

Original

Detección de autoanticuerpos en el lavado broncoalveolar en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa



Iñaki Salvador-Corres^a, Bibiana Quirant-Sanchez^b, Aina Teniente-Serra^b, Carmen Centeno^{c,d,e}, Amalia Moreno^{e,f}, Laura Rodríguez-Pons^{c,d,e}, Pere Serra-Mitjá^{c,d,e}, Marian García-Nuñez^{d,g,h}, Eva Martínez-Caceres^b, Antoni Rosell^{c,d,e,i,*}, Alejandro Olivé^{e,j} y Karina Portillo^{c,d,e,k}

^a Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia, i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^b Servei de Immunologia, Laboratori Clínic de la Metropolitana Nord (LCMN), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

^c Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

^d Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

^e Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^f Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, España

^g Servei de Pneumologia, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Sabadell, Barcelona, España

^h Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

ⁱ Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, España

^j Servei de Reumatologia, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

^k Barcelona Research Network (BRN), Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 21 de abril de 2020

Aceptado el 24 de agosto de 2020

On-line el 30 de septiembre de 2020

Palabras clave:

Autoanticuerpos

Lavado broncoalveolar

Enfermedad pulmonar intersticial difusa

R E S U M E N

Introducción: Los autoanticuerpos séricos apoyan el diagnóstico de sospecha en la enfermedad intersticial difusa (EPID) asociada a enfermedades autoinmunes sistémicas (EPID-EAS). Su presencia en el lavado broncoalveolar (LBA) no ha sido estudiada.

Objetivos: Demostrar la presencia de autoanticuerpos en el LBA de pacientes con EPID de inicio, compararlos con los resultados del suero y analizar los aspectos clínicos de los pacientes con autoanticuerpos en el LBA.

Métodos: Se analizaron autoanticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA) mediante inmunoblot en el LBA de 155 pacientes con sospecha diagnóstica de EPID y 10 controles.

Resultados: Se detectaron 7 especificidades ENA en el LBA de 19 pacientes (anti-Ro52, anti-Ro60, CENP-B, anti-La, Jo-1, Sm/RNP y anti-SL70), siendo el anti-Ro52 el más frecuente (13 pacientes; 68,4% de los positivos). Siete pacientes presentaron más de una especificidad. Catorce fueron diagnosticados de EPID-EAS, 3 de neumonía intersticial con rasgos autoinmunes, uno de neumonía intersticial no específica idiopática y otro de silicosis. En 10 casos (52%) se detectaron autoanticuerpos de clase IgA en el LBA. Los autoanticuerpos detectados en LBA también se hallaron en el suero de 17 pacientes (90%). No hubo diferencias clínicas significativas entre los pacientes con autoanticuerpos en LBA con respecto a aquellos con EPID-EAS o neumonía intersticial con rasgos autoinmunes con LBA negativo.

Conclusión: El estudio de ENA en LBA es factible y puede ser una herramienta útil en el algoritmo inicial en la EPID, concretamente, para apoyar el diagnóstico de sospecha de la EPID-EAS.

© 2020 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Detection of Autoantibodies in Bronchoalveolar Lavage in Patients with Diffuse Interstitial Lung Disease

A B S T R A C T

Introduction: Serum autoantibodies support the diagnosis of interstitial lung disease (ILD) related to systemic autoimmune diseases (SAD-ILD). Nevertheless, their presence in the bronchoalveolar lavage (BAL) has not been explored.

Keywords:

Autoantibodies

Bronchoalveolar lavage

Diffuse interstitial lung disease

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: arosellg.germanstrias@gencat.cat (A. Rosell).

<https://doi.org/10.1016/j.arbres.2020.08.020>

0300-2896/© 2020 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Objectives: To demonstrate the presence of autoantibodies in the BAL of ILD patients at onset of clinical evaluation, its relation with serum autoantibodies and to analyze clinical features of patients with autoantibodies in BAL.

Methods: Autoantibodies against extractable nuclear antigens (ENAs) were analyzed by immunoblot in the BAL of 155 patient with suspected diagnosis of ILD and 10 controls.

Results: Seven ENAs were detected in the BAL of 19 patients (Anti-Ro52, Anti-Ro60, CENP-B, Anti-La, Jo-1, Sm/RNP and Anti-SL70). The most frequent ENA was anti-Ro52 (13 patients; 68.4% of positives ones). Seven patients presented more than one ENAs. Fourteen were diagnosed of SAD-ILD, 3 of interstitial pneumonia with autoimmune features, one of non-specific idiopathic pneumonia and other of silicosis. In 10 cases (52%) IgA autoantibodies were also detected. The autoantibodies observed in BAL were also detected in the serum of 17 patients (90%). There were no significant clinical differences with the patients with SAD-ILD or interstitial pneumonia with autoimmune features with patients with negative BAL.

Conclusion: The study of ENAs in BAL is feasible and can be a useful tool in the ILD initial algorithm, specifically sustaining the suspected diagnosis of SAD-ILD.

© 2020 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La heterogeneidad de las diferentes entidades que conforman la enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) hace que para llegar a un diagnóstico de certeza se requiera un estudio secuencial y sistematizado con una aproximación diagnóstica multidisciplinar^{1–3}. En la presentación inicial de un paciente con EPID se deben considerar varios aspectos. Estas entidades pueden compartir características clínicas, funcionales o radiológicas similares². De hecho, siempre hay que descartar una causa subyacente de EPID no diagnosticada previamente (como las enfermedades autoinmunes sistémicas [EAS]).

