

11231

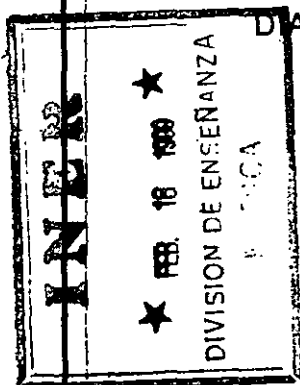
2
2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
DIRECCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

POBLACION CELULAR EN LAVADO
BRONQUIOLOALVEOLAR DE PACIENTES CON
DIAGNOSTICO DE EPOC INDUCIDO POR HUMO
DE LEÑA Y POR HUMO DE TABACO



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN NEUMOLOGIA
P R E S E N T A :

DR. JOSE WALDEMAR CASTILLO GONZALEZ

INER.

ASESOR: DR. RAUL SANBORGES MARTINEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGINAL

1999
I

271343

1000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Nadie....
Sin Ardua Fatiga
Supo Arrancar
El Laurel De La Gloria

Contenido

Dedicatoria	4
Agradecimiento	5 - 6
Introducción	7 - 9
Justificación	10
Objetivos	11
Hipótesis	12
Criterios De Inclusión Y De Exclusión	13
Material Y Métodos	14
Consentimiento Del Paciente Para El Lavado Bronquioloalveolar	15
Lavado Bronquioloalveolar (LBA)	16 -17
Manejo Del Liquido Obtenido Del LBA	18
Análisis Estadístico	19
Resultados	20 - 22
Tablas	23 - 30
Figuras	31 - 37
Discusión	38 - 43
Conclusiones	44
Apéndice	45
Bibliografía	46 - 49

Dedicatoria

**A Dios Padre Todo Poderoso Por Sus Bendiciones Bondad Y Misericordia.
A Mis Padres Emilio Castillo Y Consuelo González De Castillo Que Por Su Amor
Vivo.**

A Mis Hermanos Por Creer Y Confiar.

A María Luisa Por Su Fe Credibilidad Y Apoyo Incondicional.

A Mis Hijos Emilio José Y Jorge Andrés Por Ser Mi Continuación.

A Mis Abuelitos Por Su Amor Longevo.

A Mis Tios Y Tias Por Su Apoyo Moral.

A Mis Cuñadas Y Cuñados Por Su Apoyo Moral.

A Mis Sobrinos Por Sus Sonrisas.

A Mis Amigos Y Compañeros Por Esos Años Maravillosos.

Agradecimiento

Universidad De San Carlos De Guatemala (USAC)

Alma Mater De Mi Educación.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Hospitales:

Roosevelth De Guatemala El Inicio.

Instituto Guatemalteco De Seguridad Social (I.G.S.S)

Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias (I.N.E.R) El Complemento.

“ La Otra Casa” y a sus moradores, nuestros pacientes.

A Usted Por Leer Esta Tesis

A Betzy
Por Tu Decidido E Incólume Amor

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se define como una obstrucción permanente del flujo aéreo ocasionada por la Bronquitis Crónica o Enfisema. La obstrucción generalmente es progresiva y parcialmente reversible, y puede estar acompañada de hiperreactividad bronquial (1).

La causa más frecuente de EPOC en el mundo es el tabaquismo (1,2,3). Se ha considerado que el consumo acumulativo de 10 paquetes / año es un factor de riesgo para desarrollar EPOC. El humo del cigarrillo produce activación de macrófagos y éstos a su vez, por medio de quimiotaxis reclutan neutrófilos causando inflamación en bronquiolos terminales y en el tejido pulmonar en diferentes grados. La inflamación en la vía aérea es muy compleja, pero se sabe que la celularidad en el lavado bronquioloalveolar (LBA) se encuentra elevada 4 o 6 veces con respecto a los valores encontrados en sujetos normales (4,5).

Los macrófagos y los neutrófilos son las células que principalmente están involucradas en el proceso inflamatorio inicial (3,6) y posteriormente en los cambios anatómicos en el árbol bronquial y el deterioro del tejido pulmonar (7,8).

Otra causa de EPOC, es la exposición prolongada al humo de leña. Pandey, en Nepal (9) describió a un grupo de mujeres con bronquitis crónica en quienes el único factor de riesgo potencial fue el humo de leña. Sin embargo, sus estudios no pudieron demostrar una relación causa-efecto. Pérez-Padilla y Cols en México (10) y Dennis y Cols en Colombia (11) describieron casi al mismo tiempo una asociación entre la exposición crónica al humo de leña, bronquitis crónica y EPOC. Pérez-Padilla y Cols, pudieron incluso estimar que 200 horas/año es el tiempo de exposición que desempeña un papel clave como factor de riesgo para desarrollar EPOC (10). Además, como ocurre con el cigarro, algunos estudios han sugerido que el humo de leña puede causar Cáncer pulmonar (12,13).

