

Citoquinas inflamatorias del lavado broncoalveolar en pacientes con enfermedades pulmonares intersticiales difusas: Utilidad en estudios de investigación

Correspondencia:

Dra. Glenda Ernst

E-mail: glenda.uba@gmail.com

Hospital de Rehabilitación Respiratoria María Ferrer, Finochietto 849, 1° Piso-Endoscopia. Buenos Aires, Argentina; (C1121ABG). TE: +5411-43077474 (176)

Recibido: 04.03.2014

Aceptado: 05.06.2014

Autores: Glenda Ernst, Fabián Caro, Fernando Galíndez, Juan José Rodríguez Moncalvo y Pedro Grynblat

Hospital de Rehabilitación Respiratoria María Ferrer

Resumen

Las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID) se caracterizan por inflamación y fibrosis. El rol del lavado broncoalveolar (LBA) en el diagnóstico de las EPID, ha sido recientemente revalorizado. El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de citoquinas inflamatorias del LBA asociado a las EPID.

Recolectamos LBA de 28 pacientes con EPID y 15 sujetos con pulmones sanos. Realizamos el recuento total de células del LBA y determinamos los niveles de citoquinas por ELISA. Encontramos un incremento significativo en el número total de células y en los niveles de IL-6 en el LBA de los pacientes con Neumonía Intersticial no Específica (NINE), Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) y Sarcoidosis en comparación con el grupo control. También, observamos un significativo incremento de IL-8 en el LBA de los pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática/Neumonía Intersticial Usual (FPI/NIU) comparados con el grupo control. No encontramos relación entre los niveles de citoquinas y los parámetros de función pulmonar.

El LBA podría jugar un importante rol para entender los procesos inflamatorios asociados a las EPID. Cuando el LBA es utilizado en conjunto con la información clínica completa, el recuento diferencial y el patrón inflamatorio; este podría contribuir con la evaluación diagnóstica. Sin embargo, el procesamiento del LBA y el análisis de este fluido son críticos para poder aprovechar dicha información. En este estudio, evaluamos la utilización del LBA como una herramienta para comprender los patrones inflamatorios asociados con las EPID.

Palabras claves: enfermedades pulmonares intersticiales difusas, lavado broncoalveolar, inflamación pulmonar

Abstract

Inflammatory Cytokines in the Bronchoalveolar Lavage from Patients with Diffuse Interstitial Lung Diseases: Useful Research Studies

Interstitial Lung Diseases (ILD) are characterized by inflammation and fibrosis. The role of bronchoalveolar lavage (BAL) in the diagnosis of ILD, has been recently revalued. The aim of this work was to evaluate BAL's inflammatory cytokines associated with ILD. We collected BAL from 28 patients with ILD and 15 control subjects with healthy lungs. We counted the whole BAL cell number and determined cytokines levels by ELISA.

We found a significant increase in the whole BAL cell count and IL-6 levels in patients with fibrotic non-specific interstitial pneumonia (NSPI), hypersensitivity pneumonitis (HP) and sarcoidosis in comparison with the control group. We also observed a significant increase of IL-8 in BAL from usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis (UIP/IPF) in comparison with the control group. We didn't find relationship between cytokines levels and lung function parameters.

BAL could play an important role to understand the inflammatory process associated with ILD. When BAL is used together with complete clinical information, BAL cell differential count and inflammatory patterns could contribute to the diagnostic evaluation. BAL processing and analysis of this fluid are critically important for providing useful information. In this study we evaluated the use of BAL as a research tool to understand inflammatory patterns associated with ILD.

Key words: Interstitial Lung Diseases, Bronchoalveolar Lavage, Lung Inflammation.

Introducción

Las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID) incluyen un heterogéneo grupo de desórdenes pulmonares asociados con una progresiva pérdida de función pulmonar¹. Las EPID se caracterizan por un grado variable de inflamación y fibrosis con sobreproducción y acumulación de componentes de la matriz extracelular (CME), distorsión de la arquitectura pulmonar e inflamación intra-alveolar²⁻⁶.

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es la EPID con peor pronóstico. La supervivencia media de los pacientes posterior al diagnóstico es de 2 a 5 años⁷. La necesidad incrementada de identificar terapias clínicas efectivas para la FPI, finalmente ha conducido al desarrollo de diferentes ensayos clínicos en los cuales se ha evaluado la respuesta de drogas anti-inflamatorias anti-fibróticas. Sin embargo, basados en la evidencia de los datos publicados, estos tratamientos no han demostrado mejorar la función pulmonar ni la supervivencia de los pacientes FPI^{8,9}.

El diagnóstico de FPI requiere un patrón histopatológico y/o radiológico para definir si se trata de una de Neumonía Intersticial Usual (NIU). No hay disponible un marcador biológico disponible hasta ahora para este propósito.

Du Bois y sus colaboradores han estudiado en forma comparativa el recuento celular diferencial en el Lavado Broncoalveolar (LBA) de pacientes con FPI/NIU y Neumonía Intersticial no Usual (NINE)¹⁰. Ellos concluyeron que los hallazgos del LBA no poseen valor pronóstico y no permiten discriminar entre FPI/NIU y NINE. Por otra parte, Collard y sus colegas han descrito un aumento en los niveles de pepsina en el LBA de pacientes con FPI durante las exacerbaciones respecto de los pacientes estables. Sin embargo, los niveles de pepsina no poseen valor como predictores de tiempo de supervivencia¹¹. A pesar de estos hallazgos, la Sociedad Americana de Tórax ha publicado una nueva Guía revalorizando nuevamente el rol del LBA en el diagnóstico de las EPID¹².