Es por ello que la incorporación de herramientas que añadan información útil al algoritmo diagnóstico de las EPID es fundamental. Los autoanticuerpos son los principales biomarcadores en el diagnóstico de la EPID relacionada con las EAS⁴. Su detección puede apoyar un diagnóstico de sospecha y, en algunos casos, son predictores de la evolución de la enfermedad⁵. Habitualmente, los autoanticuerpos se estudian en suero, pero también pueden ser aislados en otras matrices biológicas y se ha demostrado su síntesis *in situ* en múltiples tejidos^{6,7}. Partiendo de esta premisa y de la descripción de centros germinales en el epitelio pulmonar en pacientes con EAS⁸, formulamos la hipótesis de que los autoanticuerpos pueden ser detectados también en el lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con EPID. El objetivo principal del estudio fue identificar diferentes autoanticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles (ENA) en el LBA de pacientes con sospecha diagnóstica de EPID. Como objetivo secundario se planteó relacionar la presencia de estos autoanticuerpos en LBA y suero, con parámetros clínicos, radiológicos y funcionales respiratorios.

Material y métodos

Inclusión de pacientes y recogida de muestras de LBA

Estudio prospectivo longitudinal observacional. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: pacientes ≤ 80 años con sospecha inicial de EPID, atendidos en la consulta monográfica o ingresados por esta causa en 2 hospitales universitarios entre los años 2014 y 2019. Los pacientes que presentaban un diagnóstico de EAS sin evidencia previa de EPID fueron también valorados para su inclusión. Las muestras de LBA en los controles procedían de pacientes que requirieron exploración con fibrobroncoscopia por hemoptisis menor, sin evidencia por tomografía axial computarizada de alta resolución de enfermedad parenquimatosa. La [figura 1](#) resume, mediante un diagrama de flujo, los pacientes incluidos y excluidos.

Los parámetros clínicos, radiológicos y anatomopatológicos fueron revisados por el comité multidisciplinar de EPID de los centros participantes. El diagnóstico de EPID y de neumonía intersticial con rasgos autoinmunes (IPAF) se estableció de acuerdo con los documentos de consenso de la ATS/ERS^{9–12}. El diagnóstico de EAS fue establecido según los criterios de ACR/EULAR^{13–17}.

Se incluyeron las siguientes variables: datos demográficos, historia de tabaquismo, antecedentes patológicos personales, familiares, laborales, de exposición ambiental, características clínicas funcionales y radiológicas.

La espirometría forzada, la medición de volúmenes pulmonares, la capacidad de difusión del monóxido de carbono y la prueba de la marcha de 6 minutos fueron realizadas de acuerdo con las recomendaciones internacionales, utilizando los valores de referencia publicados por Roca et al.^{18–21}. El Composite Physiologic Index se calculó mediante la fórmula descrita por Wells et al.²².

El LBA se obtuvo a través de un fibrobroncoscopio flexible, mediante la técnica estandarizada descrita previamente²³. Brevemente, el extremo del broncoscopio flexible se enclavó en el bronquio segmentario/subsegmentario de la zona parenquimatosa con mayor afectación, habitualmente en el lóbulo medio o lingula. Las 3 alícuotas recogidas fueron de 50 ml, de suero a temperatura corporal para la mejor tolerancia del paciente. Para el estudio de los autoanticuerpos se utilizó la tercera alícuota. Las muestras centrifugadas se conservaron congeladas a -20°C en alícuotas de 1,5 ml hasta su uso.

El estudio fue aprobado por el comité ético de cada hospital (n.º de registro PI-20-209 y 2018501) y todos los pacientes incluidos firmaron un consentimiento informado. Los derechos de los pacientes fueron protegidos por la Declaración de Helsinki.

Determinación de autoanticuerpos en suero

Los anticuerpos antinucleares (ANA) se determinaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células HEp-2 (INOVA Diagnostics Inc., Barcelona, España). Los ENA se estudiaron mediante CLIA, QUANTA Flash® ENA 7 (Jo-1, Scl-70, SSB, Ro-52, SSA, Sm y Sm/RNP) y QUANTA Flash® Centromere (CENP-B) (INOVA Diagnostics Inc., Barcelona, España). Los sueros positivos fueron verificados mediante el inmunoblot Euroline ANA Profile (Euroimmun, Lübeck, Alemania).

Determinación de autoanticuerpos en LBA

Los ENA se estudiaron mediante el inmunoblot Euroline ANA Profile en un automatizador EUROBlotMaster (ambos de Euroimmun, Lübeck, Alemania). Los resultados obtenidos se escanearon

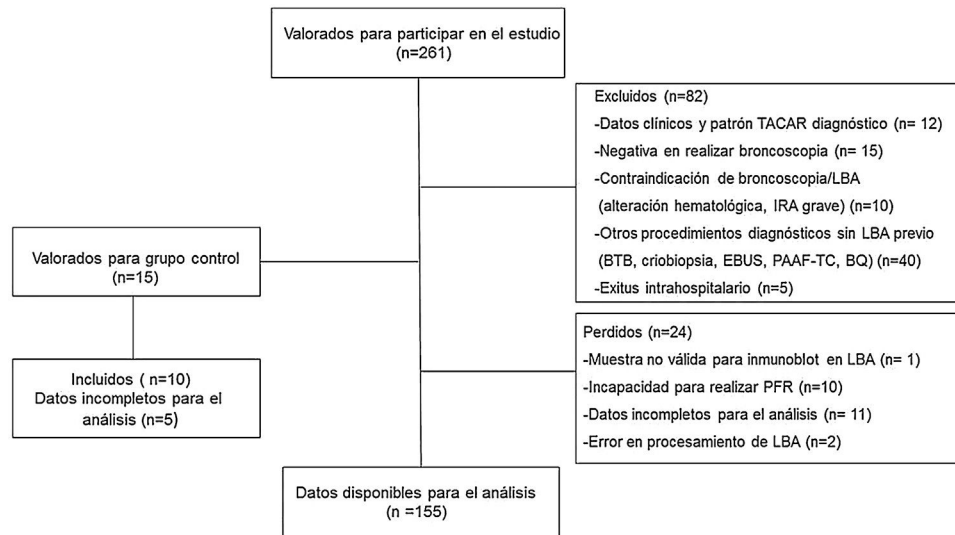


Figura 1. Diagrama de flujo de los participantes del estudio.