En estudios previos no se ha encontrado diferencias histológicas en la vía aérea y el tejido pulmonar entre pacientes con EPOC por tabaco y el humo de leña (14) lo cual, hace suponer que el proceso inflamatorio y las lesiones al árbol bronquial y tejido pulmonar, pueden ser mediadas también por la misma población celular de macrófagos, neutrófilos y sus metabolitos, así como también similares mecanismos patogénicos (liberación de mediadores proinflamatorios, oxidativos y elastolíticos (15,16,17,18,19,20,21,22,23,24).

En México, el 48% de la población en general utiliza leña como material bioenergético para cocinar y son las mujeres la población más afectada, por cuanto son las que se mantienen en las labores del hogar. (25) Se ha demostrado que esta población de riesgo desarrolla cambios citológicos en la expectoración debido a la toxicidad del humo de leña en la vía aérea (26).

En otro estudio llevado a cabo en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), se demostró que no hay diferencias en relación a los cambios histopatológicos que se observan entre los pacientes con EPOC por tabaquismo y el de HL (14). También se han estudiado desde el punto de vista epidemiológico, clínico, y radiológico las características de las pacientes con EPOC por HL (27). Además, el perfil hemodinámico de estos pacientes ha demostrado que tanto la hipertensión pulmonar secundaria y el *Cor pulmonale* es un hallazgo común en ellos (28).

El lavado bronquioloalveolar (LBA), es una herramienta que se ha utilizado para investigar a la mayoría de patologías pulmonares tanto con fines diagnósticos como pronósticos (29,30). El LBA también se ha utilizado para evaluar efectos de tratamiento y podría ser una alternativa diagnóstica en el futuro para pacientes con enfermedades pulmonares avanzadas (31,32,33,34,35).

No hay en México, ni en la literatura mundial estudios sobre el LBA de pacientes con EPOC por HL. Tampoco se conoce la población celular prevalente ni los mecanismos fisiopatológicos asociados a la obstrucción de la vía aérea.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue investigar el perfil celular en el LBA de los pacientes con EPOC / HL y compararlo con el de los pacientes con EPOC asociado al tabaquismo y sujetos sanos.

JUSTIFICACIÓN

El efecto que tiene el humo del cigarrillo se ha estudiado ampliamente, tanto desde el punto de vista clínico como de los mecanismos fisiopatológicos de muchas de las enfermedades con las que su consumo se ha asociado. Así mismo, se ha estudiado el impacto social y económico que este conlleva. En cambio, mucho menos se ha estudiado la exposición al Humo de Leña y la mayoría de los abordajes de investigación que se han hecho son de tipo epidemiológico. En este sentido, poco se ha investigado sobre el proceso inflamatorio que se observa en EPOC asociado a la exposición crónica al HL. Por tal motivo, es importante realizar estudios que permitan identificar y cuantificar algunos de los fenómenos proinflamatorios en los pacientes que desarrollan EPOC inducido por HL.

Por ejemplo, no existe información de estudios relacionados con el LBA y el perfil celular en pacientes con EPOC asociada a la exposición de HL. Su importancia radica en que podrían iniciar una línea de investigación comparativa sobre fisiopatología y los mecanismos celulares involucrados en el desarrollo de la obstrucción al flujo aéreo.

Considerando que el uso y consumo de la leña es aún muy elevado en México algunos países de Latinoamérica y que su impacto sobre el sistema respiratorio es importante, podría tratarse de un problema de salud pública que afecta principalmente a las mujeres.

OBJETIVOS

1.- Cuantificar la población celular en el LBA de pacientes con EPOC secundario a la exposición crónica al humo de leña.

2.- Comparar los resultados obtenidos con la población celular del LBA de pacientes con EPOC asociado a tabaquismo y con la de un grupo de sujetos sanos.

HIPÓTESIS

La Celularidad en el LBA, en términos de su cuenta diferencial y número total, en pacientes con EPOC asociada a la exposición crónica de Humo de leña es igual al de los pacientes con EPOC asociada al Tabaquismo.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- 1.- Mayores de 60 años, ambos sexos.
- 2.- Con diagnóstico de EPOC en el estadio I / II (Criterios de la ATS).
- 3.- Fumadores crónicos, con Índice tabáquico > de 10 paquetes / año.
- 4.- Pacientes con Índice de exposición al humo de leña > de 200 hrs / año.
- 5.- Oxemia por arriba de 60 mmHg y/o saturación de oxígeno arriba de 90 %.
- 6.- Tele de Tórax sin evidencia de otras enfermedades pleuropulmonares.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- 1.- Qué los pacientes que presenten proceso infeccioso al realizar el LBA.
- 2.- Qué tengan Hiperreactividad bronquial.
- 3.- Qué usen esteroides u otro anti-inflamatorio en las últimas cuatro semanas antes del estudio.
- 4.- Qué usen Antibióticos en las últimas cuatro semanas.
- 5.- Qué tengan antecedentes de Infarto Agudo al Miocardio en los últimos 6 meses.
- 6.- Qué cursen alguna cardiopatía
- 7.- Que cursen con Insuficiencia Respiratoria de cualquier causa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio prospectivo, comparativo, transversal, que se realizó en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en el periodo comprendido del mes de Abril a Septiembre de 1998.