El objetivo de este trabajo fue analizar el patrón inflamatorio del LBA en pacientes con EPID y comparar los resultados con un grupo control. Para esto se determinaron los niveles de citoquinas tales como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ y IL-8. También se realizaron los recuentos de células totales en los LBA tanto de los pacientes como de los sujetos control. Hipotetizamos que el análisis de los niveles de citoquinas en el LBA podría contribuir a comprender el mecanismo inflamatorio que participa en el desarrollo de las EPID.

Materiales y métodos

Diseño del Estudio

Este estudio ha sido prospectivo y de corte transversal. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Rehabilitación Respiratoria María Ferrer, de acuerdo a los criterios éticos de la Declaración de Helsinki (1975) y sus correspondientes actualizaciones. Todos los pacientes y sujetos control firmaron voluntariamente el consentimiento informado.

Pacientes y controles

Pacientes con EPID: Se incluyeron, en este estudio, veintiocho adultos con EPID diagnosticados de acuerdo a los criterios establecidos por la Sociedad Americana de Tórax (*American Thoracic Society: ATS*) y por la Sociedad Europea Respiratoria Americana (*European Respiratory Society:ERS*)¹³. En todos los pacientes se confirmó el diagnóstico por el análisis histopatológico de las biopsias pulmonares. En todos los pacientes el LBA fue realizado en el lóbulo tomográficamente más afectado.

Grupo Control: El grupo control incluyó 15 adultos sin evidencia clínica de EPID, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma o infecciones activas. Las bronoscopias fueron realizadas como seguimiento de cirugías reparativas por estenosis traqueal post-intubaciones. Las muestras de LBA fueron colectadas del lóbulo medio.

Las características de los pacientes con EPID y de los sujetos control se muestran en la **Tabla 1**.

Lavado Broncoalveolar(LBA)

El lavado broncoalveolar fue realizado como se ha descrito previamente¹⁴. Se instilaron, a través del broncoscopio, alícuotas de 20 ml de solución fisiológica a temperatura ambiente, alcanzando un volumen total de 140 ml. Las mismas fueron recuperadas por succión manual suave utilizando jeringas estériles. Todas las alícuotas del LBA fueron juntadas en tubos y centrifugados a 400 g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes acelulares se conservaron a -70 °C hasta su uso. El pellet celular fue lavado y la cantidad total de células del LBA fueron contadas utilizando una cámara de Neubauer.

Por otra parte, se conservaron muestras de suero luego de la realización de los análisis de rutina previos a la fibrobroncoscopia.

Test de Función Pulmonar

Los test de función pulmonar (TFP) incluyeron espirometrías y medición de volúmenes pulmonares por pletismografía. Los volúmenes pulmonares y la capacidad de difusión de monóxido de carbono

(DLCO), fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones de laATS/ERS. Para las mediciones de TFP se utilizó un pletismógrafo de volumen constante (Platinum Elite DL, Medical Graphics Corporation). Los valores normales predichos fueron referidos a los de Crapo^{15,16}.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Los niveles de las citoquinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ and TNF- α) fueron determinadas en muestras de LBA y suero por ELISA (se utilizaron kit comerciales BD OptEIA™) y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Los límites de detección son 0.8 pg/ml para IL-8 y IL1- β ; 2 pg/ml para IL-6 y TNF- α y finalmente 1pg/ml para IFN- γ .

Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas utilizando Test no paramétricos de Kruskal-Wallis y Test de comparaciones múltiples de Dunn. Los análisis y gráficos fueron realizados utilizando el software Graph-Pad Prism 4 (GraphPad, La Jolla, CA). Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

TABLA 1. Características de los sujetos control y de los pacientes con EPID. Se analizaron 6 pacientes con FPI/NIU: Fibrosis Pulmonar Idiopática con patrón de Neumonía Intersticial Usual; 4 pacientes con NINE con patrón fibrótico en todos los casos: Neumonía Intersticial no Específica; 12 pacientes con NH: neumonitis por hipersensibilidad y finalmente 6 pacientes con Sarcoidosis. FVC: Capacidad vital forzada. TLC: Capacidad pulmonar total. DLCO: Capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono. VA: Volumen alveolar y ND: valor no determinado. Los datos son presentados como la media y los cuartiles (25% and 75%).

Grupos	n	Edad (años)	Sexo	Test de Función Pulmonar				Estado Fumador
				FVC (% predicho)	TLC (% predicho)	DLCO (% predicho)	VA (% predicho)	
Control	15	31.0 (24.0-58.0)	Femenino: 7 Masculino: 8	90.0 (94.0-102.0)	ND	ND	ND	Nunca: 13 Previo: 1 Actual: 1
FPI/NIU	6	69.0 (54.5-75.5)	Femenino: 2 Masculino: 4	57.5 (50.0-65.0)	52.0 (45.0-59.0)	43.5 (36.5-52.5)	54.0 (42.0-58.0)	Nunca: 2 Previo: 4 Actual: 0
Ninu	4	63.0 (54.5-70.0)	Femenino: 3 Masculino: 1	88.0 (74.0-115.0)	97.0 (65.0-100.0)	49.0 (37.0-59.0)	90.0 (62.0-98.5)	Nunca: 4 Previo: 0 Actual: 0
Sarcoidosis	6	45.0 (36.5-50.0)	femenino: 4 Masculino: 2	78.0 (61.0-85.5)	81.5 (73.5-83.5)	64.0 (43.0-83.5)	78.5 (74.5-89.0)	Nunca: 1 Previo: 5 Actual: 0
NH	12	56.0 (43.0-56.5)	Femenino: 3 Masculino: 9	54.0 (44.0-74.0)	59.0 (47.0-78.0)	42.0 (34.0-47.0)	57.0 (48.5-68.5)	Nunca: 9 Previo: 3 Actual: 0