e interpretaron mediante el software EUROLinescan system (Euroimmun, Lübeck, Alemania), que permite obtener resultados semicuantitativos. Este método posibilita la detección simultánea de los siguientes anticuerpos: AMA-2, ribosomal-p, histonas, nucleosoma, dsADN, PCNA, CENP-B, Jo-1, PM100, Scl-70, SSB, Ro-52, SSA, Sm y Sm/RNP. Se aplicaron 2 modificaciones respecto al protocolo del proveedor:

1) La dilución óptima se estableció mediante diluciones seriadas. Algunas muestras mantuvieron la positividad a una dilución equivalente a la del suero (1/100); sin embargo, las positivities menos intensas pueden perderse a partir de la dilución 1/10, por lo que se estableció que las muestras debían procesarse sin diluir.

2) Se utilizó en paralelo un conjugado IgA además del IgG.

Para evitar considerar como positivos artefactos de tinción, se estableció que solamente las bandas que el software de análisis catalogara como intensidad media (++) o elevada (+++) serían consideradas como positivas (fig. 2).

Las muestras positivas fueron confirmadas mediante IFI sobre células HEp-2 con una dilución 1/1 (INOVA Diagnostics Inc., Barcelona, España). Los patrones ANA se informaron según la nomenclatura ICAP²⁴.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los datos. Los resultados de las variables cuantitativas se expresaron como media \pm desviación estándar o mediana con rango intercuartílico. Se utilizaron porcentajes y frecuencias absolutas para las variables cualitativas. En el caso de las variables cuantitativas o cualitativas ordinales, previamente se utilizó un test de normalidad de la varianza (test de Kolmogorov-Smirnov). Cuando la distribución de las variables fue normal se prosiguió con un test de comparación de medias (t de Student para muestras independientes). Cuando la distribución fue no normal, se utilizó el equivalente no paramétrico (U de de Mann-Whitney para muestras independientes). En el caso de las variables cualitativas, se utilizaron tablas de contingencia y el estadístico chi-cuadrado de Pearson. La variable dependiente fue la presencia o no de ENA en el LBA. El resto de los parámetros fueron las variables independientes. Un valor de p inferior a 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo. Los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS® 14.0 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, EE. UU.).

Resultados

Características de los pacientes

Se incluyeron 155 pacientes, de los cuales 87 eran varones (56,1%), con una edad media de 66 ± 12 años, y 10 controles, de los cuales 6 eran varones (60%), con una edad media de 58 ± 10 años. Los datos clínicos, funcionales y el recuento celular del LBA de estos pacientes se resumen en la tabla 1. Los diagnósticos más frecuentes fueron: EPID-EAS (36 pacientes; 23%), fibrosis pulmonar idiopática (31; 20%) y neumonía intersticial no específica idiopática (20; 13,5%) (fig. 3).

Tabla 1

Datos demográficos, funcionales y recuento celular en el lavado broncoalveolar de los pacientes incluidos y de los controles

	Casos (n = 155)	Controles (n = 10)
Edad (años)	66 \pm 12	58 \pm 10
Sexo (H/M)	87/68	6/4
Tabaquismo (activo/exfumador/nunca)	30/65/60	2/5/3
Disnea (escala mMRC)	21/67/48/19/0	6/4/0/0/0
FVC (% pred.)	68 \pm 15	85 \pm 15
FEV ₁ (% pred.)	70 \pm 18	81 \pm 10
FEV ₁ /FVC	78 \pm 11	72 \pm 15
TLC (% pred.)	76 \pm 16	95 \pm 9
DLco (% pred.)	63 \pm 19	82 \pm 5
CPI	38 \pm 14	20 \pm 6
SpO ₂ basal (mmHg)	93 \pm 6	98 \pm 1
PM6M (m)	420 \pm 60	N/A
SpO ₂ final (mmHg)	90 \pm 6	N/A
Recuento LBA (%)		
Macrófagos	63 [50-84]	64 [38-78]
Linfocitos	14 [4-24]	6 [3-22]
Segmentados	12 [3-15]	15 [2-37]
Eosinófilos	1 [1-4]	0 [0-0]
Mastocitos	0 [0-1]	0 [0-0]

CPI: Composite Physiologic Index; DLco: capacidad de difusión del monóxido de carbono; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FEV₁/FVC: cociente volumen espiratorio forzado en el primer segundo y capacidad vital forzada expresada como porcentaje absoluto; FVC: capacidad vital forzada; H: hombre; M: mujer; mMRC: escala de disnea modificada (Medical Research Council); N/A: no aplica; PM6M: prueba de la marcha de 6 minutos; SpO₂ inicial: saturación arterial de oxígeno al inicio de la PM6M; SpO₂ final: saturación arterial de oxígeno al final de la PM6M; TLC: capacidad pulmonar total; % pred.: porcentaje del valor predicho. Los resultados de las variables cuantitativas se expresaron como media \pm desviación estándar o mediana [rango intercuartílico].

ID paciente Número de tira Prueba	EUROLINE / Allergy / EUROASSAY											Westernblot										
	Abreviatura											Resultados			Abreviatura							
	Intensidad											Resultado			Intensidad							
	Char														Char							
1 1 Ana3b	Et	Co	M2	RIB	HI	NUDNA	PCNA	CB	Jo	PM100	Scl	SSB	52SSA	Sm	RNP/Sm							
	ANA-3/ 447-72																					
	-1	27	3	1	0	3	0	1	1	2	1	1	0	3	1	2	4					
	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
2 2 Ana3b	Et	Co	M2	RIB	HI	NUDNA	PCNA	CB	Jo	PM100	Scl	SSB	52SSA	Sm	RNP/Sm							
	ANA-3/ 447-79																					
	-1	38	1	3	2	1	0	2	3	83	5	1	0	54	3	1	1					
	0	++	0	0	0	0	0	0	0	+++	0	0	0	++	0	0	0					
3 3 Ana3b	Et	Co	M2	RIB	HI	NUDNA	PCNA	CB	Jo	PM100	Scl	SSB	52SSA	Sm	RNP/Sm							
	ANA-3/ 447-82																					
	-1	71	1	2	3	2	0	23	2	3	2	2	4	3	2	3	0					
	0	+++	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0					

Figura 2. Ejemplo de intensidades de los autoanticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo en el lavado broncoalveolar en el inmunoblot.