Se seleccionaron 11 pacientes con diagnóstico de EPOC asociado a tabaquismo y 12 con EPOC asociado a exposición crónica de HL. El diagnóstico de EPOC se hizo de acuerdo a los criterios de la ATS (American Thoracic Society) (1):

- ◆ VEF1 < del 70%
- ◆ VEF1/CVF < del 70%
- ◆ Reversibilidad al broncodilatador menor del 12%

También, se incluyeron en este estudio 12 sujetos sanos como grupo control. Se consideró sano un sujeto en el cual no existiera el antecedente de tabaquismo ni de exposición a humo de leña. Además, no debía tener historia de enfermedades respiratorias o de algún otro sistema. No debía estar tomando medicamentos de ningún tipo. Además, sus pruebas de función pulmonar debían estar dentro de límites normales.

Espirometría. A todos los pacientes se les realizó una espirometría en condiciones basales y 20 minutos después de administrar 200 µg de salbutamol en aerosol de dosis medida. Para la espirometría, se seleccionó el mejor de tres trazos aceptables de acuerdo a los criterios de la ATS (36). La reproducibilidad entre los dos mejores valores debería ser igual o menor al 5%.

Consentimiento informado para realizar la fibrobroncoscopia y el lavado bronquioloalveolar : A todos los pacientes se les explicó el procedimiento y los objetivos del estudio. Todos firmaron una carta de consentimiento.

Lavado Bronquioloalveolar

A todos los pacientes se les explicó acerca del fibrobroncoscopio y la pantalla de video y la sensación que sentirían durante el procedimiento. Además, se les presentó el fibrobroncoscopio y a quién les realizaría el LBA. Se les canalizó con solución Hartman 500 c.c y se les anestesió la orofaringe con Xilocaina al 2% en un total de 10 ml con torundas de algodón y con cotonetes las fosas nasales. Se les administró 0.5 mg de Atropina por vía I.M 15 minutos antes de LBA.

El procedimiento se vigiló continuamente con un monitor cardíaco y el oxímetro de pulso en el dedo índice para detectar función cardíaca y la saturación arterial de oxígeno.

El paciente se acostó en decúbito dorsal y se les protegió la cabeza y los ojos con material estéril y desechable.

Con anterioridad, se había planeado que el procedimiento se suspendería en caso de que se registrara un descenso de la saturación de 20% ó más, o en caso de que se presentara dolor precordial, arritmia cardíaca o aumento de la disnea.

Se introdujo el Fibrobroncoscopio visualizando la Laringe, se instilaron 2 ml de Xilocaina al 2% simple, posteriormente en subglótis, tráquea, Carina y bronquios principales se instilaron 2 ml de Xilocaina (la cantidad máxima de Xilocaina que se utilizó fue de 300 mg, con un total de 8 ml), y se realizó una inspección visual de los dos árboles bronquiales. Posteriormente, se encañó la punta del Fibrobroncoscopio en lóbulo medio y/o lingula.

Una vez ya acuñado en el bronquio segmentario, se procedió a realizar el LBA con 300 ml de solución salina al 0.9 % estéril a temperatura ambiente. Para ello, se instilaron alicuotas de 60 ml con una jeringa seguido de aspiración suave y gentil del líquido (la presión negativa aproximada que se ejerció al aspirar el líquido fue de 50-100 mmHg). Con ésta maniobra se recuperó un volumen promedio del 60% en cada lavado.

El LBA se colectó en tubos estériles de polipropileno de 50 ml y se trasladó inmediatamente al Laboratorio de Biología molecular en el área de investigación y al laboratorio de Microbiología del INER, en dónde se procesó la muestra de cada LBA.

Manejo del líquido obtenido del LBA. El procesamiento del lavado se hizo siguiendo las guías internacionales para los lavados bronquioloalveolares (29,30,33,39); la primera alícuota fue descartada para el análisis, pero se llevó a microbiología para cultivo. Con el líquido restante se hizo lo siguiente:

