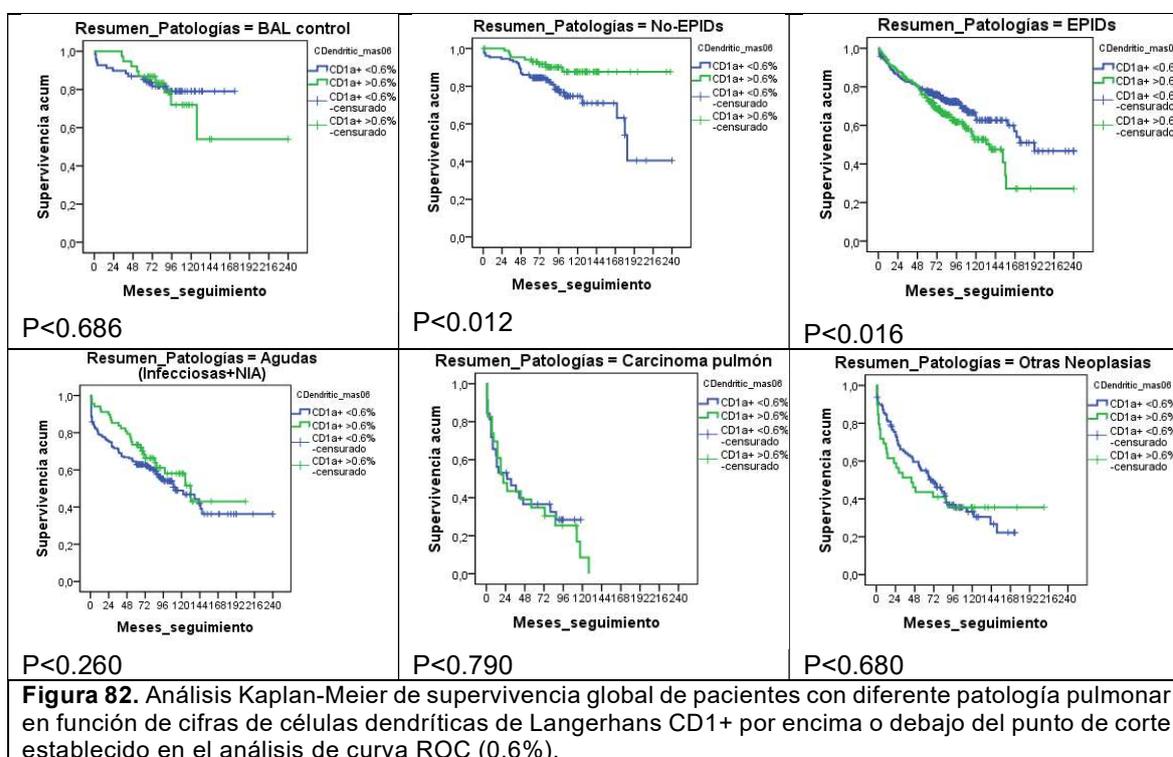
5.8. Valor pronóstico del porcentaje de células dendríticas

Ante la falta de marcadores pronósticos claramente significativos en algunas de las patologías, como las patologías no-EPID, se investigó la utilidad de otras poblaciones leucocitarias. Entre ellas, las cifras de células dendríticas de Langerhans CD1a+ mostraron valor pronóstico sobre la SG en varias patologías.

Como se muestra en la figura 81 la curva ROC identificó un punto de corte de células dendríticas de Langerhans CD1a+ en **0.6%** del total de células del LBA que tuvo valor pronóstico sobre la SG en patologías no-EPID, con una sensibilidad del 44.3% y una especificidad del 80.0%.



Se procedió a ensayar el impacto que dicho punto de corte de células dendríticas CD1a+ >0.6% tenía en la SG de los diferentes grupos de estudio, ver figura 82. Como se puede observar, cifras de células dendríticas por encima de 0.6% parecían tener un carácter protector sobre la SG a 20 años de los pacientes con patología no-EPID (89.7% vs. 76%, $p < 0.012$) y agudas (60.3% vs. 52.7%, $p = 0.260$). Por el contrario, se asociaba a peor supervivencia en pacientes con patologías EPID (61.4% vs. 70.6%, $p < 0.016$).



Por tanto, la presencia de células dendríticas por encima del 0.6% del total de leucocitos del LBA parecía tener un carácter protector en los pacientes con patología no-EPID ya que presentaban tasas de SG a 20 años superiores a los pacientes con cifras de células dendríticas por debajo del 0.6% (89.7% vs. 76.0%, $p=0.012$) y supervivencias medias más prolongadas, 18.0 ± 0.6 vs 14.2 ± 0.9 años, en la figura 83.

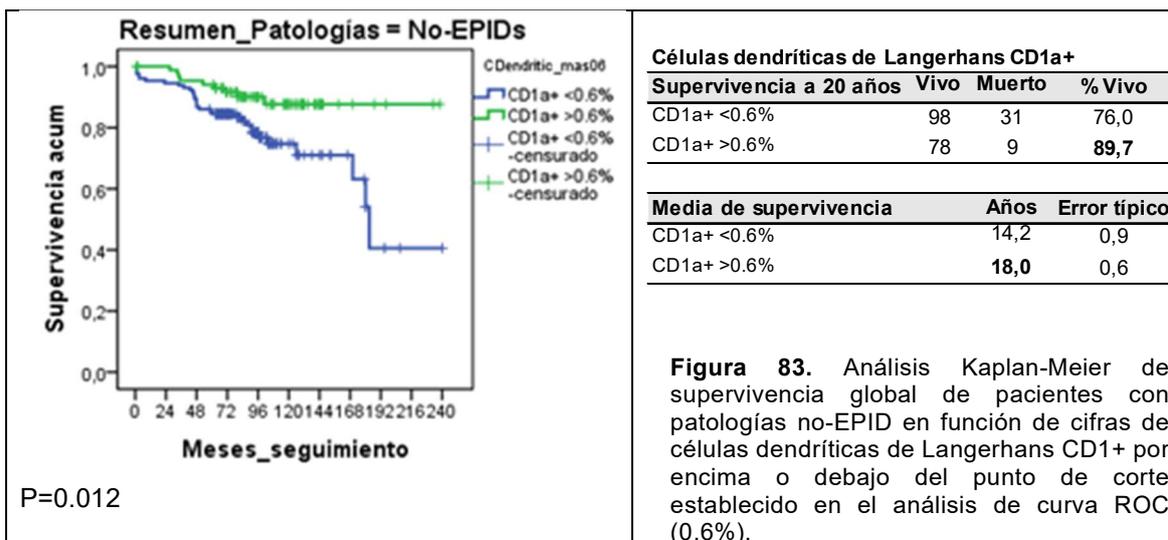
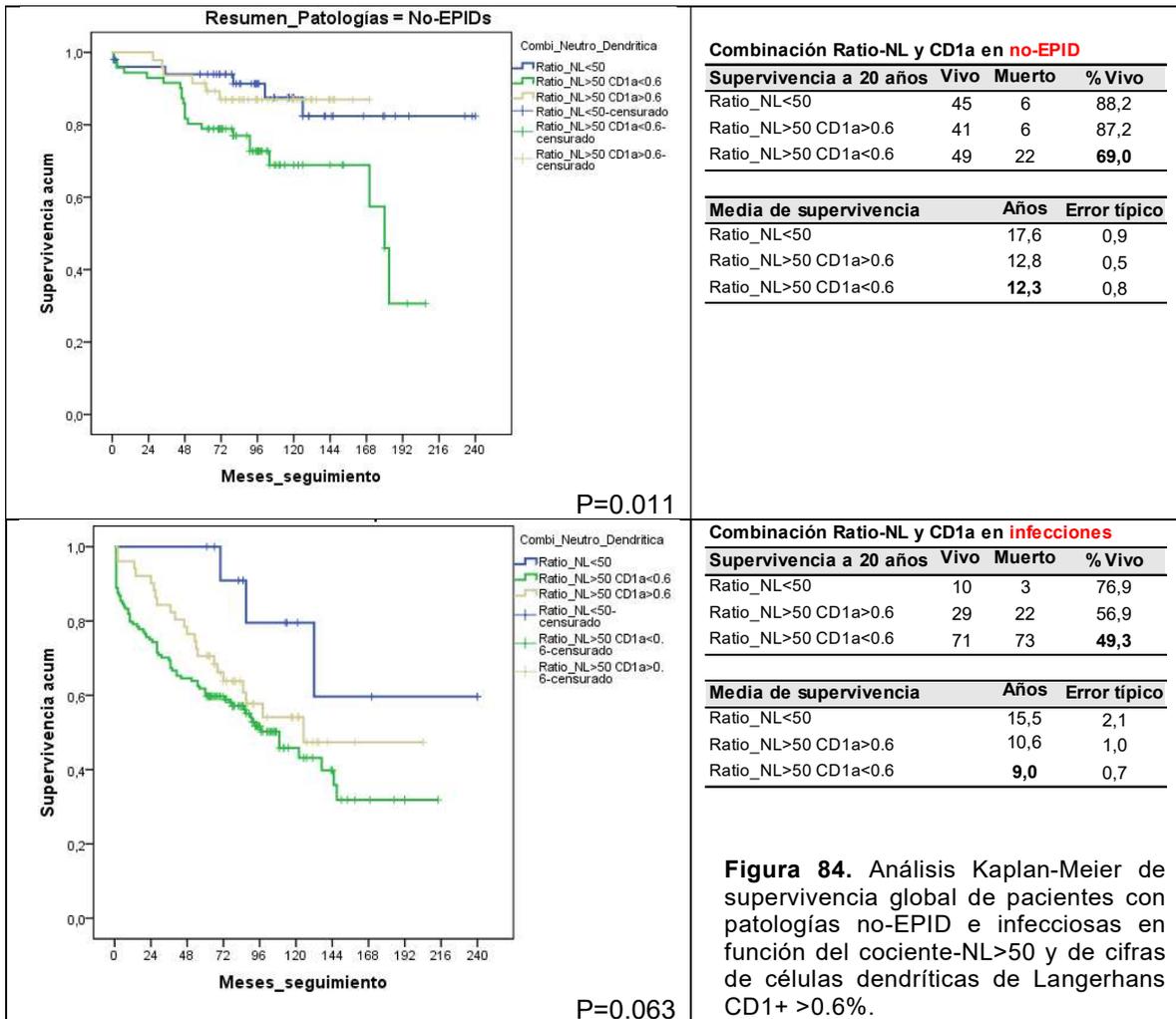


Figura 83. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con patologías no-EPID en función de cifras de células dendríticas de Langerhans CD1+ por encima o debajo del punto de corte establecido en el análisis de curva ROC (0.6%).

Dado que las células dendríticas CD1a+ parecían tener un carácter protector en los pacientes con patologías agudas, en los que no teníamos buenos marcadores pronóstico debido a las elevadas cifras de neutrófilos que dificultan la catalogación del riesgo del cociente-NL o la combinación-LN, se exploró la relación entre células dendríticas y neutrófilos. En la figura 83 se muestran los resultados de SG de pacientes con patología no-EPID (EPOC, asma, TBC y nódulos pulmonares) y de pacientes con patología infecciosa en función de cocientes-NL mayor o menor a 50 y de células dendríticas mayor o menor a 0.6%.

En este análisis en la parte superior de la figura 83, se puso de manifiesto que en pacientes con patologías no-EPID, cifras de células dendríticas elevadas (>0.6%) contrarrestaban el efecto negativo de cocientes-NL elevados (>50) y llevaban a tasas de SG a 20 años próximas a la de los pacientes con cocientes-NL<50 (87.2% y 88.2%) y superiores a las de los pacientes con cociente-NL>50 y células dendríticas <0.6% (69.0%, $p<0.011$).

En pacientes con patología infecciosas, ver parte inferior de la figura 84, las cifras de células dendríticas elevadas (>0.6%) sólo pudieron contrarrestar parcialmente el efecto negativo de cocientes-NL elevados (>50), llevando a tasas de SG más cercanas a la de los pacientes con cocientes-NL<50 (56.9% y 76.9%) que en los pacientes con cociente-NL>50 y células dendríticas <0.6% (49.3%, p<0.063).

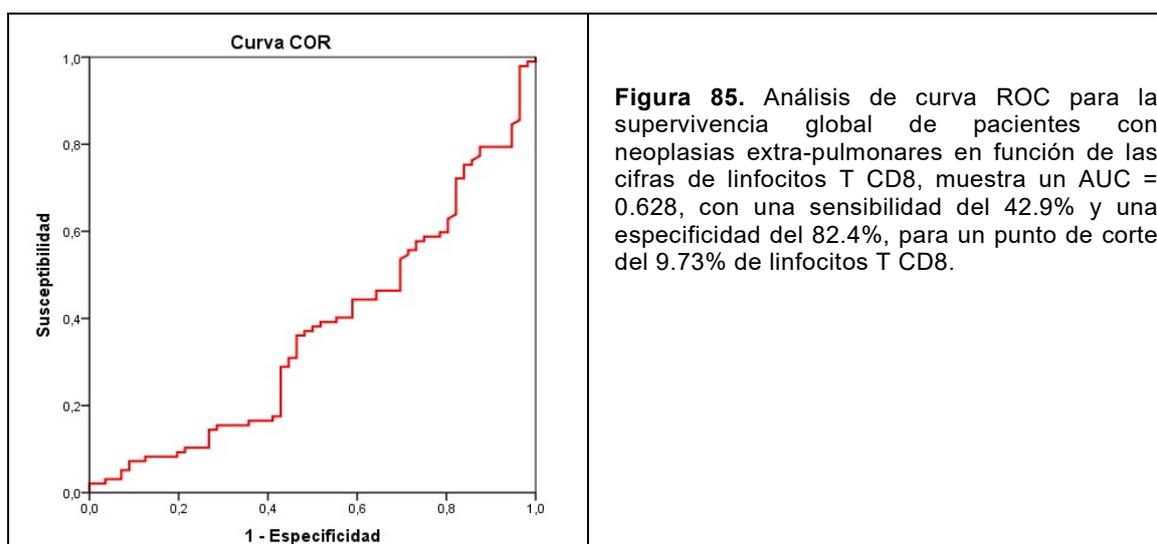


Aparentemente, y al igual que los linfocitos protegen en las patologías EPID del efecto nocivo de los neutrófilos, las células dendríticas de Langerhans parecían proteger del efecto nocivo de los neutrófilos infiltrantes en patologías no-EPID y parcialmente en patologías infecciosas.

5.9. Valor pronóstico del porcentaje de linfocitos T CD8 en pacientes con cáncer.

Se ha descrito que cifras elevadas de linfocitos T CD8 que infiltran el tejido tumoral se asocian a mejor supervivencia de pacientes con diferentes tipos de cáncer (220). Los linfocitos T CD8 tienen capacidad citolítica frente a los tumores. En este apartado investigamos el papel que representan los linfocitos T CD8 en la supervivencia de los pacientes con cáncer de nuestra serie.

Como se muestra en la figura 85, la curva ROC identificó un punto de corte de linfocitos T CD8 en 9.73% del total de células del LBA que tuvo valor pronóstico sobre la SG de pacientes con tumores extra-pulmonares, con una sensibilidad del 42.9% y una especificidad del 82.4%.



De nuevo, nos encontramos con un efecto desigual (en este caso contrario) entre los dos grupos de cáncer estudiados en esta tesis, ver figura 86. Por una parte, en los pacientes con carcinoma de pulmón cifras elevadas de linfocitos T CD8 se asociaban a peor tasa de SG a 20 años (10.0% vs. 26.7%, $p < 0.015$) que los que mostraban cifras por debajo del punto de corte. Por el contrario, en los pacientes con cáncer extrapulmonar cifras elevadas de linfocitos T CD8 se asociaban a mejor tasa de SG a 20 años (58.5% vs. 29.1%, $p < 0.002$) que los que tenían cifras por debajo del punto de corte. Por tanto, los pacientes con carcinoma de pulmón que presentaban cifras elevadas de linfocitos T CD8 tenían

supervivencias medias más cortas (1.7 vs. 4.6 años), mientras que los pacientes con tumores extrapulmonares tuvieron supervivencias medias más largas (10.9 vs. 6.8 años).

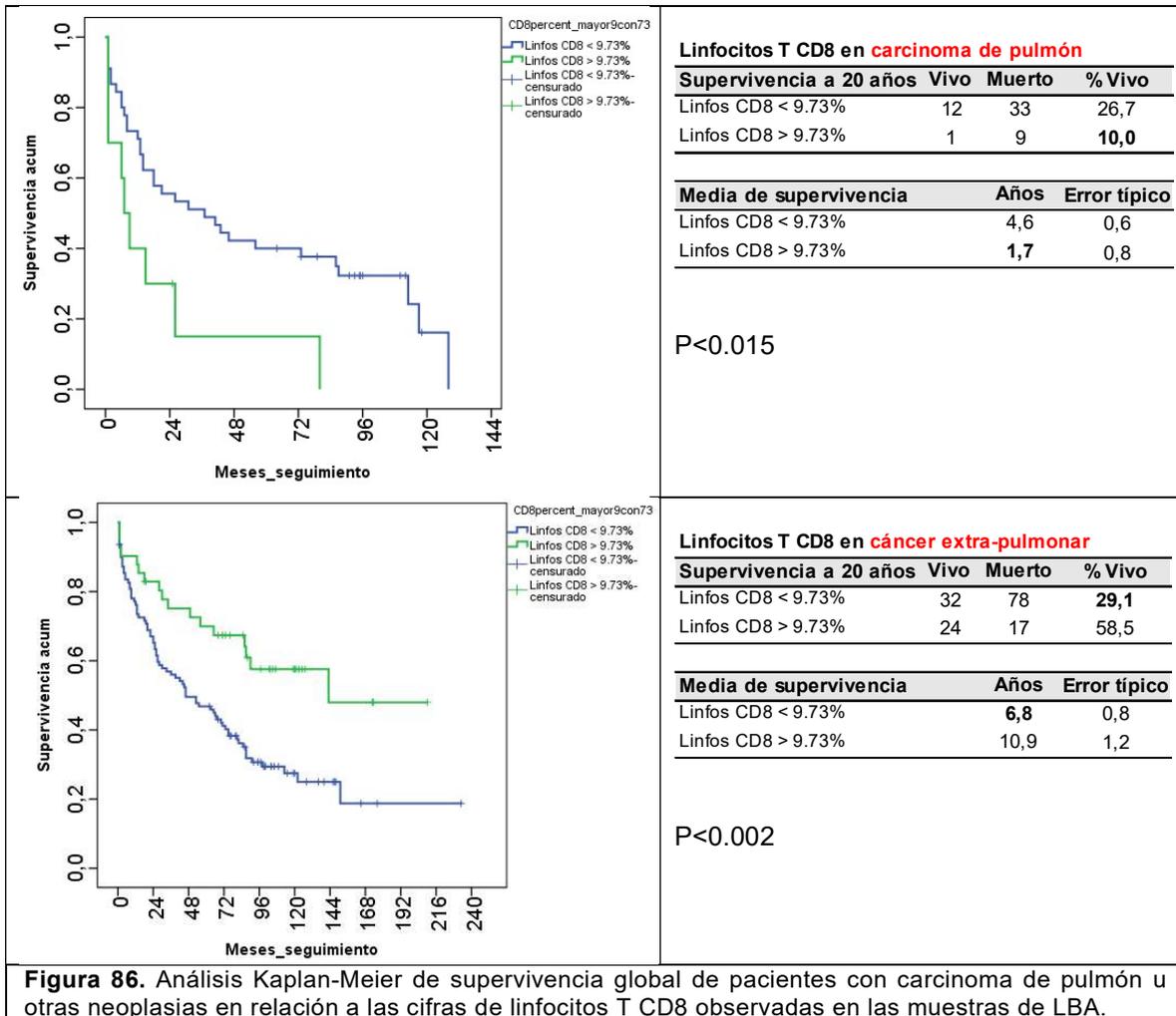


Figura 86. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con carcinoma de pulmón u otras neoplasias en relación a las cifras de linfocitos T CD8 observadas en las muestras de LBA.

6. Parámetros de valor pronóstico en grupos de pacientes con exposición a agentes orgánicos, inorgánicos y fármacos

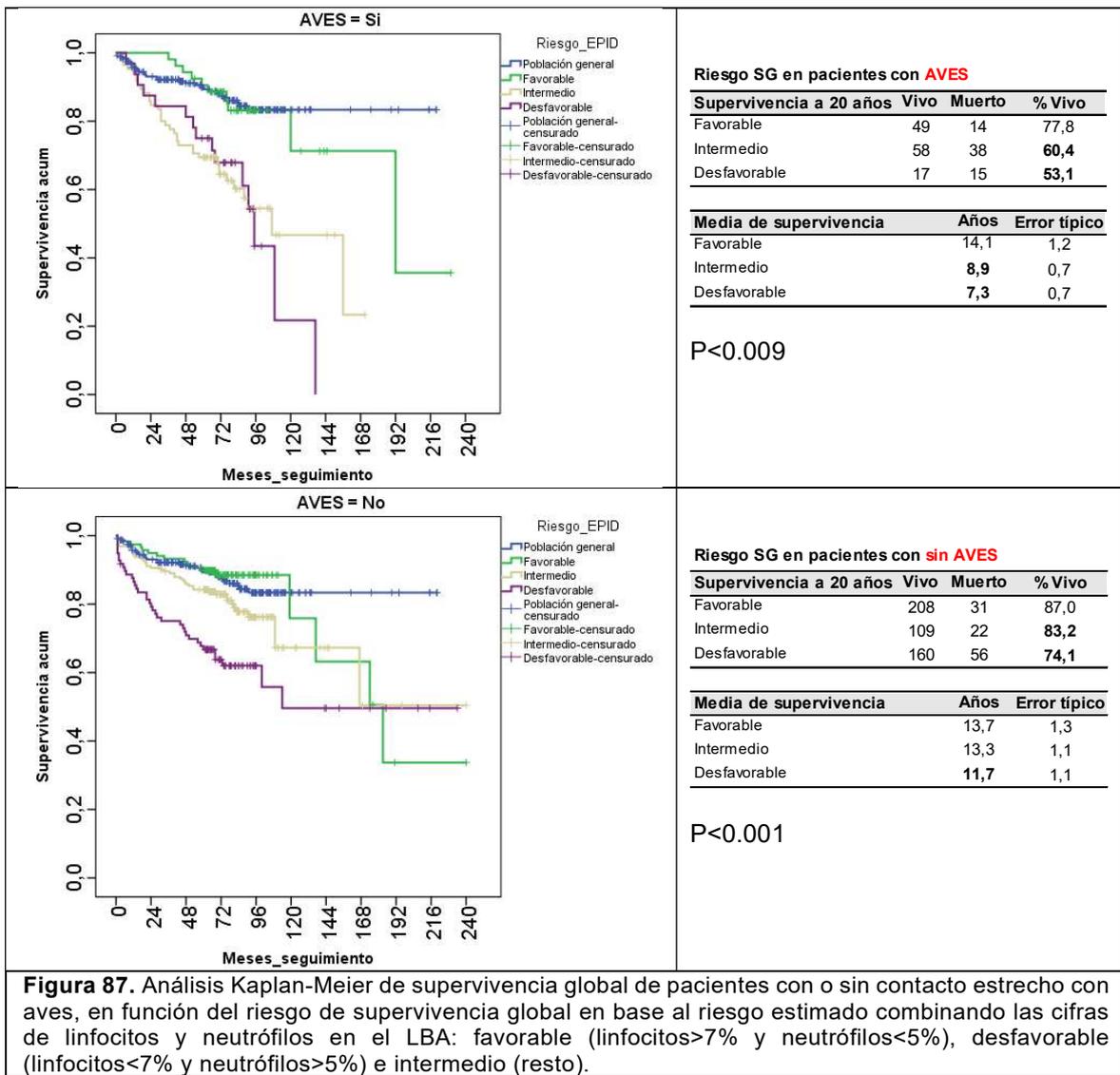
6.1 En pacientes con neumonitis por contacto habitual con aves.

Debido a la fuerte tradición del levante español a la cría y convivencia con distintas especies de aves, así como a la alta frecuencia de cría de aves de corral en el ámbito huertano de Murcia, consideramos conveniente para este trabajo evaluar la estimación del riesgo de SG en estos pacientes. En nuestra serie, excluyendo a los pacientes con cáncer, un 30% del total de pacientes tenían contacto habitual con aves (tabla 32).

Tabla 32. Frecuencia de contacto habitual con aves por patologías		
Patología	No	Si (%)
EPOC	20	7 (25,9%)
Asma	24	4 (14,3%)
TBC	2	0 (0%)
Nódulos pulmonares	2	1 (33,3%)
Sarcoidosis	35	8 (18,6%)
N. Hipersensibilidad	1	44 (97,8%)
NOC	24	4 (14,3%)
NIL (NIL-HIV)	9	3 (25%)
NIU	73	32 (30,5%)
BR-EPID	15	2 (11,8%)
NID	14	6 (30%)
NINE	62	26 (29,5%)
Neumoconiosis	14	1 (6,7%)
HPCL (H. Langerhans)	3	0 (0%)
EPID-Eosinofílica	7	0 (0%)
EPID-Inclasificable	30	7 (18,9%)
Infecciosas	39	18 (31,6%)
NIA	6	0 (0%)
Total	380	163 (30%)

Aunque se han identificado más de 300 desencadenantes de la NH, entre ellos las actividades agrícolas, manipulación de aves y contaminación del agua, el grupo NH presentó una exposición y contacto con aves que se elevó hasta el 97.8%. Además, se encontraron proporciones elevadas de casos en contacto con aves en pacientes con EPOC, NIU, NINE y patologías infecciosas (posiblemente derivadas de NH sobreinfectadas).

En la figura 87, la estimación del riesgo de SG de la combinación-LN, permitió identificar pacientes en contacto con aves que tenían SG a 20 años similar/cercana a la de la población general (77.8% vs. 87.0) cuando presentaban un pronóstico favorable (linfocitos > 7% y neutrófilos < 5%).



Queremos destacar que los pacientes con riesgo intermedio en la combinación-LN mostraron tasas de SG a 20 (60.4% vs. 83.2%, p=0.023) y supervivencias medias (8.9±0.7 vs. 13.3±1.1 años) más cortas cuando tenían contacto habitual con aves que cuando no lo tenían, se muestra en la figura 88. De hecho, como se puede ver en la figura 87 las curvas de supervivencia de los pacientes con pronóstico intermedio y desfavorables en la combinación-LN eran muy similares en los pacientes en contacto habitual con aves, mientras que, en ausencia sin ese contacto, los pacientes del grupo intermedio tenían curvas de supervivencias más próximas a los casos de pronóstico favorable.

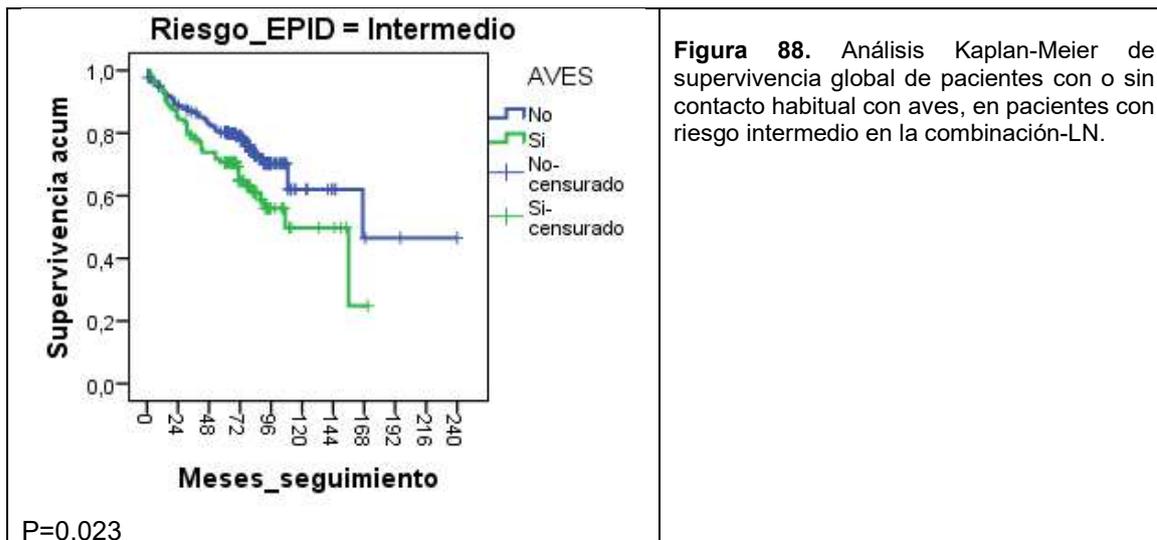


Figura 88. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con o sin contacto habitual con aves, en pacientes con riesgo intermedio en la combinación-LN.

6.2. En pacientes con neumonitis por fármacos.

Otra patología en la que el pronóstico de la combinación-NL puede identificar pacientes con buena evolución clínica. Es en los pacientes con neumonitis inducida por fármacos, en donde pacientes con pronóstico favorable tenían SG a 20 años similar a la de la población general (83.3% vs. 87.0%). Además, en esta patología parecía tener cierto valor pronóstico las cifras de células dendríticas, que parecían favorecer mejor evolución de la enfermedad, con SG a 20 años más elevadas en los casos con cifras de células dendríticas de Langerhans > 0.6% (76.5% vs. 60.4%, $p=0.224$). Ver figura 89.

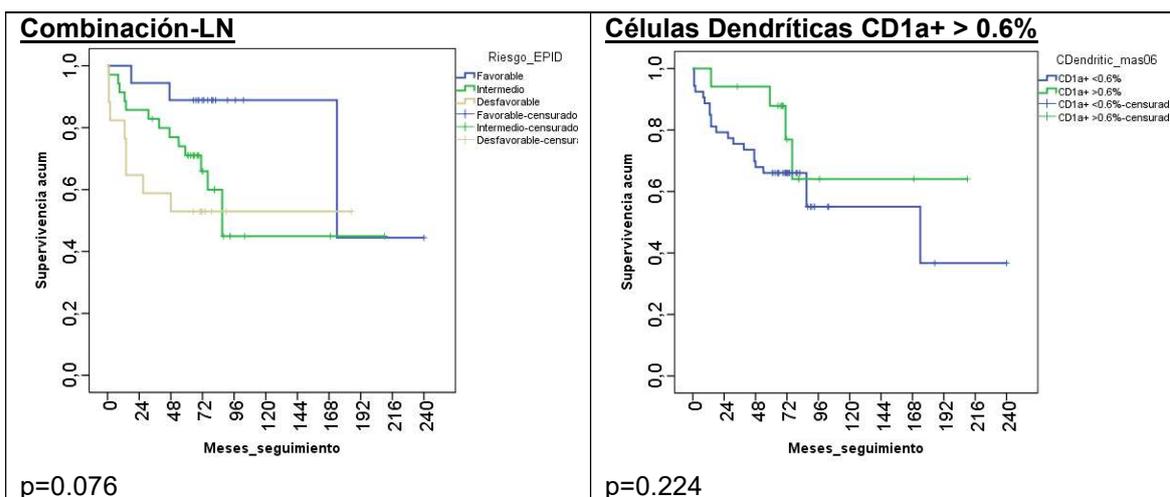
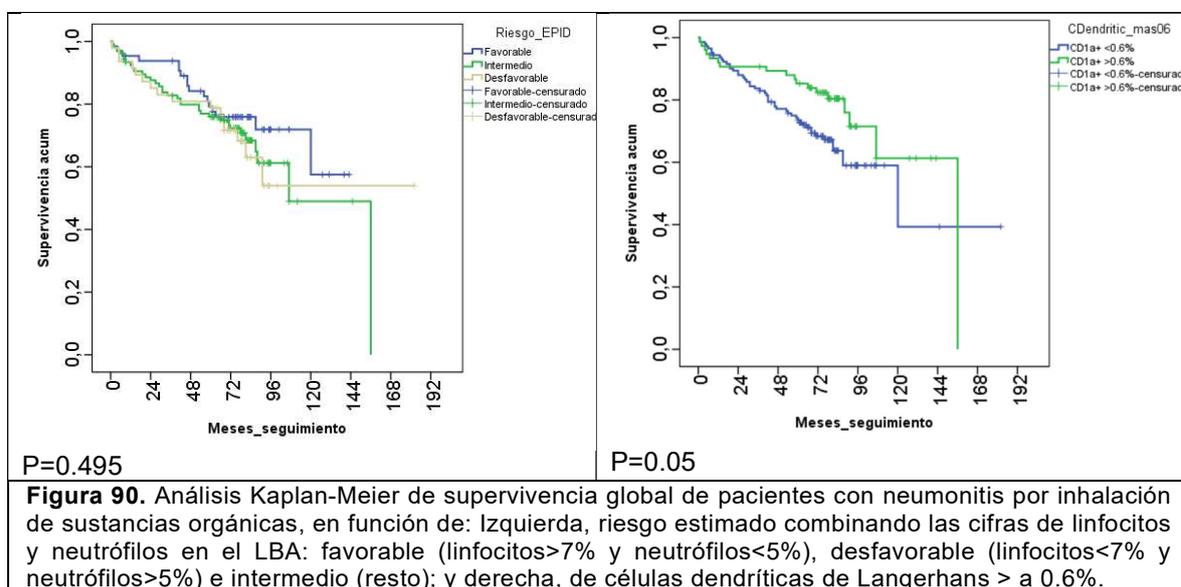


Figura 89. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con neumonitis por fármacos, en función de: izquierda, riesgo estimado combinando las cifras de linfocitos y neutrófilos en el LBA: favorable (linfocitos > 7% y neutrófilos < 5%), desfavorable (linfocitos < 7% y neutrófilos > 5%) e intermedio (resto); y derecha, de células dendríticas de Langerhans > 0.6%.