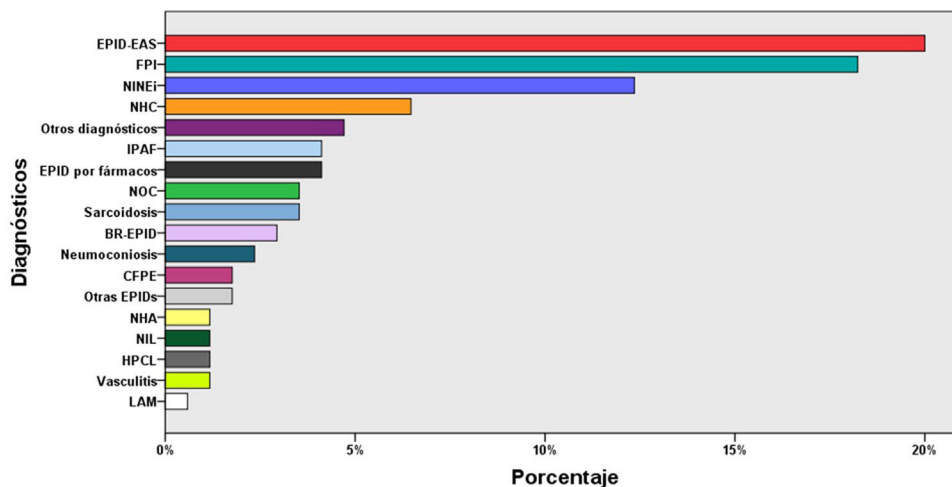


Figura 3. Diagnósticos del total de pacientes (n=155). BR-EPID: bronquiolitis respiratoria asociada a EPID; CFPE: combinación de fibrosis pulmonar y enfisema; EPID: enfermedad pulmonar intersticial difusa; EPID-EAS: EPID asociada a enfermedad autoinmune sistémica; FPI: fibrosis pulmonar idiopática; HPCL: histiocitosis pulmonar de células de Langerhans; IPAF: neumonía intersticial con rasgos autoinmunes; LAM: linfangioleiomiomatosis; NHA: neumonitis por hipersensibilidad aguda; NHC: neumonitis por hipersensibilidad crónica; NIL: neumonía intersticial linfocítica; NINEi: neumonía intersticial no específica idiopática; NOC: neumonía organizada criptogénica.

Se detectaron 7 especificidades diferentes (28 en total) en el LBA de 19 pacientes, lo cual representa un 39,5% del total de los pacientes con el diagnóstico final de EPID-EAS o IPAF. La media de edad fue de 60 ± 12 años y estuvo formado por 14 mujeres (73,6%) y 5 varones (26,3%). Catorce pacientes fueron diagnosticados de EPID-EAS, un caso de neumonía intersticial no específica idiopática, 3 casos de IPAF y un caso de silicosis. Casi un tercio de los casos (5; 26,3%) iniciaron con títulos bajos de ANA en suero (1/80). En el grupo de pacientes con EPID-EAS o IPAF, 10 presentaron patrón radiológico de EPID durante su inicio. Cuatro pacientes tenían un diagnóstico previo de EAS y la EPID supuso una complicación aguda en el transcurso de su enfermedad (bronquiolitis en paciente con síndrome de Sjögren o neumonitis lúpica en pacientes con lupus eritematoso sistémico). La tabla 2 resume las características clínicas de estos pacientes al inicio del estudio,

los autoanticuerpos en suero y en LBA, el patrón en la tomografía axial computarizada de alta resolución y su diagnóstico final. Cuando se compararon los datos clínicos y funcionales y el recuento celular del LBA de los pacientes con EPID-EAS o IPAF con autoanticuerpos en LBA positivo con aquellos que no lo presentaron no se encontró ninguna diferencia clínica ni funcional estadísticamente significativa (tabla 3). No se observó ningún ENA en el LBA del grupo control ni otras formas de EPID no asociadas con EAS.

El ENA más frecuente fue el anti-Ro52 (13 pacientes; 68,4% de los positivos), seguido de anti-Ro60 (5; 26,3%), anti-CENP-B (3; 15,8%), anti-La, Jo-1 y Sm/RNP (2; 10,5%) y anti-Scl-70 (1; 5,3%). Siete pacientes (36,8%) fueron positivos para más de un ENA. La intensidad de las bandas fue elevada en todos los pacientes, incluidos los que presentaban ANA a título bajo.

Tabla 2

Características clínicas y autoanticuerpos en suero y en el lavado broncoalveolar de los pacientes con anticuerpos extraíbles del núcleo positivos