- Se procesó en condiciones estériles a 4 °C.
- En el cuarto de cultivo el LBA se filtró a través de una gasa estéril para eliminar el moco y se homogeneizó juntando todas las alícuotas en un matraz Erlenmeyer estéril y se volvió a repartir en alícuotas.
- Las alícuotas se centrifugaron a 1500 r.p.m. por 10 minutos a 4° C, para obtener el botón celular y el sobrenadante.
- El sobrenadante se decantó y se guardó a -70 °C.
- El botón celular de cada alícuota se depositó en un tubo estéril y se resuspendió en 10 ml. de PBS estéril.
- Se tomaron 10 µl de la suspensión celular para hacer una dilución 1:10 con 90 µl de Azul de Tripano, de la que se tomaron 10 µl para cargar la Cámara de Neubauer y realizar la cuenta total de células (C.C.T), y evaluar la viabilidad celular.
- Por otro lado, se tomó una alícuota de 250 µl y se suspendió en 750 µl de Carbowax, posteriormente se hicieron frotis teñidos con Wright-Giemsa y Papanicolaou, para determinar la población celular diferencial de cada LBA.
- El conteo diferencial se realizó con un microscopio de luz convencional usando el objetivo de 40X contando un mínimo de 100 células en diferentes campos seleccionados al azar en total se contaron 500 células para realizar el reporte.
- Posteriormente, la suspensión celular original (740 µl) se vuelve a centrifugar a 1500 r.p.m. por 10 minutos a 4° C (se centrifuga para retirar el PBS que también funcionará para lavar las células de la solución salina del lavado).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados, las variables de pruebas pulmonares funcionales y edad, se utilizó la prueba de Análisis de Varianza para muestras no paramétricas (ANOVA) para comparar los tres grupos. La t de Student se usó para la comparación entre dos grupos cuando los valores se expresaron en promedio y desviación estándar. Se consideró con significancia estadística una $p < 0.05$. Los resultados de la celularidad de los lavados bronquioloalveolares se expresaron con índices de tendencia central y dispersión de tipo no paramétrico (mediana y extremos) y para comparar los tres grupos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y la U de Mann Whitney. Se utilizó el programa computarizado SYSTAT.

RESULTADOS

Se realizaron en total 35 lavados bronquioloalveolares, de los cuales 12 correspondieron a sujetos sanos y los restantes a pacientes de la clínica de EPOC. Todos estaban en condiciones estables a la hora del estudio y toleraron el procedimiento sin complicaciones a excepción de un paciente que presentó broncoespasmo después del LBA que revirtió con broncodilatadores. A todos se les permitió el uso rutinario de sus medicamentos (Salbutamol y Bromuro de Ipatropium) y la última dosis de la administraron fue la noche anterior del procedimiento. Ninguno estaba bajo tratamiento con antiinflamatorios esteroideos o cromonas y tampoco estaba recibiendo antibióticos.

En las tablas 1 y 2 se presentan las características demográficas, funcionales y los resultados del LBA de los Sujetos Sanos. Se puede observar que sus pruebas de función pulmonar están dentro de los límites de lo normal. Así mismo, las características del LBA muestran un predominio de los macrófagos seguido de los linfocitos.

En las tablas 3 y 4 y en la 5 y 6 se presentan las características demográficas, funcionales y los resultados del LBA de todos los pacientes en el grupo de EPOC asociado a la exposición de humo de leña (EPOC / HL) y de todos los pacientes del grupo de EPOC secundario a tabaquismo (EPOC / TAB) respectivamente.

En las tablas 7 y 8, se resumen las características de los 3 grupos de estudio. Se puede observar que el grupo de los sanos está formado por personas que mostraron una edad significativamente menor que los sujetos de los otros dos grupos. Así mismo, mientras los dos grupos de pacientes con EPOC mostraron un patrón obstructivo moderado y no hubo diferencias significativas en cuanto a edad y pruebas de función pulmonar entre ellos; los sujetos sanos mostraron un patrón funcional normal y si hubo diferencias entre éstos y los dos grupos de pacientes con EPOC.

Los 12 pacientes con EPOC/HL fueron del sexo femenino con una edad promedio de 63 ± 4 años, y un tiempo de exposición al HL de 226 ± 122 hrs/año. En todas ellas, el diagnóstico que prevaleció fue de bronquitis crónica. En el grupo de pacientes con EPOC asociada al consumo de tabaco solamente tres pacientes fueron del sexo femenino, ocho tuvieron diagnóstico de enfisema y 5 de bronquitis crónica con un consumo acumulativo promedio de cigarrillos de 48 ± 10 paquetes/año. Con respecto a los resultados observados en el análisis del lavado bronquioloalveolar se puede observar lo siguiente:

Volumen total recuperado (ml). En los pacientes con EPOC asociados a HL la cantidad mediana de líquido recuperado de 197 ml no fue significativamente diferente de la encontrada en los pacientes con EPOC asociada a tabaquismo de 120 ml. En cambio, en los pacientes con EPOC/TA se recuperó menor cantidad de volumen en relación a los sujetos sanos. (Ver figura 1)

Celularidad total. Expresada en millones de células (1×10^6) por volumen total del líquido recuperado no fue significativamente diferente entre los tres grupos estudiados. (ver figura 2)

Células por mililitro. Los sujetos sanos pulmonares mostraron una cantidad mediana significativamente menor de células (51×10^3) que la encontrada en los dos grupos de pacientes con EPOC, tanto, la asociada a la exposición crónica al humo de leña (1×10^3 células/ml) como a la de tabaquismo (71×10^3 células/ml). (Ver figura 3)

Macrófagos. Los sujetos sanos mostraron una cantidad mediana significativamente mayor de macrófagos (92%) que los pacientes con EPOC del grupo de tabaquismo y HL (80% y 75% respectivamente). (Ver figura 4)

Linfocitos. Se encontraron diferencias significativas entre EPOC/HL y el grupo de los sanos, pero no se encontró diferencia entre los grupos de EPOC. (Ver figura 5)