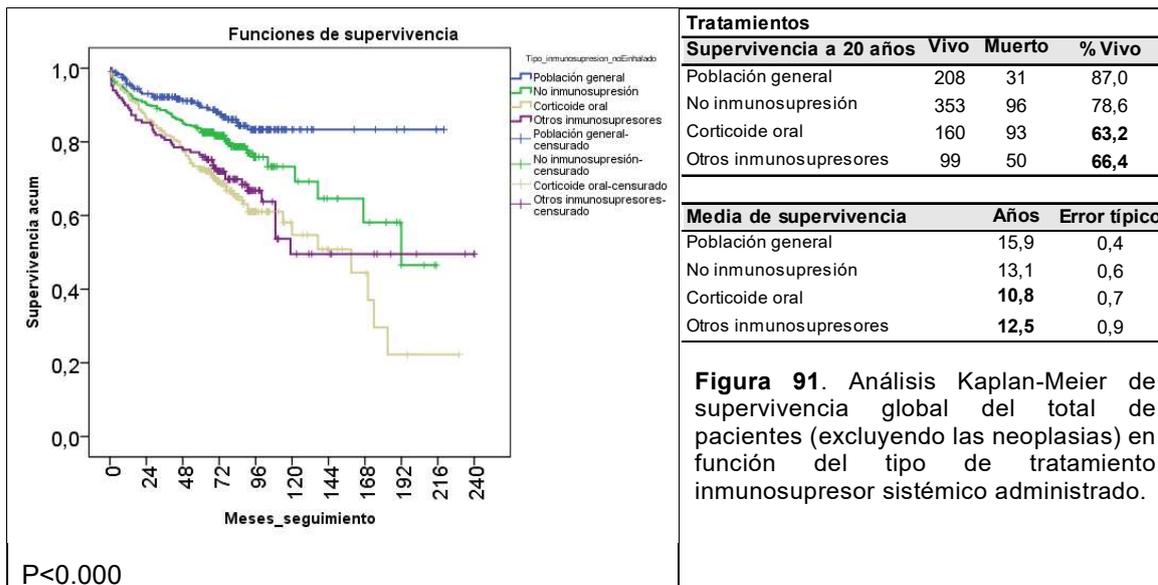
6.3. En pacientes con neumonitis por inhalación sustancias orgánicas

Al contrario que en la neumonitis inducida por fármacos, en la inducida por inhalación de sustancias orgánicas, la estimación del riesgo de la combinación-LN no parecía aportar valor pronóstico sobre la SG de estos pacientes, como se muestra en la figura 90. Sin embargo, en esta patología parecía tener cierto valor pronóstico las cifras de células dendríticas, que parecían apoyar cursos más favorables de la enfermedad, con SG a 20 años más elevadas en los casos con cifras de células dendríticas de Langerhans > 0.6% (76.0 vs. 65.7%, $p=0.05$).

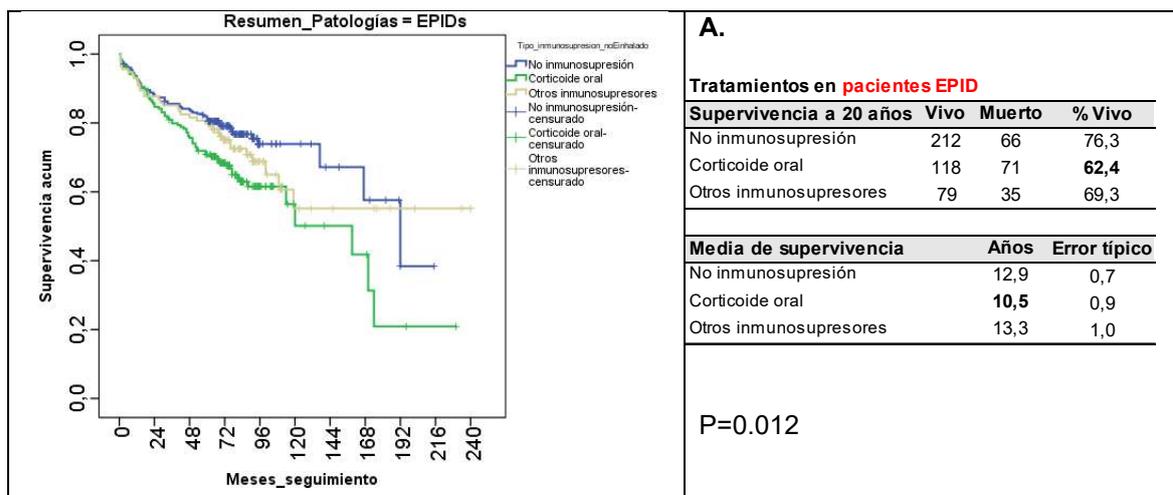


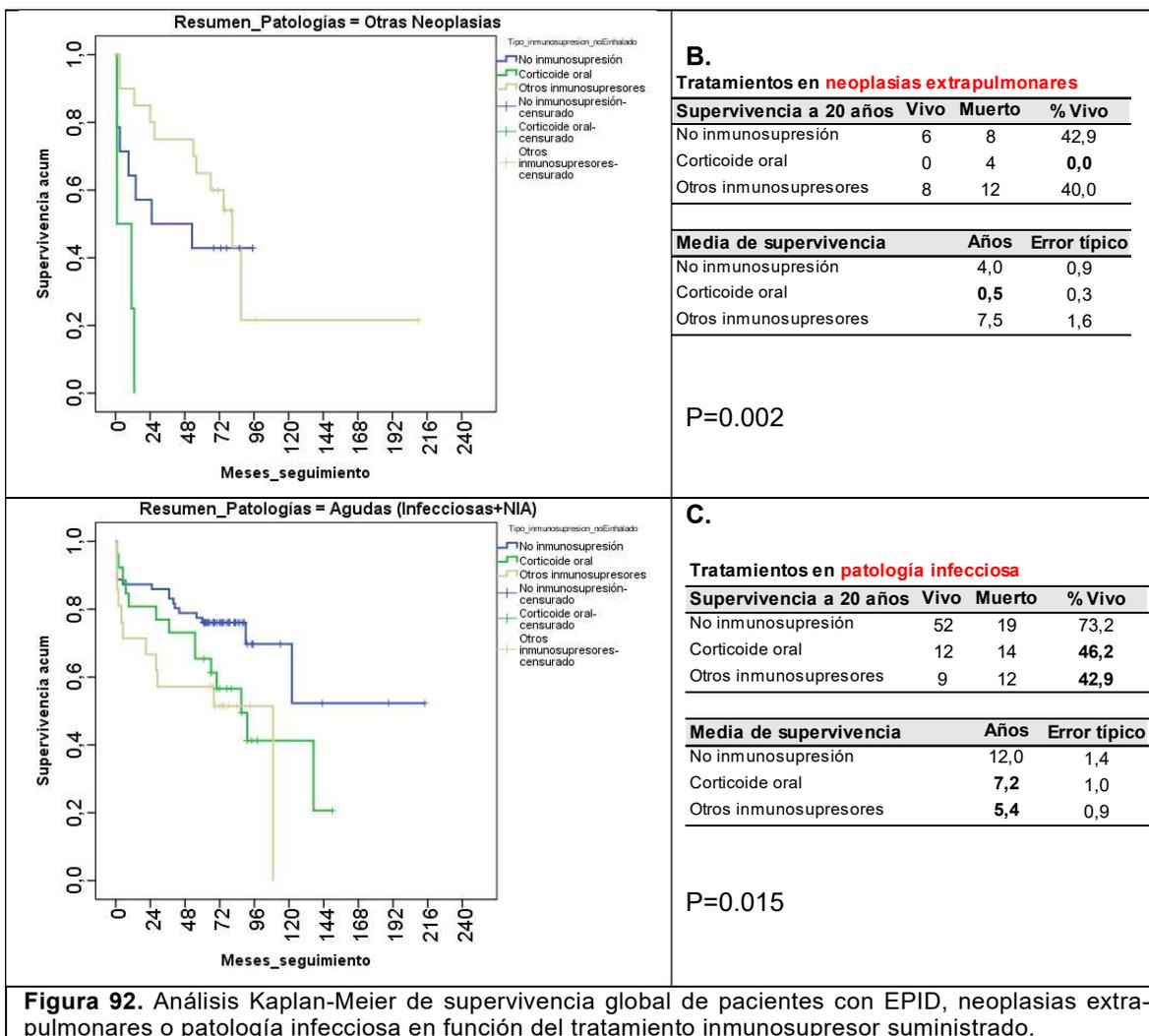
7. La tasa de neutrófilo puede ayudar en la personalización de las terapias

En primer lugar, se evaluó la SG del total de pacientes (excluyendo los carcinomas de pulmón) de acuerdo con el tratamiento inmunosupresor sistémico administrado, ver figura 91. Los pacientes sin terapia inmunosupresora representaron el grupo con mejor supervivencia (más próxima a la de la población general, 78.6% vs. 87.0% a 20 años) al tratarse de pacientes en estadio más leves de la enfermedad. En general, la inmunosupresión sistémica con corticoides mostro tasas de SG a 20 años similares al de otros inmunosupresores como micofenolato, rituximab, metotrexato, abatacept (63.2% vs. 66.4%).



Sin embargo, este comportamiento fue desigual entre las diferentes patologías. En patologías EPID los pacientes tratados con otros inmunosupresores, ver figura 92.A) presentaron mejor SG a 20 años (69.3% vs. 62.4%, $p=0.012$) que los tratados con corticoides orales. Igualmente, en la figura 92.B los pacientes con neoplasias extrapulmonares, que recibieron tratamiento con inmunosupresores no-corticoides mostraron mejor SG a 20 años que los tratados con corticoides (40% vs. 0%, $p=0.015$). Por el contrario, los pacientes con patologías infecciosas tratados con inmunosupresores no-corticoides, ver figura-92.C) mostraron peor SG a 20 años que los tratados con corticoides (42.9% vs. 46.2%, $p=0.015$).





Por otra parte, al evaluar el impacto de los tratamientos Inmunosupresores (corticoides sistémicos y otros grupos de inmunosupresores) en la SG, se encontraron diferencias a partir de un punto de corte del 10% de neutrófilos, mostrando diferencias entre ambos grupos de tratamiento como se observa en la figura 93. En pacientes con porcentaje de neutrófilos menores al 10% el tratamiento con inmunosupresores no-corticoide mostró tasas de SG a 20 años superiores (79,4%, p=0,045) a la de los tratados con corticoides (66,4%) y similar a la de pacientes sin tratamiento inmunosupresor (77,1%). Sin embargo, en pacientes con porcentajes de neutrófilos superiores al 10%, la SG a 20 años de ambos tratamientos fue comparable (52,7% y 54,3%) y muy inferior a la de los pacientes sin tratamiento inmunosupresor (72,7%, p=0,063).

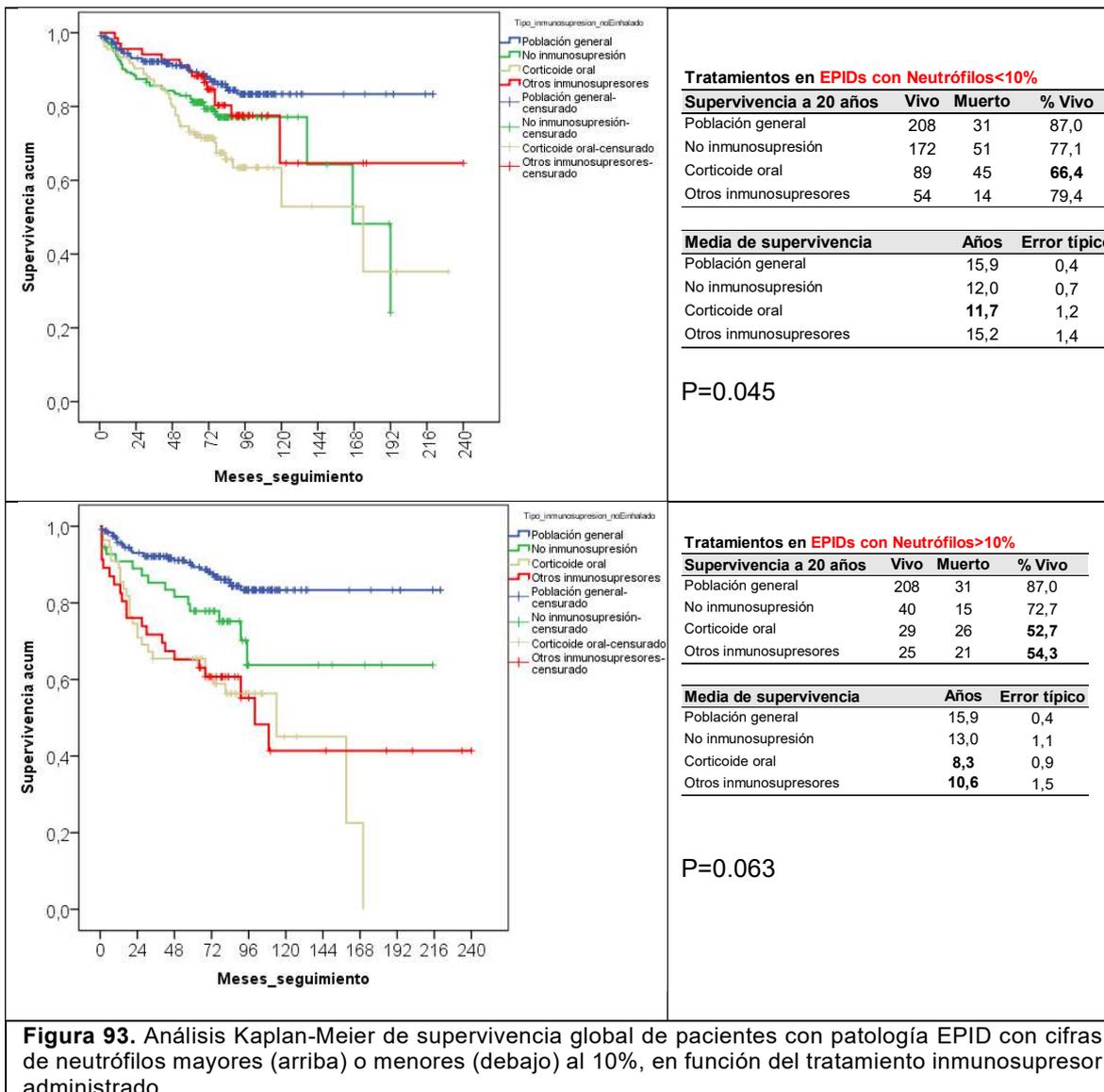


Figura 93. Análisis Kaplan-Meier de supervivencia global de pacientes con patología EPID con cifras de neutrófilos mayores (arriba) o menores (debajo) al 10%, en función del tratamiento inmunosupresor administrado.

DISCUSIÓN

1. Acerca de las aportaciones de este estudio de tesis

Con el objetivo de evaluar la utilidad de la citometría de flujo en el análisis del contenido leucocitario del LBA de pacientes con patología pulmonar, se analizó de forma prospectiva una cohorte de sujetos amplia, heterogénea y distribuida a lo largo del territorio de la Región de Murcia, disponible en la Unidad de Citometría del Hospital Clínico Virgen de la Arrixaca. La relevancia de nuestro estudio radica en los siguientes aspectos:

- 1) Es el estudio descrito con mayor número de casos en el que se analice LBA por citometría de flujo en las patologías pulmonares más prevalentes (40,42,48,50,67,74–76,122,208,221–234).
- 2) Ha permitido realizar un acercamiento a los datos epidemiológicos de las enfermedades pulmonares a nivel regional, inéditos hasta el momento.
- 3) Ha permitido establecer valores de normalidad de las diferentes subpoblaciones leucocitarias en sujetos sin patología pulmonar determinadas mediante citometría de flujo, para una mejor valoración de las desviaciones observadas en pacientes con patologías EPID y no-EPID.
- 4) Ha permitido evaluar la utilidad del recuento leucocitario del LBA para el diagnóstico de las diferentes patologías pulmonares.
- 5) Ha permitido establecer con exactitud el impacto en la supervivencia global (SG) de los pacientes de las patologías pulmonares más prevalentes en nuestra región.
- 6) Ha permitido establecer parámetros de utilidad pronóstica en diferentes patologías, que nos ayudaran a guiar terapias personalizadas y evaluar la eficacia de los diferentes tratamientos.

2. Acerca de la configuración de los grupos de estudio

Para poder evaluar la utilidad de la citometría de flujo en el diagnóstico de las diferentes patologías pulmonar, se hace preciso la correcta configuración de los grupos de estudio, y sobre todo la correcta catalogación diagnóstica de los pacientes a incluir en cada grupo de

patologías. Tal y como hemos descrito en pacientes y métodos, el diagnóstico primario se recogió del veredicto emitido por el comité médico y/o especialista al cargo, acorde con las guías de la ATS/ERS. Sin embargo, una de las principales limitaciones con la que se ha enfrentado este estudio de tesis, ha sido la gran heterogeneidad de los datos obtenidos, provocada por la participación de múltiples equipos clínicos (neumólogos, internistas, reumatólogos, etc.) y diagnósticos (radiólogos y anatomopatólogos) de cada uno de los hospitales de la Región de Murcia. Aunque el diagnóstico definitivo de las patologías pulmonares se realiza de forma colegiada, este se ve muy influenciado por la calidad de los resultados obtenidos en las pruebas de imagen, funcionales y anatomopatológicas. Estas pruebas no se realizaban por igual en todos los centros o no se solicitan por igual por todos los especialistas. Además, el detalle y/o la precisión en el informe generado por los radiólogos y anatomopatólogos no solo mostraba gran variabilidad intercentro, sino que incluso se pudo observar elevada variabilidad en los informes emitidos entre los facultativos del mismo centro. Por ejemplo, con demasiada frecuencia los informes de los anatomopatólogos se limitan a descartar la presencia de células tumorales, sin enumeran ni describir las poblaciones leucocitarias presentes en el LBA, o solo alguna de ellas. No obstante, sus informes son “imprescindibles” pues algunas de las características que describen son, per se, patognomónicas en algunas patologías, por ejemplo, la presencia de macrófagos alveolares PAS y su correlación con proteinosis alveolar, y otras entidades clínicas como el reflujo gastroesofágico. De la misma forma que los hallazgos radiológicos pueden aportar datos cruciales en el diagnóstico de una EPID, como la presencia de placas pleurales en la radiografía de tórax de pacientes con beriliosis. A pesar de los esfuerzos por estandarizar el diagnóstico radiológico la variabilidad de criterios entre los especialistas en radiológica en la evaluación de la TACAR denota la necesidad de profesionales especializados en la interpretación de la EPID en cada área de salud. Aunque está mejorando, con frecuencia, los informes de la TACAR no aportan más información de la ya descrita en la radiografía de tórax. En ambas situaciones hace patente la necesidad de la designación de profesionales especializados en el análisis de este tipo de muestras y patologías.

Por otra parte, algunos pacientes tuvieron su primer análisis de citometría de flujo del LBA en el entorno de un ingreso en urgencias, debido a exacerbaciones de la enfermedad primaria causada por procesos infecciosos. Sin embargo, los resultados del análisis microbiológico no se podían conocer hasta superar el periodo de incubación de los cultivos. Por ello, habitualmente el resultado que se reflejaba en el juicio clínico del informe correspondiente al ingreso se correlacionaba con la enfermedad de base, reflejando en la

historia clínica la sospecha diagnóstica de una posible infección que motivó la realización del LBA (aunque no siempre estaba claramente constatado), lo que llevó a búsquedas sucesivas para conocer el diagnóstico definitivo.

Todo ello ha hecho que fuera necesario la reevaluación del diagnóstico de todas y cada una de las muestras incluidas en el estudio. Este trabajo fue supervisado por los Dr. Ros y Minguela, directores de este estudio de tesis.

Por otro lado, aunque el objetivo principal de esta tesis fue evaluar la utilidad de la citometría de flujo en la patología EPID, era de esperar que siendo el LBA una técnica que está indicada para el estudio de otras enfermedades como infecciones o neoplasias, entre otras, se detectaron muestras correspondientes a otros grupos no-EPID. El interés clínico manifestado por diversos compañeros y principalmente por el Dr. Ros, nos llevó a incluir diversos grupos de patologías, distribuidas entre patologías EPID y No-EPID, dicha separación estuvo sustentada en la bibliografía disponible y a partir de cada grupo, surgieron nuevos subgrupos.

Grupo control de supervivencia poblacional: Aunque se sabe que la patología EPID de predominio fibrosante tiene un importante impacto negativo en la calidad de vida y en la supervivencia global (SG) de estos pacientes, es difícil encontrar estudios en que la merma de la esperanza de vida se evalúe y compare con la de la población sana del mismo territorio de los pacientes. Para este fin, se incluyó un grupo control de supervivencia poblacional que, en nuestro caso, consistió en una serie de sujetos con gammapatía monoclonal de significado incierto, sin marcadores de mal pronóstico (información disponible en el grupo de Inmunología IMIB-Pascual Parrilla (205). Este grupo constituido por pacientes sin patología pulmonar se ha revelado de una importancia crucial para tener una estimación de la supervivencia de la población sana a la que poder comparar la supervivencia de las diferentes patologías EPID y NO-EPID de nuestro estudio, valorar los parámetros pronósticos, determinar cuál de ellos presenta mayor impacto en la SG de los pacientes, e identificar los pacientes con supervivencia comparable a la población sana y por lo tanto de mejor pronóstico. De hecho, gracias a este grupo control, se han identificado marcadores de valor pronóstico entre los componentes celulares del LBA medidos mediante citometría de flujo y, por tanto, con elevada precisión cuantitativa, que permite identificar pacientes con patología EPID con riesgo bajo (SG comparable a la población sana), medio y alto (SG muy disminuida).

Grupo control de BAL no patológico: En segundo lugar, se incluyó un grupo control LBA no patológico cuyas muestras procedían de pacientes que a lo largo de varios años de seguimiento no presentaron evidencias clínicas de enfermedad EPID u otro tipo de patología pulmonar. La indicación de la broncoscopia y LBA en estos casos fue ocasionada por condiciones clínicas que motivaron la realización del LBA con fines diagnósticos. Entre las causas más frecuentes fueron la AOS o la hemorragia pulmonar. Este grupo se incluyó en la serie por su utilidad para establecer las cifras de normalidad mediante citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones leucocitarias en LBA normales. Resultados de gran relevancia, pues son pocas las series descritas (ver más adelante) en las que la citometría de flujo se utiliza para la cuantificación de las diversas líneas leucocitarias presentes en el LBA, ya que el análisis citopatológico continúa siendo en “gold standard” en la mayoría de los centros. Como unidad de referencia regional, estos datos están siendo de gran utilidad, ya que nos han permitido establecer los rangos de normalidad de las diferentes subpoblaciones leucocitarias en el LBA y, por tanto, una mejor valoración de las desviaciones del patrón normal en las diferentes patologías.

Aunque las cifras de normalidad de los componentes celulares del LBA han sido descritas fundamentalmente mediante estudio citológico. La publicación de Yamada en 1986 citada en el estudio de Reynolds establece, a partir de la evaluación mediante citometría de flujo de las poblaciones linfocitarias del LBA, que el porcentaje de linfocitos T CD3+ era un 13.8%, los T CD4+ un 6.26%, los T CD8+ un 3.5% y los linfocitos B CD19+ un 5.3%, con un cociente CD4/CD8 de 1.9 (234). Estos datos son bastante similares a los descritos en nuestra serie, en la que los linfocitos T CD3+ son 6.46%, CD4+ 2.84% y CD8+ 2.53%, con un cociente CD4/CD8 de 1.4. No obstante, aunque parecidas, las cifras de nuestra serie son aproximadamente la mitad a las descritas por Yamada, esto puede ser debido a diferentes factores, entre ellos que nuestros pacientes efectivamente no eran controles sanos, sino principalmente pacientes con AOS o con hemorragias alveolares, o bien a que los protocolos de análisis de los resultados de citometría fueran diferentes. En este sentido, hay que tener en cuenta que nuestro protocolo de análisis no excluye las células muertas y, por tanto, al incluir células muertas como neutrófilos y macrófagos alveolares, es posible que las cifras de linfocitos se hayan visto reducidas respecto a los valores descritos por Yamada. De hecho, nuestros datos están próximos a los valores de linfocitos descritos en la guía de la ATS (American Thoracic Society) para sujetos sanos determinados mediante estudio citopatológico (Meyer et al., 2012),(3), que describen una media de 8.9% linfocitos. En este estudio, además dan un valor promedio de neutrófilos de 1.53% y de 0.28% de eosinófilos, muy similares a los descritos por nosotros 2.12% y 0.39%, respectivamente.

Por tanto, aunque nuestro grupo de LBA control sin patología pulmonar no eran sujetos estrictamente sanos, los valores de subpoblaciones leucocitarias obtenidas parecen estar en los rangos esperados en los sujetos sanos. Estos datos nos han permitido establecer rangos propios de normalidad de cada una de las poblaciones leucocitarias, y están siendo utilizados actualmente como valores de referencia en los informes de citometría emitidos en el análisis de muestra LBA.

Grupo de pacientes no-EPID: Entre los pacientes no-EPID, las patologías más representadas en nuestra serie de LBAs fueron patologías de alta prevalencia como la EPOC y el asma. Algunos sujetos presentaban antecedentes de TBC tratada y resuelta y otros pacientes en los que el único dato relevante recogido en la historia clínica era la presencia de nódulos pulmonares, a quienes se realizó broncoscopia con LBA para descartar patología pulmonar o neoplásica. En cualquier caso, los resultados obtenidos en el estudio de citometría del LBA en estas patologías han tenido menor relevancia, tanto en el diagnóstico, pues la mayoría cursan con patrones leucocitarios casi normales, con predominio de neutrófilos. En estos grupos, además, los parámetros con mayor valor pronóstico en los pacientes EPID tampoco demostraron utilidad, por lo que no se abordará una discusión de estos resultados.

Igualmente, los pacientes con cáncer estuvieron bien representados en nuestra serie. En la búsqueda de las causas y los síntomas asociados a enfermedades del tracto respiratorio que llevan a la realización de LBA, se ha descrito que es el cáncer de pulmón uno de los más frecuentes y mortales a nivel mundial (226). De acuerdo con las afirmaciones de Meyer, el análisis celular del LBA por sí solo es insuficiente para diagnosticar las enfermedades intersticiales de pulmón, excepto en las neoplasias malignas y algunas patologías raras de pulmón (3). Por este motivo el LBA continúa siendo una técnica utilizada en pacientes con sospecha de neoplasias de pulmón. Sin embargo, nuestros resultados muestran que, en relación al diagnóstico, el recuento de leucocitos mediante citometría de flujo no aporta información relevante, ya que el patrón celular asociado es similar al del pulmón sano, aunque con un ligero incremento de todas las células inmunitarias no macrofágicas. Sin embargo, se han encontrado resultados interesantes en relación a la capacidad pronóstica de algunas subpoblaciones celulares, concretamente los linfocitos T CD8+, que discutiremos más adelante.

Por otro lado, nos encontramos con un grupo nutrido de pacientes con cáncer extrapulmonar, mayoritariamente de origen hematopoyético o linfoide, que en su gran mayoría terminan desarrollando enfermedades pulmonares debido a reacciones adversas

a la quimioterapia o la inmunosupresión concomitante al trasplante de médula ósea. Sólo una quinta parte de estos pacientes en nuestra serie presentaban metástasis pulmonares. Algunos casos presentaron infecciones pulmonares, pero estos casos se incluyeron en el grupo de patologías infecciosas. Por tanto, la gran mayoría eran pacientes con patología neoplásica que no presentaban infecciones ni metástasis pulmonares, y, por tanto, se correspondían principalmente con patologías pulmonares tipo EPID, algunos tipo NIA, con cifras de neutrófilos elevadas, pero no tan altas como las observadas en las infecciones. Es quizás por ese motivo que los marcadores pronósticos se comporten en estos pacientes de forma más parecida a como lo hacen en los pacientes EPID, que como lo hacen en pacientes con cáncer primario de pulmón. Como discutiremos más adelante, es sorprendente que cifras elevadas de linfocitos totales o de linfocitos T CD8+ se asocien a buen pronóstico en pacientes EPID en general y en pacientes EPID con tumores extrapulmonares, mientras que se asocian a mal pronóstico en pacientes con cáncer primario de pulmón. Esto sugiere que los mecanismos involucrados en la respuesta inmunitaria que desencadena la patología pulmonar son diferentes en la EPID y el cáncer de pulmón, pero esto deberá ser investigados en proyectos diseñados específicamente.

Grupos EPID: Como se ha mencionado de manera reiterada, este fue el grupo principal al que se dirigió nuestro estudio. Siguiendo las recomendaciones de la ATS/ERS, los pacientes se dividieron en grupos de acuerdo con la clasificación propuesta por el comité multidisciplinar internacional de las neumonías intersticiales idiopáticas (2). Sin embargo, dos grupos de patologías importantes en dicha clasificación no pudieron ser evaluados en nuestra serie. Por un lado, los pacientes con EPID-ETC no pudieron ser englobados como grupo propio por diversas causas, la principal es que de acuerdo a los protocolos de trabajo de los grupos actuales las EPID-ETC y ETC, una vez diagnosticadas no requieren de la realización de pruebas invasivas como el LBA (140,235) , por ello esta patología estuvo infrarrepresentada en nuestra serie. Por otro lado, algunos de los pacientes con EPID-ETC se distribuyeron en los diferentes grupos de neumonías intersticiales según el patrón radiológico y/o juicio emitido por el clínico. Tal y como describe el estudio retrospectivo de Oldham et al (236), en nuestra serie las ETC se encontraban distribuidas principalmente entre los casos de NINE, NIU, NOC y NIL.