Pacientes (n = 19)	Sexo (H/M)	Edad (años)	Características de los pacientes al inicio	ANA suero: título y patrón	ENA suero	ENA en LBA	Patrón TACAR	Diagnóstico
1	M	70	Disnea y patrón EPID en Rx de tórax	1/80 Homogéneo (AC-1)	Anti-Ro52	Anti-Ro52	NINE	SS
2	M	72	Disnea, artralgias	1/80 Citoplasmático difuso (AC-19)	Anti-Ro52	Anti-Ro52	NINE	SAS
3	M	59	Disnea, mialgias	1/640 Citoplasmático difuso (AC-19)	Anti-Ro52/anti-Ro60	Anti-Ro52 Anti-Jo-1	NINE	Polimiositis
4	H	65	Disnea, IRA	1/640 Moteado grueso (AC-6)	Anti-Jo1 Anti-Ro52/anti-Ro60, anti-La	Anti-Ro52 Anti-Ro60	NIA	SS
5	H	73	Disnea	1/2.560 Centromérico (AC-5)	CENP-B	CENP-B	NIU	ES limitada
6	M	57	Disnea	1/80 Aparato de Golgi	Negativo	CENP-B	NINE-f	NINEi
7	M	60	Disnea, tos seca, IRA	1/80 Citoplasmático difuso (AC-19)	Anti-Jo-1	Anti-Ro52 Anti-Jo-1	NINE	SAS
8	M	81	Disnea, tos seca, IRA	1/320 Moteado fino (AC-5)	Anti-Ro52	Anti-Ro52	NIA	LES
9	M	56	Disnea, IRA, fiebre, hemorragia alveolar	1/1.280 Citoplasmático punteado (AC-18)	Anti-Sm/RNP	Sm/RNP	Hemorragia alveolar	EMTC
10	H	73	Disnea EPID Rx de tórax	1/320 Nucleolar cromatina positiva (AC-29)	Negativo	Anti-Ro52	NIU	IPAF
11	M	70	Tos	ANA 1/320 Moteado grueso (AC-6)	Anti-Ro52	Anti-Ro52 Anti-Ro60	Panbronquiolitis	SS
12	H	68	Disnea, infiltrados en Rx de tórax	ANA 1/80 Moteado fino (AC-5)	Anti-Ro52	Anti-Ro52	Neumonía organizada	IPAF
13	M	74	Astenia, disnea, mialgias	1/320 Moteado fino (AC-5)	Anti-Ro52	Anti-Ro52	Infiltrados bilaterales	SS
14	H	49	Disnea, artralgias	1/2.560 Homogéneo (AC-1)	Anti-Ro52 Anti-Scl-70	Anti-Ro52	NINE	ES difusa
15	M	50	Disnea	1/2.560 Moteado fino (AC-5)	Anti-Ro52 Anti-La	Anti-Ro52 Anti-Ro60 Anti-La	NIL	SS
16	M	43	Disnea	1/1.280 Moteado grueso (AC-6)	Anti-Sm/RNP	Sm/RNP	Neumonitis lúpica	LES
17	M	43	Hemoptisis no amenazante y disnea	1/2.560 Moteado fino (AC-5)	Anti-Ro52 Anti-Ro60	Anti-Ro52 Anti-Ro60	Neumonitis lúpica Hemorragia intraalveolar	LES
18	H	51	Patrón EPID Rx de tórax	1/640 Moteado fino (AC-5)	Anti-Ro52	Anti-Ro52 Anti-Ro60	Micronodulillar	Silicosis
19	M	74	Disnea	1/640 Centromérico (AC-3)	CENP-B	CENP-B	NINE-f	IPAF

ANA: anticuerpos antinucleares; Anti-Scl-70: anticuerpos dirigidos contra la topoisomerasa I; CENP-B: anticuerpos dirigidos contra proteínas del centrómero B; EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo; ENA: anticuerpo extraíble del núcleo; EPID: enfermedad pulmonar intersticial difusa; ES: esclerodermia; H: hombre; IPAF: neumonía intersticial con rasgos autoinmunes; IRA: insuficiencia respiratoria aguda; LBA: lavado broncoalveolar; LES: lupus eritematoso sistémico; M: mujer; NIA: neumonía intersticial aguda; NIL: neumonía intersticial linfocítica; NINE: neumonía intersticial no específica; NINEi: neumonía intersticial no específica idiopática; NINE-f: neumonía intersticial no específica fibrótica; NIU: neumonía intersticial usual; Rx: radiografía; SAS: síndrome antisintetasa; SS: síndrome de Sjögren; TACAR: tomografía axial computarizada de alta resolución.

Comparativa de los pacientes ENA positivos en suero y LBA

Diecisiete pacientes (90%) con autoanticuerpos en LBA mostraban estos mismos anticuerpos en suero. En 3 pacientes (7, 11 y 15) se observaron especificidades en el LBA que no fueron detectadas en suero. Sin embargo, un paciente presentó autoanticuerpos anti-Ro52 en LBA con suero negativo. Este paciente falleció por una neoplasia de pulmón meses después de la aparición del autoanticuerpo en LBA, por lo que la seroconversión no pudo estudiarse. Tampoco se ha comprobado la positividad en suero de una

paciente con CENP-B en el LBA y diagnóstico de neumonía intersticial no específica idiopática. Por el contrario, hubo 3 pacientes que mostraron una cantidad inferior de especificidades en LBA que en suero (3, 14 y 17).

Comparativa de los pacientes con ENA en LBA de clase IgA e IgG

Más de la mitad (10/19) de los pacientes con anticuerpos de clase IgG en el LBA presentaron anticuerpos de clase IgA frente a las mismas especificidades. De las 28 especificidades encontradas,

Tabla 3
Comparación de variables funcionales en pacientes con EPID-EAS e IPAF de acuerdo con la presencia de anticuerpos extraíbles del núcleo en el lavado broncoalveolar

	n (%) ENA– 29 (60%)	ENA+ 19 (40%)	p
Edad (años)	65 ± 10	60 ± 12	0,75
Sexo (H/M)	11/18	5/14	0,32
Tabaquismo (activo/exfumador/nunca)	8/7/14	3/5/11	0,61
Disnea mMRC (0/1/2/3/4)	2/10/16/1/0	4/7/6/2/0	0,30
FVC (% pred.)	66 ± 17	68 ± 20	0,62
FEV ₁ (% pred.)	68 ± 16	66 ± 23	0,81
FEV ₁ /FVC (% pred.)	78 ± 8	71 ± 13	0,06
TLC (% pred.)	92 ± 25	79 ± 17	0,21
DLco (% pred.)	64 ± 21	60 ± 23	0,52
CPI	43 ± 22	40 ± 18	0,72
SpO ₂ basal (mmHg)	94 ± 3	96 ± 3	0,62
PM6M (m)	387 ± 122	472 ± 70	0,06
SpO ₂ final (mmHg)	92 ± 4	90 ± 6	0,31