Neutrófilos. El porcentaje de neutrófilos fue significativamente menor en los sujetos sanos en comparación con los pacientes con EPOC por tabaquismo así como con los pacientes con EPOC por HL (medianas de 0, 6 y 4% respectivamente). (Ver figura 6)

Eosinófilos. No hubo diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos estudiados. (Ver figura 7)

Tabla 1
**Características Demográficas Y Funcionales
 De Sujetos Sanos No Fumadores**

Pte No.	Edad Años	Sexo F/M	CVF ML	VEF₁ mL	VEF₁ pp	VEF₁/CVF %
1	35	f	3310	2860	92	86
2	27	f	3140	2650	90	84
3	40	m	3100	2840	98	92
4	26	m	3470	2880	97	83
5	37	f	4580	3960	89	86
6	40	f	3290	2770	92	84
7	20	m	3400	3100	97	91
8	27	m	3100	2600	87	84
9	23	f	3470	2880	105	83
10	24	f	3290	2770	89	84
11	20	m	3480	2900	90	83
12	26	m	4100	3400	91	83
X	29	6/6	3477	2967	93	85
DE ±	7		437	375	5	3

X: promedio. DE: desviación estándar. CVFL. capacidad vital forzada en mL..

VEF₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

VEF₁ pp: volumen forzado en el primer segundo, expresado en porcentaje del predicho.

VEF₁ / CVF : relación del volumen forzado en el primer segundo con la capacidad vital. forzada, expresado en porcentaje

Tabla 2
Conteo Celular Y Diferencial Del LBA
Sujetos Sanos

Pte No.	VOL REC	CEL TOT	CEL ML	Macrófagos %	Linfocitos %	Neutrófilos %	Eosinófilos %
1	310	7.9	25.7	92	7	0	0
2	182	7.3	40.1	93	5	2	0
3	224	13.3	59.4	93	5	2	0
4	200	9.4	43.0	86	15	1	0
5	225	5.4	24.3	93	7	0	0
6	270	17.7	65.6	82	17	0	0
7	240	8.7	36.3	89	10	1	0
8	150	11.2	74.6	95	5	0	0
9	235	17.5	81.3	92	8	0	0
10	230	13.0	56.5	96	4	0	0
11	202	10.2	50.6	92	8	0	0
12	210	11.0	52.3	97	3	0	0
Me	224	10.6	51.4	92	7	0	0
Ext	150-130	5.4-17.7	24-81	82-97	3-17	0-2	0-1

Me: Mediana. Ext: Extremos. Vol Rec: Volumen recuperado en mL.

Cel TOT: Células Total : 1×10^6 . Cel ml: Células por mililitro: 1×10^3

Tabla 3
Características Demográficas Y Funcionales
De Pacientes Con EPOC / HL

Pte No.	Edad Años	Sexo F/M	Hrs / Años	CVF ML	VEF₁ mL	VEF₁ pp	VEF₁/CVF %
1	64	f	180	1600	988	55	63
2	62	f	95	1800	1200	71	66
3	56	f	430	1260	780	43	62
4	64	f	72	1200	790	45	65
5	67	f	100	1020	480	34	47
6	68	f	144	1280	850	54	66
7	60	f	200	1500	1000	45	66
8	60	f	360	1800	960	61	53
9	67	f	180	1900	1000	50	65
10	64	f	380	1700	1100	67	63
11	67	f	240	1600	1000	72	62
12	56	f	336	1320	920	68	69
X	62		226	1498	922	55	62
DE±	4		122	279	183	12	6

X: promedio. DE: desviación estándar. CVF: capacidad vital forzada en mL.

VEF₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

VEF₁ pp: volumen forzado en el primer segundo, expresado en porcentaje del predicho.

VEF₁ / CVF: relación del volumen forzado en el primer segundo con la capacidad vital forzada, expresado en porcentaje

Hrs / años: exposición al humo por horas /año.

Tabla 4
Conteo Celular Y Diferencial Del LBA En EPOC / HL

Pte No.	VOL REC	CEL TOT	CEL mL	Macrófagos %	Linfocitos %	Neutrófilos %	Eosinófilos %
1	190	33.4	175.7	65	17	18	0
2	260	60.1	231.1	76	22	2	0
3	155	18.8	121.2	90	8	2	1
4	210	22.2	105.7	74	22	3	0
5	110	14.9	135.4	61	18	21	1
6	230	17.7	76.9	65	27	8	0
7	170	21.7	127.6	92	7	1	0
8	130	9.40	72.3	98	1	1	0
9	176	3.80	21.5	68	26	6	0
10	100	1.32	13.2	74	9	17	0
11	90	1.14	12.7	88	10	2	0
12	240	25.4	106.0	81	14	5	0
Me	197	18.2	106	75	15	4	0
Ext	90-260	1.14-60	13-231	61-98	1-27	1-21	0-1

Me.: Mediana. Ext. Extremos. Vol Rec: Volumen recuperado en ml.