Por otro lado, tampoco pudo establecerse un grupo de pacientes con patología EPID asociada a fármacos o radioterapia, en parte debido a su baja prevalencia, escasez de datos y diversidad de fármacos detectados. De manera que en general, estos casos se incluyen dentro del grupo NIL. Los fármacos relacionados con esta patología dentro de la

serie fueron en primer lugar la amiodarona, seguido de los betabloqueantes, metotrexato, rituximab, isoniazida, nitrofurantoina, ciclofosfamida, triptizol y paroxetina.

Las patologías menos frecuentes como linfangioleiomiomatosis (LAM), proteinosis alveolar, microlitiasis alveolar o EPID asociadas a enfermedades hereditarias no fueron incluidas en esta tesis por no disponer de casos suficientes para establecer grupos propios. La amiloidosis no fue incluida por pertenecer al grupo de enfermedades hematológicas, que se estimó presentaban alteraciones no comparables con el resto de los grupos en el LBA.

La NH se reunió en un único grupo amplio, sin diferenciar por el agente causal, dada la dificultad para establecer su relación directa en cada caso. Tampoco se ha realizado una discriminación entre las formas agudas, subaguda y crónica, dato raramente reflejado en las historias clínicas. No obstante, si han sido muy frecuente los pacientes en contacto profesional o aficionado con aves, lo que nos ha permitido establecer la utilidad de los valores pronóstico en estos casos, como veremos más adelante.

El grupo de patologías pulmonares asociadas a neumoconiosis (silicosis, asbestosis, antracosis o beriliosis) se han considerado de forma conjunta, ya que las dos últimas son raras y, las dos primeras, aunque más frecuentes, no permitían hacer estudios estadísticos adecuados por separados.

El grupo sarcoidosis incluyó pacientes con manifestaciones clínicas e histopatológicas compatibles con esta enfermedad. La sarcoidosis es una enfermedad de presentación relativamente temprana (segunda o tercera década de vida) que tiene 4 estadios bien diferenciados, siendo el grado IV el que evoluciona a patrones fibróticos pulmonares con mayor probabilidad. Para la inclusión de estos pacientes en el grupo de esta tesis, nos hemos encontrado con diversas dificultades, la principal es que no siempre se reflejaba en las historias clínicas el estadio de la enfermedad, de manera que los casos con estadios más tempranos podían presentarse sin grandes alteraciones en el perfil celular del cociente CD4/CD8. Por otro lado, los anatompatólogos en ocasiones describen lesiones de aspecto sarcoideo, que no siempre se asocian a sarcoidosis. En algunos casos nos hemos encontrado con pacientes sin rasgos clínicos o evolutivos o patrones celulares típicos de sarcoidosis que estaban catalogados en las historias clínicas como "sarcoidosis". Cuando la evidencia de una clasificación incorrecta era muy clara, estos casos fueron excluidos. En otros casos, eran pacientes que presentaban cuadros infecciosos que terminaron siendo incluidos en el grupo de infecciones.

Para definir apropiadamente el grupo de eosinofilia pulmonar fue necesario el análisis retrospectivo de algunas de muestras, pues en algunos casos se habían identificado neutrófilos erróneamente como eosinófilos, dada la complejidad que veces existe para diferenciar los neutrófilos de los eosinófilos, particularmente en los paneles de estudio realizados con citómetros de menor resolución. Con la mejora de la citometría, actualmente es inequívoca la identificación de los eosinófilos, y por tanto más probable identificar correctamente este tipo de patologías.

El grupo EPID-inclasificables representa el 10% de las EPID en algunas series, atribuyéndose la dificultad del diagnóstico a la imposibilidad de realizar una biopsia quirúrgica que permita establecer el diagnóstico definitivo como consecuencia del alto riesgo quirúrgico (134). En nuestra serie se incluyeron en este grupo 80 casos de los 726 EPIDs (11.02%), y por tanto en la línea de otros estudios.

Grupos de patología pulmonar aguda: En este grupo se encuadraron pacientes que, por su presentación clínica abrupta, generalmente requirieron ser atendidos en urgencias. Posteriormente no pudieron ser encuadrados en ninguna de las patologías EPID o no-EPID descritas arriba. Igualmente, el grupo de las infecciones también incluía pacientes que con patologías EPID o no-EPID conocidas, que presentaban exacerbaciones de sus patologías debido a procesos infecciosos pulmonares. Fueron incluidos en el grupo de infecciones al tratarse de una situación clínica y analítica ajena a la situación basal del sujeto, y que por tanto podrían enmascarar el verdadero contenido celular que caracteriza a cada una de las diversas patologías de base. De hecho, las infecciones no permitían valorar/evaluar el contenido celular de las EPID o de la enfermedad de base, ya que las infecciones cursaban, en general, con cifras de neutrófilos muy elevadas. En cualquier caso, la elevada frecuencia de casos con infecciones está soportado por el hecho de que el LBA es la técnica de elección en el diagnóstico de las infecciones oportunistas del enfermo inmunodeprimido, también es muy eficaz en el diagnóstico de la infección por *Pneumocystis jirovecii*(237) o asociada a ventilación mecánica (238).

3. Acerca de las aportaciones de las pruebas radiológicas y funcionales

Dada la gran relevancia de las pruebas radiológicas y funcionales en el diagnóstico y seguimiento de las patologías pulmonares, los clínicos y en particular el neumólogo codirector de esta tesis, estuvieron muy interesados en la recolección de estos resultados, y así poder evaluar en qué medida habían contribuido al manejo clínico de los pacientes.

Sin embargo, durante la recolección de estos datos nos hemos encontrado importantes dificultades, tanto en la incorporación de datos como en la interpretación de los resultados. Aunque gran parte de los pacientes tenían resultados de las pruebas de imagen recogidos en la histórica clínica, no fue así en todos los casos, bien porque no se realizaran, o porque no se reflejaban en la historia. En cualquier caso, una vez más es indicativo de la alta heterogeneidad en el manejo clínico que nos hemos encontrado en los pacientes con patología pulmonar de nuestra región. Tanto se observó variabilidad elevada en las pruebas de imagen, y falta de disponibilidad de las pruebas funcionales, quizás por falta del equipamiento necesario en los hospitales periféricos, ya que estuvo disponible sólo en un tercio de nuestros pacientes, por lo que la recogida de esta información en nuestra serie ha producido resultados de menor significación.

A modo de resumen (tabla 33), se muestra un análisis comparado de los resultados observados en los patrones radiológicos en los pacientes de nuestra serie para las diferentes patologías, frente al patrón descrito en la literatura como más frecuente en cada una de ellas. De este análisis se infiere que, en general, los datos radiológicos asociados a los pacientes de nuestra serie son equiparables a los descritos en la literatura(8,239–242). Y, por tanto, soporta una catalogación diagnóstica adecuada de los pacientes de nuestra serie por parte de los clínicos a cargo. Con ello, la serie se valida y cobra valor, para poder evaluar adecuadamente la utilidad de la citometría de flujo en el diagnóstico de la patología pulmonar.

A pesar de las directrices publicadas en 2017 por la ATS, que recomiendan el uso rutinario de FVC, FEV1 y FEV1/FVC (245), en nuestra serie las pruebas funcionales se han realizado con muy escasa frecuencia, o bien los resultados no se han reflejado en las historias clínicas electrónicas. Las pruebas de función pulmonar son una herramienta básica para confirmar la presencia de una EPID, valorar su gravedad y monitorizar la progresión o la respuesta al tratamiento, pero carecen de utilidad en el diagnóstico de entidades específicas (246), y es por esto último que quizás se hayan utilizado con menor frecuencia en los pacientes de nuestra región. Igualmente, es posible que la falta de dichas pruebas en algunos de los hospitales periféricos de nuestra región durante la primera década de los 2000, haya dificultado el acceso a las pruebas funcionales de los pacientes de nuestra serie. No obstante, nuestros resultados muestran que muchos pacientes presentaban disfunción ventilatoria restrictiva, con capacidad DLCO reducida significativamente en NH, NIU y NIL.

Tabla 33. Patrones radiológicos consenso descritos y correlación con los resultados de la serie		
Patología EPID	Hallazgos típicos en la TAC	Patrón radiológico dentro de la serie
NIU	<ul style="list-style-type: none"> . Predominio basal y subpleural . Anomalías reticulares Panalización con o sin bronquiectasias de tracción. Ausencia de otros hallazgos no relacionados con el patrón de NIU (predominio en campos medios o superiores, predominio peribroncovascular, extensa afectación en vidrio deslustrado predominando sobre la afectación reticular, numerosos micronódulos, quistes aislados, atenuación en mosaico difuso o atrapamiento aéreo o consolidación) (68) 	<p>La NIU estuvo representada por la fibrosis, el patrón reticular y en panal de abeja, distribución en los lóbulos superiores como medios, bilateral, además de un patrón alveolo intersticial.</p> <ul style="list-style-type: none"> . Afectación en vidrio deslustrado extensa <p>Se observó durante el seguimiento de los sujetos, que la progresión natural fue heterogénea, puesto que mientras algunos sujetos permanecieron estables durante algún tiempo, otros mostraron progresión más rápida, con tendencia a exacerbaciones infecciosas, presentando mayor demanda en pruebas radiológicas.</p>
NIA	<ul style="list-style-type: none"> Consolidación parcheada y opacidades en vidrio deslustrado a menudo con áreas respetadas Bronquiectasias de tracción (fase tardía) Distribución: difusa (2) 	<p>Grupo pobremente representado, ya que la mayoría de los casos se trataban de pacientes en situación crítica e ingresados en UCI, carentes de informe radiológico, sin embargo, predominaban las consolidaciones parcheadas y el patrón en vidrio deslustrado.</p>
NINE	<ul style="list-style-type: none"> . Vidrio deslustrado bilateral, . Opacidades reticulares con bronquiectasias de tracción. . Bronquiolectasias de predominio basal. imágenes en panal (suelen estar ausentes en el momento del diagnóstico), pero pueden aparecer durante la evolución. . Cuadro fibrótico predominante, Distribución: periférica, subpleural (no subpleural en el 20%), basal, simétrica.(2) 	<ul style="list-style-type: none"> . Vidrio deslustrado bilateral . Predominio de fibrosis, . Patrones coexistentes; reticular y vidrio deslustrado bilateral. . Distribución periférica en lóbulos superiores, inferiores y bilateral.
BR-EPID	<ul style="list-style-type: none"> . Engrosamiento de la pared bronquial Nódulos centrolobulillares . Áreas parcheadas en vidrio deslustrado Distribución: difusa (2) 	<ul style="list-style-type: none"> . patrón nodulillar, . vidrio deslustrado . Distribución difusa
HPCL	<ul style="list-style-type: none"> . Patrón quístico, con localización en lóbulo superior. Un aspecto variable según el estadio de la enfermedad, desde pequeñas opacidades nodulares peribronquiolar hasta múltiples quistes de forma irregular, existiendo predilección por la zona media y superior (171,243) 	<p>Pese al escaso número de sujetos, predominó el patrón quístico</p>
NID	<ul style="list-style-type: none"> . Opacidades en vidrio deslustrado . Opacidades lineales y afectación reticular . Distribución: Lóbulos inferiores Periférica en la mayoría de los casos 	<ul style="list-style-type: none"> . Patrón reticular . Opacidades en vidrio deslustrado . Patrón alveolo intersticial, . Distribución en lóbulos inferiores.
NOC	<ul style="list-style-type: none"> Consolidación parcheada y/o Nódulos Distribución: Predominio en lóbulos inferiores 	<ul style="list-style-type: none"> . Patrón alveolo intersticial bilateral, con una distribución tanto en lóbulos superiores como inferiores
NIL	<ul style="list-style-type: none"> Engrosamiento septal y peribroncovascular Nódulos 	<ul style="list-style-type: none"> . Alveolo intersticial, escasa descripción del patrón peribroncovascular, algunos nódulos.

	centrolobulillares Atenuación en vidrio deslustrado Quistes de pared fina Distribución: difusa	. Distribución difusa
EPID inclasificables	Superposición de patrones radiológicos	patrón nodulillar y alveolo intersticial con una distribución en lóbulos superiores, inferiores e incluso difusa, muy heterogéneo e inespecífico
Neumoconiosis	Los radiólogos diagnostican la neumoconiosis basándose en la profusión, la forma y el tamaño de las opacidades neumoconiosis. El nivel de profusión de pequeñas opacidades representa la concentración de pequeñas opacidades en las zonas afectadas del pulmón, lo que puede reflejar el grado de neumoconiosis. (163)(244)	patrón radiológico nodulillar, con localización en lóbulo superiores y afectación bilateral se separa de la descripción general por una distribución difusa
NH	hallazgos radiológicos dependientes de la fase clínica(239)	distribución equitativa de los patrones nodulillar y alveolo intersticial, difusa en lóbulos superiores e inferiores y afectación bilateral. La fibrosis fue menos preponderante en esta patología
Sarcoidosis	El hallazgo más típico es la presencia de adenopatías hiliares bilaterales y patrón difuso de tipo reticular y nodular que afecta predominantemente a los campos medios y superiores del parénquima pulmonar en ambos pulmones(37)	patrón nodulillar, de distribución difusa y preferencia en los lóbulos inferiores y superiores, con afectación bilateral En nuestra serie, el patrón reticular estuvo muy poco representado, sugestivo de una incidencia de fibrosis baja.
Neumonías eosinófilas	Dos tipos de patrones: 1) infiltrados bilaterales perihiliares y migratorios, asociados a neumonías eosinofílicas agudas y 2) infiltrados bilaterales y periféricos, caso menos frecuentes y asociados a neumonías eosinofílicas crónicas(52,242)	Patrones alveolo-intersticial y nodulillar con distribución en lóbulo superior y multifocal.

En los últimos años se han estudiado las implicaciones pronósticas de la exploración funcional respiratoria en la EPID, con la mayoría de los trabajos realizados sobre casos con FPI y NINE. La evaluación funcional inicial se ha revelado imprecisa y a veces contradictoria desde un punto de vista pronóstico(91) (247). No obstante, la evolución en el tiempo de las variables fisiológicas es un buen método para predecir la supervivencia en la EPID. Una caída del 10% o más en la capacidad vital forzada (FVC) en los primeros 6 meses de seguimiento es el mejor indicador de mal pronóstico (248,249). Nuestros datos confirman estos resultados, pues muestran que DLCO más bajas (<55.5%) se asocian muy significativamente con SG más corta. Pero lo más importante es que es en los pacientes sin fibrosis pulmonar en los que este parámetro se muestra más determinante y, por tanto, a diferencia de los estudios anteriores realizados en pacientes con FPI y NINE, nuestros

resultados sugieren que esta prueba debe realizarse (también) en pacientes con enfermedad menos avanzada.

Por otro lado, nuestros resultados igualmente demuestran la gran complementariedad de los estudios funcionales y del recuento leucocitario del LBA, ya que juntos al combinar el valor predictivo del cociente-Linfocito/Neutrófilo del LBA y la DLCO < 55.5% se obtienen la mayor capacidad predictiva en los pacientes con patología pulmonar. Así, en relación con los grupos pronósticos determinados por la relación entre linfocitos y neutrófilos del LBA y, que discutiremos extensamente más adelante, el grupo de pacientes con riesgo intermedio (casi el 50% de los casos) es en el que la DLCO muestra mayor valor predictivo, identificando un tercio de pacientes de pronóstico intermedio que en realidad tiene muy mal pronóstico, dejando 2 tercios de pacientes con un pronóstico semejante a los pacientes de buen pronóstico, esto es, con linfocitos > 7% y neutrófilos < 5% en el LBA.

En su conjunto la recogida de datos radiológicos y funcionales en nuestra serie nos ha permitido comprobar que es necesario hacer un esfuerzo a nivel regional para estandarizar el manejo clínico de estos pacientes, con un acuerdo que englobe a todos los clínicos responsables de estas patologías en cuanto a: 1) que patologías y en qué momentos requieren pruebas de imagen y/o funcionales; 2) que resultados y como deben recogerse y valorarse en la historia clínica del paciente (mejor aún si se crearan formularios estandarizados que faciliten estudios prospectivos o retrospectivos); 3) que información mínima relevante debe contener los informes emitidos por los equipos de radiología y de neumólogos que realicen la pruebas funcionales, en los que se describan que datos se deben informar y como, para que sean útiles y fáciles de interpretar por los clínicos. No menos importante, debería consensuarse que especialidad ha de liderar el manejo clínico de estos pacientes. Aunque este punto es complejo, ya que la patología pulmonar suele asociar comorbilidades que involucran a diversas especialidades. En cualquier caso, lo referente a pruebas funcionales y de imagen pulmonar, debería estar coordinado por un equipo multidisciplinar que integre neumólogos, junto al resto de especialidades.

En definitiva, aunque las pruebas de imagen son imprescindibles para el correcto manejo clínico de la patología pulmonar, no siempre ofrecen resultados concluyentes que permitan la correcta catalogación de la patología y, por tanto, continúa siendo conveniente combinar estas pruebas con los datos de la celularidad del LBA y por supuesto con los estudios histopatológicos, que en con frecuencia son definitorios de la patología. Además, las pruebas funcionales son importante, tanto en estadios avanzados como tempranos de la enfermedad, por su elevado valor predictivo cuando se combina con la cuantificación de

las células en el LBA, realizada esta por citometría de flujo, ya que ofrece recuentos más precisos.

4. Acerca de utilidad de la citometría de flujo del LBA en el diagnóstico de la patología pulmonar

Al revisar la bibliografía, se puede apreciar que, a día de hoy, la técnica estándar para analizar el contenido celular del LBA continúa siendo el análisis citopatológico, estando la citometría de flujo mayormente relegada a la caracterización de las subpoblaciones linfocitarias, principalmente CD4 y CD8 (250), (59), (251), (251), (54), (252),(221). Sin embargo, poco a poco, nuevos grupos van incorporando la determinación de las poblaciones leucocitarias para el diagnóstico de la patología pulmonar. Algunos de los trabajos precursores en el uso de la citometría de flujo para la cuantificación de macrófagos alveolares, neutrófilos y linfocitos son los de Pablo Tutor-Ureta (253) en el Hospital Puerta de Hierro de Madrid en 2006 o el de Lourdes Tricas y col (67) en el hospital central de Asturias en 2012. El trabajo de Shanthikumar y col (254) describe como cuantificar simultáneamente macrófagos alveolares, linfocitos T (CD4 y CD8), linfocitos B, células NK, células dendríticas, granulocitos y monocitos (CD16+/CD16-) en el BAL de niños con patología pulmonar. Otros estudios han perfilado la composición celular del LBA en adultos, como el de Yu y col (255), que desarrollaron un protocolo que identificaba macrófagos alveolares, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas y monocitos. En el trabajo indican que las células mieloides constituían el 81% de todas las células inmunitarias, entre las que los macrófagos alveolares eran el 97%, lo que significa que el resto de las células mieloides (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, etc.) raramente estarían por encima del 1% de las células del BAL. Freeman y colegas (256) analizaron el BAL de una cohorte de sujetos adultos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica EPOC, identificando una proporción variable de macrófagos alveolares, neutrófilos, células T CD4 y CD8, monocitos clásicos (CD14+1CD16-), monocitos no clásicos (CD14dim y CD16+), monocitos intermedios (CD14+CD16+), eosinófilos y células dendríticas.

Basado en estos trabajos y teniendo en cuenta las mejoras tecnológicas y analíticas en citometría de flujo, nuestro grupo ha diseñado sucesivos paneles de 4 (entre 1998 y 2006), 8 (entre 2006 y 2020) y 12 (desde 2020) marcadores que han permitido incorporar a la rutina de trabajo del laboratorio de citometría de flujo del Hospital Virgen de la Arrixaca la caracterización de la mayoría de las subpoblaciones leucocitarias: macrófagos alveolares, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos (y sus subtipos T, B y K), células dendríticas CD1a+ y

basófilos (en el último panel de 12 marcadores). Con la ventaja que este análisis es rápido, pues no lleva más de 30 minutos desde la recepción de la muestra hasta la obtención de resultados, además de preciso ya que el recuento de las diferentes subpoblaciones celulares se realiza sobre cientos de miles de células y no sobre unas pocas centenas a las que se limitan los estudios citopatológicos. Por último, este tipo de análisis es más objetivo, pues las ventanas de análisis están prefijadas, contribuyendo a minimizar la variabilidad entre los diferentes analistas.

En este punto, creemos de gran importancia discutir la relevancia y el impacto que puede haber tenido en nuestro estudio la inclusión del total de leucocitos (incluidas las células muertas) en el análisis de citometría. Es práctica habitual en citometría de flujo incluir colorantes (Ej. 7 actinomicina D) para excluir del análisis las células muertas y apoptóticas. Sin embargo, esta práctica puede distorsionar significativamente la distribución de las subpoblaciones leucocitarias en el LBA, debido a la diferente mortalidad de los distintos leucocitos. Los granulocitos (y en particular los neutrófilos) tienen una vida media más corta y son más sensibles que los linfocitos a la mortalidad en condiciones adversas. Esto cobra especial relevancia si tenemos en cuenta que el LBA es una parte del contenido de los alveolos y bronquios y, por tanto, de leucocitos que se han extravasado desde el parénquima pulmonar. Estas células una vez en la luz del alveolo, desprovistas de riego sanguíneo, comienzan a morir rápidamente. Esta mortalidad se acentúa en medios pobres, como es la solución salina con la que se suelen realizar estos estudios. Dado que las cifras elevadas de neutrófilos es una característica definitoria de algunas patologías pulmonares (principalmente en infección y NIA), la proporción/relación entre linfocitos y neutrófilos puede verse alterada si excluimos las células muertas. Esta relación, como veremos más adelante, es el parámetro con mayor valor pronóstico en los pacientes con patología pulmonar y, en particular, con patología EPID. Por ello, creemos que la decisión de incluir las células muertas en nuestro análisis de citometría ha sido un factor decisivo de los buenos resultados observados en el valor pronóstico de la relación neutrófilo/linfocito. Además, puede haber contribuido en minimizar el impacto que el tiempo y las condiciones de transporte desde los diferentes hospitales de la región, puedan haber tenido en la cuantificación de las subpoblaciones leucocitarias. No obstante, para confirmarlo, serían necesarios estudios de control diseñados específicamente para valorar el impacto del transporte y del tiempo de procesamiento de las muestras.

La amplitud de la muestra analizada en este estudio de tesis ha permitido valorar la utilidad de los estudios de citometría de flujo en LBA para la orientación diagnóstica de los

pacientes con patología pulmonar. En primer lugar, hay que destacar su gran relevancia, por su rapidez y precisión, en la detección de posibles patologías infecciosas (independientemente de la patología de base del paciente). En estos pacientes se detecta un fuerte incremento en las cifras de neutrófilos, que llevan a cocientes Neutrófilos/Linfocito tan elevados que permiten diferenciar las patologías infecciosas del resto de EPID y no-EPID. Nuestros datos indican que cifras superiores a 12.05% de neutrófilos y sobre todo cifras superiores a 1.635 de ratio Neutrófilo/Linfocitos se asocian a patología infecciosa con cifras relativamente altas de sensibilidad y especificidad. Esto permite una orientación terapéutica temprana, para establecer tratamientos contra la infección y postponer tratamientos con corticoides. No obstante, otras patologías como NIA, NIU y BR-EPID pueden cursar también con incrementos de neutrófilos que, aunque menos cuantiosas, nos debe hacer ser cautos en la toma de decisiones. En este sentido, Raghu y col (3), describe como patologías con incrementos en las cifras de neutrófilos en el LBA > 3% las ETC, FPI, neumonía por aspiración, infecciones bacterianas y fúngicas, bronquitis, asbestosis, bronquitis en general, síndrome de distrés respiratorio agudo y daño alveolar difuso. No obstante, en nuestra serie las patologías infecciosas en general (bronquitis, neumonías, independientemente del agente etiológico implicado) presentan cifras de neutrófilos muy superiores ($45.75\% \pm 1.8$) al resto de patologías ($10.3\% \pm 0.44$) o los LBA de sujetos sin patología pulmonar ($2.12\% \pm 0.19$) o incluso a la NIA ($24.82\% \pm 5.14$). Raghu y col, describen que incrementos superiores al 50% de neutrófilos se asocian a infección o a daño pulmonar.

Igualmente es de gran utilidad en la caracterización de la neumonía eosinófila y en la HPCL, en las que la detección de cifras elevadas de eosinófilos o células dendríticas CD1a+, por encima de los valores de corte establecidos en esta memoria de tesis (3.44% y 1.4%, respectivamente para eosinófilos y células dendríticas), permite una aproximación diagnóstica rápida y bastante precisa. Algunos autores (2)(40) establecen un valor > 1% para un grupo de enfermedades como las neumonías eosinofílicas, neumonitis inducidas por medicamentos, trasplante de médula ósea, enfermedad de hodgkin, asma, bronquitis, síndrome de Churg-Strauss, aspergilosis broncopulmonar alérgica, infecciones bacterianas, fúngicas, por helmintos e infección por *P. jiroveci*. Los autores afirman que el recuento diferencial de eosinófilos >25% es virtualmente diagnóstico de neumonía eosinófila crónica o aguda. En nuestra serie 9 de los 15 pacientes catalogados de neumonía eosinófila tuvieron cifras por encima del 25%, los 6 restantes presentaron valores entre el 3.5% y el 16.8%, por lo que cifras por debajo del 25% no son excluyentes de dicha

patología. En cualquier caso, el 3% de eosinófilos es muy superior a las cifras de normalidad descritas en esta memoria, $0.38\% \pm 0.3$.

Las patologías que cursan con elevaciones en las cifras de linfocitos en los análisis de citometría, sarcoidosis, NH, NOC y NIL, también son fácilmente diferenciables del resto de patologías EPID y no-EPID, con un punto de corte de 21.56% de linfocitos sobre el total de células del LBA, con buena sensibilidad y especificidad. Estas cifras están en línea con las descritas por Raghu y col (3,209), que estiman que un recuento diferencial superior al 25% es altamente sugerente de sarcoidosis, NH, enfermedad crónica por berilio, NINE, reacción a medicamentos, NIL, NOC, o linfoma. No obstante, en nuestra serie solamente la sarcoidosis, NH, NOC y NIL presentan elevaciones tan prominentes de linfocitos. La sarcoidosis, especialmente en sus estadios más avanzados, presenta cifras de linfocitos elevadas que se acompañan de cocientes CD4/CD8 tan altos que permiten establecer puntos de corte (cociente CD4/CD8 > 2.13) para separar esta enfermedad de la NH, NIL y la NOC. Este punto de corte es muy similar al descrito por un estudio realizado en Sevilla en el que describen una mediana para el cociente CD4/CD8 en pacientes con sarcoidosis de 2,3(221), pero más bajo al descrito por Raghu y col (3,40,43), que determinan que cocientes CD4/CD8 > 4 son altamente específicos de sarcoidosis en ausencia del aumento de otras células inflamatorias. Desafortunadamente, la falta de información del estadio de la enfermedad en muchos de los pacientes con sarcoidosis hará necesario futuros estudio que nos permitan comprobar si la desviación del cociente CD4/CD8 se incrementa con la severidad de la enfermedad, y con ello su capacidad diagnóstica.

El resto de las patologías con elevación en las cifras de linfocitos son más difíciles de diferenciar entre sí en base a los datos de citometría, por lo que continúan siendo imprescindibles los datos clínicos, radiológicos y anatomopatológicos para su correcta catalogación. No obstante, la NIL mostraba una tendencia a presentar un predominio de los linfocitos T CD8 sobre los CD4, aunque esto pudo deberse a la presencia de abundantes pacientes NIL-HIV en nuestra serie. Además, la NH cursa con los mayores valores de linfocitos totales ($48.6\% \pm 3.11$) y cocientes CD4/CD8 mantenidos ($2.53\% \pm 0.58$), esto está en línea con lo descrito por Raghu y cols (3,40,43) que establecen que recuentos igual o superior al 50% de linfocitos sugieren NH. Sin embargo, ni los análisis convencionales ni los análisis de *clusters* han permitido establecer puntos de corte para diferencias estas tres patologías ricas en linfocitos.

Por otro lado, existen múltiples patologías EPID (NID, NINE, Neumoconiosis y BR-EPID) y otras no EPID (asma, EPOC, nódulos pulmonares, TBC y el cáncer) que, aunque cursan

con cifras más elevadas de células inflamatorias que los LBA de sujetos sin patología pulmonar, mantienen el patrón leucocitario de predominio de macrófagos y, por tanto, son difíciles de separar entre sí en base a los resultados de la citometría del LBA.

A pesar de que se ha llegado a cuestionar la utilidad del estudio del LBA en el manejo clínico de la enfermedad pulmonar intersticial (76) (228) y de que la ATS haya llegado a afirmar que la citometría de flujo del LBA posee escaso valor en el diagnóstico de las enfermedades que afectan el pulmón (3), hay un hecho por encima de todos que respalda la utilidad de la citometría de flujo en el estudio del LBA, y es que desde finales de los 90, cuando se comenzaron a realizar estos estudios, todos los equipos de neumólogos de la región han ido remitiendo los LBA de sus pacientes a nuestra unidad de citometría. Actualmente se ha convertido en un análisis habitual en nuestro laboratorio, que supera el medio millar de muestras cada año. Por tanto, en la actualidad la citometría de flujo del LBA es una técnica que complementa al estudio citopatológico del LBA, pues existen características morfológicas de las células o de deposición de materiales, que la citometría no es capaz de discriminar, por el momento, ya que las nuevas generaciones de citómetros tomarán fotografías de cada una de las células o partículas que analiza, y, por tanto, podremos analizar características morfológicas junto a las señales de fluorescencia. No obstante, nuestros resultados demuestran que la citometría de flujo multiparamétrica ofrece una clara ventaja en la cuantificación rápida, precisa y objetiva de las subpoblaciones leucocitarias y linfocitarias del LBA.

A continuación (tabla 34), se muestran las compatibilidades diagnósticas EPID en función de los patrones celulares observados en la citometría del LBA.

- **Patrones con predominio de linfocitos** asociados a sarcoidosis, NH, NIL y NOC que deben sospecharse con cifras de linfocitos > 21.6%, pero que son mucho más probables con cifras de linfocitos > 48.2%.
 - o La sarcoidosis que debe sospecharse con cifras de linfocitos > 21.6% y cocientes-CD4/CD8 > 2.13, pero que son mucho más probables con cocientes-CD4/CD8 > 5.6.
 - o La NIL que debe sospecharse con cifras de linfocitos > 21.6% y cocientes-CD4/CD8 < 0.8, pero que son mucho más probables con cocientes-CD4/CD8 < 0.27.
- **Patrones con predominio de neutrófilos** asociados a infección, NIA, NIU y BR-EPID que deben sospecharse con cifras de neutrófilos > 12.1%, pero que son mucho más probables con cifras de neutrófilos > 45.0%.

- Las infecciones que deben sospecharse con cifras de neutrófilos > 12.1%, y cocientes-Neutrófilo/linfocito > 1.65, pero que son mucho más probables con cocientes-N/L > 15.2.
- **Patrón con predominio de eosinófilos** asociados a neumonía eosinófila que deben sospecharse con cifras de eosinófilos > 3.44%, pero que son mucho más probables con cifras de neutrófilos > 4.5%.
- **Patrón con aumento de células dendríticas CD1a+** asociados a HPCL que deben sospecharse con cifras de C. dendríticas > 1.4%, pero que son mucho más probables con cifras de C. dendríticas > 3.0% (3)
- **Los patrones con predominio de macrófagos alveolares** asociados a NINE, NID, neumoconiosis y EPID-inclasificable que deben sospecharse con cifras de macrófagos > 75%, y cifras mantenidas para el resto de las subpoblaciones leucocitarias (Linfocitos < 21.6% & Neutrófilos < 12.1% & Eosinófilos < 3.44% & C. Dendríticas < 1.4%).
- **Patrón sin alteración**, asociado a pacientes sin indicios de patología pulmonar demostrable, que deben sospecharse con cifras de macrófagos > 89.0%, y cifras mantenidas para el resto de las subpoblaciones leucocitarias (Linfocitos < 10.0% & Neutrófilos < 2.0% & Eosinófilos < 0.5% & C. Dendríticas < 0.6%).