Resultados

Recuento total celular en el LBA

Encontramos un incremento significativo en el número total de células en el LBA de los pacientes con EPID respecto de los sujetos control: Como mostramos en la **Figura 1**, el LBA de los pacientes con NINE, Sarcoidosis y NH contienen mayor número de células comparadas con los controles ($0.93 \pm 0.32 \times 10^6$ células/ml; $0.73 \pm 0.13 \times 10^6$ células/ml y $0.82 \pm 0.28 \times 10^6$ células/ml, respectivamente *vs* $0.19 \pm 0.03 \times 10^6$ células/ml; $p < 0.05$) pero no el LBA de los pacientes con FPI/NIU ($0.31 \pm 0.04 \times 10^6$ células/ml). No observamos diferencias estadísticamente significativas respecto del recuento celular total en el LBA cuando discriminamos los pacientes con EPID en relación al tabaquismo.

Concentraciones de citoquinas de pacientes con EPID

Además analizamos los niveles de las citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ and TNF- α en muestras de LBA. No hubo diferencias entre las concentraciones de IFN- γ , TNF- α o IL-1 β en el LBA de los pacientes con EPID comparados con los sujetos control (**Figuras 2 A, B y C**). En-

contramos un significativo aumento en los niveles de IL-8, sólo en el LBA de los pacientes con FPI/NIU comparado con los sujetos control (224.0 ± 56.3 pg/ml *vs* 75.8 ± 12.5 pg/ml; $p < 0.05$, **Figura 2D**). Los pacientes con NINE, NH y Sarcoidosis mostraron mayores de IL-6 en el LBA comparados con los controles (366.0 ± 80.2 pg/ml; $p < 0.001$; 163.4 ± 36.7 pg/ml; $p < 0.05$ y 233.9 ± 74.9 pg/ml; $p < 0.01$ respectivamente *vs* 15.86 ± 4.6 pg/ml (**Figura 2E**).

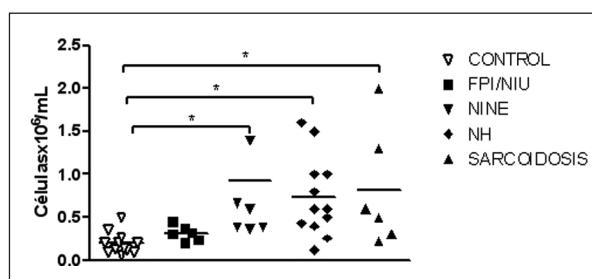


Figura 1. Aumento en el recuento total de células en el LBA de los pacientes con EPID comparados con los sujetos control. Observamos un significativo incremento en recuento celular total en los pacientes con NINE (n=4), NH (n=12) y Sarcoidosis (n=6) respecto de los sujetos control (n=15), * $p < 0.05$. Sin embargo los pacientes con FPI/NIU (n=6) no mostraron diferencias comparados con los controles.

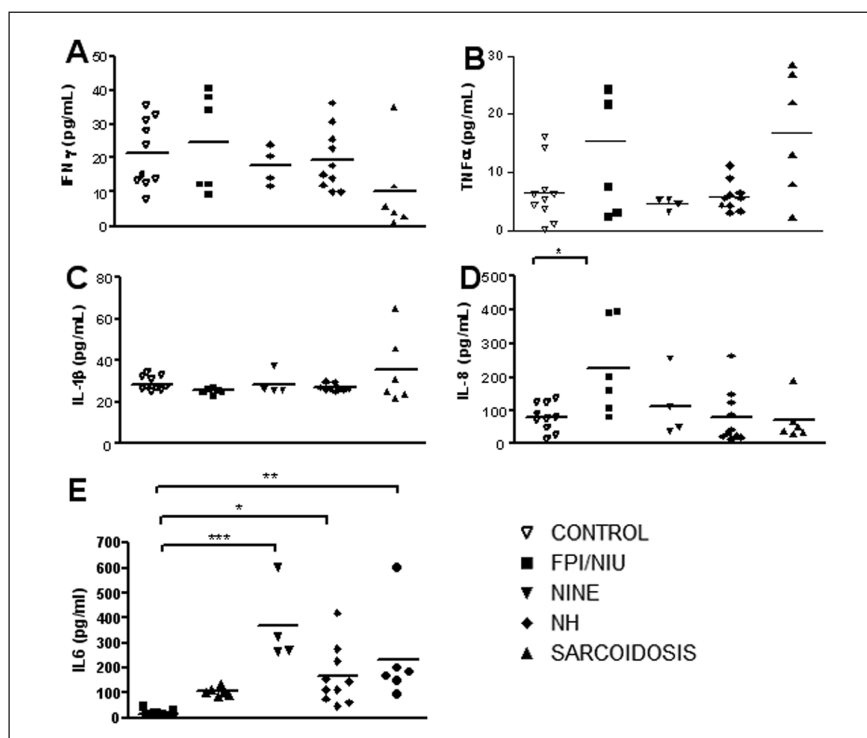


Figura 2. Concentraciones de citoquinas en muestras de LBA de pacientes con EPID. Los niveles de IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-1 β (C), IL-8 (D), y IL-6 (E) fueron analizadas por ELISA. *: $p < 0.05$ y **: $p < 0.01$.