Cel TOT: Células Totales : 1×10^6 . Cel mL: Células por mililitro 1×10^4

Tabla 5
Características Demográfica Y Funcionales
De Pacientes Con EPOC / TABACO

Pte	Edad	Sexo	Indice	CVF	VEF₁	VEF₁	VEF₁/CVF
No.	Años	F / M	Tab.	ML	mL	pp	%
1	44	f	35	4860	3170	115	65
2	60	f	60	3250	2060	106	63
3	50	f	16	4110	2290	102	56
4	65	m	52	1810	940	49	66
5	71	m	49	1500	870	23	45
6	68	m	47	1870	890	48	55
7	68	m	38	1340	480	26	35
8	81	m	48	1400	820	62	42
9	54	m	60	2500	680	32	35
10	67	m	42	3850	760	26	20
11	66	m	44	2880	980	37	34
X	63	3/8	48	2668	1267	56	44
DE ±	10		10	1216	848	34	16

X: promedio. DE: desviación estándar. CVF: capacidad vital forzada mL.

VEF₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

VEF₁ pp: volumen forzado en el primer segundo, expresado en porcentaje del predicho.

VEF₁ / CVF : relación del volumen forzado en 1 segundo con la capacidad vital forzada, expresado en porcentaje.

Indice tab: Indice tabáquico.

Tabla 6
Conteo Celular Y Diferencial Del LBA
EPOC / TABACO

Pte No.	VOL REC	CEL TOT	CEL mL	Macrófagos %	Linfocitos %	Neutrófilos %	Eosinófilos %
1	100	7.02	70.2	92	2	2	0
2	120	30.4	253.9	80	10	10	0
3	20	25.4	127.4	91	8	1	0
4	210	2.96	95.4	98	2	0	0
5	80	5.90	70.8	55	13	32	0
6	130	9.30	70.6	80	10	10	0
7	40	14.25	356.2	67	10	23	0
8	120	5.35	44.5	81	15	4	0
9	135	4.50	33.3	86	8	6	0
10	108	6.00	55.5	79	15	5	0
11	85	4.06	47.8	61	30	9	0
Me	120	6	70.6	80	10	6	0
Ext	40-210	2.9-30	33-356	55-98	2-30	0-32	0-1

Me: Mediana. Ext: Extremos. Vol Rec: Volumen recuperado en mL.

Cel TOT: Células Totales : 1×10^6 . Cel mL: Células por ml: 1×10^3

Tabla 7

CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS Y FUNCIONALES DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS

	HUMO DE LEÑA (N = 12)	TABAQUISMO (N = 11)	SANOS (N = 12)	P *
Edad en años	63 ± 4	63 ± 10	29 ± 7	0.00 †
Sexo M / F	12 / F	3 / F 8 / M	6 / F 6 / M	
Hrs / año	226 ± 122	—	—	
I.Tabáquico (p / a)	—	48 ± 10	—	
CVF ml	1498 ± 279	2668 ± 1218	3477 ± 437	0.00 †
VEF1 ml	922 ± 183	1267 ± 848	2967 ± 375	0.00 †
VEF1 % pp	55 ± 12	56 ± 34	93 ± 5	0.00 ‡
VEF1/CVF	62 ± 6	43 ± 16	85 ± 3	0.00 ‡

Datos expresados en promedio y desviación estándar

ANOVA: * P < 0.05

t - no pareada:

- † EPOC / HL Versus SANOS: p = 0.000
- ‡ EPOC / TA Versus SANOS: p = 0.001
- † EPOC / HL Versus SANOS: p = 0.000
- † EPOC / HL Versus EPOC / TA: p = 0.009
- * EPOC / HL Versus SANOS: p = 0.000
- * EPOC / TA Versus SANOS: p = 0.000
- ‡ EPOC / HL Versus SANOS: p = 0.000
- ‡ EPOC / TA Versus SANOS: p = 0.007
- * EPOC / HL Versus SANOS: p = 0.000
- * EPOC / TA Versus SANOS: p = 0.008
- * EPOC / HL Versus EPOC / TA: p = 0.004

Tabla 8
CUENTA TOTAL Y DIFERENCIAL DE CELULAS EN LBA
DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS

LAVADO BRONQUIOLO- ALVEOLAR	HUMO DE LEÑA (N=12) Mediana Extremos	TABAQUISMO (N=11) Mediana Extremos	SANOS (N=12) Mediana Extremos	*P
Vol Recuperado ml	197 (90-260)	120 (150-310)	224 (40-310)	0.04 †
Cuenta total 1×10^6	18.2 (1.1-60.1)	6 (2.9-30)	10.6 (5.4-17.7)	0.17
Células x ml 1×10^3	105.8 (12.7-231.1)	70.6 (33.3-356.2)	51.4 (24.3-81.3)	0.03 ✱
Macrófagos %	75 (61-98)	80 (55-98)	92 (82-97)	0.00 †
Linfocitos %	15 (1-27)	10 (2-30)	7 (3-17)	0.05 †
Neutrófilos %	4 (1-21)	6 (0-32)	0 (0-2)	0.00 †
Eosinófilos %	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0.86