Tabla 34. Compatibilidades diagnósticas en patología EPID según patrón celular del LBA					
Patrón	Tipo EPID ¹	Condición	Sensibilidad	Especificidad	Especificidad>95% ²
Predominio Linfocitos	- Sarcoidosis, NH, NIL y NOC	Linfocitos > 21.6%	73.0%	81.7%	Linfocitos>48.2%
	- Sarcoidosis	Cociente-4/8 > 2.13 & Linfocitos > 21.6%	97.6%	74.9%	Cociente-4/8>5.6
	- NIL	Cociente-4/8 < 0.8 & Linfocitos > 21.6%	79.0%	67.5%	Cociente-4/8<0.27
Predominio Neutrófilos	- Infección, NIA, NIU, BR-EPID	Neutrófilos > 12.1%	86.0%	76.0%	Neutrófilos>45.0%
	- Infecciones	Cociente-N/L³>1.65 & Neutrófilos>12.1%	77.2%	74.9%	Cociente-N/L>15.2
Predominio Eosinófilos	- Neumonía Eosinófila	Eosinófilos > 3.44%	100%	94.1%	Eosinófilos > 4.5%
Aumento C.Dendríticas	- HPCL	C.Dendríticas>1.4%	67.0%	90.0%	C.Dendríticas>3.0%⁴
Predominio Macrófagos	NINE, NID, neumoconiosis & EPID-inclasificable	Macrófagos > 75% & Linfocitos < 21.6% & Neutrófilos < 12.1% & Eosinófilos < 3.44% & C. Dendríticas < 1.4%			
Sin alteración	- Sin patología pulmonar	Macrófagos > 89% & Linfocitos < 10.0% & Neutrófilos < 2.0% & Eosinófilos < 0.5% & C. Dendríticas < 0.6%			

¹ esta clasificación es válida sólo para patologías EPID e infecciones pulmonares. No se incluye EPOC, Asma o Cáncer.

² para conseguir una especificidad > 95%, se tienen que dar cifras superiores o inferiores a lo indicado en cada caso.

³ cociente-Neutrófilo/Linfocito.

⁴ dato extraído de Meyer y col. 2012 (3)

Estos datos deben ser interpretados en conjunto con el resto de los datos clínicos y de pruebas diagnósticas.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, no debemos olvidar que la citometría de flujo simplemente aporta un dato más, de mayor o menor utilidad, a la información clínica, radiológica, de pruebas funcionales y anatomopatológicas que los clínicos deben tener en cuenta para la adecuada catalogación diagnóstica y terapéutica de las diferentes patologías pulmonares.

5. Acerca de los marcadores pronósticos que aporta la citometría del LBA a la patología pulmonar

Se han propuesto diversos modelos que estiman el riesgo de mortalidad en FPI(257) o EPID general (258) para guiar el tratamiento clínico de estos pacientes. Estos modelos han tenido en cuenta los síntomas clínicos, la función pulmonar, la extensión de la NIU e incluso la puntuación del índice de comorbilidad de Charlson (CCIS) (ILD-GAPC) (258). Sin embargo, en estos modelos no se han incluido las células inmunitarias que están implicadas en el deterioro pulmonar y/o el proceso fibrótico. Sin embargo, como discutiremos en este apartado, nuestros resultados muestran que los linfocitos y los neutrófilos, células que con mayor frecuencia infiltran el pulmón en la EPI, juegan un papel decisivo y opuesto en la evolución clínica de los pacientes.

En 2001 King y col, describen un score predictivo para FPI a partir de los datos clínicos, radiológicos y fisiológicos (CRF) de los pacientes, que parecía correlacionarse con el alcance y la gravedad de las características histopatológicas (fibrosis, celularidad, deposición de tejido). Utilizando este modelo, propusieron que el clínico estuviera en condiciones de proporcionar mejor información pronóstica a los pacientes y de mejorar la selección para el trasplante de pulmón u otras intervenciones terapéuticas, estándar o novedosas (90). Previamente Shwartz y col, describieron que uno de los factores determinantes en la supervivencia de paciente con FPI, era la concentración de linfocitos en el LBA (91). Más recientemente, en una cohorte de 157 casos de FPI con y sin oxigenoterapia se ha descrito que el bajo índice de masa corporal (IMC), la baja capacidad vital forzada (FVC), la baja capacidad de difusión (DLCO), hipoxemia en reposo, una menor distancia recorrida en el test de 6 minutos marcha (6MM) y una puntuación alta en la prueba de evaluación de la EPOC se asociaron significativamente con un mal pronóstico (256). Igualmente se han caracterizado de manera exhaustiva los factores pronósticos en la EPOC (259) y en la hipertensión arterial pulmonar (94). Sin embargo, los factores pronósticos en el resto de las patologías pulmonares y en particular las patologías EPID, fuera de la FIP y enfermedad obstructiva, han sido mucho menos explorados.

Aunque no era el objetivo inicial de este trabajo, del análisis de los datos demográficos y clínicos de los pacientes de nuestra serie, ha permitido confirmar que, a parte de la edad, tanto los patrones radiológicos asociados a fibrosis (panal, reticular y fibrosis) como una DLCO disminuida, son parámetros que impactan de forma muy negativa a la SG de los pacientes. Sin embargo, el sexo, fumar, la presencia de patología autoinmune, los antecedentes familiares de patología pulmonar, el contacto frecuente con aves, la inhalación de sustancias orgánicas o inorgánicas, neumonitis por fármacos o el tipo de tratamiento en global (corticoide inhalado o sistémico u otros inmunosupresores), no parecían tener impacto en la SG de los pacientes con patología pulmonar en global.

En relación con los parámetros citológicos del LBA, se ha descrito que la presencia de neutrófilos en el LBA se relaciona con progresión a fibrosis en la enfermedad pulmonar intersticial(36,95). Los resultados de Kinder y col en 2008, mostraban que en pacientes con FPI, cada duplicación del porcentaje inicial de neutrófilos analizados mediante citología del BAL se asociaba con un aumento del 30% en el riesgo de mortalidad, aunque no observaron asociación entre el porcentaje de linfocitos o eosinófilos en el BAL y la mortalidad (260). Por el contrario, en 2021 Kanaoka et cols describen que las cifras de neutrófilos altos y linfocitos bajos determinados mediante citología en LBA son factores pronósticos de mortalidad durante la hospitalización en hemorragia alveolar difusa (97). En 2006 Tutor-Ureta y col tras estudiar el LBA de 33 pacientes con Sarcoidosis, describen que el aumento de los porcentajes de neutrófilos y células NK en el LBA se asociaba a mal pronóstico y a una mayor probabilidad de necesitar tratamiento con corticoides (253). Más recientemente, D'Alessandro y col, describen una relación entre el cociente-NL del BAL y los parámetros de la función pulmonar en pacientes con FPI que podrían ayudar a optimizar el tratamiento de los pacientes y a mejorar el seguimiento y los resultados (99). Describen además un cociente-NL más bajo en pacientes con sarcoidosis y NH que en pacientes con FPI. En el trabajo, el cociente-NL se correlacionó inversamente con los porcentajes de capacidad vital forzada (CVF) y volumen espiratorio forzado en 1 segundo (VEF1). Otros trabajos igualmente apuntan a que el recuento de neutrófilos en el LBA podría predecir la gravedad y los resultados de la sarcoidosis pulmonar (Feng et al., 2021). Por otro lado, los pacientes con cáncer de pulmón y cifras de cociente-NL elevados se asociaron a SG más corta (100), así como les ocurre a los pacientes con infección por *Mycobacterium avium*(59).

Donde sí está bien establecido el carácter pronóstico del cociente-NL es cuando éste se analiza en muestras de sangre periférica en diversos tipos de cáncer (261), (261). En 2023,

Mikolasch y col describen que el cociente-NL en sangre periférica puede predecir los resultados en la FPI. En una población de 999 sujetos, cocientes NL $< 2,9$ en sangre periférica se asociaron a mayor riesgo de mortalidad (96). Sin embargo, la relevancia de este resultado es relativa, ya que cocientes-NL elevados en sangre periférica se asocian a mayor mortalidad incluso en población general (262).

La aportación de nuestro trabajo en este tema es decisiva, ya que se trata de la mayor serie descrita en la que se evalúa el papel de los linfocitos y neutrófilos en el LBA en diferentes patologías, incluidas la FPI y la sarcoidosis. En primer lugar, ha puesto claramente de manifiesto el papel protector de los linfocitos y por el contrario el papel negativo que juegan los neutrófilos. La cuantificación precisa y objetiva que ofrece la citometría ha permitido establecer puntos de corte de linfocitos en menos del 7% y neutrófilos en más del 5% que combinados ofrecen un sistema de estratificación del riesgo que es útil para los pacientes con patología pulmonar, en general, y en particular para pacientes EPID. De hecho, estas cifras que son más intuitivas y de más fácil manejo para el clínico que el cociente NL, permiten identificar pacientes con linfocitos por encima del 7% y neutrófilos por debajo del 5% que tendrán una esperanza de vida similar a la población general, y por tanto se pueden identificar como pacientes de buen pronóstico y si la situación clínica lo permite, candidatos a evitar o postponer tratamientos. Por el contrario, pacientes con cifras de linfocitos por debajo del 7% y de neutrófilos por encima del 5% tendrán la peor supervivencia, y por tanto deberán ser considerados pacientes de alto riesgo. En ellos, sería conveniente establecer tratamientos adecuados o ser sometidos a un control clínico más frecuente y riguroso.

No obstante, para la correcta interpretación del valor pronóstico de la combinación-NL es necesario tener en cuenta la edad del paciente cuando se toma la muestra de LBA, ya que en los pacientes más jóvenes (< 55 años) sólo los pacientes con pronóstico desfavorable (linfocitos $< 7\%$ y neutrófilos $> 5\%$) van a tener un claro impacto negativo en la supervivencia global, mientras que los de pronóstico favorable e intermedio tiene un pronóstico de supervivencia comparable. En los pacientes de edad intermedia (entre 55 y 70 años) la clasificación pronóstica separa perfectamente los pacientes con pronóstico favorable, desfavorable e intermedio. Por el contrario, en los pacientes añosos (> 75 años) sólo los pacientes con pronóstico favorable presentan una supervivencia superior a los pacientes con pronóstico desfavorable o intermedio, que tienen supervivencias similares. A la vez que estos resultados dependientes de la edad son de utilidad clínica para la correcta catalogación del riesgo en cada grupo de edad, son indicativos de que el efecto

nocivo de los neutrófilos es diferente en función de la edad del paciente (263)siendo mucho más nocivo y difícil de ser contrarrestado por las cifras elevadas de linfocitos, cuanto mayor es la edad del paciente. En este sentido se ha descrito que la edad se relaciona con peor capacidad reparativa y más posibilidad de desarrollo de fibrosis por daño estructural.(264–266).

A modo de resumen, se muestra en la figura 94 el impacto sobre la supervivencia global de los pacientes de la combinación-NL en función del grupo de edad del paciente. En ella se indican datos de tasa de supervivencia a 20 años y la media o media de supervivencia para cada grupo.

FAVORABLE: linfocitos >7% y neutrófilos <5% (34.9% de pacientes EPID).
DEFAVORABLE: linfocitos <7% y neutrófilos >5% (19.0% de pacientes EPID).
INTERMEDIO: resto de pacientes (46.1% de pacientes EPID).

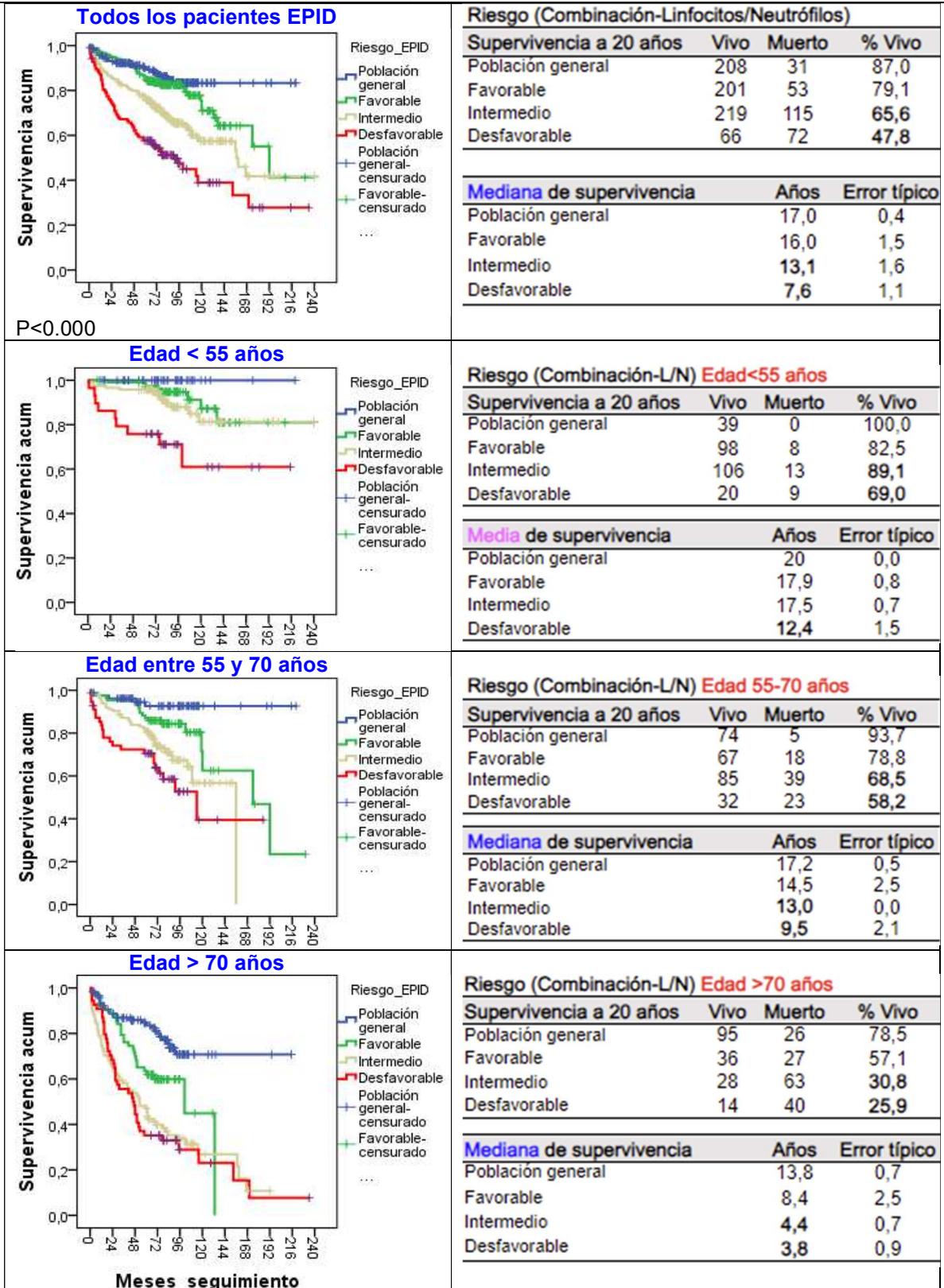


Figura 94. Curvas de supervivencia global de población general y pacientes EPID en función del riesgo en la combinación-Linfocito/Neutrófilo y el grupo de edad.

Sin embargo, como suele ocurrir en otros sistemas de estratificación de riesgo, el grupo de riesgo intermedio (que no cumplen criterios de buen o mal pronóstico) es el más abundante (46,1% en nuestra serie). Afortunadamente, la estratificación de riesgo basada en linfocitos y neutrófilos del LBA se complementa con los resultados de las pruebas funcionales. Concretamente la $DLCO < 55.5\%$ permite identificar de entre ese 46.1% de las EPID de riesgo intermedio, un 41.5% de ellos que presentan un pronóstico tan desfavorable como los pacientes con alto riesgo, dejando al resto de pacientes, el 58.5% de las EPID de riesgo intermedio, con un pronóstico casi tan buen como el de los pacientes con cifras de linfocitos $> 7\%$ y neutrófilos $< 5\%$. Por tanto, combinando el recuento por citometría de flujo de las cifras de linfocitos y neutrófilos del LBA con las pruebas funcionales, el clínico podrá tener una aproximación a una clasificación de alto y bajo riesgo de la mayoría de los pacientes EPID. No obstante, las pruebas funcionales solo estuvieron disponibles en un tercio de los pacientes EPID de nuestra serie, por lo que estos resultados será necesario confirmarlos en nuevas series más amplias y actuales, donde las pruebas funcionales se incorporen a la rutina clínica del manejo de estos pacientes. Además, hay que destacar que la $DLCO < 55.5\%$ muestra mayor capacidad predictiva entre los pacientes EPID sin fibrosis, y por tanto es de mayor utilidad en los estadios menos avanzados de la patología EPID, por lo que los tiempos de actuación clínica personalizada pueden planificarse con suficiente antelación.

Este descubrimiento no habría sido posible si no se hubiera incluido un grupo control sin patología pulmonar, que nos permitiera comparar la supervivencia de los diferentes grupos de riesgo, con la de la población general. Estos resultados serán de gran utilidad, por ejemplo, en el asesoramiento clínico de los pacientes que desarrollan patología pulmonar intersticial por estar en contacto habitual (profesional o aficionado) con aves. En esta situación, el clínico podrá recomendar al paciente abandonar dicho contacto en caso de que el paciente presente en el LBA características de alto riesgo (bajas cifras de linfocitos y altas de neutrófilos) o $DLCO < 55.5\%$ y, por el contrario, informar al paciente que en principio no sería estrictamente necesario evitar el contacto con las aves pues los marcadores pronósticos son favorables. No obstante, esta información deberá ser contrastada en nuevas series para poder ser incorporada a la práctica clínica habitual, donde retirar el contacto inductor de la NH continúa siendo el “estándar oro”.

Igualmente, la estratificación del riesgo basada en las cifras de linfocitos y neutrófilos es de utilidad en la orientación de terapias personalizadas. Al comparar la supervivencia de los dos tipos de tratamientos sistémicos más habituales en la patología pulmonar, no pudimos

observar diferencias en la SG entre los corticoides y los otros inmunosupresores (micofenolato, rituximab, metotrexato, abatacept). Sin embargo, este comportamiento fue desigual entre las diferentes patologías, en la patología EPID y en la neoplasia extrapulmonar, los pacientes tratados con otros inmunosupresores tuvieron mejor SG a 20 que los tratados con corticoides orales. De hecho, algunos autores recomiendan el uso prudente de los corticoides en pacientes con cáncer (267). Por el contrario, los pacientes con patologías infecciosas tratados con inmunosupresores no-corticoides tuvieron peor SG. Nuestros resultados, además, parecían sugerir que el análisis del BAL también podría tener utilidad para predecir el éxito de las diferentes terapias. En pacientes con porcentaje de neutrófilos menores al 10% en el LBA, el tratamiento inmunosupresor no-corticoide mostró tasas de SG a 20 años superiores a la de los tratados con corticoides y similar a la de pacientes sin tratamiento inmunosupresor. Sin embargo, en pacientes con porcentajes de neutrófilos superiores al 10%, la SG a 20 años de ambos tratamientos sistémicos fue comparable y muy inferior a la de los pacientes sin tratamiento inmunosupresor. Aunque estos resultados deben ser considerados preliminares por tratarse de un estudio prospectivo, sí sería importante que pudieran ser corroborados en estudios prospectivos a nivel regional diseñados para tal fin.

Otro aspecto importante que queremos resaltar en esta discusión es que el sistema de estratificación del riesgo basado en la cuantificación por citometría de flujo de los linfocitos y neutrófilos del LBA, no se vio afectado por el transporte de las muestras desde los hospitales de origen, cuando los datos se comparaban con los observados en los pacientes que eran sometidos a la broncoscopia en nuestro centro. Esto pudo ser debido a que en nuestra sistemática de análisis las células muertas no eran excluidas y, por tanto, aunque la viabilidad celular se pudiera haber visto comprometida por el transporte, el recuento celular por citometría continuaba dando valores adecuados para la correcta catalogación del riesgo.

Aunque, la estratificación del riesgo basada en linfocitos-neutrófilos parecía ofrecer información pronóstica independientemente al sexo y edad de los pacientes, no ofrecía valor pronóstico en todas las patologías. Por ejemplo, en las infecciones, donde fue necesario incrementar el punto de corte para observar capacidad predictiva, con cifras de cociente-NL>50 como punto de corte para identificar pacientes con peor pronóstico. Además, en el grupo de pacientes infectados pudimos observar que las células dendríticas parecían tener un efecto protector en la supervivencia global, de manera que cifras elevadas de células dendríticas (>0.6%) mejoraban la supervivencia de pacientes con

cocientes-NL>50. Esto no fue un hecho aislado, pues las cifras de células dendríticas elevadas también parecían mejorar la supervivencia de los pacientes con patología no-EPID (sin infecciones) con cifras elevadas de neutrófilos y también en los pacientes con neumonías inducidas por fármacos o por inhalación de sustancias orgánicas. Por tanto, nuestro trabajo parece sugerir, que tanto las células dendríticas como los linfocitos, podrían tener una función protectora de la supervivencia en pacientes con algunos subtipos de EPID, al contrarrestar los efectos nocivos de las elevadas cifras de neutrófilos.

El papel protector de los linfocitos ya había sido propuesto en patologías como la NINE(268) y, el de células dendríticas en la FPI, donde se había demostrado que la baja frecuencia de las células dendríticas CD1c+ convencionales predice un peor pronóstico (269). Nuestros resultados muestran además un papel más preponderante de los linfocitos sobre los neutrófilos en la SG de los pacientes con fibrosis pulmonar, de hecho, las cifras de linfocitos >7% claramente protegen a los pacientes, mientras que cifras elevadas de neutrófilos (5%, 10% o 15%) no cambiaron el pronóstico significativamente. Estos resultados sugieren que, aunque los neutrófilos puedan estar involucrados en el desarrollo de fibrosis pulmonar (270), (271), son las cifras de linfocitos, por su papel protector, las que modifican la esperanza de vida de estos pacientes y, son capaces, además, de compensar el efecto adverso de la infiltración por neutrófilos. Por tanto, se deberían investigar nuevos tratamientos dirigidos a incrementar las cifras de linfocitos en el parénquima pulmonar en pacientes con fibrosis y en pacientes con elevada infiltración de neutrófilos. En este sentido, debemos tener en cuenta que si los corticosteroides inhalados (y posiblemente los sistémicos) actúan en parte suprimiendo la localización de las células T en los pulmones, es posible que su utilización no esté mejorando la supervivencia a largo plazo de los pacientes con patología pulmonar. Para guiar estas terapias, el análisis por citometría del contenido leucocitario podría aportar información crucial de forma rápida y precisa.

Aunque nuestros resultados y otros (272) parecen sugerir que la presencia elevada de linfocitos en el LBA y por tanto su infiltración en el parénquima pulmonar, parece tener efecto protector en la supervivencia de los pacientes, este hecho es desigual entre las diversas patologías. El efecto protector de los linfocitos se apreció fundamentalmente en los pacientes EPID, pero no fue tan claro en los pacientes no-EPID o en aquellos que no presentaban patología pulmonar. Sin embargo, para nuestra sorpresa, los linfocitos infiltrantes parecían estar jugando un papel contrapuesto en los pacientes con cáncer, dependiendo de si este era cáncer primario de pulmón o el LBA se había realizado en otros tipos de cáncer con alteraciones radiológicas que llevaron a la broncoscopia. Mientras que

en los pacientes que tenían carcinoma de pulmón las cifras de linfocitos se asociaban inversamente a la SG, en pacientes con neoplasias extrapulmonar lo hicieron de forma directamente proporcional. Si tenemos en cuenta que la mayoría de los pacientes con cáncer extrapulmonar presentaban neoplasias hematológicas (111 de 154, 72.0%) que asociaban neumonías intersticiales de diferente tipo debido a la inmunosupresión y la quimioterapia, no es sorprendente que las mayores cifras de linfocitos se relacionaran con tasas mayores de supervivencia, como lo hacen en la EPID en general. Sin embargo, es más difícil de entender la supervivencia más corta que presentaban los pacientes con carcinoma de pulmón con cifras de linfocitos totales superiores al 7%, o de linfocitos T CD8+ mayores al 9.73%. Esto parece contradecir lo descrito en la mayoría de los tumores, en los que una mayor infiltración de linfocitos (especialmente de linfocitos T CD8) se asocia a mejor supervivencia (273). El microambiente tumoral condiciona no solo el grado de infiltración del tumor por linfocitos y otras células, sino también su funcionalidad. De los resultados desprendidos de este estudio, cabe pensar que el microambiente tumoral del cáncer de pulmón debe favorecer linfocitos T de carácter supresor y/o protumoral, que contribuyen a la menor supervivencia de estos pacientes. Este resultado contrasta con lo descrito para cáncer de pulmón de célula no-pequeña, en la que las cifras elevadas de linfocitos T CD8+ se asociaban a mejor supervivencia (274) (275). No obstante, este tipo de resultados contradictorios puede deberse al subtipo tumoral, de hecho, se ha descrito que cifras elevadas de neutrófilos infiltrantes es un marcador de buen pronóstico en el subtipo “escamoso”, pero de mal pronóstico en el subtipo adenocarcinoma del cáncer de pulmón de célula no-pequeña (276). Por tanto, nuestros resultados deberán ser investigados en estudios funcionales de los linfocitos infiltrantes, en los que además se tenga en cuenta el subtipo del tumor pulmonar.

En definitiva, el estudio del contenido leucocitario del LBA mediante citometría de flujo es una metodología rápida, accesible, económica y objetiva que ofrece información valiosa y complementaria al resto de pruebas diagnósticas, para la correcta catalogación diagnóstica de los pacientes, la orientación y monitorización del tratamiento y, sobre todo, para la estimación del riesgo de los pacientes según el tipo de patología, lo que puede contribuir de manera decisiva a la personalización de las terapias.

LIMITACIONES Y ACCIONES FUTURAS

La principal limitación de esta tesis es que se trata de un estudio retrospectivo, en el que la recolección de datos clínicos y diagnósticos se obtuvieron de las historias electrónicas disponibles en los programas informáticos Selene, agrupados en el portal Agora, de los hospitales que envían muestras LBA a la Unidad de Citometría del HCUVA. Desafortunadamente no todos los pacientes fueron accesibles y en los que sí, algunos no tenían información crítica para poder ser incluidos. Esto nos llevó a la exclusión de numerosas muestras y con ello a que algunos grupos clínicos como la neumonía-eosinófila, la HPCL o la NIA tuvieran pocos pacientes, por lo que los estudios estadísticos tuvieron menos potencia en estos grupos. Además, la falta de información ha impedido la inclusión de un grupo específico con EPID-ETC o EPID-fármacos.

Al tratarse de muestras analizadas entre los años 2000 y 2018 el número de casos tratados con antifibróticos fue muy reducido, por lo que no se pudieron realizar estudios de seguimiento de un tratamiento que se ha introducido en los últimos años y cuya eficacia será necesario evaluar en próximas series.

Esta tesis ha tenido principalmente un carácter exploratorio, por lo que muchos de sus resultados, aun siendo interesantes, deberán ser investigados con mayor profundidad en futuros estudios, por ej.:

- La discordancia del impacto de los linfocitos totales y de los linfocitos TCD8+ del LBA en la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón, frente a los pacientes con otros tipos de cáncer o con enfermedad pulmonar. Hipotetizamos que el microambiente tumoral en el pulmón debe modificar la funcionalidad de las células T volviéndolas tolerogénicas y/o protumorales. Por el contrario, en el pulmón EPID los linfocitos T podrían estar contrarrestando el efecto profibrótico de los neutrófilos. Esto deberá ser investigado en proyectos diseñados para tal fin.
- La utilidad pronóstica de la combinación-LN en pacientes en contacto habitual con aves no se ha investigado con detalle, quedando aspectos por explorar, como el tipo de ave, el tiempo de contacto, el vínculo (aficionado o laboral), etc. Tampoco se ha investigado si el paciente pudiera haber terminado el contacto con aves y su evolución posterior.
- El análisis de *cluster* no ha ofrecido los resultados esperados. Teníamos esperanza que pudiera generar un algoritmo (herramienta) que ayudara a los clínicos en la

estimación del diagnóstico, al cargar los datos de la citometría del LBA. Sin embargo, varias dificultades han limitado el funcionamiento óptimo del análisis no guiado. La primera ha sido lo reducido de los grupos de neumonitis-eosinófila y de HPCH que, junto a la variabilidad de los casos, ha dificultado que el algoritmo separara estos dos grupos de forma autónoma. La segunda es la falta de homogeneidad en la catalogación de las diversas patologías que nos hemos encontrado en las historias clínicas de los diferentes hospitales. Esto ha dificultado la identificación de patrones celulares en el LBA definitorios de cada patología. En cualquier caso, el análisis de *cluster* ha permitido confirmar los resultados obtenidos en el análisis convencional, que identifica 4 grupos de patologías: sarcoidosis, otras patologías con predominio de linfocitos, patologías con predominio de neutrófilos y las que tienen predominio de macrófagos. Serán necesario estudios futuros con series amplias de pacientes correctamente catalogados.

- El carácter protector que tienen los linfocitos (en general) y las células dendríticas en algunas patologías, deberá ser investigado en estudios funcionales que permitan desvelar los mecanismos implicados, para localizar potenciales dianas terapéuticas que contribuyan a mejorar los resultados clínicos en estos pacientes.

Una fuente importante de variabilidad, que no se ha podido controlar en este estudio, es la metodología utilizada en la toma de la muestra LBA. La calidad del contenido celular del LBA se puede ver afectada por el volumen de solución salina instilada y el lugar y modo de muestreo, así como por las condiciones de transporte. Por eso, se hace preciso un plan de estandarización del procedimiento de recolección del LBA en la Región de Murcia. Así mismo, se debería estandarizar la información registrada en las historias del acto clínico, para que incluya: hora y fecha del procedimiento, historial de tabaquismo, edad y sexo, características clínicas pertinentes (sospecha clínica de diagnóstico subyacente), área(s) específica(s) lavada(s), volumen total instilado y recuperado, aspecto macroscópico del LBA, posición del paciente durante el procedimiento, a parte del resto de información clínica relevante (comorbilidades, tratamientos, etc.).

Sin embargo, la principal limitación que hemos encontrado en este trabajo es la gran variabilidad en la práctica clínica que existe en torno a la patología pulmonar, no ya entre equipos de diferentes centros, sino también entre los profesionales del mismo centro. La medicina moderna se basa en la atención coordinada del paciente desde diversas especialidades. En la catalogación diagnóstica de los pacientes con patología

pulmonar intervienen neumólogos, patólogos, radiólogos, inmunólogos (u otros analistas) y otras especialidades en función de las comorbilidades del paciente. Las guías internacionales han establecido consensos para el apropiado diagnóstico y manejo clínico de estos pacientes y ha propuesto la necesidad de crear comités multidisciplinares que unifiquen los tipos de estudios a realizar en estos pacientes, la forma en que los estudios deben ser informados, como deben ser interpretados los resultados y por último consensuar un diagnóstico apropiado para cada paciente.

Nuestra Región cuenta con especialistas de gran prestigio y alto grado de conocimientos científicos, pero no debemos ignorar la complejidad que plantea el proceso diagnóstico y terapéutico de las EPID. Son cada vez más los motivos para emprender el diseño de planes de mejora asistencial, como la creación de un programa Regional de Atención al paciente EPID, que facilite y unifique la labor del especialista y responda a la demanda de los pacientes, fundamentalmente de aquellos con patología pulmonar fibrosante.