CPI: Composite Physiologic Index; DLco: capacidad de difusión del monóxido de carbono; EPID-EAS: enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada a enfermedad autoinmune sistémica; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FEV₁/FVC: cociente volumen espiratorio forzado en el primer segundo y capacidad vital forzada expresada como porcentaje absoluto; FVC: capacidad vital forzada; H: hombre; IPAF: neumonía intersticial con rasgos autoinmunes; M: mujer; mMRC: escala de disnea modificada (Medical Research Council); PM6M: prueba de la marcha de 6 minutos; SpO₂ inicial: saturación arterial de oxígeno al inicio de la PM6M; SpO₂ final: saturación arterial de oxígeno al final de la PM6M; TLC: capacidad pulmonar total; % pred.: porcentaje del valor predicho.

Tabla 4
Resultados del inmunoblot de anticuerpos extraíbles del núcleo en el lavado broncoalveolar (conjugados IgG; IgA)

	Ro52		Ro60		La		Jo-1		CENP-B		Scl-70		Sm/RNP	
	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
Paciente 1	+++	–												
Paciente 2	+++	–												
Paciente 3	+++	++					+++	+++						
Paciente 4	+++	+++	++	++	+++	+++								
Paciente 5									+++	–				
Paciente 6									++	–				
Paciente 7	++	–					+++	+++						
Paciente 8	+++	+	+	+										
Paciente 9													+++	–
Paciente 10	++	++												
Paciente 11	+++	+++	+	++										
Paciente 12	+++	–												
Paciente 13	+++	–												
Paciente 14											+	++		
Paciente 15	+++	++	++	++	++	–								
Paciente 16													++	+
Paciente 17	+++	–	+++	–	+	–								
Paciente 18	++	+++	++	++										
Paciente 19									+++	–				

Las cruces indican el grado de intensidad de las bandas: débil (+); intermedia (++); fuerte (+++). Las intensidades débiles se interpretaron como negativas.

13 mostraron exclusivamente anticuerpos de clase IgG. En 2 casos se observó mayor intensidad de IgA que de IgG. En uno de ellos, la intensidad de la banda IgG fue baja, por lo cual, según el punto de corte establecido para el estudio, de no haberse realizado el estudio con anticuerpos IgA este paciente habría sido considerado como negativo (tabla 4).

Determinación de ANA de clase IgA e IgG en muestras de LBA

En todos los casos, el patrón de IFI detectado concuerda con el asociado a las especificidades obtenidas. Ro52 y Ro60 no se asocian a ningún patrón en los ANA, por lo que no todos los sueros fueron positivos.

Discusión

El presente estudio evidencia la presencia de autoanticuerpos en el LBA de pacientes con EPID durante su proceso diagnóstico. Hasta donde conocemos, se trata de un hallazgo nuevo no descrito previamente. Se detectaron positividad para 7 especificidades de ENA diferentes, siendo el anti-Ro52 la más frecuente. El estudio en el LBA mostró concentraciones altas de autoanticuerpos desde

el inicio en todos los pacientes, independientemente del título de ANA en suero.

La detección de ENA en el LBA es una técnica económica y accesible. Los presentes resultados ponen de manifiesto que pueden añadir información en el cribado de la EPID de origen autoinmune cuando se combina con el estudio en suero. Su detección mediante diferentes técnicas (inmunoblot, IFI) confirma que se trata de una estrategia reproducible que podría incorporarse al diagnóstico de rutina.

El LBA es una técnica ampliamente utilizada en el algoritmo diagnóstico de las EPID^{2,25}. Su análisis podría reflejar los mecanismos humorales e inmunobiológicos que tienen lugar en el pulmón de manera más fidedigna y anticipada que en sangre periférica²⁶. Sin embargo, la información sobre biomarcadores de EPID en LBA es todavía limitada. La mayoría de las moléculas estudiadas están relacionadas con la activación aberrante de las células epiteliales o de los macrófagos alveolares y, en menor medida, con la alteración de la respuesta inmunitaria^{8,27,28}.

La aparición de autoanticuerpos en suero puede adelantarse años a las primeras manifestaciones clínicas^{1,12}. Conocer el órgano en el que se está iniciando la autoinmunidad podría abrir la puerta a nuevas estrategias diagnósticas o terapéuticas. En la presente serie,

todos los pacientes se estudiaron al iniciarse las manifestaciones pulmonares (clínicas o radiológicas), por lo cual planteamos que su aparición en el LBA podría servir como marcador temprano de desarrollo de EPID en pacientes con EAS. A diferencia de las neumonías intersticiales idiopáticas, el estudio de los autoanticuerpos en las EPID-EAS representa un aspecto fundamental, ya que su presencia está directamente relacionada con la patogénesis y el daño tisular^{28,29}.

Tres pacientes mostraron autoanticuerpos en LBA no detectables en suero, y otros 3 presentaron autoanticuerpos en suero no detectables en LBA. Estas disparidades pueden reflejar diferencias en la respuesta local. Los autoanticuerpos detectados únicamente en el LBA podrían provenir directamente del pulmón y los exclusivos del suero, sintetizarse en otros tejidos. Estos hallazgos apoyan la utilidad del estudio de ambas matrices en paralelo.