U. Kruskal-Wallis: *P < 0.05.

U. Man-Whitney:

† EPOC / TA Versus SANOS: $p = 0.01$

✱ EPOC/HL Versus SANOS: $p = 0.030$

✱ EPOC/TA Versus SANOS: $p = 0.050$

† EPOC/HL Versus SANOS: $p = 0.044$

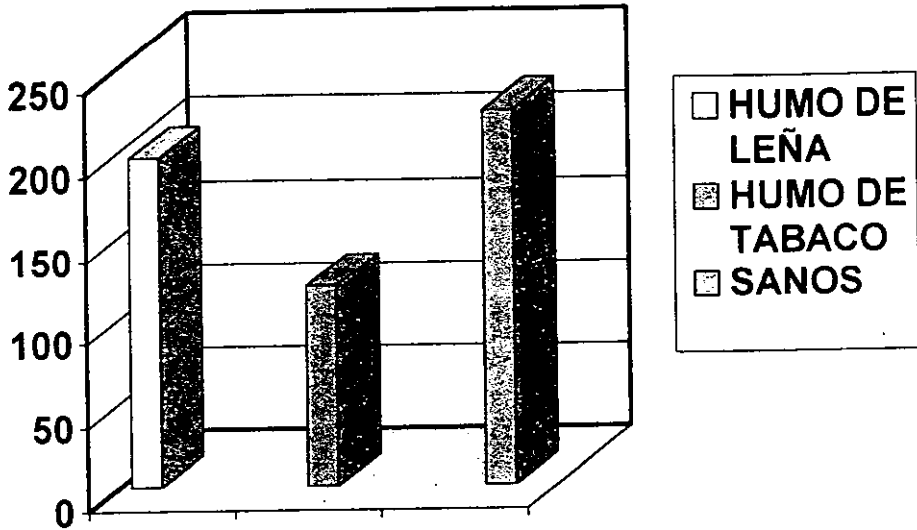
† EPOC/TA Versus SANOS: $p = 0.020$

† EPOC/HL Versus SANOS: $p = 0.010$

† EPOC/HL Versus SANOS: $p = 0.000$

† EPOC/TA Versus SANOS: $p = 0.000$

Figura 1
Volumen Recuperado mL



* Kruskal Wallis: $p = 0.04$

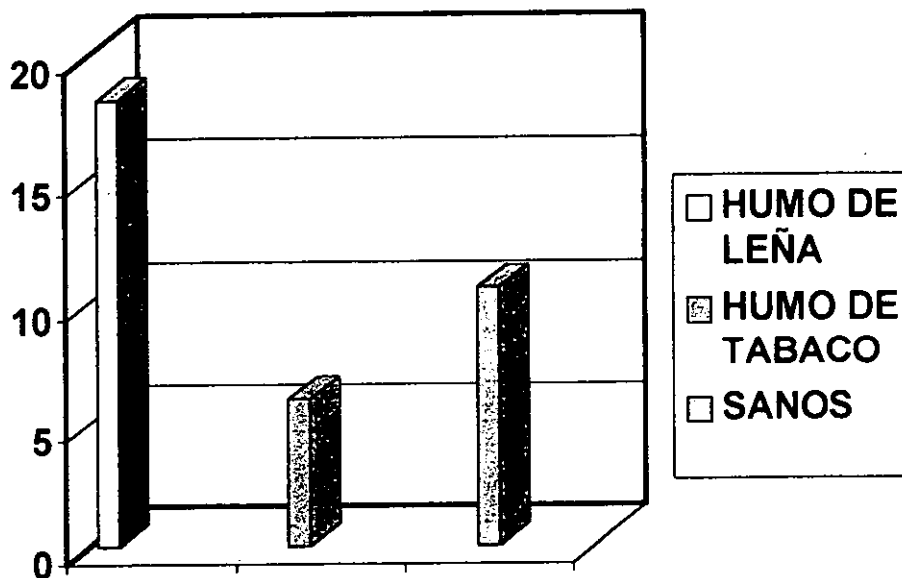
** U. Mann-Whitney.