CONCLUSIONES

1. La patología EPID impacta negativamente en la esperanza de vida de los pacientes, con una reducción de la supervivencia de entre 10 a 15 años con relación a la población general. Por ejemplo, los pacientes EPID de entre 55-65 años, muestran curvas de supervivencia superponibles a las de la población general mayor de 75 años.
2. Entre los parámetros biológicos y clínicos, la fibrosis pulmonar estimada como patrones radiológicos con fibrosis, panal o reticular (característico de la NIU), fue la que tuvo mayor impacto negativo en la supervivencia global de los pacientes, con una tasa de supervivencia media a 20 años del 43.8% frente al 78.4% del resto de pacientes o al 87% de la población general.
3. La citometría de flujo ofrece resultados rápidos, precisos y objetivos de las cifras de células inmunitarias del LBA (macrófagos alveolares, neutrófilos, eosinófilos células dendríticas CD1a+, linfocitos totales, linfocitos T CD3, CD4 y CD8 y linfocitos B) que son de utilidad en la catalogación diagnóstica y pronóstica de pacientes con diversas patologías pulmonares.
4. Los análisis estadísticos convencionales y los análisis de *cluster* permiten diferenciar hasta 6 grupos de patologías EPID, en función del patrón de leucocitos del LBA: neumonía-eosinófila (eosinófilos > 3.44%), HPCL (células dendríticas CD1a+ \approx 3.0%), sarcoidosis (linfocitos > 24.56% y cociente-CD4/CD8 > 2.13%), otras patologías con predominio de linfocitos como la NH, NOC y NIL (linfocitos > 24.56% y cocientes CD4/CD8 < 2.13), infecciones (cociente-neutrófilo/linfocito > 1.65%), otras patologías con predominio de neutrófilos como la NIA, NIU y BR-EPID (neutrófilos > 12.05%) y patologías con predominio de macrófagos como NINE, NID, neumoconiosis y EPID-inclasificables. Por tanto, para una correcta catalogación diagnóstica, los datos de citometría deben interpretarse junto a los datos clínicos, radiológicos y anatomopatológicos.
5. Cifras elevadas de linfocitos (>7%) se asocian a supervivencias globales más largas, mientras que cifras elevadas de neutrófilos (>5%) lo hacen a supervivencias más cortas. La combinación de estos dos parámetros (combinación-LN) permite estratificar el riesgo de los pacientes con patología EPID en FAVORABLE (linfocitos >7% y neutrófilos <5%), DESFAVORABLE (linfocitos <7% y neutrófilos >5%) e INTERMEDIO (ninguno de los dos anteriores). Con tasas de supervivencias a 20 años de 79.1%, 65.6% y 47.8%, respectivamente para riesgo favorable, intermedio y desfavorable.

6. La capacidad pronóstica de la estratificación del riesgo basada en la combinación-LN, no se vio afectada por el transporte de las muestras desde otros hospitales, el sexo, la edad o la presencia de fibrosis pulmonar de los pacientes. La combinación-LN tuvo valor pronóstico en patología EPID y patologías agudas (infecciones y NIA), pero no en patologías No-EPID o pacientes con cáncer.
7. La tasa de difusión de monóxido de carbono (DLCO) $<55.5\%$ estimada en las pruebas funcionales complementa la capacidad pronóstica de la combinación-LN, al permitir reclasificar los pacientes de riesgo intermedio en riesgo desfavorable (DLCO $<55.5\%$) y riesgo favorable (DLCO $>55.5\%$).
8. Cifras elevadas de células dendríticas CD1a+ ($>0.6\%$) se asocian a tasas de supervivencia más altas en pacientes con patologías No-EPID y patologías infecciosas, particularmente cuando las cifras de neutrófilos son elevadas. Por tanto, tanto los linfocitos como las células dendríticas parecían tener efectos protectores al contrarrestar el efecto negativo de las cifras elevadas de neutrófilos.
9. El efecto protector de los linfocitos es dosis dependiente. Sin embargo, cuanto mayor es la infiltración de neutrófilos, mayor debe ser la infiltración de linfocitos para poder contrarrestar el efecto adverso de los neutrófilos.
10. La combinación-NL permite identificar pacientes de pronóstico favorable entre los que desarrollan patología pulmonar por contacto habitual con aves, en los que no sería necesario recomendar la interrupción del contacto con las aves ya que muestran supervivencias similares a la población general. Por el contrario, también identifica pacientes con pronóstico desfavorable en los que dicho contacto estaría contraindicado.
11. La combinación-NL podría ser de utilidad para personalizar la terapia inmunosupresora, particularmente en los pacientes con cifras de neutrófilos por debajo del 10% en el LBA, en los que tratamientos no-corticoides podrían ofrecer ventajas frente a los corticoides.
12. Las cifras de linfocitos en el LBA, en especial la de linfocitos T CD8+, tienen valor pronóstico en pacientes con cáncer. Sin embargo, su papel es contrapuesto, en los pacientes con carcinoma de pulmón, cifras elevadas de linfocitos T CD8 se asocian a peor supervivencia. Mientras, en los a pacientes con patología EPID o con cáncer extrapulmonar que desarrollan patología EPID, las cifras elevadas de linfocitos se asocian a mejor supervivencia.
13. En definitiva, la citometría de flujo del LBA ofrece información útil tanto para la orientación diagnóstica, como para la evaluación pronóstica y la orientación del

tratamiento de los pacientes. Sin embargo, estos resultados siempre deberán ser interpretados en el contexto clínico del paciente y a la luz de los resultados del resto de pruebas diagnósticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Travis WD, King TE, Bateman ED, Lynch DA, Capron F, Center D, et al. American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2002 Jan 15 [cited 2023 Feb 16];165(2):277–304. Available from: www.atsjournals.org
2. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2013 Sep 15 [cited 2023 May 29];188(6):733–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24032382/>
3. Crouser ED, Maier LA, Baughman RP, Abston E, Bernstein RC, Blankstein R, et al. Diagnosis and Detection of Sarcoidosis. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2020 Apr 15 [cited 2023 Jul 6];201(8): E26–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32293205/>
4. Graney BA, Fischer A. Interstitial pneumonia with autoimmune features. *Ann Am Thorac Soc* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2023 Aug 1];16(5):525–33. Available from: [/pmc/articles/PMC6850782/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32293205/)
5. Kondoh Y, Makino S, Ogura T, Suda T, Tomioka H, Amano H, et al. 2020 guide for the diagnosis and treatment of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *Respir Investig*. 2021 Nov 1;59(6):709–40.
6. Raghu G, Wilson KC, Bargagli E, Bendstrup E, Chami HA, Chua AT, et al. Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2023 Jul 6];202(3): E36–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32706311/>
7. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic pulmonary fibrosis:

Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(6).

8. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*. 2013;38(1).
9. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4).
10. Baughman RP, Valeyre D, Korsten P, Mathioudakis AG, Wuyts WA, Wells A, et al. ERS clinical practice guidelines on treatment of sarcoidosis. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 5];58(6). Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/58/6/2004079>
11. Kaul B, Cottin V, Collard HR, Valenzuela C. Variability in Global Prevalence of Interstitial Lung Disease. Vol. 8, *Frontiers in Medicine*. 2021.
12. Xaubet A, Ancochea J., Morell F, Rodriguez-Arias JM. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. (1):64-70. 2004 [cited 2023 Apr 25]. p. 64–70 Report on the incidence of interstitial lung diseases in Spain - Búsqueda. Available from: <https://www.bing.com/search?q=Report+on+the+incidence+of+interstitial+lun+g+diseases+in+Spain&form=ANNTH1&refig=6ca0a1a6664b437e9a165c2e9c5cade9>
13. López-Campos JL, Rodríguez-Becerra E. Incidence of interstitial lung diseases in the south of Spain 1998-2000: the RENIA study. *Eur J Epidemiol* [Internet]. 2004 [cited 2023 Apr 25];19(2):155–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15074571/>
14. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1994 [cited 2023 Apr 25];150(4):967–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7921471/>
15. M. J. Linares, J. Jareno, C. Almonacid, A. Casanova, J. Flandes, M.A. Juretschke. Annual Congress 2007 - Clinical aspects of interstitial lung

- disease. 2007 [cited 2023 Apr 25]. Interstitial lung disease incidence in Guadalajara and Madrid community (Spain). Available from: <https://www.ers-education.org/lr/show-details/?idP=4849>
16. Scott J, Johnston I, Britton J. What causes cryptogenic fibrosing alveolitis? A case-control study of environmental exposure to dust. *Br Med J* [Internet]. 1990 Nov 3 [cited 2023 Apr 25];301(6759):1015–7. Available from: <https://www.bmj.com/content/301/6759/1015>
 17. Encinas J, Corral MA, Fernández GC, Águeda DS, De Castro FJ. Aproximación al diagnóstico radiológico de las neumonías intersticiales idiopáticas. Hallazgos en tomografía computarizada de alta resolución. *Radiología* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2023 May 23];54(1):73–84. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-radiologia-119-articulo-aproximacion-al-diagnostico-radiologico-neumonias-S0033833811002323>
 18. Fischer A, Antoniou KM, Brown KK, Cadranet J, Corte TJ, Du Bois RM, et al. An official European Respiratory Society/American Thoracic Society research statement: interstitial pneumonia with autoimmune features. *Eur Respir J* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2023 Apr 30];46(4):976–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26160873/>
 19. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodríguez Becerra E, et al. Diagnóstico y Tratamiento de las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas. *Arch Bronconeumol*. 2003;39(12):580–600.
 20. Martinez FJ, Safrin S, Weycker D, Starko KM, Bradford WZ, King TE, et al. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med* [Internet]. 2005 Jun 21 [cited 2023 Apr 30];142(12 Pt 1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15968010/>
 21. Hambly N, Farooqi MM, Dvorkin-Gheva A, Donohoe K, Garlick K, Scallan C, et al. Prevalence and characteristics of progressive fibrosing interstitial lung disease in a prospective registry. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2023 Sep 5];60(4). Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/60/4/2102571>

22. Nayir Buyuksahin H, Basaran O, Balik Z, Bilginer Y, Ozen S, Dogru D. Interstitial lung disease in autoinflammatory disease in childhood: A systematic review of the literature. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 Sep 5];58(2):367–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36314652/>
23. Kumar A, Cherian S V., Vassallo R, Yi ES, Ryu JH. Current Concepts in Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Smoking-Related Interstitial Lung Diseases. *Chest* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Apr 30];154(2):394–408. Available from: <http://journal.chestnet.org/article/S0012369217331975/fulltext>
24. Dawod YT, Cook NE, Graham WB, Madhani-Lovely F, Thao C. Smoking-associated interstitial lung disease: update and review. <https://doi.org/10.1080/1747634820201766971> [Internet]. 2020 Aug 2 [cited 2023 Sep 5];14(8):825–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17476348.2020.1766971>
25. Johannson KA, Balmes JR, Collard HR. Air pollution exposure: a novel environmental risk factor for interstitial lung disease? *Chest* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Apr 30];147(4):1161–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25846532/>
26. Stevenson BR, Thompson GA, Watson MC, Bundell CS, Klinken EM, John M, et al. Autoantibodies in interstitial lung diseases. *Pathology* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2023 Sep 5];51(5):518–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31230817/>
27. Zerhouni EA, Naidich DP, Stitik FP, Khouri NF, Siegelman SS. Computed tomography of the pulmonary parenchyma. Part 2: Interstitial disease. *J Thorac Imaging* [Internet]. 1985 [cited 2023 Apr 30];1(1):54–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3843414/>
28. Strange C, Highland KB. Interstitial lung disease in the patient who has connective tissue disease. *Clin Chest Med* [Internet]. 2004 Sep [cited 2023 Jun 1];25(3):549–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15331191/>

29. Leslie KO, Trahan S, Gruden J. Pulmonary pathology of the rheumatic diseases. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Aug [cited 2023 Jun 1];28(4):369–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17764055/>
30. Oldham JM, Adegunsoye A, Valenzi E, Lee C, Witt L, Chen L, et al. Characterisation of patients with interstitial pneumonia with autoimmune features. *Eur Respir J* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Jun 1];47(6):1767–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27103387/>
31. Bahmer T, Romagnoli M, Girelli F, Claussen M, Rabe KF. The use of auto-antibody testing in the evaluation of interstitial lung disease (ILD)--A practical approach for the pulmonologist. *Respir Med* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2023 Apr 30];113:80–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26921132/>
32. Mikolasch TA, Garthwaite HS, Porter JC. Update in diagnosis and management of interstitial lung disease. *Clinical Medicine* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 Sep 5];16(Suppl 6):s71. Available from: </pmc/articles/PMC6329571/>
33. Costabel U, Hunninghake GW. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. *Eur Respir J*. 1999;14(4).
34. B Bradley BH, Wells AU, Hirani N. Interstitial lung disease guideline: The British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. *Thorax*. 2008;63(SUPPL. 5).
35. Mario Abinun MA et al. Esid . European Society for Immunodeficiencies. [cited 2023 May 20]. ESID - European Society for Immunodeficiencies. Available from: <https://www.esid.org/Working-Parties/Registry-Working-Party/Diagnosis-criteria>
36. Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: Is it clinically useful? *European Respiratory Journal*. 2011 Oct 1;38(4):761–9.

37. Travis WD, Matsui K, Moss J, Ferrans VJ. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns: survival comparison with usual interstitial pneumonia and desquamative interstitial pneumonia. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2000 Jan [cited 2023 May 30];24(1):19–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10632484/>

38. Kiliç G, Kolsuk EA. The role of bronchoalveolar lavage in diffuse parenchymal lung diseases. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2023 Apr 30];11(5):417–21. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/16093816>

39. Keith C. Meyer GR, Marjolein Drent PLH, Moise's Selman CS. Supplementary . American Thoracic Society Clinical Practice Guideline BAL. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease [Internet]. 2012 Jan [cited 2023 Feb 25]; Available from: https://thoracic-prod-cdn.literatumonline.com/journals/content/ajrccm/2012/ajrccm.2012.185.issue-9/rccm.201202-0320st/production/suppl/ats%20document_data_supplement.pdf?b92b4ad1b4f274c70877518416abb28b88699062dc1e9e1820569d30bc26a8a12b6934d568e0fe0f15bcd5e3cabdf763235524e1fecc7547a719184225177b81cc71b3f936e2478ebd3b81707755e1f057167541b9cdda3d72c80b57d62a6305fa161a8b352b039864dc6f883ab9c083f83c6046ddad2dd9f4ef123daca43520473d1c669b0a7bff33915cc0b2f0cbbc49f3bde216cce5a998965b217affdd51465427e67391a91227520dd5

40. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, Du Bois RM, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: The clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. Vol. 185, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2012.

41. Martín Juan J. Guía de procedimientos: Lavado Broncoalveolar. *Neumosur*. 1994;6(7).

42. Baughman RP. Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure. *Semin Respir Crit Care Med*

- [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 May 25];28(5):475–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975775/>
43. Costabel U. Diffuse Parenchymal Lung Disease. 1st ed. Bois RM, & EJJ, editor. Vol. 36. S Karger Ag; 2007. 22–28 p.
 44. Haslam P, Baughman RP. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. *Eur Respir J* [Internet]. 1999 [cited 2023 May 25];14(2):245–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10515395/>
 45. Meyer KC. The role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Clin Chest Med* [Internet]. 2004 [cited 2023 May 4];25(4):637–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15564013/>
 46. Costabel U, Guzman J. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2001 [cited 2023 May 4];7(5):255–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11584173/>
 47. Baughman RP, Drent M. Role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Clin Chest Med* [Internet]. 2001 [cited 2023 May 4];22(2):331–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11444116/>
 48. Bhatt N, Allen J. Update on eosinophilic lung diseases. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33(5).
 49. Bernheim A, McLoud T. A review of clinical and imaging findings in eosinophilic lung diseases. Vol. 208, *American Journal of Roentgenology*. 2017.
 50. Smith PA, Kohli LM, Wood KL, Hage CA, Twigg HL, Knox KS. Cytometric analysis of BAL T cells labeled with a standardized antibody cocktail correlates with immunohistochemical staining. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2023 Sep 1];70(3):170–8. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/16568476>
 51. Smith PA, Kohli LM, Wood KL, Hage CA, Twigg HL, Knox KS. Cytometric analysis of BAL T cells labeled with a standardized antibody cocktail correlates

- with immunohistochemical staining. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2006 May [cited 2023 Sep 3];70(3):170–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16568476/>
52. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1987 [cited 2023 Jul 17];135(1):250–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3541717/>
53. Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1974;84(4).
54. Patolia S, Kakazu MT, Chami HA, Chua A, Diaz-Mendoza J, Duggal A, et al. Bronchoalveolar Lavage Lymphocytes in the Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis among Patients with Interstitial Lung Disease. *Ann Am Thorac Soc* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Sep 3];17(11):1455–67. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/32757946>
55. Inomata T, Konno S, Nagai K, Suzuki M, Nishimura M. Neutrophil predominance in bronchoalveolar lavage fluid is associated with disease severity and progression of HRCT findings in pulmonary *Mycobacterium avium* infection. *PLoS One* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 Sep 1];13(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30611111/>
56. Jara-Palomares L, Martín-Juan J, Gómez-Izquierdo L, Cayuela-Domínguez A, Rodríguez-Becerra E, Rodríguez-Panadero F. Hallazgos en el lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa. Estudio de una cohorte prospectiva de 562 pacientes. *Arch Bronconeumol*. 2009;45(3).
57. Murayama JI, Yoshizawa Y, Ohtsuka M, Hasegawa S. Lung fibrosis in hypersensitivity pneumonitis. Association with CD4+ but not CD8+ cell dominant alveolitis and insidious onset. *Chest* [Internet]. 1993 [cited 2023 Sep 3];104(1):38–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8325114/>
58. Caillaud DM, Vergnon JM, Madroszyk A, Melloni BM, Murriss M, Dalphin JC. Bronchoalveolar lavage in hypersensitivity pneumonitis: a series of 139

- patients. *Inflamm Allergy Drug Targets* [Internet]. 2012 [cited 2023 Sep 3];11(1):15–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22309080/>
59. Drent M, Mansour K, Linssen C. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 May 2];28(5):486–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975776/>
 60. Oda K, Ishimoto H, Yatera K, Yamada S, Nakao H, Ogoshi T, 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* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 2];52(3):179–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24853018/>
 61. Ohshimo S, Bonella F, Guzman J, Costabel U. Hypersensitivity pneumonitis. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. 2012 Nov [cited 2023 May 2];32(4):537–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23102065/>
 62. AbdullGaffar B, Abdelkareem F. Plasma cell-rich bronchoalveolar lavage fluid: Could be a first clue to IgG4 plasma cell-related lung disease. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 May 2];49(7):E253–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33405362/>
 63. Tricas L, Echeverría A, Blanco MA, Menéndez M, Belda J. Flow cytometry counting of bronchoalveolar lavage leukocytes with a new profile of monoclonal antibodies combination. *Cytometry B Clin Cytom*. 2012;82 B(2).
 64. Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Antoniou KM, Bissell BD, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2022 May 5 [cited 2023 May 21];205(9):e18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35462041/>
 65. Aronson KI, Swigris JJ, Bajwah S, Bianchi P, Corte TJ, Danoff SK, et al. Patient-centered outcomes research in interstitial lung disease: An official american thoracic society research statement. Vol. 204, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society; 2021. p. E3–23.

66. Silver RM, Wells AU. Histopathology and bronchoalveolar lavage. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2008 [cited 2023 May 25];47 Suppl 5(Suppl 5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18784150/>
67. Poletti V, Poletti G, Murer B, Saragoni L, Chilosi M. Bronchoalveolar lavage in malignancy. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 May 4];28(5):534–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975781/>
68. Meyer KC. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 May 4];28(5):546–60. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2007-991527>
69. Costabel U, Guzman J, Bonella F, Oshimo S. Bronchoalveolar lavage in other interstitial lung diseases. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 May 26];28(5):514–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975779/>
70. Ju Ryu Y, Pyo Chung M, Han J, Kim TS, Lee KS, Chun EM, et al. Bronchoalveolar lavage in fibrotic idiopathic interstitial pneumonias. *Respir Med*. 2007 Mar 1;101(3):655–60.
71. Ratjen F, Costabel U, Griese M, Paul K. Bronchoalveolar lavage fluid findings in children with hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2023 Mar 7];21(1):144–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12570123/>
72. Hogeia SP, Tudorache E, Pescaru C, Marc M, Oancea C. Bronchoalveolar lavage: role in the evaluation of pulmonary interstitial disease. *Expert Rev Respir Med*. 2020 Nov 1;14(11):1117–30.
73. Collard HR, Richeldi L. Interstitial Lung Disease. *Interstitial Lung Disease*. 2018 Jan 1;1–190.
74. Tomashefski JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* [Internet]. 2000 [cited 2023 May 30];21(3):435–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11019719/>

75. Beasley MB. The pathologist's approach to acute lung injury. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2010 May [cited 2023 May 30];134(5):719–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20441502/>
76. Katzenstein ALA, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1998 [cited 2023 May 30];157(4 Pt 1):1301–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9563754/>
77. Travis WD, Matsui K, Moss J, Ferrans VJ. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns: survival comparison with usual interstitial pneumonia and desquamative interstitial pneumonia. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2000 Jan [cited 2023 May 30];24(1):19–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10632484/>
78. Tomassetti S, Wells AU, Costabel U, Cavazza A, Colby T V., Rossi G, et al. Bronchoscopic Lung Cryobiopsy Increases Diagnostic Confidence in the Multidisciplinary Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2023 Apr 30];193(7):745–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26562389/>
79. Katzenstein ALA, Fiorelli RF. Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 1994 Feb 1 [cited 2023 May 30];18(2):136–47. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/8291652>
80. Fraig M, Shreesha U, Savici D, Katzenstein ALA. Respiratory bronchiolitis: a clinicopathologic study in current smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2002 [cited 2023 May 23];26(5):647–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11979095/>
81. Ware LB, Matthay MA. The Acute Respiratory Distress Syndrome. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005043421806> [Internet]. 2000 May 4 [cited 2023 May 30];342(18):1334–49. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200005043421806>
82. Katzenstein ALA, Mukhopadhyay S, Zanardi C, Dexter E. Clinically occult interstitial fibrosis in smokers: classification and significance of a surprisingly

common finding in lobectomy specimens. *Hum Pathol*. 2010 Mar 1;41(3):316–25.

83. Utz JP, Swensen SJ, Gertz MA. Pulmonary amyloidosis. The Mayo Clinic experience from 1980 to 1993. *Ann Intern Med* [Internet]. 1996 Feb 1 [cited 2023 May 30];124(4):407–13. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/8554249>
84. de los Santos Sastre S, Carretera Sevilla-Huelva E. Capacidad de difusión de monóxido de carbono: principios teóricos, formas de medición y aplicaciones clínicas. *Neumosur: revista de la Asociación de Neumólogos del Sur*, ISSN-e 0214-6266, Vol 2, N° 2, 1990, págs 57-75 [Internet]. 1990 [cited 2023 May 1];2(2):57–75. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7409013>
85. Petro W, Müller E, Bergmann KC, Unger U, Vogel J. Impaired CO transfer factors in bird fancier's lung. *Lung* [Internet]. 1978 Dec 1 [cited 2023 Apr 30];155(1):269–76. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02730701>
86. King TE, Tooze JA, Schwarz MI, Brown KR, Cherniack RM. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: Scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(7).
87. Schwartz DA, Helmers RA, Galvin JR, Van Fossen DS, Frees KL, Dayton CS, et al. Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1994 [cited 2023 Jul 7];149(2 Pt 1):450–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8306044/>
88. Kataoka K, Oda K, Takizawa H, Ogura T, Miyamoto A, Inoue Y, et al. Cohort study to evaluate prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis patients introduced to oxygen therapy. *Scientific Reports* 2023 13:1 [Internet]. 2023 Aug 22 [cited 2023 Sep 3];13(1):1–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-40508-8>
89. Hurst JR, Han MLK, Singh B, Sharma S, Kaur G, de Nigris E, et al. Prognostic risk factors for moderate-to-severe exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic literature review. *Respiratory*

- Research 2022 23:1 [Internet]. 2022 Aug 23 [cited 2023 Sep 3];23(1):1–23. Available from: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-022-02123-5>
90. Howard LS. Prognostic factors in pulmonary arterial hypertension: assessing the course of the disease. *Eur Respir Rev* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2023 Sep 1];20(122):236–42. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC9487744>
 91. Achaiah A, Rathnapala A, Pereira A, Bothwell H, Dwivedi K, Barker R, et al. Neutrophil lymphocyte ratio as an indicator for disease progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *BMJ Open Respir Res* [Internet]. 2022 Jun 17 [cited 2023 Aug 24];9(1). Available from: [/pmc/articles/PMC9207910/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36483266/)
 92. Mikolasch TA, George PM, Sahota J, Nancarrow T, Barratt SL, Woodhead FA, et al. multi-center evaluation of baseline neutrophil-to-lymphocyte (NLR) ratio as an independent predictor of mortality and clinical risk stratifier in idiopathic pulmonary fibrosis. *EClinicalMedicine* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 Jun 4];55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36483266/>
 93. Kanaoka K, Minami S, Ihara S, Komuta K. High neutrophils and low lymphocytes percentages in bronchoalveolar lavage fluid are prognostic factors of higher in-hospital mortality in diffuse alveolar hemorrhage. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Jun 4];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34503470/>
 94. Feng H, Yan L, Zhao Y, Li Z, Kang J. Neutrophils in Bronchoalveolar Lavage Fluid Indicating the Severity and Relapse of Pulmonary Sarcoidosis. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 2021 Feb 2 [cited 2023 Aug 24];8:787681. Available from: [/pmc/articles/PMC8847269/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36483266/)
 95. D’Alessandro M, Bergantini L, Carleo A, Cameli P, Perrone A, Fossi A, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in bronchoalveolar lavage from IPF patients: ¿a novel prognostic biomarker? *Minerva Med* [Internet]. 2020 May 14 [cited 2023 Aug 24];113(3):526–31. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/32407050>

96. Ryu WK, Moon Y, Park MH, Lim JH, Kim YS, Lee KH, et al. A Preliminary Study on the Prognostic Impact of Neutrophil to Lymphocyte Ratio of the Bronchoalveolar Lavage Fluid in Patients with Lung Cancer. *Diagnostics (Basel)* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Jun 4];11(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34943437/>
97. Inomata T, Konno S, Nagai K, Suzuki M, Nishimura M. Neutrophil predominance in bronchoalveolar lavage fluid is associated with disease severity and progression of HRCT findings in pulmonary *Mycobacterium avium* infection. *PLoS One* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 Jun 4];13(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29401501/>
98. Meyer KC. Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. 2017 May 4 [cited 2023 Apr 27];11(5):343–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28345383/>
99. Pedraza-Serrano F, De Andrés AL, Jiménez-García R, Jiménez-Trujillo I, Hernández-Barrera V, Sánchez-Muñoz G, et al. Retrospective observational study of trends inhospital admissions for idiopathic pulmonary fibrosis in Spain (2004-2013) using administrative data. *BMJ Open*. 2017;7(2).
100. Aldera JK, Barkauskas CE, Limjunyawong N, Stanley SE, Kembou F, Tuder RM, et al. Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2015 Apr 21 [cited 2023 May 1];112(16):5099–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25840590/>
101. Armanios MY, Chen JJL, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2007 Mar 29 [cited 2023 May 1];356(13):1317–26. Available from: <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/telomerase-mutations-in-families-with-idiopathic-pulmonary-fibros-6>
102. Moisés Selman, Ivette Buendía-Roldán, Annie Pardo. Aging and Pulmonary Fibrosis. *Rev Inves Clin*, 2016. 68: p. 75-83. *Revista de investigación clínica* . 2013 Dec;14(6):609–15.