Cuando se realizó el análisis de los niveles de cada citoquina, discriminando por su estado fumador, no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

En las muestras de suero no observamos diferencias significativas. Es más, los valores de TNF- α y de IL-1 β estuvieron debajo del límite de detección del kit (datos no mostrados).

Relación entre los niveles de citoquinas en el LBA y los test de función pulmonar

Para determinar la relación entre los niveles de citoquinas y los parámetros de función pulmonar realizamos análisis de regresión lineal; sin embargo, no encontramos ninguna correlación entre los mismos.

Discusión

Las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas representan un heterogéneo grupo de enfermedades de baja incidencia caracterizadas por inflamación y fibrosis del parénquima pulmonar^{1,5}. El LBA ha sido ampliamente utilizado para obtener información diagnóstica de estas enfermedades^{17,18}. Sin embargo, esta información podría no ser específica. Por esta razón, no se han utilizado datos del LBA en ensayos clínicos controlados. Los hallazgos del LBA requieren ser analizados junto con una completa información clínica y tomografías computadas de tórax con alta resolución¹². Sólo en algunas EPID específicas, el reconocimiento de un patrón de células inflamatorias en el LBA (linfocítico, eosinofílico o neutrofílico) podrían contribuir con el diagnóstico diferencial de algunas enfermedades, pero estos patrones no son específicos¹⁹. A pesar de esto, nosotros hipotetizamos que el análisis de las citoquinas pro-inflamatorias en el LBA podría contribuir a comprender mejor los procesos inflamatorios asociados con los mecanismos patogénicos que contribuyen con el desarrollo de estas enfermedades. Estas citoquinas se sintetizan como resultado de la activación de diferentes tipo celulares, principalmente macrófagos y linfocitos, cuya plasticidad permiten la activación de distintos perfiles²⁰. Los macrófagos alveolares, dada su localización privilegiada y el amplio conjunto de receptores que posee son capaces de censar las señales que los rodean; esto les permite la activación de una robusta respuesta inmune frente a la presencia de un microorganismo pero también la activación de una respuesta inflamatoria frente a señales de daño tisular²¹. Se ha descrito recientemente que algunas

microinjurias que actúan sobre el epitelio pulmonar podrían producir señales de daño que favorezcan la activación de diferentes perfiles de activación del sistema inmune, contribuyendo a exacerbar la respuesta inflamatoria o la fibrosis asociada a las EPID²².

De acuerdo con nuestros resultados, ha sido previamente descrito un aumento significativo en los niveles de IL-8 en muestras de LBA de pacientes con FPI^{23,24}. Más aún, Carré y sus colaboradores, mostraron que los macrófagos alveolares aislados a partir de LBA de pacientes con FPI, producen mayores niveles de IL-8 que los macrófagos alveolares de sujetos sanos²⁵. Esta citoquina ha sido reportada como una de las moléculas relevantes en los procesos fibróticos por su rol como quimioatracción de neutrófilos y el potencial daño tisular generado por este tipo celular²⁶.

También, encontramos un aumento significativo en los niveles de IL-6 y en el número total de células en el LBA de los pacientes con NINE, NH y sarcoidosis pero no en los pacientes con FPI/NIU; sin embargo, sería necesario incrementar el número de pacientes para confirmar estos hallazgos. IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria con un amplio rango de funciones biológicas tales como la inducción de una respuesta de fase aguda²⁷. No obstante, **sólo** se ha reportado un incremento de IL-6 en LBA de pacientes con neumoconiosis²⁸. Nosotros encontramos un incremento significativo en IL-6 en las muestras de LBA de todas las EPID, pero no en el LBA de pacientes con FPI/NIU. Estos hallazgos podrían estar asociados con diferentes mecanismos patológicos involucrados en el desarrollo de las mismas.

En el pasado, el análisis de los hallazgos en la celularidad del LBA era incluida dentro de los criterios menores y mayores clínicos de diagnóstico de FPI cuando no se realizaba biopsia pulmonar²⁹. Sin embargo, desde que poseen valor predictivo los hallazgos de la tomografía computada de tórax con alta resolución para la FPI con patrón de NIU, el diagnóstico de FPI/NIU ha sido confiado a los expertos radiólogos y los procedimientos invasivos, incluyendo broncoscopias, BAL y biopsias pulmonares han dejado de ser requeridos para el diagnóstico de la FPI^{30,31}.

Diferentes factores ambientales u ocupacionales, drogas, radiaciones o infecciones y enfermedades del colágeno podrían estar asociados con las EPID. Empero, muchas de ellas, son idiopáticas⁴. Los mecanismos subyacentes de la patogénesis de ciertas EPID son poco comprendidos. En este

estudio analizamos si las citoquinas inflamatorias podrían estar involucradas. Las diferencias observadas en este trabajo, podrían sugerir que los mecanismos inflamatorios que contribuyen al desarrollo de la FPI/NIU podrían resultar diferentes al resto de las EPID.

Conclusiones

Las EPID constituyen un conjunto de enfermedades agrupadas como tales por compartir características clínicas y radiológicas; sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos que participan en sus orígenes son diferentes. Esta heterogeneidad va de la mano con las diferentes necesidades terapéuticas. Comprender mejor los mediadores biológicos que participan en cada una podría contribuir a futuro, a generar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses existentes en el desarrollo de este trabajo.