El hecho de que no se obtuviera ningún resultado positivo en otro grupo de EPID frecuentes, como la fibrosis pulmonar idiopática o la neumonitis por hipersensibilidad, también puede indicar que la detección de los autoanticuerpos en el LBA es muy indicativa de una EAS de base. Al respecto, debemos señalar que dentro del grupo con LBA positivo se incluyó un caso de silicosis con positividad también en suero. Aunque este resultado puede parecer discordante, se ha descrito que la exposición al polvo de sílice es un factor de riesgo para el desarrollo de varias EAS^{30,31}. Así mismo, hay que destacar que tampoco se detectaron autoanticuerpos en el grupo control ni en pacientes con enfermedades que por su similitud clínica o radiológica pueden confundirse con una EPID en su inicio (insuficiencia cardíaca congestiva, infección en inmunosuprimidos, entre otras)².

Al comparar el grupo de pacientes con LBA positivo con aquellos con diagnóstico de EAS o IPAF con LBA negativo no encontramos diferencias significativas en los parámetros clínicos ni funcionales. Pese a esto, consideramos que podría ser interesante analizar la evolución de estos pacientes para valorar el papel de los autoanticuerpos en el pronóstico de estas enfermedades.

El ENA más frecuente detectado en el LBA de estos pacientes fue el anti-Ro52. El anti-Ro52 se encuentra en varias EAS, como el síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso sistémico o la esclerodermia, entre otras. Su presencia en suero se ha relacionado con una mayor prevalencia de EPID³² y con un peor pronóstico cuando coexiste con autoanticuerpos específicos de miopatías inflamatorias³²⁻³⁴. En nuestra serie, los pacientes con anti-Ro52 positivo en el LBA fueron en su mayoría mujeres y tuvieron diferentes diagnósticos con manifestaciones clínicas y radiológicas muy variadas. Se observaron desde casos asintomáticos que fueron estudiados por un patrón radiológico compatible con EPID hasta pacientes que comenzaron con insuficiencia respiratoria aguda, hemorragia alveolar o signos de neumonía intersticial aguda en la tomografía axial computarizada de alta resolución. Este hallazgo clínico es de interés en los pacientes con lupus eritematoso sistémico, en los cuales la prevalencia de EPID en general es menor que en otras EAS¹³. Sin embargo, cuando esta se presenta, lo puede hacer como complicación aguda, como ocurrió en nuestros casos. Estos resultados están en línea con lo publicado en la literatura, en la cual se describe que los pacientes con anti-Ro52 positivo en suero pueden tener un fenotipo clínico muy heterogéneo³⁵.

En el grupo de los pacientes con LBA positivo se pudieron detectar también autoanticuerpos con alta especificidad y relevancia clínica, entre los que destacamos el Jo-1, el Sm/RNP y el Scl-70. Estos autoanticuerpos se encuentran entre los criterios clasificatorios de diferentes EAS, como el síndrome antisintetasa, la enfermedad mixta del tejido conectivo y la esclerosis difusa, respectivamente. Así mismo, es conocido que estos marcadores también pueden ofrecer información pronóstica^{29,35,36}.

Actualmente, no se dispone de protocolos estandarizados sobre el estudio inmunológico en el cribado de la EPID. Muchos laboratorios realizan únicamente el estudio de ANA mediante IFI, y si estos

son negativos, no se estudian las especificidades ENA. En el presente trabajo, el aislamiento de los ENA en el LBA detectados también en suero respalda las recomendaciones planteadas por otros autores de ampliar el análisis de autoanticuerpos en suero. Además de los marcadores de miositis, los anti-Ro52, por su alta prevalencia y por no presentar un patrón ANA característico en suero (pudiendo ser negativos), deberían estudiarse de manera rutinaria en estos pacientes^{4,29,35,36}.

Otro hallazgo inesperado es la mayor prevalencia de anticuerpos de clase IgG sobre los IgA. En las mucosas, los anticuerpos de clase IgA son mayoritarios y la concentración pulmonar de IgG es muy baja. Sin embargo, hemos encontrado pacientes positivos para anticuerpos de clase IgG y negativos para IgA. Esta aparente incongruencia podría explicarse por una falta de sensibilidad del conjugado IgA polimérica. También podría deberse a que las IgA poliméricas están fuertemente unidas a la capa de moco y no llegan a la fase líquida que se recoge en el LBA. En sangre periférica, las inmunoglobulinas de isotipo IgA tienen una semivida de pocos días, por lo que son minoritarias³⁷. Por este motivo, es muy improbable que los anticuerpos de clase IgA detectados en nuestros pacientes procedan de una contaminación con sangre periférica. Así mismo, pese a ser minoritarios, su mera presencia demuestra la síntesis *in situ*. Este hecho apoyaría la hipótesis descrita en otros estudios de que, al menos en algunos pacientes, el pulmón sea un órgano involucrado en los mecanismos de autoinmunidad^{26,38}. Estos resultados necesitan ser replicados mediante ensayos funcionales y abren la puerta a futuras investigaciones.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones. En primer lugar, no se dispone de una cohorte de validación para determinar el valor predictivo de la prueba. Puesto que el objetivo principal del estudio era detectar la presencia de autoanticuerpos en el LBA, los hallazgos presentados responden a la pregunta de la investigación. Segundo, los pacientes en el grupo control no eran voluntarios sanos y algunos tenían antecedentes de tabaquismo. Es reconocido que a pesar de que el LBA es una técnica mínimamente invasiva, puede resultar molesta en algunos pacientes, dificultando la realización en población sana. Por último, aunque el estudio recoge pacientes de 2 centros, el grupo de pacientes con EAS es relativamente reducido para generar un adecuado tratamiento estadístico. Sin embargo, asumimos que refleja la práctica clínica real de las unidades de EPID en nuestro medio, en donde un porcentaje elevado de pacientes es referido con un diagnóstico previo de EAS para su seguimiento.