103. Byun HO, Lee YK, Kim JM, Yoon G. From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB Rep* [Internet]. 2015 [cited 2023 May 1];48(10):549–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26129674/>
104. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of Aging. *Cell*. 2013 jun 6;153(6):1194.
105. Minagawa S, Araya J, Numata T, Nojiri S, Hara H, Yumino Y, et al. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2023 May 1];300(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21224216/>
106. Gilani SR, Vuga LJ, Lindell KO, Gibson KF, Xue J, Kaminski N, et al. CD28 down-regulation on circulating CD4 T-cells is associated with poor prognoses of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan 29 [cited 2023 May 1];5(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20126467/>
107. Hunninghake GW, Bridget Zimmerman M, Schwartz DA, King TE, Lynch J, Hegele R, et al. Utility of a lung biopsy for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(2).
108. Lynch DA, Sverzellati N, Travis WD, Brown KK, Colby T V., Galvin JR, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 May 4];6(2):138–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29154106/>
109. Antón E, De Miguel J, Hermida JA, Aramburu JA, Jara B, Juretschke MA. Neumonía intersticial aguda: evolución favorable con tratamiento esteroide. *Arch Bronconeumol*. 2001 Jan 1;37(7):286–8.
110. Manfredi A, Cassone G, Luppi F, Atienza-Mateo B, Cavazza A, Sverzellati N, et al. Rheumatoid arthritis related interstitial lung disease. *Expert Rev Clin Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2023 Feb 19];17(5):485–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33779447/>

111. Shorr AF, Scoville SL, Cersovsky SB, Shanks GD, Ockenhouse CF, Smoak BL, et al. Acute eosinophilic pneumonia among US Military personnel deployed in or near Iraq. *JAMA* [Internet]. 2004 Dec 22 [cited 2023 May 23];292(24):2997–3005. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15613668/>
112. Girard M, Israël-Assayag E, Cormier Y. Pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2023 May 23];4(2):93–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15021060/>
113. Niewoehner DE, Kleinerman J, Rice DB. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med* [Internet]. 1974 Oct 10 [cited 2023 May 23];291(15):755–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4414996/>
114. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodríguez Becerra E, et al. Diagnosis and treatment of diffuse interstitial lung diseases]. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2003 Jan [cited 2023 Apr 27];39(12):580–600. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14636495/>
115. Ryu JH, Myers JL, Capizzi SA, Douglas WW, Vassallo R, Decker PA. Desquamative interstitial pneumonia and respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease. *Chest* [Internet]. 2005 [cited 2023 May 23];127(1):178–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15653981/>
116. Zinn DJ, Chakraborty R, Allen CE. Langerhans Cell Histiocytosis: Emerging Insights and Clinical Implications. *Oncology (Williston Park)* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Mar 6];30(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26888790/>
117. Lommatzsch M, Bratke K, Stoll P, Mülleneisen N, Prall F, Bier A, et al. Bronchoalveolar lavage for the diagnosis of Pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Respir Med* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2023 Feb 19];119:168–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27692140/>

118. Vassallo R, Ryu JH, Colby T V., Hartman T, Limper AH. Pulmonary Langerhans'-Cell Histiocytosis. <https://doi.org/10.1056/NEJM200006293422607> [Internet]. 2000 Jun 29 [cited 2023 Sep 3];342(26):1969–78. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200006293422607>
119. Favara BE. Langerhans cell histiocytosis: An identity crisis. *Med Pediatr Oncol.* 2001;37(6):545.
120. Chaowalit N, Pellikka PA, Decker PA, Aubry MC, Krowka MJ, Ryu JH, et al. Echocardiographic and clinical characteristics of pulmonary hypertension complicating pulmonary langerhans cell histiocytosis. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2023 Sep 3];79(10):1269–75. Available from: <http://www.mayoclinicproceedings.org/article/S002561961162661X/fulltext>
121. Diamond EL, Durham BH, Haroche J, Yao Z, Ma J, Parikh SA, et al. Diverse and targetable kinase alterations drive histiocytic neoplasms. *Cancer Discov* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Sep 3];6(2):154–65. Available from: <https://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0913>
122. Harmon CM, Brown N. Langerhans Cell Histiocytosis: A Clinicopathologic Review and Molecular Pathogenetic Update. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2023 Sep 3];139(10):1211–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26414464/>
123. Yousem SA, Dacic S, Nikiforov YE, Nikiforova M. Pulmonary langerhans cell histiocytosis: Profiling of multifocal tumors using next-generation sequencing identifies concordant occurrence of BRAF V600E mutations. *Chest* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2023 Sep 3];143(6):1679–84. Available from: <http://journal.chestnet.org/article/S0012369213603980/fulltext>
124. Mourah S, How-Kit A, Meignin V, Gossot D, Lorillon G, Bugnet E, et al. Recurrent NRAS mutations in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Sep 3];47(6):1785–96. Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/47/6/1785>

125. Diamond EL, Subbiah V, Craig Lockhart A, Blay JY, Puzanov I, Chau I, et al. Vemurafenib for BRAF V600-Mutant Erdheim-Chester Disease and Langerhans Cell Histiocytosis: Analysis of Data From the Histology-Independent, Phase 2, Open-label VE-BASKET Study. *JAMA Oncol* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Sep 3];4(3):384–8. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2664827>
126. Donadieu J, Larabi IA, Tardieu M, Visser J, Hutter C, Sieni E, et al. Vemurafenib for Refractory Multisystem Langerhans Cell Histiocytosis in Children: An International Observational Study. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2019 Nov 11 [cited 2023 Sep 3];37(31):2857. Available from: </pmc/articles/PMC6823889/>
127. Cordier JF. Cryptogenic organising pneumonia. *Eur Respir J* [Internet]. 2006 Aug [cited 2023 Apr 27];28(2):422–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16880372/>
128. Cha SI, Fessler MB, Cool CD, Schwarz MI, Brown KK. Lymphoid interstitial pneumonia: clinical features, associations and prognosis. *Eur Respir J* [Internet]. 2006 Aug [cited 2023 May 1];28(2):364–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16571614/>
129. Ryerson CJ, Urbania TH, Richeldi L, Mooney JJ, Lee JS, Jones KD, et al. Prevalence and prognosis of unclassifiable interstitial lung disease. *Eur Respir J* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2023 Apr 30];42(3):750–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23222877/>
130. Kinder BW, Collard HR, Koth L, Daikh DI, Wolters PJ, Elicker B, et al. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: Lung manifestation of undifferentiated connective tissue disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(7).
131. Dixon S, Benamore R. The idiopathic interstitial pneumonias: Understanding key radiological features. Vol. 65, *Clinical Radiology*. 2010.
132. O'Donnell DE, Ora J, Webb KA, Laveneziana P, Jensen D. Mechanisms of activity-related dyspnea in pulmonary diseases. *Respir Physiol Neurobiol*

- [Internet]. 2009 May 30 [cited 2023 Jun 1];167(1):116–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19450767/>
133. G R, KJ A, TE K, JA L, FJ M. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 May 24 [cited 2023 Jun 1];366(21):1968–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22607134/>
 134. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Bois RMD, Fagan EA, et al. Pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis: analysis of pooled data from three multinational phase 3 trials. *Eur Respir J* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Jun 1];47(1):243–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26647432/>
 135. Fischer A, West SG, Swigris JJ, Brown KK, Du Bois RM. Connective tissue disease-associated interstitial lung disease: a call for clarification. *Chest* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2023 Jun 3];138(2):251–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20682528/>
 136. Tanizawa K, Handa T, Nakashima R, Kubo T, Hosono Y, Watanabe K, et al. HRCT features of interstitial lung disease in dermatomyositis with anti-CADM-140 antibody. *Respir Med* [Internet]. 2011 Sep [cited 2023 Jun 3];105(9):1380–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21632230/>
 137. Hanke K, Brückner CS, Dährnich C, Huscher D, Komorowski L, Meyer W, et al. Antibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2009 Feb 16 [cited 2023 Jun 3];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19220911/>
 138. Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, et al. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1998 [cited 2023 Jun 3];157(1):199–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9445300/>
 139. Chetta A, Aiello M, Foresi A, Marangio E, D'Ippolito R, Castagnaro A, et al. Relationship between outcome measures of six-minute walk test and baseline lung function in patients with interstitial lung disease. *Sarcoidosis Vasc Diffuse*

- Lung Dis [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2023 Jun 3];18(2):170–5. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/11436537>
140. Wallace T. Miller. Diagnostic Thoracic Imaging [Internet]. 2006 [cited 2023 Jun 3]. Available from: <https://www.mhebooklibrary.com/doi/book/10.1036/9780071487399>
 141. Stack BHR, Grant IWB. Rheumatoid interstitial lung disease. *Br J Dis Chest*. 1965 Oct 1;59(4):202–11.
 142. Kim EA, Lee KS, Johkoh T, Tae SK, Gee YS, Kwon OJ, et al. Interstitial lung diseases associated with collagen vascular diseases: radiologic and histopathologic findings. *Radiographics* [Internet]. 2002 [cited 2023 Jun 3];22 Spec No(SPEC. ISS). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12376608/>
 143. Tanaka N, Kim JS, Newell JD, Brown KK, Cool CD, Meehan R, et al. Rheumatoid arthritis-related lung diseases: CT findings. *Radiology* [Internet]. 2004 Jul [cited 2023 Jun 3];232(1):81–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15166329/>
 144. Kocheril S V., Appleton BE, Somers EC, Kazerooni EA, Flaherty KR, Martinez FJ, et al. Comparison of disease progression and mortality of connective tissue disease-related interstitial lung disease and idiopathic interstitial pneumonia. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2005 Aug 15 [cited 2023 Jun 3];53(4):549–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16082627/>
 145. Walsh SLF, Hansell DM. Diffuse interstitial lung disease: overlaps and uncertainties. *Eur Radiol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2023 Jun 3];20(8):1859–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20204644/>
 146. Travis WD, Hunninghake G, King TE, Lynch DA, Colby T V., Galvin JR, et al. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: report of an American Thoracic Society project. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2008 Jun 15 [cited 2023 Jun 3];177(12):1338–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18388353/>

147. Mathai SC, Danoff SK. Management of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *BMJ* [Internet]. 2016 Feb 24 [cited 2023 Jun 3];352. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26912511/>
148. Luppi F, Sebastiani M, Salvarani C, Bendstrup E, Manfredi A. Acute exacerbation of interstitial lung disease associated with rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Jul 7];18(2):85–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34876670/>
149. Xiangyang Z, Lutian Y, Lin Z, Liping X, Hui S, Jing L. Increased levels of interleukin-33 associated with bone erosion and interstitial lung diseases in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2012;58(1).
150. Ramos-Casals M, Perez-Alvarez R, Perez-De-Lis M, Xaubet A, Bosch X. Pulmonary disorders induced by monoclonal antibodies in patients with rheumatologic autoimmune diseases. Vol. 124, *American Journal of Medicine*. 2011.
151. Bonniaud P, Georges M, Favrolt N, Camus P. Drug-induced interstitial lung diseases. *Revue du Praticien*. 2014;64(7).
152. Arakawa H, Yamasaki M, Kurihara Y, Yamada H, Nakajima Y. Methotrexate-Induced Pulmonary Injury: Serial CT findings. *J Thorac Imaging*. 2003;18(4).
153. Salaffi F, Carotti M, Di Carlo M, Tardella M, Giovagnoni A, Adamek M. High-resolution computed tomography of the lung in patients with rheumatoid arthritis: Prevalence of interstitial lung disease involvement and determinants of abnormalities. *Medicine (United States)*. 2019;98(38).
154. Chen J, Shi Y, Wang X, Huang H, Ascherman D. Asymptomatic preclinical rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013.
155. Garcia JGN, James HL, Zinkgraf S, Perlman MB, Keogh BA. Lower respiratory tract abnormalities in rheumatoid interstitial lung disease. Potential role of neutrophils in lung injury. *American Review of Respiratory Disease*. 1987;136(4).

156. Biederer J, Schnabel A, Muhle C, Gross WL, Heller M, Reuter M. Correlation between HRCT findings, pulmonary function tests and bronchoalveolar lavage cytology in interstitial lung disease associated with rheumatoid arthritis. *Eur Radiol.* 2004;14(2).
157. Nagasawa Y, Takada T, Shimizu T, Narita JI, Moriyama H, Terada M, et al. Inflammatory cells in lung disease associated with rheumatoid arthritis. *Internal Medicine.* 2009;48(14).
158. Chong S, Lee KS, Chung MJ, Han J, Kwon OJ, Kim TS. Pneumoconiosis: Comparison of Imaging and Pathologic Findings1. <https://doi.org/10.1148/rg.261055070> [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2023 Feb 21];26(1):59–77. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.261055070>
159. Hedlund U, Jonsson H, Eriksson K, Järholm B. Exposure-response of silicosis mortality in Swedish iron ore miners. *Ann Occup Hyg* [Internet]. 2008 Jan [cited 2023 Feb 21];52(1):3–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18063590/>
160. Talay F, Gurel K, Gurel S, Kurt B, Tug T. Silicosis in manufacture of electric cable: report of four cases. *J Occup Health* [Internet]. 2007 Sep [cited 2023 Feb 21];49(5):405–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17951974/>
161. Murray J, Kielkowski D, Reid P. Occupational disease trends in black South African gold miners. An autopsy-based study. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1996 [cited 2023 Feb 21];153(2):706–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8564121/>
162. Manual de neumología ocupacional [Internet]. [cited 2023 Feb 21]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-patologia-respiratoria-318-pdf-S1576989510700114>
163. Plaza C, González-Viñolis M, Quirce S, Barranco P. Neumonitis por hipersensibilidad (alveolitis alérgica extrínseca). *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.* 2018 Nov 1;12(67):3936–40.

164. Hamblin M, Prosch H, Vašáková M. Diagnosis, course and management of hypersensitivity pneumonitis. *European Respiratory Review* [Internet]. 2022 Mar 31 [cited 2023 Jul 6];31(163). Available from: <https://err.ersjournals.com/content/31/163/210169>
165. Chen ES, Moller DR. Sarcoidosis - Scientific progress and clinical challenges. Vol. 7, *Nature Reviews Rheumatology*. 2011.
166. Brauner MW, Grenier P, Tijani K, Battesti JP, Valeyre D. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis: evolution of lesions on CT scans. <https://doi.org/10.1148/radiology20429240543> [Internet]. 1997 Aug 1 [cited 2023 Jul 4];204(2):497–502. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiology.204.2.9240543>
167. Newman LS, Rose CS, Bresnitz EA, Rossman MD, Barnard J, Frederick M, et al. A case control etiologic study of sarcoidosis: Environmental and occupational risk factors. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2004 Dec 15 [cited 2023 Mar 6];170(12):1324–30. Available from: <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/a-case-control-etiological-study-of-sarcoidosis-environmental-and-o-5>
168. Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, Thompson BW, Rossman MD, Bresnitz EA, et al. Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2023 Mar 6];164(11):2085–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11739139/>
169. Fischer A, Grunewald J, Spagnolo P, Nebel A, Schreiber S, Müller-Quernheim J. Genetics of sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 6];35(3):296–306. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25007082/>
170. Gabilovich MI, Walrath J, Van Lunteren J, Nethery D, Seifu M, Kern JA, et al. Disordered Toll-like receptor 2 responses in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2023 Mar 6];173(3):512–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23668840/>

171. Wennerström A, Pietinalho A, Lasota J, Salli K, Surakka I, Seppänen M, et al. Major histocompatibility complex class II and BTNL2 associations in sarcoidosis. *Eur Respir J* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2023 Mar 6];42(2):550–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23904553/>
172. Rich RR. Editorial Elsevier. [cited 2023 Feb 24]. *Clinical Immunology*. Fifth edition. Available from: [https://bookshelf.health.elsevier.com/reader/books/9780702070402/epubcfi/6/174\[%3Bvnd.vst.idref%3Did_chp00072\]!/4/2/12/2\[s0010\]/6/2\[f0010\]/2\[ln0010\]%4051:26](https://bookshelf.health.elsevier.com/reader/books/9780702070402/epubcfi/6/174[%3Bvnd.vst.idref%3Did_chp00072]!/4/2/12/2[s0010]/6/2[f0010]/2[ln0010]%4051:26)
173. Johnson SR. Lymphangiomyomatosis. *European Respiratory Journal*. 2006 May;27(5):1056–65.
174. Tanaka M, Hirata H, Wataya-Kaneda M, Yoshida M, Katayama I. Lymphangiomyomatosis and multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia in Japanese patients with tuberous sclerosis complex1Drs. Tanaka and Hirata contributed equally to this article. *Respir Investig*. 2016 Jan 1;54(1):8–13.
175. Ries AL, Bauldoff GS, Carlin BW, Casaburi R, Emery CF, Mahler DA, et al. Pulmonary rehabilitation: Joint ACCP/AACVPR Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2007;131(5 SUPPL.).
176. Clark M, Cooper B, Singh S, Cooper M, Carr A, Hubbard R. A survey of nocturnal hypoxaemia and health related quality of life in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax*. 2001;56(6).
177. Carrington CB, Gaensler EA, Coutu RE, FitzGerald MX, Gupta RG. Natural History and Treated Course of Usual and Desquamative Interstitial Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 1978;298(15).
178. Raghu G, Johnson WC, Lockhart D, Mageto Y. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone: Results of a prospective, open-label phase II study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(4 I).

179. Smith CM, Moser KM. Management for interstitial lung disease. State of the art. *Chest*. 1989;95(3).
180. Rojas-Serrano J, González-Velásquez E, Mejía M, Sánchez-Rodríguez A, Carrillo G. Interstitial lung disease related to rheumatoid arthritis: Evolution after treatment. *Reumatol Clin*. 2012;8(2).
181. Sanchez-Ramirez DC, Kosowan L, Singer A. Management of cough in patients with idiopathic interstitial lung diseases in primary care. *Chron Respir Dis* [Internet]. 2022 Mar 30 [cited 2023 Sep 5];19:1–6. Available from: </pmc/articles/PMC8984847/>
182. Cohen JM, Miller A, Spiera H. Interstitial pneumonitis complicating rheumatoid arthritis. Sustained remission with azathioprine therapy. *Chest*. 1977;72(4).
183. Broen JCA, van Laar JM. Mycophenolate mofetil, azathioprine and tacrolimus: mechanisms in rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology* 2020 16:3 [Internet]. 2020 Feb 13 [cited 2023 Sep 5];16(3):167–78. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41584-020-0374-8>
184. Nannini C, West CP, Erwin PJ, Matteson EL. Effects of cyclophosphamide on pulmonary function in patients with scleroderma and interstitial lung disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and observational prospective cohort studies. Vol. 10, *Arthritis Research and Therapy*. 2008.
185. Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, Furst DE, Khanna D, Kleerup EC, et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 Sep 5];4(9):708–19. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2213260016301527/fulltext>
186. Saketkoo LA, Espinoza LR. Experience of mycophenolate mofetil in 10 patients with autoimmune-related interstitial lung disease demonstrates promising effects. *American Journal of the Medical Sciences*. 2009;337(5).

187. Yiannopoulos G, Pastromas V, Antonopoulos I, Katsiberis G, Kalliolias G, Liossis SN, et al. Combination of intravenous pulses of cyclophosphamide and methylprednisolone in patients with systemic sclerosis and interstitial lung disease. *Rheumatol Int.* 2007;27(4).
188. Chang HK, Park W, Ryu DS. Successful treatment of progressive rheumatoid interstitial lung disease with cyclosporine: a case report. *J Korean Med Sci.* 2002;17(2).
189. Carrasco Cubero C, Chamizo Carmona E, Vela Casasempere P. Revisión sistemática sobre el impacto de los fármacos en la enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada a Artritis Reumatoide. *Reumatol Clin.* 2021 Nov 1;17(9):504–13.
190. Rybicki BA, Iannuzzi MC. Epidemiology of sarcoidosis: recent advances and future prospects. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Feb [cited 2023 Mar 6];28(1):22–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17330190/>
191. Baughman RP, Lower EE. Treatment of Sarcoidosis. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2015 Aug 22 [cited 2023 Mar 6];49(1):79–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25989728/>
192. Vorselaars ADM, Van Moorsel CHM, Deneer VHM, Grutters JC. Current therapy in sarcoidosis, the role of existing drugs and future medicine. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2013;12(6):369–77.
193. Papiris S, Stagaki E, Papadaki G, Kolilekas L, Korbila I, Apollonatos V, et al. Mycophenolate mofetil as an alternative treatment in sarcoidosis. *Pulm Pharmacol Ther* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 Sep 3];58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31518648/>
194. Hebert RS, Arnold RM, Schulz R. Improving well-being in caregivers of terminally ill patients. Making the case for patient suffering as a focus for intervention research. *J Pain Symptom Manage* [Internet]. 2007 Nov [cited 2023 May 21];34(5):539–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17616333/>

195. Vianello A, Arcaro G, Battistella L, Pipitone E, Vio S, Concas A, et al. Noninvasive ventilation in the event of acute respiratory failure in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Crit Care* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 21];29(4):562–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24768565/>
196. Schachna L, Medsger TA, Dauber JH, Wigley FM, Braunstein NA, White B, et al. Lung transplantation in scleroderma compared with idiopathic pulmonary fibrosis and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum*. 2006;54(12).
197. Vasco-Mogorrón MA, Campillo JA, Periago A, Cabañas V, Berenguer M, García-Garay MC, et al. Blood-based risk stratification for pre-malignant and symptomatic plasma cell neoplasms to improve patient management. *Am J Cancer Res*. 2021;11(6).
198. Mrad A, Huda N. Acute Interstitial Pneumonia. *StatPearls* [Internet]. 2022 Aug 8 [cited 2023 Feb 19]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554429/>
199. Bouros D, Nicholson AC, Polychronopoulos V, Du Bois RM. Acute interstitial pneumonia.
200. Gharsalli H, Mlika M, Sahnoun I, Maalej S, Douik El Gharbi L, Mezni F El. The utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung diseases: A clinicopathological perspective. Vol. 35, *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2018.
201. Raghu G, Mageto YN, Lockhart D, Schmidt RA, Wood DE, Godwin JD. The accuracy of the clinical diagnosis of new-onset idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung disease: A prospective study. *Chest*. 1999;116(5).
202. Behr J, Furst DE. Pulmonary function tests. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2008 [cited 2023 Jun 4];47 Suppl 5(SUPPL. 5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18784151/>
203. Chen H, Zhou N, Shi H, Yu W, Wu L, Zhou F. Presentation and outcomes of patients with multiple myeloma harboring gain or amplification of 1q21 and receiving novel agent therapies: results from a single-center study.

Hematology [Internet]. 2023 Dec 31 [cited 2023 Feb 19];28(1):2177979. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36794720>

204. Pérez-Alva J, Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Farré Mateos J, Sisó Almirall A, López Soto A. Autoinmunidad y geriatría. *Medicina Integral* [Internet]. 2002 Jul 30 [cited 2023 Sep 3];40(3):108–17. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-autoinmunidad-geriatria-13036145>
205. Etensohn DB, Jankowski MJ, Redondo AA, Duncan PG. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. 2. Safety and results of repeated BAL, and use in the assessment of intrasubject variability. *Chest* [Internet]. 1988 [cited 2023 Jun 13];94(2):281–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3396404/>
206. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. The BAL Cooperative Group Steering Committee. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1990 May 1 [cited 2023 Jun 13];141(5 Pt 2):S169-202. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/2186681>
207. Xu-Vanpala S, Deerhake ME, Wheaton JD, Parker ME, Juvvadi PR, MacIver N, et al. Functional heterogeneity of alveolar macrophage population based on expression of CXCL2. *Sci Immunol* [Internet]. 2020 Aug 8 [cited 2023 Sep 3];5(50). Available from: </pmc/articles/PMC7717592/>
208. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, et al. Smoking-dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of COPD. *J Immunol* [Internet]. 2009 Aug 8 [cited 2023 Sep 3];183(4):2867. Available from: </pmc/articles/PMC2873685/>
209. Fritsch P, Masse R. Overview of pulmonary alveolar macrophage renewal in normal rats and during different pathological processes. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1992 [cited 2023 Sep 3];97:59. Available from: </pmc/articles/PMC1519558/?report=abstract>

210. Achaiah A, Rathnapala A, Pereira A, Bothwell H, Dwivedi K, Barker R, et al. Neutrophil lymphocyte ratio as an indicator for disease progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *BMJ Open Respir Res* [Internet]. 2022 Jun 17 [cited 2023 Jun 4];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35715193/>
211. Obayashi Y, Yamadori I, Fujita J, Yoshinouchi T, Ueda N, Takahara J. The role of neutrophils in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* [Internet]. 1997 [cited 2023 Jun 14];112(5):1338–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9367478/>
212. Angell HK, Bruni D, Carl Barrett J, Herbst R, Galon J. The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2023 Jun 4];26(2):332–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31413009/>
213. Jara-Palomares L, Martín-Juan J, Gómez-Izquierdo L, Cayuela-Domínguez A, Rodríguez-Becerra E, Rodríguez-Panadero F. Hallazgos en el lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa. Estudio de una cohorte prospectiva de 562 pacientes. *Arch Bronconeumol*. 2009;45(3).
214. Turner-Warwick ME, Haslam PL. Clinical applications of bronchoalveolar lavage: an interim view. *Br J Dis Chest* [Internet]. 1986 [cited 2023 Jul 17];80(2):105–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3524646/>
215. Schnabel A, Richter C, Bauerfeind S, Gross WL. Bronchoalveolar lavage cell profile in methotrexate induced pneumonitis. *Thorax* [Internet]. 1997 [cited 2023 May 26];52(4):377–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9196524/>
216. Costabel U, Uzaslan E, Guzman J. Bronchoalveolar lavage in drug-induced lung disease. *Clin Chest Med* [Internet]. 2004 Mar [cited 2023 May 4];25(1):25–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15062594/>
217. Winterbauer RH, Lammert J, Selland M, Wu R, Corley D, Springmeyer SC. Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest*

- [Internet]. 1993 [cited 2023 Mar 7];104(2):352–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8339618/>
218. Pirozynski M. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of peripheral, primary lung cancer. *Chest* [Internet]. 1992 Aug 1 [cited 2023 Jul 3];102(2):372–4. Available from: <http://journal.chestnet.org/article/S0012369216340272/fulltext>
 219. Strange C, Bolster MB, Roth MD, Silver RM, Theodore A, Goldin J, et al. Bronchoalveolar lavage and response to cyclophosphamide in scleroderma interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(1).
 220. Meyer KC. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis and management of interstitial lung diseases. Vol. 14, *Clinical Pulmonary Medicine*. 2007.
 221. Wells AU. The clinical utility of bronchoalveolar lavage in diffuse parenchymal lung disease. Vol. 19, *European Respiratory Review*. 2010.
 222. Barbers RG, Gong H, Tashkin DP, Oishi J, Wallace JM. Differential examination of bronchoalveolar lavage cells in tobacco cigarette and marijuana smokers. *American Review of Respiratory Disease*. 1987;135(6).
 223. Stover DE, Zaman MB, Hajdu SI, Lange M, Gold J, Armstrong D. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosuppressed host. *Ann Intern Med*. 1984;101(1).
 224. Akoun GM, Cadranel JL, Blanchette G, Milleron BJ, Mayaud CM. Bronchoalveolar lavage cell data in amiodarone-associated pneumonitis: Evaluation in 22 patients. *Chest*. 1991;99(5):1177–82.
 225. Zaidi A, Kaur H, Gupta P, Gupta N, Srinivasan R, Dey P, et al. Role of bronchoalveolar lavage in diagnosing pulmonary infections and malignancies: Experience from a tertiary care center. *Diagn Cytopathol*. 2020;48(12).
 226. 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* [Internet]. 1986 [cited 2023 Aug 8];24(5):559–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3097810/>

227. Jeganathan N, Sathananthan M. Connective Tissue Disease-Related Interstitial Lung Disease: Prevalence, Patterns, Predictors, Prognosis, and Treatment. *Lung*. 2020;198(5).
228. Justin M. Oldham, Ayodeji Adegunsoye , Eleanor Valenzi, Cathryn Lee. Characterisation of patients with interstitial pneumonia with autoimmune features. Vol. 49, *The European respiratory journal*. 2017.
229. J.. Flandes Aldeyturriagaa. El lavado broncoalveolar: un procedimiento sencillo que aporta mucha información | *Revista de Patología Respiratoria* [Internet]. 2011 [cited 2023 May 29]. p. 41–2. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-patologia-respiratoria-318-articulo-el-lavado-broncoalveolar-un-procedimiento-X1576989511206784>
230. Estella Á, Monge MI, Pérez Fontaiña L, Sainz de Baranda A, Galá MJ, Moreno E. Lavado broncoalveolar para el diagnóstico de neumonía en enfermos en ventilación mecánica TT - Bronchoalveolar lavage for diagnosing pneumonia in mechanically ventilated patients. *Med Intensiva*. 2008;32(9).
231. Franquet T, Giménez Palleiro A. Fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática (FEPPi). *Radiología*. 2022 Dec 1;64:301–7.
232. Keogh BA, Hunninghake GW, Line BR, Crystal RG. The alveolitis of pulmonary sarcoidosis. Evaluation of natural history and alveolitis-dependent changes in lung function. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1983 [cited 2023 Mar 7];128(2):256–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6603804/>
233. Emilio Losa J. Neumonía eosinófila aguda en España. *Med Clin (Barc)*. 2003;120(13).
234. Allen J, Wert M. Eosinophilic Pneumonias. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2023 Jul 6];6(5):1455–61. Available from: <http://www.jaci-inpractice.org/article/S2213219818302691/fulltext>
235. Abbott GF, Rosado-De-Christenson ML, Franks TJ, Frazier AA, Galvin JR. From the Archives of the AFIP. <https://doi.org/101148/rg243045005> [Internet].

- 2004 May 1 [cited 2023 Jul 4];24(3):821–41. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.243045005>
236. Advanced Pneumoconiosis Among Working Underground Coal Miners—Eastern Kentucky and Southwestern Virginia, 2006. *JAMA* [Internet]. 2007 Aug 15 [cited 2023 Feb 21];298(7):734. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22600370/>
237. Culver BH, Graham BL, Coates AL, Wanger J, Berry CE, Clarke PK, et al. Recommendations for a Standardized Pulmonary Function Report. An Official American Thoracic Society Technical Statement. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Aug 1];196(11):1463–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29192835/>
238. Lama VN, Martinez FJ. Resting and exercise physiology in interstitial lung diseases. *Clin Chest Med* [Internet]. 2004 Sep [cited 2023 Jul 7];25(3):435–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15331185/>
239. Gay SE, Kazerooni EA, Toews GB, Lynch JP, Gross BH, Cascade PN, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1998 [cited 2023 Jul 7];157(4 Pt 1):1063–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9563720/>
240. Collard HR, King TE, Bartelson BB, Vourlekis JS, Schwarz MI, Brown KK. Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2023 Jul 7];168(5):538–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12773325/>
241. Flaherty KR, Colby T V., Travis WD, Toews GB, Mumford J, Murray S, et al. Fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia: idiopathic versus collagen vascular disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2003 May 15 [cited 2023 Jul 7];167(10):1410–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12615630/>
242. Hoffman TW, van Moorsel CHM, Kazemier KM, Biesma DH, Grutters JC, van Kessel DA. Humoral Immune Status in Relation to Outcomes in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung* [Internet]. 2021 Oct 29 [cited 2023 Sep

- 1];199(6):667–76. Available from:
<https://europepmc.org/article/MED/34714393>
243. Barry SM, Janossy G. Optimal gating strategies for determining bronchoalveolar lavage CD4/CD8 lymphocyte ratios by flow cytometry. *J Immunol Methods* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2023 Sep 1];285(1):15–23. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/14871531>
244. Szpechcinski A, Kopinski P, Giedronowicz D, Rozy A, Jagus P, Szolkowska M, et al. Simple flow cytometric protocol of CD4+/CD8+ lymphocyte ratio assessment in bronchoalveolar lavage fluids from patients with interstitial lung diseases. *Anal Quant Cytol Histol* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2023 Sep 1];33(5):289–96. Available from:
<https://europepmc.org/article/MED/22611757>
245. Tutor-Ureta P, Citores MJ, Castejón R, Mellor-Pita S, Yebra-Bango M, Romero Y, et al. Prognostic value of neutrophils and NK cells in bronchoalveolar lavage of sarcoidosis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70(6).
246. Shanthikumar S, Burton M, Saffery R, Ranganathan SC, Neeland MR. Single-cell flow cytometry profiling of BAL in children. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020;63(2).
247. Yu YRA, Hotten DF, Malakhau Y, Volker E, Ghio AJ, Noble PW, et al. Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Sep 1];54(1):13–24. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26267148/>
248. Freeman CM, Crudgington S, Stolberg VR, Brown JP, Sonstein J, Alexis NE, et al. Design of a multi-center immunophenotyping analysis of peripheral blood, sputum and bronchoalveolar lavage fluid in the Subpopulations and Intermediate Outcome Measures in COPD Study (SPIROMICS). *J Transl Med* [Internet]. 2015 Jan 27 [cited 2023 Sep 1];13(1). Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25622723/>

249. Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ryu JH, Tomassetti S, Lee JS, et al. A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med.* 2012;156(10).
250. Fujii H, Hara Y, Saigusa Y, Tagami Y, Murohashi K, Nagasawa R, et al. ILD-GAP Combined with the Charlson Comorbidity Index Score (ILD-GAPC) as a Prognostic Prediction Model in Patients with Interstitial Lung Disease. *Can Respir J.* 2023;2023.
251. Hurst JR, Han MLK, Singh B, Sharma S, Kaur G, de Nigris E, et al. Prognostic risk factors for moderate-to-severe exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic literature review. *Respir Res* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Sep 1];23(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35999538/>
252. Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King TE. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* [Internet]. 2008 [cited 2023 Jul 12];133(1):226–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18071016/>
253. Rachidi S, Wallace K, Wrangle JM, Day TA, Alberg AJ, Li Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and overall survival in all sites of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2023 Sep 3];38(S1):E1068–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hed.24159>
254. Song M, Graubard BI, Rabkin CS, Engels EA. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in the United States general population. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 3];11(1):464. Available from: </pmc/articles/PMC7801737/>
255. Schuliga M, Read J, Knight DA. Ageing mechanisms that contribute to tissue remodeling in lung disease. Vol. 70, *Ageing Research Reviews.* 2021.
256. Soma T, Nagata M. Immunosenescence, Inflammaging, and Lung Senescence in Asthma in the Elderly. Vol. 12, *Biomolecules.* 2022.