Bibliografía

- King TE Jr. Clinical advances in the diagnosis and therapy of the interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 268-279.
- Kim R, Meyer KC. Therapies for interstitial lung disease: past, present and future. *Ther Adv Respir Dis* 2008; 2: 319-338.
- Nathan SD, Shlobin OA, Weir N, et al. Long-term course and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis in the new millennium. *Chest* 2011; 40: 221-229.
- Selman M, King TE, Pardo A; American Thoracic Society, European Respiratory Society and American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134: 136-151.
- Strieter RM. Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel. *Chest* 2005; 128 (Suppl 1): 526S-532S.
- Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, et al. Bronchoalveolar Lavage Fluid Cellular Characteristics, Functional Parameters and Cytokine and Chemokine Levels in Interstitial Lung Diseases. *Scand J Immunol* 2009; 69: 268-274.
- 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: 788-724.
- McGrath EE, Miller AB. Hot off the breath: triple therapy for idiopathic pulmonary fibrosis-hear the PANTHER roar. *Thorax* 2012; 67: 97-98.
- Raghu G, Anstrom KJ, King TE Jr, et al. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network*. *N Engl J Med* 2012; 366: 1968-1977.
- Veeraraghavan S, Latsi PI, Wells AU, et al. BAL findings in idiopathic nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2003; 22: 239-244.
- Lee JS, Song JW, Wolters PJ, Elicker BM, King TE Jr, Kim DS, Collard HR. Bronchoalveolar lavage pepsin in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2012; 39: 352-358.
- Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 1004-1014.
- American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277-304.
- Consenso de la Asociación Argentina de Broncoesofagología para la realización de Fibrobroncoscopia. *Med Resp* 2009; 9: 196-209.
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319-338.
- Macintyre N, Crapo RO, Viegi G et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2005; 26: 720-735.
- Wells AU. The clinical utility of bronchoalveolar lavage in diffuse parenchymal lung disease. *Eur Respir Rev* 2010; 19(117): 237-241.
- Domagała-Kulawik J, Skirecki T, Maskey-Warzechowska M, et al. Bronchoalveolar lavage total cell count in interstitial lung diseases-does it matter? *Inflammation*. 2012; 35 (3): 803-809.
- Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful?. *Eur Respir J* 2011; 38: 761-769.
- Wynn AT. 2004. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 583-594.
- Wick G, Backovic A, Rabensteiner E, et al. The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. *Trends Immunol* 2010; 31: 110-119.
- Ellson CD, Dunmore R, Hogaboam CM, et al. DAMPs and Danger Signals in IPF. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 [En proceso de publicación].
- Meloni F, Caporali R, Marone Bianco A, et al. BAL cytokine profile in different interstitial lung diseases: a focus on systemic sclerosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004; 21: 111-118.
- Carré PC, Mortenson RL, King TE Jr, et al. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1802-1810.
- Gadek JE, Kelman JA, Fells G, et al. Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Eng J Med* 1979; 301: 737-742.
- Hunninghake GW, Gadek J, and Lawley T. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1982; 68: 259-269.
- Naka T, Nishimoto N, and Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 2006; 4 (Suppl 3): S233 and S242.
- Ulker O, Yucesoy B, Demir O, et al. Serum and BAL cytokine and antioxidant enzyme levels at different stages of pneumoconiosis in coal workers. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27(12): 871-877.
- International consensus statement. American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS). American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 646-664.
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, 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* 2013; 188: 733-748.
- Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: guidelines for diagnosis and clinical management have advanced from consensus-based in 2000 to evidence-based in 2011. *Eur Respir J* 2011; 37: 743-746.

Inflammatory Cytokines in the Bronchoalveolar Lavage of Patients with Diffuse Interstitial Lung Diseases: Usefulness in research studies

Authors: Glenda Ernst, Fabián Caro, Fernando Galíndez, Juan José Rodríguez Moncalvo y Pedro Grynblat

Respiratory Rehabilitation Hospital María Ferrer

Correspondence to:

Glenda Ernst

Email: glenda.uba@gmail.com

Address: María Ferrer Hospital, Finochietto 849, 1° Floor- Endoscopy. Buenos Aires, Argentina; (C1121ABG).

Tel: +5411-43077474 (176).

Received: 04.03.2014

Accepted: 05.06.2014

Introduction

Interstitial lung diseases (ILDs) include a heterogeneous group of lung disorders associated with progressive loss of lung function¹. ILDs are characterized by variable degrees of inflammation and fibrosis with overproduction and deposition of extracellular matrix (ECM) components, distortion of pulmonary architecture, and intra-alveolar inflammation²⁻⁶.

IPF is the ILD with the worst prognosis. The median survival of patients with IPF after diagnosis is 2 to 5 years⁷. The increased need to identify effective clinical therapies for IPF has finally led to the development of different clinical trials to evaluate the response of anti-inflammatory or anti-fibrotic drugs. However, based on the evidence from published data, these treatments have not shown improvement in lung function and IPF survival rates^{8,9}.

IPF diagnosis requires a histopathological and/or radiological pattern to confirm a UIP but to date there is no specific biomarker available.

Du Bois and colleagues¹⁰ have compared the BAL differential cell count between UIP/IPF and NSIP and concluded that BAL findings do not discriminate between UIP/IPF and NSIP and have no prognostic value. Collard et al reported higher pepsin concentrations in BAL during acute exacerbations in IPF patients compared to stable patients. However, pepsin was not a predictor of survival time¹¹. Despite these findings, the American Thoracic Society has published a new guideline revaluing the role of BAL in the diagnosis of ILD¹².

The aim of this study was to analyze the inflammatory pattern in BAL in patients with ILD and compare results with a control group. Levels

of cytokines such as IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ and IL-8 were determined. BAL total cell counts from patients and controls were performed. We hypothesized that the study of cytokine levels in BAL could help to understand the inflammatory mechanisms involved in the development of ILD.