En resumen, el presente estudio demuestra que es posible detectar mediante técnicas convencionales autoanticuerpos en el LBA de pacientes con EPID de inicio. Su análisis en paralelo con el del suero añade información valiosa en el algoritmo diagnóstico de estas enfermedades. Podría ser de utilidad para identificar de manera precoz a aquellos pacientes con EAS con afectación intersticial en los diversos escenarios en que puede presentarse.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado mediante las siguientes ayudas: Beca para la investigación de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR): proyecto 020, Beca EPID Futuro 2014, Ayudas para estancias en otros centros SEPAR 2018, (Karina Portillo), Fondo de Investigación Sanitaria P16/0216 (Marian García-Nuñez) y Beca Separ-Boehringer EPID 2018 para jóvenes investigadores (Laura Rodríguez Pons).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.arbres.2020.08.020](https://doi.org/10.1016/j.arbres.2020.08.020)

Bibliografía

- Walsh SLF. Multidisciplinary evaluation of interstitial lung diseases: Current insights. *Eur Respir Rev.* 2017;26:170002.
- 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;39:580–600.
- Skolnik K, Ryerson CJ. Unclassifiable interstitial lung disease: A review. *Respirology.* 2016;21:51–6.
- 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.* 2016;113:80–92.
- Koenig M, Dieudé M, Senécal JL. Predictive value of antinuclear autoantibodies: The lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmun Rev.* 2008;7:588–93.
- Kryštůfková O, Barbasso Helmers S, Venalis P, Malmström V, Lindroos E, Vencovský J, et al. Expression of BAFF receptors in muscle tissue of myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro52/anti-Ro60 autoantibodies. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:454.
- Barcellos KS, Nonogaki S, Enokihara MM, Teixeira MS, Andrade LE. Differential expression of Ro/SSA 60 kDa and La/SSB, but not Ro/SSA 52 kDa, mRNA and protein in minor salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 2007;34:1283–92.
- Rangel-Moreno J, Hartson L, Navarro C, Gaxiola M, Selman M, Randall TD. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2006;116:3183–94.
- American Thoracic Society; European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:277–304.
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, 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.* 2013;188:733–48.
- Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198:e44–6.
- 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.* 2015;46:976–87.
- Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2677–86.
- Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell LA, Baer AN, Challacombe S, Lanfranchi H, et al. American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: A data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res.* 2012;64:475–87.
- Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med.* 1975;292:344–7.
- Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:1747–55.
- Limaye VS, Cassidy J, Scott G, Roberts-Thomson PJ, Gillis D. Anti-Ro52 antibodies, antisynthetase antibodies, and antisynthetase syndrome. *Clin Rheumatol.* 2008;27:521–3.
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J.* 2005;26:319–38.
- Wanger J, Clausen JL, Coates A, Pedersen OF, Brusasco V, Burgos F, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J.* 2005;26:511–22.
- American Thoracic Society Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statements: Guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;166:111–7.
- Roca J, Burgos F, Sunyer J, Saez M, Chinn S, Antó JM, et al. Reference values for forced spirometry. Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J.* 1998;11:1354–62.
- Wells AU, Desai SR, Rubens MB, Goh NS, Cramer D, Nicholson AG, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: A composite physiologic index derived from disease extent observed by computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:962–9.
- 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. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185:1004–14.
- Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Carvalho Franciscantonio PL, et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014–2015. *Front Immunol.* 2015;6:412.
- Benstrup E, Maher TM, Manali ED, Wijsenbeek M. Challenges in the classification of fibrotic ILD. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2015;32 Suppl 1:4–9.
- Harlow L, Gochuico BR, Rosas IO, Doyle TJ, Osorio JC, Travers TS, et al. Anticitrullinated heat shock protein 90 antibodies identified in bronchoalveolar lavage fluid are a marker of lung-specific immune responses. *Clin Immunol.* 2014;155:60–70.
- Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respir Investig.* 2012;50:3–13.
- Bonella F, Costabel U. Biomarkers in connective tissue disease-associated interstitial lung disease. *Semin Respir Crit Care Med.* 2014;35:181–200.
- DeDent AM, Fischer A. Interstitial pneumonia with autoimmune features. En: Wuyts WA, Cottin V, Spagnolo P, Wells AU, editores. *Pulmonary manifestations of systemic diseases (ERS Monograph)* PL Sheffield. European Respiratory Society; 2019. p. 140–52.
- Lee S, Hayashi H, Mastuzaki H, Kumagai-Takei N, Otsuki T. Silicosis and autoimmunity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2017;17:78–84.
- Martín Asenjo M, Martín Guerra JM, Iglesias Pérez C, Prieto de Paula JM. Silicosis y síndrome de Sjögren. *Arch Bronconeumol.* 2019;55:536–49.
- Ghillani P, André C, Toly C, Rouquette AM, Bengoufa D, Nicaise P, et al. Clinical significance of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies non-associated with anti-SSA 60kDa antibodies: Results of a multicentric study. *Autoimmun Rev.* 2011;10:509–13.
- La Corte R, Lo Mo Naco A, Locaputo A, Dolzani F, Trotta F. In patients with antisynthetase syndrome the occurrence of anti-Ro/SSA antibodies causes a more severe interstitial lung disease. *Autoimmunity.* 2006;39:249–53.
- Vánca A, Csípo I, Németh J, Dévényi K, Gergely L, Dankó K. Characteristics of interstitial lung disease in SS-A positive/Jo-1 positive inflammatory myopathy patients. *Rheumatol Int.* 2009;29:989–94.
- Sclafani A, D'Silva KM, Little BP, Miloslavsky EM, Locascio JJ, Sharma A, et al. Presentations and outcomes of interstitial lung disease and the anti-Ro52 autoantibody. *Respir Res.* 2019;20:256.
- Shi J, Li S, Yang H, Zhang Y, Peng Q, Lu X, et al. Clinical profiles and prognosis of patients with distinct antisynthetase autoantibodies. *J Rheumatol.* 2017;44:1051–7.
- Lusuardi M, Capelli A, Di Stefano A, Donner CF. Lung mucosal immunity: Immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J.* 2002;19:785.
- Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: From triggering to targeting. *Nat Rev Immunol.* 2017;17:60–75.