257. Bailey KL, Bonasera SJ, Wilderdyke M, Hanisch BW, Pavlik JA, DeVasure J, et al. Aging causes a slowing in ciliary beat frequency, mediated by PKC ϵ . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306(6).
258. Schulte H, Mühlfeld C, Brandenberger C. Age-Related Structural and Functional Changes in the Mouse Lung. *Front Physiol*. 2019;10.
259. Arbour KC, Mezquita L, Long N, Rizvi H, Auclin E, Ni A, et al. Impact of baseline steroids on efficacy of programmed cell death-1 and programmed death-ligand 1 blockade in patients with non–small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(28).
260. Arpaia N, Green JA, Moltedo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* [Internet]. 2015 Aug 8 [cited 2023 Sep 1];162(5):1078. Available from: [/pmc/articles/PMC4603556/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2603556/)
261. Bocchino M, Zanotta S, Capitelli L, Galati D. Dendritic Cells Are the Intriguing Players in the Puzzle of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Apr 30 [cited 2023 Sep 1];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33995394/>
262. Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King TE. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2023 Sep 3];133(1):226–32. Available from: <http://journal.chestnet.org/article/S0012369215489822/fulltext>
263. Kanaoka K, Minami S, Ihara S, Komuta K. High neutrophils and low lymphocytes percentages in bronchoalveolar lavage fluid are prognostic factors of higher in-hospital mortality in diffuse alveolar hemorrhage. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 3];21(1):1–8. Available from: <https://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12890-021-01660-x>
264. Kanaoka K, Minami S, Ihara S, Komuta K. High neutrophils and low lymphocytes percentages in bronchoalveolar lavage fluid are prognostic factors of higher in-hospital mortality in diffuse alveolar hemorrhage. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 1];21(1):288. Available from: [/pmc/articles/PMC8431931/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33995394/)

265. Church SE, Galon J. Regulation of CTL Infiltration Within the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017 [cited 2023 Sep 1];1036:33–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29275463/>
266. Donnem T, Hald SM, Paulsen EE, Richardsen E, Al-Saad S, Kilvaer TK, et al. Stromal CD8+ T-cell Density—A Promising Supplement to TNM Staging in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2023 Sep 1];21(11):2635–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25680376/>
267. Bremnes RM, Busund LT, Kilver TL, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, et al. The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2016 [cited 2023 Sep 1];11(6):789–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26845192/>
268. Rakae M, Busund LT, Paulsen EE, Richardsen E, Al-Saad S, Andersen S, et al. Prognostic effect of intratumoral neutrophils across histological subtypes of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cited 2023 Sep 1];7(44):72184–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27708229/>
1. Travis WD, King TE, Bateman ED, Lynch DA, Capron F, Center D, et al. American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2002 Jan 15 [cited 2023 Feb 16];165(2):277–304. Available from: www.atsjournals.org
2. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2013 Sep 15 [cited 2023 May 29];188(6):733–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24032382/>
3. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, Du Bois RM, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: The clinical utility of

- bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. Vol. 185, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2012.
4. Crouser ED, Maier LA, Baughman RP, Abston E, Bernstein RC, Blankstein R, et al. Diagnosis and Detection of Sarcoidosis. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2020 Apr 15 [cited 2023 Jul 6];201(8):E26–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32293205/>
 5. Graney BA, Fischer A. Interstitial pneumonia with autoimmune features. *Ann Am Thorac Soc* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2023 Aug 1];16(5):525–33. Available from: </pmc/articles/PMC6850782/>
 6. Kondoh Y, Makino S, Ogura T, Suda T, Tomioka H, Amano H, et al. 2020 guide for the diagnosis and treatment of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *Respir Investig*. 2021 Nov 1;59(6):709–40.
 7. Raghu G, Wilson KC, Bargagli E, Bendstrup E, Chami HA, Chua AT, et al. Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2023 Jul 6];202(3):E36–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32706311/>
 8. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(6).
 9. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*. 2013;38(1).
 10. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4).
 11. Baughman RP, Valeyre D, Korsten P, Mathioudakis AG, Wuyts WA, Wells A, et al. ERS clinical practice guidelines on treatment of sarcoidosis. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 5];58(6). Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/58/6/2004079>

12. Kaul B, Cottin V, Collard HR, Valenzuela C. Variability in Global Prevalence of Interstitial Lung Disease. Vol. 8, *Frontiers in Medicine*. 2021.
13. Xaubet A, Ancochea J., Morell F, Rodríguez-Arias JM. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. (1):64-70. 2004 [cited 2023 Apr 25]. p. 64–70 Report on the incidence of interstitial lung diseases in Spain - Búsqueda. Available from: <https://www.bing.com/search?q=Report+on+the+incidence+of+interstitial+lung+diseases+in+Spain&form=ANNTTH1&refig=6ca0a1a6664b437e9a165c2e9c5cade9>
14. López-Campos JL, Rodríguez-Becerra E. Incidence of interstitial lung diseases in the south of Spain 1998-2000: the RENIA study. *Eur J Epidemiol* [Internet]. 2004 [cited 2023 Apr 25];19(2):155–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15074571/>
15. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1994 [cited 2023 Apr 25];150(4):967–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7921471/>
16. Bermúdez JA, De J, Díez M. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas Monografías NEUMOMADRID.
17. M. J. Linares, J. Jareno, C. Almonacid, A. Casanova, J. Flandes, M.A. Jurestsckhe. Annual Congress 2007 - Clinical aspects of interstitial lung disease. 2007 [cited 2023 Apr 25]. Interstitial lung disease incidence in Guadalajara and Madrid community (Spain). Available from: <https://www.ers-education.org/lr/show-details/?idP=4849>
18. Scott J, Johnston I, Britton J. What causes cryptogenic fibrosing alveolitis? A case-control study of environmental exposure to dust. *Br Med J* [Internet]. 1990 Nov 3 [cited 2023 Apr 25];301(6759):1015–7. Available from: <https://www.bmj.com/content/301/6759/1015>
19. Encinas J, Corral MA, Fernández GC, Águeda DS, De Castro FJ. Aproximación al diagnóstico radiológico de las neumonías intersticiales idiopáticas. Hallazgos en tomografía computarizada de alta resolución. *Radiologia* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2023 May 23];54(1):73–84. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-radiologia-119-articulo-aproximacion-al-diagnostico-radiologico-neumonias-S0033833811002323>

20. Fischer A, Antoniou KM, Brown KK, Cadranel J, Corte TJ, Du Bois RM, et al. An official European Respiratory Society/American Thoracic Society research statement: interstitial pneumonia with autoimmune features. *Eur Respir J* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2023 Apr 30];46(4):976–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26160873/>
21. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodríguez Becerra E, et al. Diagnóstico y Tratamiento de las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas. *Arch Bronconeumol*. 2003;39(12):580–600.
22. Martinez FJ, Flaherty K. Pulmonary Function Testing in Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Proc Am Thorac Soc* [Internet]. 2006 Jun [cited 2023 Jun 3];3(4):315. Available from: [/pmc/articles/PMC2658684/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16082627/)
23. Kocheril S V., Appleton BE, Somers EC, Kazerooni EA, Flaherty KR, Martinez FJ, et al. Comparison of disease progression and mortality of connective tissue disease-related interstitial lung disease and idiopathic interstitial pneumonia. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2005 Aug 15 [cited 2023 Jun 3];53(4):549–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16082627/>
24. Martinez FJ, Safrin S, Weycker D, Starko KM, Bradford WZ, King TE, et al. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med* [Internet]. 2005 Jun 21 [cited 2023 Apr 30];142(12 Pt 1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15968010/>
25. Hambly N, Farooqi MM, Dvorkin-Gheva A, Donohoe K, Garlick K, Scallan C, et al. Prevalence and characteristics of progressive fibrosing interstitial lung disease in a prospective registry. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2023 Sep 5];60(4). Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/60/4/2102571>
26. Nayir Buyuksahin H, Basaran O, Balık Z, Bilginer Y, Ozen S, Dogru D. Interstitial lung disease in autoinflammatory disease in childhood: A systematic review of the literature. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 Sep 5];58(2):367–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36314652/>
27. Kumar A, Cherian S V., Vassallo R, Yi ES, Ryu JH. Current Concepts in Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Smoking-Related Interstitial Lung

- Diseases. *Chest* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Apr 30];154(2):394–408. Available from: <http://journal.chestnet.org/article/S0012369217331975/fulltext>
28. Dawod YT, Cook NE, Graham WB, Madhani-Lovely F, Thao C. Smoking-associated interstitial lung disease: update and review. <https://doi.org/10.1080/1747634820201766971> [Internet]. 2020 Aug 2 [cited 2023 Sep 5];14(8):825–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17476348.2020.1766971>
 29. Johannson KA, Balmes JR, Collard HR. Air pollution exposure: a novel environmental risk factor for interstitial lung disease? *Chest* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Apr 30];147(4):1161–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25846532/>
 30. Stevenson BR, Thompson GA, Watson MC, Bundell CS, Klinken EM, John M, et al. Autoantibodies in interstitial lung diseases. *Pathology* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2023 Sep 5];51(5):518–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31230817/>
 31. Zerhouni EA, Naidich DP, Stitik FP, Khouri NF, Siegelman SS. Computed tomography of the pulmonary parenchyma. Part 2: Interstitial disease. *J Thorac Imaging* [Internet]. 1985 [cited 2023 Apr 30];1(1):54–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3843414/>
 32. Strange C, Highland KB. Interstitial lung disease in the patient who has connective tissue disease. *Clin Chest Med* [Internet]. 2004 Sep [cited 2023 Jun 1];25(3):549–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15331191/>
 33. Leslie KO, Trahan S, Gruden J. Pulmonary pathology of the rheumatic diseases. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Aug [cited 2023 Jun 1];28(4):369–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17764055/>
 34. Oldham JM, Adegunsoye A, Valenzi E, Lee C, Witt L, Chen L, et al. Characterisation of patients with interstitial pneumonia with autoimmune features. *Eur Respir J* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Jun 1];47(6):1767–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27103387/>

35. Bahmer T, Romagnoli M, Girelli F, Claussen M, Rabe KF. The use of auto-antibody testing in the evaluation of interstitial lung disease (ILD)--A practical approach for the pulmonologist. *Respir Med* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2023 Apr 30];113:80–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26921132/>
36. Mikolasch TA, Garthwaite HS, Porter JC. Update in diagnosis and management of interstitial lung disease. *Clinical Medicine* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 Sep 5];16(Suppl 6):s71. Available from: </pmc/articles/PMC6329571/>
37. Costabel U, Hunninghake GW. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. *Eur Respir J*. 1999;14(4).
38. B Bradley BH, Wells AU, Hirani N. Interstitial lung disease guideline: The British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. *Thorax*. 2008;63(SUPPL. 5).
39. Mario Abinun MA et al. Esid . European Society for Immunodeficiencies. [cited 2023 May 20]. ESID - European Society for Immunodeficiencies. Available from: <https://www.esid.org/Working-Parties/Registry-Working-Party/Diagnosis-criteria>
40. Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: Is it clinically useful? *European Respiratory Journal*. 2011 Oct 1;38(4):761–9.
41. Travis WD, Matsui K, Moss J, Ferrans VJ. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns: survival comparison with usual interstitial pneumonia and desquamative interstitial pneumonia. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2000 Jan [cited 2023 May 30];24(1):19–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10632484/>
42. Kiliñç G, Kolsuk EA. The role of bronchoalveolar lavage in diffuse parenchymal lung diseases. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2023 Apr 30];11(5):417–21. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/16093816>
43. Keith C. Meyer GR, Marjolein Drent PLH, Moise´s Selman CS. Supplementary . American Thoracic Society Clinical Practice Guideline BAL. An official American

Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease [Internet]. 2012 Jan [cited 2023 Feb 25]; Available from: https://thoracic-prod-cdn.literatumonline.com/journals/content/ajrccm/2012/ajrccm.2012.185.issue-9/rccm.201202-0320st/production/suppl/ats%20document_data_supplement.pdf?b92b4ad1b4f274c70877518416abb28b88699062dc1e9e1820569d30bc26a8a12b6934d568e0fe0f15bcd5e3cabdf763235524e1fecc7547a719184225177b81cc71b3f936e2478ebd3b81707755e1f057167541b9cdda3d72c80b57d62a6305fa161a8b352b039864dc6f883ab9c083f83c6046ddad2dd9f4ef123daca43520473d1c669b0a7bff33915cc0b2f0cbb c49f3bde216cce5a998965b217affdd51465427e67391a91227520dd5

44. Martín Juan J. Guía de procedimientos: Lavado Broncoalveolar. *Neumosur*. 1994;6(7).
45. Baughman RP. Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 May 25];28(5):475–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975775/>
46. Costabel U,. *Diffuse Parenchymal Lung Disease*. 1st ed. Bois RM, & EJJ, editor. Vol. 36. S Karger Ag; 2007. 22–28 p.
47. Haslam P, Baughman RP. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. *Eur Respir J* [Internet]. 1999 [cited 2023 May 25];14(2):245–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10515395/>
48. Meyer KC. The role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Clin Chest Med* [Internet]. 2004 [cited 2023 May 4];25(4):637–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15564013/>
49. Costabel U, Guzman J. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2001 [cited 2023 May 4];7(5):255–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11584173/>
50. Baughman RP, Drent M. Role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Clin Chest Med* [Internet]. 2001 [cited 2023 May 4];22(2):331–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11444116/>

51. Susarla SC, Fan LL. Diffuse alveolar hemorrhage syndromes in children. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2007 Jun [cited 2023 May 4];19(3):314–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17505192/>
52. Bhatt N, Allen J. Update on eosinophilic lung diseases. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33(5).
53. Bernheim A, McLoud T. A review of clinical and imaging findings in eosinophilic lung diseases. Vol. 208, *American Journal of Roentgenology*. 2017.
54. Smith PA, Kohli LM, Wood KL, Hage CA, Twigg HL, Knox KS. Cytometric analysis of BAL T cells labeled with a standardized antibody cocktail correlates with immunohistochemical staining. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2023 Sep 1];70(3):170–8. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/16568476>
55. Smith PA, Kohli LM, Wood KL, Hage CA, Twigg HL, Knox KS. Cytometric analysis of BAL T cells labeled with a standardized antibody cocktail correlates with immunohistochemical staining. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2006 May [cited 2023 Sep 3];70(3):170–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16568476/>
56. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1987 [cited 2023 Jul 17];135(1):250–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3541717/>
57. Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1974;84(4).
58. Patolia S, Kakazu MT, Chami HA, Chua A, Diaz-Mendoza J, Duggal A, et al. Bronchoalveolar Lavage Lymphocytes in the Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis among Patients with Interstitial Lung Disease. *Ann Am Thorac Soc* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Sep 3];17(11):1455–67. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/32757946>
59. Inomata T, Konno S, Nagai K, Suzuki M, Nishimura M. Neutrophil predominance in bronchoalveolar lavage fluid is associated with disease severity and progression of

- HRCT findings in pulmonary *Mycobacterium avium* infection. PLoS One [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 Sep 1];13(2). Available from: [/pmc/articles/PMC5798761/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31311111/)
60. Jara-Palomares L, Martín-Juan J, Gómez-Izquierdo L, Cayuela-Domínguez A, Rodríguez-Becerra E, Rodríguez-Panadero F. Hallazgos en el lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa. Estudio de una cohorte prospectiva de 562 pacientes. Arch Bronconeumol. 2009;45(3).
 61. Murayama JI, Yoshizawa Y, Ohtsuka M, Hasegawa S. Lung fibrosis in hypersensitivity pneumonitis. Association with CD4+ but not CD8+ cell dominant alveolitis and insidious onset. Chest [Internet]. 1993 [cited 2023 Sep 3];104(1):38–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8325114/>
 62. Caillaud DM, Vergnon JM, Madroszyk A, Melloni BM, Murriss M, Dalphin JC. Bronchoalveolar lavage in hypersensitivity pneumonitis: a series of 139 patients. Inflamm Allergy Drug Targets [Internet]. 2012 [cited 2023 Sep 3];11(1):15–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22309080/>
 63. Drent M, Mansour K, Linssen C. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. Semin Respir Crit Care Med [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 May 2];28(5):486–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975776/>
 64. Oda K, Ishimoto H, Yatera K, Yamada S, Nakao H, Ogoshi T, 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 [Internet]. 2014 [cited 2023 May 2];52(3):179–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24853018/>
 65. Ohshimo S, Bonella F, Guzman J, Costabel U. Hypersensitivity pneumonitis. Immunol Allergy Clin North Am [Internet]. 2012 Nov [cited 2023 May 2];32(4):537–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23102065/>
 66. AbdullGaffar B, Abdelkareem F. Plasma cell-rich bronchoalveolar lavage fluid: Could be a first clue to IgG4 plasma cell-related lung disease. Diagn Cytopathol [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 May 2];49(7):E253–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33405362/>

67. Tricas L, Echeverría A, Blanco MA, Menéndez M, Belda J. Flow cytometry counting of bronchoalveolar lavage leukocytes with a new profile of monoclonal antibodies combination. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012;82 B(2).
68. Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Antoniou KM, Bissell BD, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2022 May 5 [cited 2023 May 21];205(9):e18. Available from: </pmc/articles/PMC9851481/>
69. Aronson KI, Swigris JJ, Bajwah S, Bianchi P, Corte TJ, Danoff SK, et al. Patient-centered outcomes research in interstitial lung disease: An official american thoracic society research statement. Vol. 204, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society; 2021. p. E3–23.
70. Silver RM, Wells AU. Histopathology and bronchoalveolar lavage. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2008 [cited 2023 May 25];47 Suppl 5(Suppl 5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18784150/>
71. Poletti V, Poletti G, Murer B, Saragoni L, Chilosi M. Bronchoalveolar lavage in malignancy. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 May 4];28(5):534–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975781/>
72. Meyer KC. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 May 4];28(5):546–60. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2007-991527>
73. Costabel U, Guzman J, Bonella F, Oshimo S. Bronchoalveolar lavage in other interstitial lung diseases. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 May 26];28(5):514–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975779/>
74. Ju Ryu Y, Pyo Chung M, Han J, Kim TS, Lee KS, Chun EM, et al. Bronchoalveolar lavage in fibrotic idiopathic interstitial pneumonias. *Respir Med.* 2007 Mar 1;101(3):655–60.
75. Ratjen F, Costabel U, Griese M, Paul K. Bronchoalveolar lavage fluid findings in children with hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited

- 2023 Mar 7];21(1):144–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12570123/>
76. Hogeia SP, Tudorache E, Pescaru C, Marc M, Oancea C. Bronchoalveolar lavage: role in the evaluation of pulmonary interstitial disease. *Expert Rev Respir Med*. 2020 Nov 1;14(11):1117–30.
77. Collard HR, Richeldi L. Interstitial Lung Disease. *Interstitial Lung Disease*. 2018 Jan 1;1–190.
78. Tomashefski JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med [Internet]*. 2000 [cited 2023 May 30];21(3):435–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11019719/>
79. Beasley MB. The pathologist's approach to acute lung injury. *Arch Pathol Lab Med [Internet]*. 2010 May [cited 2023 May 30];134(5):719–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20441502/>
80. Katzenstein ALA, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med [Internet]*. 1998 [cited 2023 May 30];157(4 Pt 1):1301–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9563754/>
81. Travis WD, Matsui K, Moss J, Ferrans VJ. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns: survival comparison with usual interstitial pneumonia and desquamative interstitial pneumonia. *Am J Surg Pathol [Internet]*. 2000 Jan [cited 2023 May 30];24(1):19–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10632484/>
82. Tomassetti S, Wells AU, Costabel U, Cavazza A, Colby T V., Rossi G, et al. Bronchoscopic Lung Cryobiopsy Increases Diagnostic Confidence in the Multidisciplinary Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med [Internet]*. 2016 Apr 1 [cited 2023 Apr 30];193(7):745–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26562389/>
83. Katzenstein ALA, Fiorelli RF. Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance. *Am J Surg Pathol [Internet]*. 1994 Feb 1 [cited 2023 May 30];18(2):136–47. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/8291652>

84. Fraig M, Shreesha U, Savici D, Katzenstein ALA. Respiratory bronchiolitis: a clinicopathologic study in current smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2002 [cited 2023 May 23];26(5):647–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11979095/>
85. Ware LB, Matthay MA. The Acute Respiratory Distress Syndrome. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005043421806> [Internet]. 2000 May 4 [cited 2023 May 30];342(18):1334–49. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200005043421806>
86. Katzenstein ALA, Mukhopadhyay S, Zanardi C, Dexter E. Clinically occult interstitial fibrosis in smokers: classification and significance of a surprisingly common finding in lobectomy specimens. *Hum Pathol*. 2010 Mar 1;41(3):316–25.
87. Utz JP, Swensen SJ, Gertz MA. Pulmonary amyloidosis. The Mayo Clinic experience from 1980 to 1993. *Ann Intern Med* [Internet]. 1996 Feb 1 [cited 2023 May 30];124(4):407–13. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/8554249>
88. de los Santos Sastre S, Carretera Sevilla-Huelva E. Capacidad de difusión de monóxido de carbono: principios teóricos, formas de medición y aplicaciones clínicas. *Neumosur: revista de la Asociación de Neumólogos del Sur*, ISSN-e 0214-6266, Vol 2, Nº 2, 1990, págs 57-75 [Internet]. 1990 [cited 2023 May 1];2(2):57–75. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7409013>
89. Petro W, Müller E, Bergmann KC, Unger U, Vogel J. Impaired CO transfer factors in bird fancier's lung. *Lung* [Internet]. 1978 Dec 1 [cited 2023 Apr 30];155(1):269–76. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02730701>
90. King TE, Tooze JA, Schwarz MI, Brown KR, Cherniack RM. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: Scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(7).
91. Schwartz DA, Helmers RA, Galvin JR, Van Fossen DS, Frees KL, Dayton CS, et al. Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1994 [cited 2023 Jul 7];149(2 Pt 1):450–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8306044/>

92. Kataoka K, Oda K, Takizawa H, Ogura T, Miyamoto A, Inoue Y, et al. Cohort study to evaluate prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis patients introduced to oxygen therapy. *Scientific Reports* 2023 13:1 [Internet]. 2023 Aug 22 [cited 2023 Sep 3];13(1):1–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-40508-8>
93. Hurst JR, Han MLK, Singh B, Sharma S, Kaur G, de Nigris E, et al. Prognostic risk factors for moderate-to-severe exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic literature review. *Respiratory Research* 2022 23:1 [Internet]. 2022 Aug 23 [cited 2023 Sep 3];23(1):1–23. Available from: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-022-02123-5>
94. Howard LS. Prognostic factors in pulmonary arterial hypertension: assessing the course of the disease. *Eur Respir Rev* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2023 Sep 1];20(122):236–42. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC9487744>
95. Achaiah A, Rathnapala A, Pereira A, Bothwell H, Dwivedi K, Barker R, et al. Neutrophil lymphocyte ratio as an indicator for disease progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *BMJ Open Respir Res* [Internet]. 2022 Jun 17 [cited 2023 Aug 24];9(1). Available from: </pmc/articles/PMC9207910/>
96. Mikolasch TA, George PM, Sahota J, Nancarrow T, Barratt SL, Woodhead FA, et al. Multi-center evaluation of baseline neutrophil-to-lymphocyte (NLR) ratio as an independent predictor of mortality and clinical risk stratifier in idiopathic pulmonary fibrosis. *EClinicalMedicine* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 Jun 4];55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36483266/>
97. Kanaoka K, Minami S, Ihara S, Komuta K. High neutrophils and low lymphocytes percentages in bronchoalveolar lavage fluid are prognostic factors of higher in-hospital mortality in diffuse alveolar hemorrhage. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Jun 4];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34503470/>
98. Feng H, Yan L, Zhao Y, Li Z, Kang J. Neutrophils in Bronchoalveolar Lavage Fluid Indicating the Severity and Relapse of Pulmonary Sarcoidosis. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 2021 Feb 2 [cited 2023 Aug 24];8:787681. Available from: </pmc/articles/PMC8847269/>

99. D'Alessandro M, Bergantini L, Carleo A, Cameli P, Perrone A, Fossi A, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in bronchoalveolar lavage from IPF patients: a novel prognostic biomarker? *Minerva Med* [Internet]. 2020 May 14 [cited 2023 Aug 24];113(3):526–31. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/32407050>
100. Ryu WK, Moon Y, Park MH, Lim JH, Kim YS, Lee KH, et al. A Preliminary Study on the Prognostic Impact of Neutrophil to Lymphocyte Ratio of the Bronchoalveolar Lavage Fluid in Patients with Lung Cancer. *Diagnostics (Basel)* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Jun 4];11(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34943437/>
101. Inomata T, Konno S, Nagai K, Suzuki M, Nishimura M. Neutrophil predominance in bronchoalveolar lavage fluid is associated with disease severity and progression of HRCT findings in pulmonary *Mycobacterium avium* infection. *PLoS One* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 Jun 4];13(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29401501/>
102. Flaherty KR, Toews GB, Travis WD, Colby T V., Kazerooni EA, Gross BH, et al. Clinical significance of histological classification of idiopathic interstitial pneumonia. *Eur Respir J* [Internet]. 2002 [cited 2023 Jun 3];19(2):275–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11866008/>
103. Meyer KC. Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. 2017 May 4 [cited 2023 Apr 27];11(5):343–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28345383/>
104. Pedraza-Serrano F, De Andrés AL, Jiménez-García R, Jiménez-Trujillo I, Hernández-Barrera V, Sánchez-Muñoz G, et al. Retrospective observational study of trends in hospital admissions for idiopathic pulmonary fibrosis in Spain (2004-2013) using administrative data. *BMJ Open*. 2017;7(2).
105. Aldera JK, Barkauskas CE, Limjunyawong N, Stanley SE, Kembou F, Tuder RM, et al. Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2015 Apr 21 [cited 2023 May 1];112(16):5099–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25840590/>
106. Armanios MY, Chen JJL, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *New England*

- Journal of Medicine [Internet]. 2007 Mar 29 [cited 2023 May 1];356(13):1317–26. Available from: <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/telomerase-mutations-in-families-with-idiopathic-pulmonary-fibros-6>
107. Moisés Selman, Ivette Buendía-Roldán, Annie Pardo. Aging and Pulmonary Fibrosis. *Rev Inves Clin*, 2016. 68: p. 75-83. *Revista de investigación clínica* . 2013 Dec;14(6):609–15.
 108. Byun HO, Lee YK, Kim JM, Yoon G. From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB Rep* [Internet]. 2015 [cited 2023 May 1];48(10):549–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26129674/>
 109. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of Aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1194.
 110. Minagawa S, Araya J, Numata T, Nojiri S, Hara H, Yumino Y, et al. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2023 May 1];300(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21224216/>
 111. Gilani SR, Vuga LJ, Lindell KO, Gibson KF, Xue J, Kaminski N, et al. CD28 down-regulation on circulating CD4 T-cells is associated with poor prognoses of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan 29 [cited 2023 May 1];5(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20126467/>
 112. Hunninghake GW, Bridget Zimmerman M, Schwartz DA, King TE, Lynch J, Hegele R, et al. Utility of a lung biopsy for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(2).
 113. Lynch DA, Sverzellati N, Travis WD, Brown KK, Colby T V., Galvin JR, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 May 4];6(2):138–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29154106/>

114. Antón E, De Miguel J, Hermida JA, Aramburu JA, Jara B, Juretschke MA. Neumonía intersticial aguda: evolución favorable con tratamiento esteroide. *Arch Bronconeumol*. 2001 Jan 1;37(7):286–8.
115. Manfredi A, Cassone G, Luppi F, Atienza-Mateo B, Cavazza A, Sverzellati N, et al. Rheumatoid arthritis related interstitial lung disease. *Expert Rev Clin Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2023 Feb 19];17(5):485–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33779447/>
116. Shorr AF, Scoville SL, Cersovsky SB, Shanks GD, Ockenhouse CF, Smoak BL, et al. Acute eosinophilic pneumonia among US Military personnel deployed in or near Iraq. *JAMA* [Internet]. 2004 Dec 22 [cited 2023 May 23];292(24):2997–3005. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15613668/>
117. Girard M, Israël-Assayag E, Cormier Y. Pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2023 May 23];4(2):93–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15021060/>
118. Niewoehner DE, Kleinerman J, Rice DB. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med* [Internet]. 1974 Oct 10 [cited 2023 May 23];291(15):755–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4414996/>
119. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodríguez Becerra E, et al. Diagnosis and treatment of diffuse interstitial lung diseases]. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2003 Jan [cited 2023 Apr 27];39(12):580–600. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14636495/>
120. Ryu JH, Myers JL, Capizzi SA, Douglas WW, Vassallo R, Decker PA. Desquamative interstitial pneumonia and respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease. *Chest* [Internet]. 2005 [cited 2023 May 23];127(1):178–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15653981/>
121. Zinn DJ, Chakraborty R, Allen CE. Langerhans Cell Histiocytosis: Emerging Insights and Clinical Implications. *Oncology (Williston Park)* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Mar 6];30(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26888790/>
122. Lommatzsch M, Bratke K, Stoll P, Mülleneisen N, Prall F, Bier A, et al. Bronchoalveolar lavage for the diagnosis of Pulmonary Langerhans cell histiocytosis.