Materials and Methods

Study Design

The study had a prospective cross-sectional design. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Respiratory Rehabilitation Hospital "María Ferrer" in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration (1975) and corresponding updates. Informed consent was obtained from all patients and control subjects.

Patients and controls

Patients with ILD: Twenty eight adults with ILD, diagnosed according to the criteria established by the American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS)¹³, were included in this study. All diagnoses were confirmed by histopathology of lung biopsies. BAL was performed in the most affected lobe according to High Resolution Computed Tomography (HRCT).

Control Group: The control group included 15 adults without clinical evidence of ILD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), asthma or active infections. Bronchoscopy was performed as follow up for reconstructive surgery after post-intubation tracheal stenosis and BAL samples from middle lobe were collected.

Characteristics of ILD patients and control subjects are shown in **Table 1**.

Table 1. Characteristics of control subjects and ILD patients. We study 6 patients with UIP/IPF: usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis, 4 patients with fibrotic NSIP: non-specific interstitial pneumonia, 12 patients with HP: hypersensitivity pneumonitis and 6 patients with Sarcoidosis. FVC: forced vital capacity. TLC: total lung capacity. DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide. AV: alveolar volume and ND: non determined values. Data are presented as the median and quartiles (25% and 75%).

Groups	n	Age (years)	Sex	Pulmonary Function Test				Status Smoking
				FVC (% predicted)	TLC (% predicted)	DLCO (% predicted)	AV (% predicted)	
Control	15	31.0 (24.0-58.0)	Female: 7 Male: 8	90.0 (94.0-102.0)	ND	ND	ND	Never: 13 Previous: 1 Current: 1
IPF/UIP	6	69.0 (54.5-75.5)	Female: 2 Male: 4	57.5 (50.0-65.0)	52.0 (45.0-59.0)	43.5 (36.5-52.5)	54.0 (42.0-58.0)	Never: 2 Previous: 4 Current: 0
NSIP	4	63.0 (54.5-70.0)	Female: 3 Male: 1	88.0 (74.0-115.0)	97.0 (65.0-100.0)	49.0 (37.0-59.0)	90.0 (62.0-98.5)	Never: 4 Previous: 0 Current: 0
SARCOIDOSIS	6	45.0 (36.5-50.0)	Female: 4 Male: 2	78.0 (61.0-85.5)	81.5 (73.5-83.5)	64.0 (43.0-83.5)	78.5 (74.5-89.0)	Never: 1 Previous: 5 Current: 0
HP	12	56.0 (43.0-56.5)	Female: 3 Male: 9	54.0 (44.0-74.0)	59.0 (47.0-78.0)	42.0 (34.0-47.0)	57.0 (48.5-68.5)	Never: 9 Previous: 3 Current: 0

Bronchoalveolar lavage (BAL)

Sterile saline solution at room temperature was instilled through the bronchoscope in aliquots of 20 mL reaching a total volume of 140 mL. BAL fluid was manually aspirated with sterile syringes. The BAL was pooled in ice-cold tubes and centrifuged at 400g for 10 min at 4°C. Aliquots of the cell-free supernatant were stored at -70°C until use. The cell pellet was washed and total BAL cells were counted in a Neubauer chamber. Serum samples were stored after performing routine tests prior to bronchoscopy.

Pulmonary function tests

Pulmonary function tests (PFTs), including spirometry, plethysmographic measurement of lung volumes and lung diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) were performed according to ATS/ERS recommendations. A constant volume plethysmography (Platinum Elite DL, Medical Graphics Corporation) was used for PFT measurements. Predicted normal values were those of Crapo¹⁵⁻¹⁶.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ and TNF- α) in BAL and serum samples were determined by ELISA (BD OptEIA™ kits were used) following the manufacturer's recommendations. Limits of detection were 0.8 pg/mL for IL-8 and IL-1- β ; 2 pg/mL for IL-6 and TNF- α and finally 1 pg/mL for IFN- γ .

Statistical analysis

Differences between the groups were evaluated by the non-parametric Kruskal-Wallis and Dunn's multiple - comparison tests. Analyses and graphs were performed using Prism 4 software (Graph Pad, La Jolla, CA). We considered $p < 0.05$ as statistically significant.

Results

Total BAL cell count

We found a significant increase in the total BAL cell count from ILD patients compared with controls. As shown in **Figure 1**, BAL from NSIP, sarcoidosis and HP contained higher number of

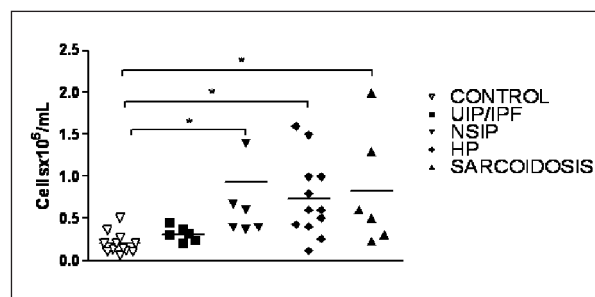


Fig. 1. Increased levels of cell counts in BAL from ILD patients compared with control subjects. We observed a significant increase in the whole cell number in BAL from NSIP (n=4), HP (n=12) and Sarcoidosis (n=6) patients, respect to control subjects (n=15); * $p < 0.05$. However patients with UIP/IPF (n=6) didn't show differences compared with control group.

cells compared with controls ($0.93 \pm 0.32 \times 10^6$ cell/ml; $0.73 \pm 0.13 \times 10^6$ cell/ml and $0.82 \pm 0.28 \times 10^6$ cell/ml, respectively vs $0.19 \pm 0.03 \times 10^6$ cell/ml; $p < 0.05$) unlike BAL from IPF/UIP patients ($0.31 \pm 0.04 \times 10^6$ cell/ml). We did not find statistically significant differences with respect to the total BAL cell count when we analyzed the patients with ILD in relation to smoking.

Cytokine concentrations in ILD patients

We also analyzed the levels of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ and TNF- α in BAL samples. There were no differences between IFN- γ , TNF- α or IL-1 β BAL concentrations in ILD patients and control subjects (**Figure 2 A, B and C**). We found a significant increase of IL-8 BAL concentrations in patients with UIP/IPF compared with control subjects (224.0 ± 56.3 pg/ml vs 75.8 ± 12.5 pg/ml; $p < 0.05$, **Figure 2 D**). NSIP, HP and sarcoidosis patients showed higher levels of IL-6 in BAL, compared with controls (366.0 ± 80.2 pg/ml; $p < 0.001$; 163.4 ± 36.7 pg/ml; $p < 0.05$ and

233.9 ± 74.9 pg/ml; $p < 0.01$ respectively vs 15.86 ± 4.6 pg/ml, **Figure 2 E**). We did not find statistically significant differences in BAL cytokine levels when we analyzed the patients with ILD in relation to smoking.

In serum samples, we did not find significant differences. TNF- α and IL-1 β levels were undetectable (data not shown).

Relationship between cytokine levels in BAL and pulmonary function tests

We analyzed the relationship between cytokine levels and lung function parameters by linear regression analysis. However, no correlations were found.

Discussion

Interstitial lung diseases represent a heterogeneous group of low incidence diseases characterized by inflammation and fibrosis of the lung parenchyma¹⁻⁵. Although BAL is widely used to

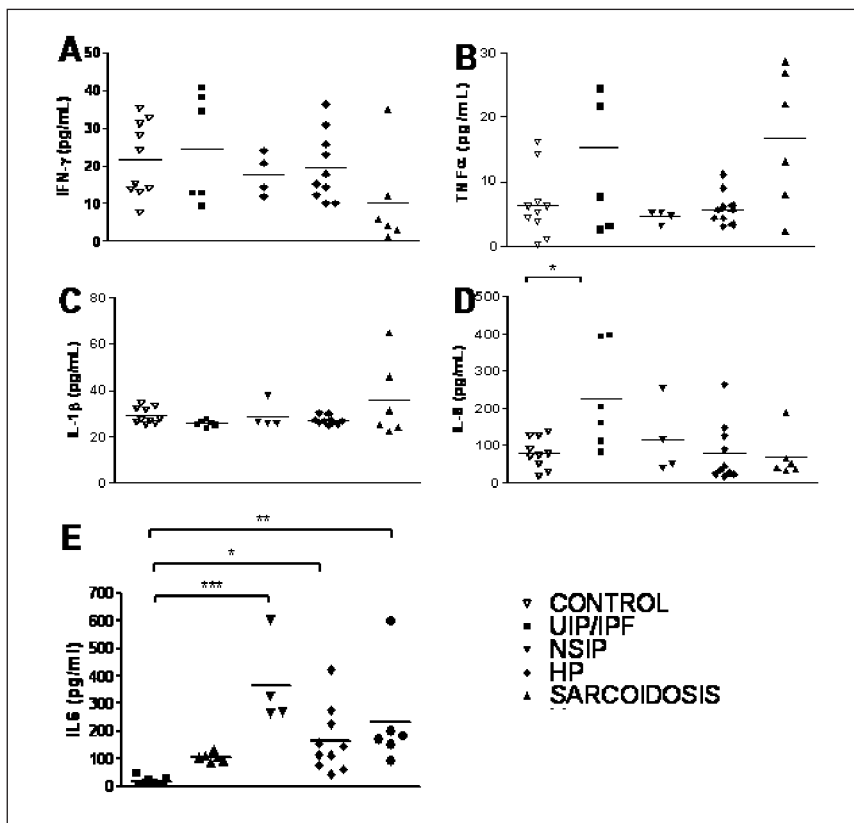


Fig. 2. Concentrations of cytokines in BAL samples from ILD patients. The levels of IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-1 β (C), IL-8 (D), and IL-6 (E) were analyzed by ELISA. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$.

obtain diagnostic information about this illness¹⁷⁻¹⁸, it could lack specificity.

As a consequence, BAL is poorly used in controlled clinical trials and its clinical utility must be validated with complete clinical information and HRCT of the thorax¹². Only in some specific ILD, the recognition of a predominantly inflammatory BAL cellular pattern (lymphocytic, eosinophilic, or neutrophilic) could contribute in the differential diagnosis of the illness, though such patterns are nonspecific¹⁹. Despite this, we hypothesized that the analysis of inflammatory cytokine levels in BAL could help to understand the inflammatory process associated with the pathogenic mechanism of this illness. Different cell types can produce these cytokines, mainly macrophages and lymphocytes, whose plasticity manifest different activation profiles²⁰. Alveolar macrophages occupy a privileged site and possess a wide array of receptors that can sense the signals surrounding them, contributing both with the activation of a robust immune response to microorganisms and the activation of an inflammatory response under tissue injury signals²¹. It has recently been described that the injuries upon lung epithelium could produce signals of damage leading to the activation of different immune cells and the exacerbation of the inflammatory response or fibrosis associated to ILD²².