- Respir Med [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2023 Feb 19];119:168–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27692140/>
123. Vassallo R, Ryu JH, Colby T V., Hartman T, Limper AH. Pulmonary Langerhans'-Cell Histiocytosis. <https://doi.org/10.1056/NEJM200006293422607> [Internet]. 2000 Jun 29 [cited 2023 Sep 3];342(26):1969–78. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200006293422607>
 124. Favara BE. Langerhans cell histiocytosis: An identity crisis. *Med Pediatr Oncol*. 2001;37(6):545.
 125. Chaowalit N, Pellikka PA, Decker PA, Aubry MC, Krowka MJ, Ryu JH, et al. Echocardiographic and clinical characteristics of pulmonary hypertension complicating pulmonary langerhans cell histiocytosis. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2023 Sep 3];79(10):1269–75. Available from: <http://www.mayoclinicproceedings.org/article/S002561961162661X/fulltext>
 126. Diamond EL, Durham BH, Haroche J, Yao Z, Ma J, Parikh SA, et al. Diverse and targetable kinase alterations drive histiocytic neoplasms. *Cancer Discov* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Sep 3];6(2):154–65. Available from: <https://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0913>
 127. Harmon CM, Brown N. Langerhans Cell Histiocytosis: A Clinicopathologic Review and Molecular Pathogenetic Update. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2023 Sep 3];139(10):1211–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26414464/>
 128. Yousem SA, Dacic S, Nikiforov YE, Nikiforova M. Pulmonary langerhans cell histiocytosis: Profiling of multifocal tumors using next-generation sequencing identifies concordant occurrence of BRAF V600E mutations. *Chest* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2023 Sep 3];143(6):1679–84. Available from: <http://journal.chestnet.org/article/S0012369213603980/fulltext>
 129. Mourah S, How-Kit A, Meignin V, Gossot D, Lorillon G, Bugnet E, et al. Recurrent NRAS mutations in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Sep 3];47(6):1785–96. Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/47/6/1785>

130. Diamond EL, Subbiah V, Craig Lockhart A, Blay JY, Puzanov I, Chau I, et al. Vemurafenib for BRAF V600–Mutant Erdheim-Chester Disease and Langerhans Cell Histiocytosis: Analysis of Data From the Histology-Independent, Phase 2, Open-label VE-BASKET Study. *JAMA Oncol* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Sep 3];4(3):384–8. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2664827>
131. Donadieu J, Larabi IA, Tardieu M, Visser J, Hutter C, Sieni E, et al. Vemurafenib for Refractory Multisystem Langerhans Cell Histiocytosis in Children: An International Observational Study. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2019 Nov 11 [cited 2023 Sep 3];37(31):2857. Available from: [/pmc/articles/PMC6823889/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33111111/)
132. Cordier JF. Cryptogenic organising pneumonia. *Eur Respir J* [Internet]. 2006 Aug [cited 2023 Apr 27];28(2):422–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16880372/>
133. Cha SI, Fessler MB, Cool CD, Schwarz MI, Brown KK. Lymphoid interstitial pneumonia: clinical features, associations and prognosis. *Eur Respir J* [Internet]. 2006 Aug [cited 2023 May 1];28(2):364–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16571614/>
134. Ryerson CJ, Urbania TH, Richeldi L, Mooney JJ, Lee JS, Jones KD, et al. Prevalence and prognosis of unclassifiable interstitial lung disease. *Eur Respir J* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2023 Apr 30];42(3):750–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23222877/>
135. Kinder BW, Collard HR, Koth L, Daikh DI, Wolters PJ, Elicker B, et al. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: Lung manifestation of undifferentiated connective tissue disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(7).
136. Dixon S, Benamore R. The idiopathic interstitial pneumonias: Understanding key radiological features. Vol. 65, *Clinical Radiology*. 2010.
137. O'Donnell DE, Ora J, Webb KA, Laveneziana P, Jensen D. Mechanisms of activity-related dyspnea in pulmonary diseases. *Respir Physiol Neurobiol* [Internet]. 2009 May 30 [cited 2023 Jun 1];167(1):116–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19450767/>

138. G R, KJ A, TE K, JA L, FJ M. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 May 24 [cited 2023 Jun 1];366(21):1968–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22607134/>
139. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Bois RMD, Fagan EA, et al. Pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis: analysis of pooled data from three multinational phase 3 trials. *Eur Respir J* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Jun 1];47(1):243–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26647432/>
140. Fischer A, West SG, Swigris JJ, Brown KK, Du Bois RM. Connective tissue disease-associated interstitial lung disease: a call for clarification. *Chest* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2023 Jun 3];138(2):251–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20682528/>
141. Tanizawa K, Handa T, Nakashima R, Kubo T, Hosono Y, Watanabe K, et al. HRCT features of interstitial lung disease in dermatomyositis with anti-CADM-140 antibody. *Respir Med* [Internet]. 2011 Sep [cited 2023 Jun 3];105(9):1380–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21632230/>
142. Hanke K, Brückner CS, Dähnrich C, Huscher D, Komorowski L, Meyer W, et al. Antibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2009 Feb 16 [cited 2023 Jun 3];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19220911/>
143. Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, et al. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1998 [cited 2023 Jun 3];157(1):199–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9445300/>
144. Chetta A, Aiello M, Foresi A, Marangio E, D'Ippolito R, Castagnaro A, et al. Relationship between outcome measures of six-minute walk test and baseline lung function in patients with interstitial lung disease. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2023 Jun 3];18(2):170–5. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/11436537>
145. Wallace T. Miller. *Diagnostic Thoracic Imaging* [Internet]. 2006 [cited 2023 Jun 3]. Available from: <https://www.mhebooklibrary.com/doi/book/10.1036/9780071487399>

146. Stack BHR, Grant IWB. Rheumatoid interstitial lung disease. *Br J Dis Chest*. 1965 Oct 1;59(4):202–11.
147. Kim EA, Lee KS, Johkoh T, Tae SK, Gee YS, Kwon OJ, et al. Interstitial lung diseases associated with collagen vascular diseases: radiologic and histopathologic findings. *Radiographics* [Internet]. 2002 [cited 2023 Jun 3];22 Spec No(SPEC. ISS). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12376608/>
148. Tanaka N, Kim JS, Newell JD, Brown KK, Cool CD, Meehan R, et al. Rheumatoid arthritis-related lung diseases: CT findings. *Radiology* [Internet]. 2004 Jul [cited 2023 Jun 3];232(1):81–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15166329/>
149. Kocheril S V., Appleton BE, Somers EC, Kazerooni EA, Flaherty KR, Martinez FJ, et al. Comparison of disease progression and mortality of connective tissue disease-related interstitial lung disease and idiopathic interstitial pneumonia. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2005 Aug 15 [cited 2023 Jun 3];53(4):549–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16082627/>
150. Walsh SLF, Hansell DM. Diffuse interstitial lung disease: overlaps and uncertainties. *Eur Radiol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2023 Jun 3];20(8):1859–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20204644/>
151. Travis WD, Hunninghake G, King TE, Lynch DA, Colby T V., Galvin JR, et al. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: report of an American Thoracic Society project. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2008 Jun 15 [cited 2023 Jun 3];177(12):1338–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18388353/>
152. Mathai SC, Danoff SK. Management of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *BMJ* [Internet]. 2016 Feb 24 [cited 2023 Jun 3];352. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26912511/>
153. Luppi F, Sebastiani M, Salvarani C, Bendstrup E, Manfredi A. Acute exacerbation of interstitial lung disease associated with rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Jul 7];18(2):85–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34876670/>

154. Xiangyang Z, Lutian Y, Lin Z, Liping X, Hui S, Jing L. Increased levels of interleukin-33 associated with bone erosion and interstitial lung diseases in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2012;58(1).
155. Ramos-Casals M, Perez-Alvarez R, Perez-De-Lis M, Xaubet A, Bosch X. Pulmonary disorders induced by monoclonal antibodies in patients with rheumatologic autoimmune diseases. Vol. 124, *American Journal of Medicine*. 2011.
156. Bonniaud P, Georges M, Favrolt N, Camus P. Drug-induced interstitial lung diseases. *Revue du Praticien*. 2014;64(7).
157. Arakawa H, Yamasaki M, Kurihara Y, Yamada H, Nakajima Y. Methotrexate-Induced Pulmonary Injury: Serial CT findings. *J Thorac Imaging*. 2003;18(4).
158. Salaffi F, Carotti M, Di Carlo M, Tardella M, Giovagnoni A, Adamek M. High-resolution computed tomography of the lung in patients with rheumatoid arthritis: Prevalence of interstitial lung disease involvement and determinants of abnormalities. *Medicine (United States)*. 2019;98(38).
159. Chen J, Shi Y, Wang X, Huang H, Ascherman D. Asymptomatic preclinical rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013.
160. Garcia JGN, James HL, Zinkgraf S, Perlman MB, Keogh BA. Lower respiratory tract abnormalities in rheumatoid interstitial lung disease. Potential role of neutrophils in lung injury. *American Review of Respiratory Disease*. 1987;136(4).
161. Biederer J, Schnabel A, Muhle C, Gross WL, Heller M, Reuter M. Correlation between HRCT findings, pulmonary function tests and bronchoalveolar lavage cytology in interstitial lung disease associated with rheumatoid arthritis. *Eur Radiol*. 2004;14(2).
162. Nagasawa Y, Takada T, Shimizu T, Narita JI, Moriyama H, Terada M, et al. Inflammatory cells in lung disease associated with rheumatoid arthritis. *Internal Medicine*. 2009;48(14).
163. Chong S, Lee KS, Chung MJ, Han J, Kwon OJ, Kim TS. Pneumoconiosis: Comparison of Imaging and Pathologic Findings.

- <https://doi.org/10.1148/rg261055070> [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2023 Feb 21];26(1):59–77. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.261055070>
164. Hedlund U, Jonsson H, Eriksson K, Järholm B. Exposure-response of silicosis mortality in Swedish iron ore miners. *Ann Occup Hyg* [Internet]. 2008 Jan [cited 2023 Feb 21];52(1):3–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18063590/>
 165. Talay F, Gurel K, Gurel S, Kurt B, Tug T. Silicosis in manufacture of electric cable: report of four cases. *J Occup Health* [Internet]. 2007 Sep [cited 2023 Feb 21];49(5):405–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17951974/>
 166. Murray J, Kielkowski D, Reid P. Occupational disease trends in black South African gold miners. An autopsy-based study. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1996 [cited 2023 Feb 21];153(2):706–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8564121/>
 167. Manual de neumología ocupacional [Internet]. [cited 2023 Feb 21]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-patologia-respiratoria-318-pdf-S1576989510700114>
 168. Plaza C, González-Viñolis M, Quirce S, Barranco P. Neumonitis por hipersensibilidad (alveolitis alérgica extrínseca). *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2018 Nov 1;12(67):3936–40.
 169. Hamblin M, Prosch H, Vašáková M. Diagnosis, course and management of hypersensitivity pneumonitis. *European Respiratory Review* [Internet]. 2022 Mar 31 [cited 2023 Jul 6];31(163). Available from: <https://err.ersjournals.com/content/31/163/210169>
 170. Chen ES, Moller DR. Sarcoidosis - Scientific progress and clinical challenges. Vol. 7, *Nature Reviews Rheumatology*. 2011.
 171. Brauner MW, Grenier P, Tijani K, Battesti JP, Valeyre D. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis: evolution of lesions on CT scans. <https://doi.org/10.1148/radiology20429240543> [Internet]. 1997 Aug 1 [cited 2023 Jul 4];204(2):497–502. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiology.204.2.9240543>

172. Newman LS, Rose CS, Bresnitz EA, Rossman MD, Barnard J, Frederick M, et al. A case control etiologic study of sarcoidosis: Environmental and occupational risk factors. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2004 Dec 15 [cited 2023 Mar 6];170(12):1324–30. Available from: <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/a-case-control-etiologic-study-of-sarcoidosis-environmental-and-o-5>
173. Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, Thompson BW, Rossman MD, Bresnitz EA, et al. Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2023 Mar 6];164(11):2085–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11739139/>
174. Fischer A, Grunewald J, Spagnolo P, Nebel A, Schreiber S, Müller-Quernheim J. Genetics of sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 6];35(3):296–306. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25007082/>
175. Gabrilovich MI, Walrath J, Van Lunteren J, Nethery D, Seifu M, Kern JA, et al. Disordered Toll-like receptor 2 responses in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2023 Mar 6];173(3):512–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23668840/>
176. Wennerström A, Pietinalho A, Lasota J, Salli K, Surakka I, Seppänen M, et al. Major histocompatibility complex class II and BTNL2 associations in sarcoidosis. *Eur Respir J* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2023 Mar 6];42(2):550–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23904553/>
177. Rich RR. Editorial Elsevier. [cited 2023 Feb 24]. *Clinical Immunology*. Fifth edition. Available from: [https://bookshelf.health.elsevier.com/reader/books/9780702070402/epubcfi/6/174\[%3Bvnd.vst.idref%3Ddid_chp00072\]!/4/2/12/2\[s0010\]/6/2\[f0010\]/2\[ln0010\]%4051:26](https://bookshelf.health.elsevier.com/reader/books/9780702070402/epubcfi/6/174[%3Bvnd.vst.idref%3Ddid_chp00072]!/4/2/12/2[s0010]/6/2[f0010]/2[ln0010]%4051:26)
178. Le Louet S, Barkaoui MA, Miron J, Galambrun C, Aladjidi N, Chastagner P, et al. Childhood Langerhans cell histiocytosis with severe lung involvement: A nationwide cohort study. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15(1).
179. Ottink M, Feijen S, Rosias P, Robben S, Granzen B, Heynens J, et al. Langerhans cell histiocytosis presenting with complicated pneumonia, a case report. *Respir Med Case Rep*. 2013;8(1).

180. Jouenne F, Chevret S, Bugnet E, Clappier E, Lorillon G, Meignin V, et al. Genetic landscape of adult Langerhans cell histiocytosis with lung involvement. *European Respiratory Journal*. 2020;55(2).
181. Johnson SR. Lymphangiomyomatosis. *European Respiratory Journal*. 2006 May;27(5):1056–65.
182. Tanaka M, Hirata H, Wataya-Kaneda M, Yoshida M, Katayama I. Lymphangiomyomatosis and multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia in Japanese patients with tuberous sclerosis complex¹Drs. Tanaka and Hirata contributed equally to this article. *Respir Investig*. 2016 Jan 1;54(1):8–13.
183. Ries AL, Bauldoff GS, Carlin BW, Casaburi R, Emery CF, Mahler DA, et al. Pulmonary rehabilitation: Joint ACCP/AACVPR Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2007;131(5 SUPPL.).
184. Clark M, Cooper B, Singh S, Cooper M, Carr A, Hubbard R. A survey of nocturnal hypoxaemia and health related quality of life in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax*. 2001;56(6).
185. Carrington CB, Gaensler EA, Coutu RE, FitzGerald MX, Gupta RG. Natural History and Treated Course of Usual and Desquamative Interstitial Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 1978;298(15).
186. Raghu G, Johnson WC, Lockhart D, Mageto Y. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone: Results of a prospective, open-label phase II study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(4 I).
187. Smith CM, Moser KM. Management for interstitial lung disease. State of the art. *Chest*. 1989;95(3).
188. Rojas-Serrano J, González-Velásquez E, Mejía M, Sánchez-Rodríguez A, Carrillo G. Interstitial lung disease related to rheumatoid arthritis: Evolution after treatment. *Reumatol Clin*. 2012;8(2).
189. Sanchez-Ramirez DC, Kosowan L, Singer A. Management of cough in patients with idiopathic interstitial lung diseases in primary care. *Chron Respir Dis [Internet]*. 2022 Mar 30 [cited 2023 Sep 5];19:1–6. Available from: [/pmc/articles/PMC8984847/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38984847/)

190. Cohen JM, Miller A, Spiera H. Interstitial pneumonitis complicating rheumatoid arthritis. Sustained remission with azathioprine therapy. *Chest*. 1977;72(4).
191. Broen JCA, van Laar JM. Mycophenolate mofetil, azathioprine and tacrolimus: mechanisms in rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology* 2020 16:3 [Internet]. 2020 Feb 13 [cited 2023 Sep 5];16(3):167–78. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41584-020-0374-8>
192. Nannini C, West CP, Erwin PJ, Matteson EL. Effects of cyclophosphamide on pulmonary function in patients with scleroderma and interstitial lung disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and observational prospective cohort studies. Vol. 10, *Arthritis Research and Therapy*. 2008.
193. Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, Furst DE, Khanna D, Kleerup EC, et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 Sep 5];4(9):708–19. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2213260016301527/fulltext>
194. Saketkoo LA, Espinoza LR. Experience of mycophenolate mofetil in 10 patients with autoimmune-related interstitial lung disease demonstrates promising effects. *American Journal of the Medical Sciences*. 2009;337(5).
195. Yiannopoulos G, Pastromas V, Antonopoulos I, Katsiberis G, Kalliolias G, Liossis SN, et al. Combination of intravenous pulses of cyclophosphamide and methylprednisolone in patients with systemic sclerosis and interstitial lung disease. *Rheumatol Int*. 2007;27(4).
196. Chang HK, Park W, Ryu DS. Successful treatment of progressive rheumatoid interstitial lung disease with cyclosporine: a case report. *J Korean Med Sci*. 2002;17(2).
197. Carrasco Cubero C, Chamizo Carmona E, Vela Casasempere P. Revisión sistemática sobre el impacto de los fármacos en la enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada a Artritis Reumatoide. *Reumatol Clin*. 2021 Nov 1;17(9):504–13.

198. Rybicki BA, Iannuzzi MC. Epidemiology of sarcoidosis: recent advances and future prospects. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Feb [cited 2023 Mar 6];28(1):22–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17330190/>
199. Baughman RP, Lower EE. Treatment of Sarcoidosis. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2015 Aug 22 [cited 2023 Mar 6];49(1):79–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25989728/>
200. Vorselaars ADM, Van Moorsel CHM, Deneer VHM, Grutters JC. Current therapy in sarcoidosis, the role of existing drugs and future medicine. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2013;12(6):369–77.
201. Papiris S, Stagaki E, Papadaki G, Kolilekas L, Korbila I, Apollonatu V, et al. Mycophenolate mofetil as an alternative treatment in sarcoidosis. *Pulm Pharmacol Ther* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 Sep 3];58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31518648/>
202. Hebert RS, Arnold RM, Schulz R. Improving well-being in caregivers of terminally ill patients. Making the case for patient suffering as a focus for intervention research. *J Pain Symptom Manage* [Internet]. 2007 Nov [cited 2023 May 21];34(5):539–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17616333/>
203. Vianello A, Arcaro G, Battistella L, Pipitone E, Vio S, Concas A, et al. Noninvasive ventilation in the event of acute respiratory failure in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Crit Care* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 21];29(4):562–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24768565/>
204. Schachna L, Medsger TA, Dauber JH, Wigley FM, Braunstein NA, White B, et al. Lung transplantation in scleroderma compared with idiopathic pulmonary fibrosis and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum*. 2006;54(12).
205. Vasco-Mogorrón MA, Campillo JA, Periago A, Cabañas V, Berenguer M, García-Garay MC, et al. Blood-based risk stratification for pre-malignant and symptomatic plasma cell neoplasms to improve patient management. *Am J Cancer Res*. 2021;11(6).
206. Bouros D, Nicholson AC, Polychronopoulos V, Du Bois RM. Acute interstitial pneumonia.

207. Mrad A, Huda N. Acute Interstitial Pneumonia. StatPearls [Internet]. 2022 Aug 8 [cited 2023 Feb 19]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554429/>
208. Gharsalli H, Mlika M, Sahnoun I, Maalej S, Douik El Gharbi L, Mezni F El. The utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung diseases: A clinicopathological perspective. Vol. 35, Seminars in Diagnostic Pathology. 2018.
209. Raghu G, Mageo YN, Lockhart D, Schmidt RA, Wood DE, Godwin JD. The accuracy of the clinical diagnosis of new-onset idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung disease: A prospective study. *Chest*. 1999;116(5).
210. Behr J, Furst DE. Pulmonary function tests. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2008 [cited 2023 Jun 4];47 Suppl 5(SUPPL. 5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18784151/>
211. Chen H, Zhou N, Shi H, Yu W, Wu L, Zhou F. Presentation and outcomes of patients with multiple myeloma harboring gain or amplification of 1q21 and receiving novel agent therapies: results from a single-center study. *Hematology* [Internet]. 2023 Dec 31 [cited 2023 Feb 19];28(1):2177979. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36794720>
212. Pérez-Alva J, Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Farré Mateos J, Sisó Almirall A, López Soto A. Autoinmunidad y geriatría. *Medicina Integral* [Internet]. 2002 Jul 30 [cited 2023 Sep 3];40(3):108–17. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-autoinmunidad-geriatria-13036145>
213. Ettensohn DB, Jankowski MJ, Redondo AA, Duncan PG. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. 2. Safety and results of repeated BAL, and use in the assessment of intrasubject variability. *Chest* [Internet]. 1988 [cited 2023 Jun 13];94(2):281–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3396404/>
214. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. The BAL Cooperative Group Steering Committee. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1990 May 1 [cited 2023 Jun 13];141(5 Pt 2):S169-202. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/2186681>

215. Xu-Vanpala S, Deerhake ME, Wheaton JD, Parker ME, Juvvadi PR, MacIver N, et al. Functional heterogeneity of alveolar macrophage population based on expression of CXCL2. *Sci Immunol* [Internet]. 2020 Aug 8 [cited 2023 Sep 3];5(50). Available from: [/pmc/articles/PMC7717592/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37717592/)
216. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, et al. Smoking-dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of COPD. *J Immunol* [Internet]. 2009 Aug 8 [cited 2023 Sep 3];183(4):2867. Available from: [/pmc/articles/PMC2873685/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18342867/)
217. Fritsch P, Masse R. Overview of pulmonary alveolar macrophage renewal in normal rats and during different pathological processes. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1992 [cited 2023 Sep 3];97:59. Available from: [/pmc/articles/PMC1519558/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1519558/)
218. Achaiah A, Rathnapala A, Pereira A, Bothwell H, Dwivedi K, Barker R, et al. Neutrophil lymphocyte ratio as an indicator for disease progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *BMJ Open Respir Res* [Internet]. 2022 Jun 17 [cited 2023 Jun 4];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35715193/>
219. Obayashi Y, Yamadori I, Fujita J, Yoshinouchi T, Ueda N, Takahara J. The role of neutrophils in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* [Internet]. 1997 [cited 2023 Jun 14];112(5):1338–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9367478/>
220. Angell HK, Bruni D, Carl Barrett J, Herbst R, Galon J. The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2023 Jun 4];26(2):332–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31413009/>
221. Jara-Palomares L, Martín-Juan J, Gómez-Izquierdo L, Cayuela-Domínguez A, Rodríguez-Becerra E, Rodríguez-Panadero F. Hallazgos en el lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa. Estudio de una cohorte prospectiva de 562 pacientes. *Arch Bronconeumol*. 2009;45(3).
222. Turner-Warwick ME, Haslam PL. Clinical applications of bronchoalveolar lavage: an interim view. *Br J Dis Chest* [Internet]. 1986 [cited 2023 Jul 17];80(2):105–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3524646/>

223. Schnabel A, Richter C, Bauerfeind S, Gross WL. Bronchoalveolar lavage cell profile in methotrexate induced pneumonitis. *Thorax* [Internet]. 1997 [cited 2023 May 26];52(4):377–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9196524/>
224. Costabel U, Uzaslan E, Guzman J. Bronchoalveolar lavage in drug-induced lung disease. *Clin Chest Med* [Internet]. 2004 Mar [cited 2023 May 4];25(1):25–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15062594/>
225. Winterbauer RH, Lammert J, Selland M, Wu R, Corley D, Springmeyer SC. Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest* [Internet]. 1993 [cited 2023 Mar 7];104(2):352–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8339618/>
226. Pirozynski M. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of peripheral, primary lung cancer. *Chest* [Internet]. 1992 Aug 1 [cited 2023 Jul 3];102(2):372–4. Available from: <http://journal.chestnet.org/article/S0012369216340272/fulltext>
227. Strange C, Bolster MB, Roth MD, Silver RM, Theodore A, Goldin J, et al. Bronchoalveolar lavage and response to cyclophosphamide in scleroderma interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(1).
228. Meyer KC. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis and management of interstitial lung diseases. Vol. 14, *Clinical Pulmonary Medicine*. 2007.
229. Wells AU. The clinical utility of bronchoalveolar lavage in diffuse parenchymal lung disease. Vol. 19, *European Respiratory Review*. 2010.
230. Barbers RG, Gong H, Tashkin DP, Oishi J, Wallace JM. Differential examination of bronchoalveolar lavage cells in tobacco cigarette and marijuana smokers. *American Review of Respiratory Disease*. 1987;135(6).
231. Stover DE, Zaman MB, Hajdu SI, Lange M, Gold J, Armstrong D. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosuppressed host. *Ann Intern Med*. 1984;101(1).
232. Akoun GM, Cadranet JL, Blanchette G, Milleron BJ, Mayaud CM. Bronchoalveolar lavage cell data in amiodarone-associated pneumonitis: Evaluation in 22 patients. *Chest*. 1991;99(5):1177–82.

233. Zaidi A, Kaur H, Gupta P, Gupta N, Srinivasan R, Dey P, et al. Role of bronchoalveolar lavage in diagnosing pulmonary infections and malignancies: Experience from a tertiary care center. *Diagn Cytopathol.* 2020;48(12).
234. 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 [Internet].* 1986 [cited 2023 Aug 8];24(5):559–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3097810/>
235. Jeganathan N, Sathananthan M. Connective Tissue Disease-Related Interstitial Lung Disease: Prevalence, Patterns, Predictors, Prognosis, and Treatment. *Lung.* 2020;198(5).
236. Justin M. Oldham, Ayodeji Adegunsoye , Eleanor Valenzi, Cathryn Lee. Characterisation of patients with interstitial pneumonia with autoimmune features. Vol. 49, *The European respiratory journal.* 2017.
237. J.. Flandes Aldeyturriagaa. El lavado broncoalveolar: un procedimiento sencillo que aporta mucha información | *Revista de Patología Respiratoria [Internet].* 2011 [cited 2023 May 29]. p. 41–2. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-patologia-respiratoria-318-articulo-el-lavado-broncoalveolar-un-procedimiento-X1576989511206784>
238. Estella Á, Monge MI, Pérez Fontaiña L, Sainz de Baranda A, Galá MJ, Moreno E. Lavado broncoalveolar para el diagnóstico de neumonía en enfermos en ventilación mecánica TT - Bronchoalveolar lavage for diagnosing pneumonia in mechanically ventilated patients. *Med Intensiva.* 2008;32(9).
239. Franquet T, Giménez Palleiro A. Fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática (FEPPI). *Radiología.* 2022 Dec 1;64:301–7.
240. Keogh BA, Hunninghake GW, Line BR, Crystal RG. The alveolitis of pulmonary sarcoidosis. Evaluation of natural history and alveolitis-dependent changes in lung function. *Am Rev Respir Dis [Internet].* 1983 [cited 2023 Mar 7];128(2):256–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6603804/>
241. Emilio Losa J. Neumonía eosinófila aguda en España. *Med Clin (Barc).* 2003;120(13).

242. Allen J, Wert M. Eosinophilic Pneumonias. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2023 Jul 6];6(5):1455–61. Available from: <http://www.jaci-inpractice.org/article/S2213219818302691/fulltext>
243. Abbott GF, Rosado-De-Christenson ML, Franks TJ, Frazier AA, Galvin JR. From the Archives of the AFIP. <https://doi.org/10.1148/rg.243045005> [Internet]. 2004 May 1 [cited 2023 Jul 4];24(3):821–41. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.243045005>
244. Advanced Pneumoconiosis Among Working Underground Coal Miners—Eastern Kentucky and Southwestern Virginia, 2006. *JAMA* [Internet]. 2007 Aug 15 [cited 2023 Feb 21];298(7):734. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22600370/>
245. Culver BH, Graham BL, Coates AL, Wanger J, Berry CE, Clarke PK, et al. Recommendations for a Standardized Pulmonary Function Report. An Official American Thoracic Society Technical Statement. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Aug 1];196(11):1463–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29192835/>
246. Lama VN, Martinez FJ. Resting and exercise physiology in interstitial lung diseases. *Clin Chest Med* [Internet]. 2004 Sep [cited 2023 Jul 7];25(3):435–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15331185/>
247. Gay SE, Kazerooni EA, Toews GB, Lynch JP, Gross BH, Cascade PN, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1998 [cited 2023 Jul 7];157(4 Pt 1):1063–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9563720/>
248. Collard HR, King TE, Bartelson BB, Vourlekis JS, Schwarz MI, Brown KK. Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2023 Jul 7];168(5):538–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12773325/>
249. Flaherty KR, Colby T V., Travis WD, Toews GB, Mumford J, Murray S, et al. Fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia: idiopathic versus collagen vascular disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2003 May 15 [cited 2023 Jul 7];167(10):1410–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12615630/>

250. Hoffman TW, van Moorsel CHM, Kazemier KM, Biesma DH, Grutters JC, van Kessel DA. Humoral Immune Status in Relation to Outcomes in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung* [Internet]. 2021 Oct 29 [cited 2023 Sep 1];199(6):667–76. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/34714393>
251. Barry SM, Janossy G. Optimal gating strategies for determining bronchoalveolar lavage CD4/CD8 lymphocyte ratios by flow cytometry. *J Immunol Methods* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2023 Sep 1];285(1):15–23. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/14871531>
252. Szpechcinski A, Kopinski P, Giedronowicz D, Rozy A, Jagus P, Szolkowska M, et al. Simple flow cytometric protocol of CD4+/CD8+ lymphocyte ratio assessment in bronchoalveolar lavage fluids from patients with interstitial lung diseases. *Anal Quant Cytol Histol* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2023 Sep 1];33(5):289–96. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/22611757>
253. Tutor-Ureta P, Citores MJ, Castejón R, Mellor-Pita S, Yebra-Bango M, Romero Y, et al. Prognostic value of neutrophils and NK cells in bronchoalveolar lavage of sarcoidosis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70(6).
254. Shanthikumar S, Burton M, Saffery R, Ranganathan SC, Neeland MR. Single-cell flow cytometry profiling of BAL in children. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020;63(2).
255. Yu YRA, Hotten DF, Malakhau Y, Volker E, Ghio AJ, Noble PW, et al. Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Sep 1];54(1):13–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26267148/>
256. Freeman CM, Crudgington S, Stolberg VR, Brown JP, Sonstein J, Alexis NE, et al. Design of a multi-center immunophenotyping analysis of peripheral blood, sputum and bronchoalveolar lavage fluid in the Subpopulations and Intermediate Outcome Measures in COPD Study (SPIROMICS). *J Transl Med* [Internet]. 2015 Jan 27 [cited 2023 Sep 1];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25622723/>
257. Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ryu JH, Tomassetti S, Lee JS, et al. A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med*. 2012;156(10).

258. Fujii H, Hara Y, Saigusa Y, Tagami Y, Murohashi K, Nagasawa R, et al. ILD-GAP Combined with the Charlson Comorbidity Index Score (ILD-GAPC) as a Prognostic Prediction Model in Patients with Interstitial Lung Disease. *Can Respir J*. 2023;2023.
259. Hurst JR, Han MLK, Singh B, Sharma S, Kaur G, de Nigris E, et al. Prognostic risk factors for moderate-to-severe exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic literature review. *Respir Res* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Sep 1];23(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35999538/>
260. Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King TE. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* [Internet]. 2008 [cited 2023 Jul 12];133(1):226–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18071016/>
261. Rachidi S, Wallace K, Wrangle JM, Day TA, Alberg AJ, Li Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and overall survival in all sites of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2023 Sep 3];38(S1):E1068–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hed.24159>
262. Song M, Graubard BI, Rabkin CS, Engels EA. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in the United States general population. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 3];11(1):464. Available from: </pmc/articles/PMC7801737/>
263. Schuliga M, Read J, Knight DA. Ageing mechanisms that contribute to tissue remodeling in lung disease. Vol. 70, *Ageing Research Reviews*. 2021.
264. Soma T, Nagata M. Immunosenescence, Inflammaging, and Lung Senescence in Asthma in the Elderly. Vol. 12, *Biomolecules*. 2022.
265. Bailey KL, Bonasera SJ, Wilderdyke M, Hanisch BW, Pavlik JA, DeVasure J, et al. Aging causes a slowing in ciliary beat frequency, mediated by PKC ϵ . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306(6).
266. Schulte H, Mühlfeld C, Brandenberger C. Age-Related Structural and Functional Changes in the Mouse Lung. *Front Physiol*. 2019;10.
267. Arbour KC, Mezquita L, Long N, Rizvi H, Auclin E, Ni A, et al. Impact of baseline steroids on efficacy of programmed cell death-1 and programmed death-ligand 1

- blockade in patients with non–small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(28).
268. Arpaia N, Green JA, Moltedo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* [Internet]. 2015 Aug 8 [cited 2023 Sep 1];162(5):1078. Available from: [/pmc/articles/PMC4603556/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25704441/)
269. Bocchino M, Zanotta S, Capitelli L, Galati D. Dendritic Cells Are the Intriguing Players in the Puzzle of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Apr 30 [cited 2023 Sep 1];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33995394/>
270. Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King TE. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2023 Sep 3];133(1):226–32. Available from: <http://journal.chestnet.org/article/S0012369215489822/fulltext>
271. Kanaoka K, Minami S, Ihara S, Komuta K. High neutrophils and low lymphocytes percentages in bronchoalveolar lavage fluid are prognostic factors of higher in-hospital mortality in diffuse alveolar hemorrhage. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 3];21(1):1–8. Available from: <https://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12890-021-01660-x>
272. Kanaoka K, Minami S, Ihara S, Komuta K. High neutrophils and low lymphocytes percentages in bronchoalveolar lavage fluid are prognostic factors of higher in-hospital mortality in diffuse alveolar hemorrhage. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 1];21(1):288. Available from: [/pmc/articles/PMC8431931/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/358431931/)
273. Church SE, Galon J. Regulation of CTL Infiltration Within the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017 [cited 2023 Sep 1];1036:33–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29275463/>
274. Donnem T, Hald SM, Paulsen EE, Richardsen E, Al-Saad S, Kilvaer TK, et al. Stromal CD8+ T-cell Density—A Promising Supplement to TNM Staging in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2023 Sep 1];21(11):2635–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25680376/>

275. Bremnes RM, Busund LT, Kilver TL, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, et al. The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2016 [cited 2023 Sep 1];11(6):789–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26845192/>
276. Rakaee M, Busund LT, Paulsen EE, Richardsen E, Al-Saad S, Andersen S, et al. Prognostic effect of intratumoral neutrophils across histological subtypes of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cited 2023 Sep 1];7(44):72184–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27708229/>

ANEXO

Tabla 35. Ficha individual de recolección de datos del paciente.		
FICHA INDIVIDUAL PARA RECOLECCIÓN DE DATOS DEL PACIENTE		
Tesis Doctoral " Utilidad diagnóstica de la citometría de flujo multiparamétrica del lavado broncopulmonar en la enfermedad pulmonar"		
Id (citometria): NHC NSS CARM	Hospital de Procedencia: CP paciente: F. Nacimiento:	Nombres: Apellidos: Sexo: Número de citometrias realizadas:
Fumador Si () No () Numero cig:	Exitus Si () No ()	Aves : Si () No (X) desc () Palomas: Si () No (X) desc ()
Inducida por Fármacos Si () No (X) Cual:	Radiación: Si () No ()	Químicos/ Tóxicos: Si () No () Cual (es): Exposición profesional:
Fecha 1ra visita:	Diagnóstico principal:	Diagnóstico 2:
Fecha Ultima visita:	Diagnóstico 3:	Diagnóstico 4:
Activo: Excluido:	RADIOLOGIA: RX () TC () Fecha: Adenopatías () _____ Patrón: _____ Distribución: _____ Consolidación: _____	
Antec. Familiares EPID:	Corticoide sistémico:	Corticoide Inhalado:
Otra Inmunosupresión sistémica:	PRUEBAS DE FUNCIÓN PULMONAR: FVC _____ FEV1: _____ FEV1/FVC _____ DLCO _____ Sin PFP () Observaciones:	