A significant increase of IL-8 levels in BAL samples from patients with IPF^{23,24} has previously been described in accordance with our findings. Furthermore, Carré et al showed that alveolar macrophages isolated from BAL of patients with IPF produced higher levels of IL-8 than alveolar macrophages from healthy subjects²⁵. This cytokine has been reported as one of the relevant molecules in fibrotic processes for its role in the chemotaxis of neutrophils and its potential tissue damage²⁶.

We also found a significant increase in IL-6 levels and in the total BAL cell count in patients with NSIP, HP and sarcoidosis but not in UIP/IPF. However, it would be necessary to increase the number of patients to confirm these findings. IL-6 is a proinflammatory cytokine with a wide range of biological functions such as an acute phase response²⁷, though, *only* an increase of IL-6 in the BAL from patients with pneumoconiosis²⁸ has been reported. We found a significant increase of IL-6 in the BAL from patients with ILD but not in BAL from FPI/UIP patients. This finding

could be associated with the different pathologic mechanisms associated.

In the past, BAL cellular findings were included in the major and minor diagnostic criteria for IPF when the surgical lung biopsy was not performed²⁹. However, since the HRCT findings for UIP patterns have gained predictive value, the diagnosis of IPF/UIP is carried out by experienced radiologists, and invasive procedures such as bronchoscopy, BAL and lung biopsy are no longer required for a confident diagnosis of IPF³⁰⁻³¹.

Different factors such as environmental / occupational parameters, drugs, radiation, infections, and collagen diseases could be associated to ILD. However, most causes are idiopathic⁴. The mechanisms underlying the pathogenesis of certain ILD are poorly understood. In the present study, we analyzed whether inflammatory cytokines might be involved. The differences observed in this study could suggest that inflammatory mechanisms contributing to the development of UIP/IPF could be different from the rest of ILDs.

Conclusions

ILDs share clinical and radiologic features; however the development mechanisms are different. Thus, varied therapeutic strategies are necessary. A better understanding of the role of molecules involved in this process could contribute to new diagnostic and therapeutic strategies in the future.

Conflict of interest statement: Authors declare there is no conflict of interest in the development of this work.

References

1. King TE Jr. Clinical advances in the diagnosis and therapy of the interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 268-279.
2. Kim R, Meyer KC. Therapies for interstitial lung disease: past, present and future. *Ther Adv Respir Dis* 2008; 2: 319-338.
3. Nathan SD, Shlobin OA, Weir N, et al. Long-term course and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis in the new millennium. *Chest* 2011; 40: 221-229.
4. Selman M, King TE, Pardo A; American Thoracic Society, European Respiratory Society and American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134: 136-151.
5. Strieter RM. Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel. *Chest* 2005; 128(Suppl 1): 526S-532S.

6. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, et al. Bronchoalveolar Lavage Fluid Cellular Characteristics, Functional Parameters and Cytokine and Chemokine Levels in Interstitial Lung Diseases. *Scand J Immunol* 2009; 69: 268-274.
7. 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: 788-724.
8. McGrath EE, Millar AB. Hot off the breath: triple therapy for idiopathic pulmonary fibrosis-hear the PANTHER roar. *Thorax* 2012; 67: 97-98.
9. Raghu G, Anstrom KJ, King TE Jr, et al. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network. *N Engl J Med* 2012; 366: 1968-1977.
10. Veeraghavan S, Latsi PI, Wells AU, et al. BAL findings in idiopathic nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2003; 22: 239-244.
11. Lee JS, Song JW, Wolters PJ, Elicker BM, King TE Jr, Kim DS, Collard HR. Bronchoalveolar lavage pepsin in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2012; 39: 352-358.
12. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 1004-1014.
13. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277-304.
14. Consenso de la Asociación Argentina de Broncoesofagología para la realización de Fibrobroncoscopia. *Med Resp* 2009; 9: 196-209.
15. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319-338.
16. Macintyre N, Crapo RO, Viegi G et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2005; 26: 720-735.
17. Wells AU. The clinical utility of bronchoalveolar lavage in diffuse parenchymal lung disease. *Eur Respir Rev.* 2010; 19(117): 237-241.
18. Domagała-Kulawik J, Skirecki T, Maskey-Warzechowska M, et al. Bronchoalveolar lavage total cell count in interstitial lung diseases-does it matter? *Inflammation.* 2012; 35(3): 803-809.
19. Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful?. *Eur Respir J* 2011; 38: 761-769.
20. Wynn AT. 2004. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 583-594
21. Wick G, Backovic A, Rabensteiner E, et al. The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. *Trends Immunol* 2010; 31: 110-119.
22. Ellson CD, Dunmore R, Hogaboam CM, et al. DAMPs and Danger Signals in IPF. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014 [En proceso de publicación].
23. Meloni F, Caporali R, Marone Bianco A, et al. BAL cytokine profile in different interstitial lung diseases: a focus on systemic sclerosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004; 21: 111-118.
24. Carré PC, Mortenson RL, King TE Jr, et al. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1802-1810.
25. Gadek, JE, Kelman JA, Fells G, et al. Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Eng J Med* 1979; 301: 737-742.
26. Hunninghake GW, Gadek J, and Lawley T. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1982; 68: 259-269.
27. Naka T, Nishimoto N, and Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 2006; 4 (Suppl 3): S233 and S242.
28. Ulker O, Yucesoy B, Demir O, et al. Serum and BAL cytokine and antioxidant enzyme levels at different stages of pneumoconiosis in coal workers. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27(12): 871-877.
29. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS). American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 646-664.
30. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, 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* 2013; 188: 733-748.
31. Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: guidelines for diagnosis and clinical management have advanced from consensus-based in 2000 to evidence-based in 2011. *Eur Respir J* 2011; 37: 743-746.