** EPOC / TA Versus SA: $P < 0.01$

** EPOC / HL Versus SA: $p = ns$

** EPOC / HL Versus EPOC / TA: $p = ns$

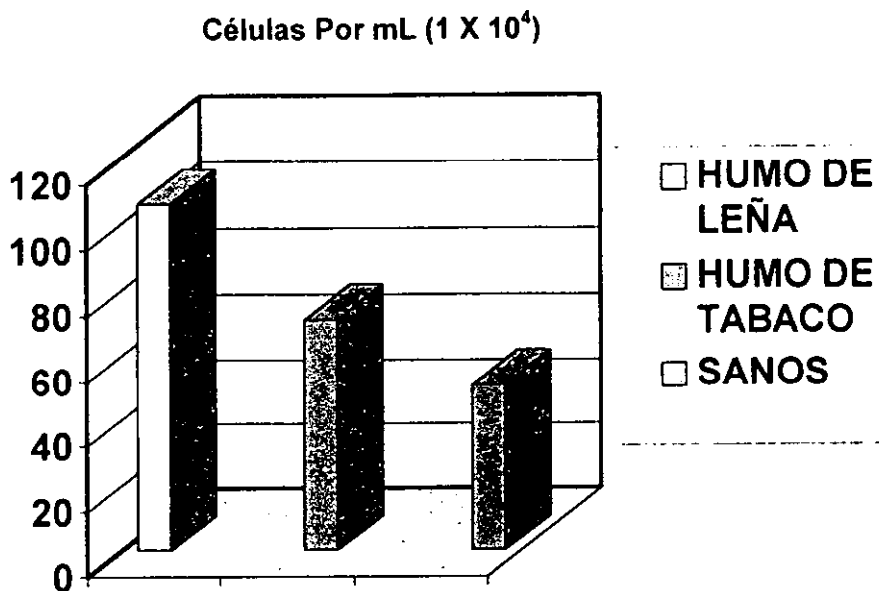
Figura 2
Células Totales (1×10^6)



Kruskall Wallis: $P > 0.05$

U. Mann-Whitney: ns

Figura 3



* Kruskal Wallis: $p = 0.01$

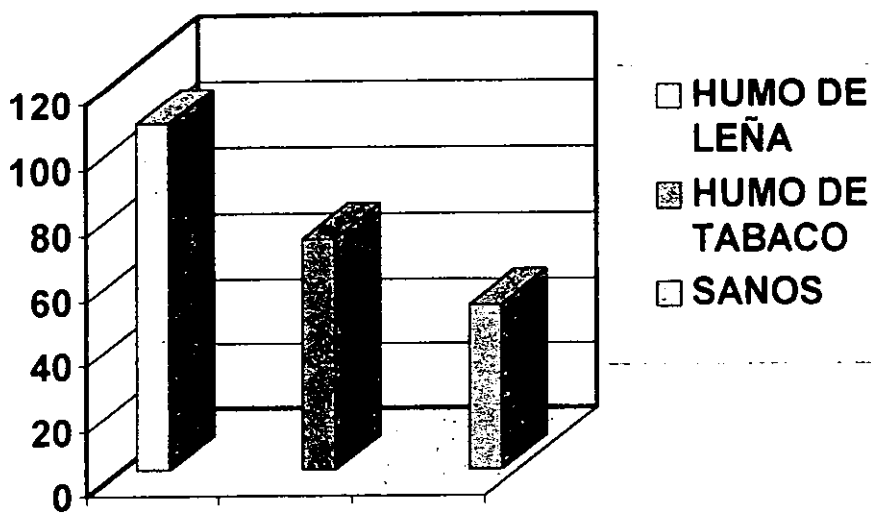
** U. Mann-Whitney.

** EPOC / HL Versus SA: $p = 0.03$

** EPOC / TA Versus SA: $p = 0.05$

** EPOC / HL Versus EPOC / TA: $p = n.s$

Figura 4
Porcentaje De Macrófagos En El LBA



* Kruskal Wallis: $p < 0.00$

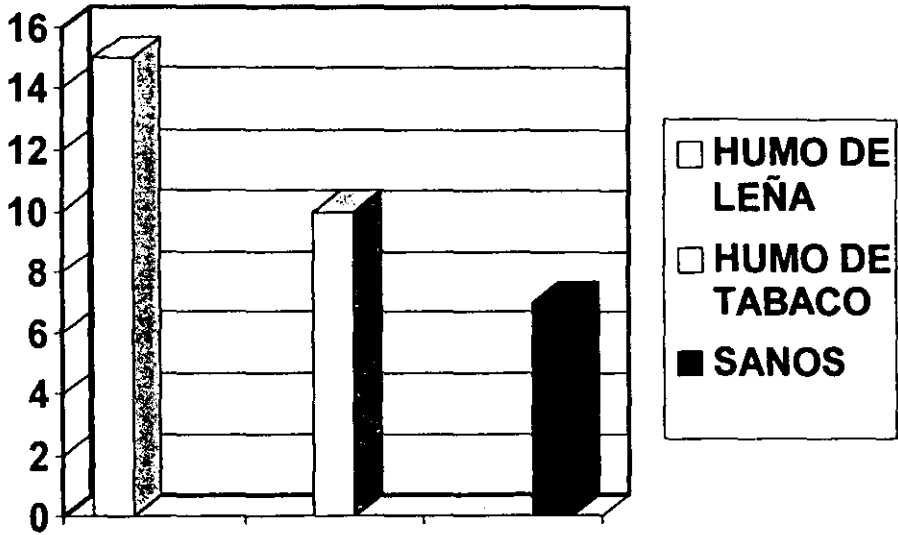
** U. Mann-Whitney:

** EPOC / HL Versus SA: $p = 0.04$

** EPOC / TA Versus SA: $p = 0.02$

** EPOC / HL Versus TA: $p = ns$

Figura 5
Porcentaje De Linfocitos En El LBA



* Kruskal Wallis: $p = 0.054$

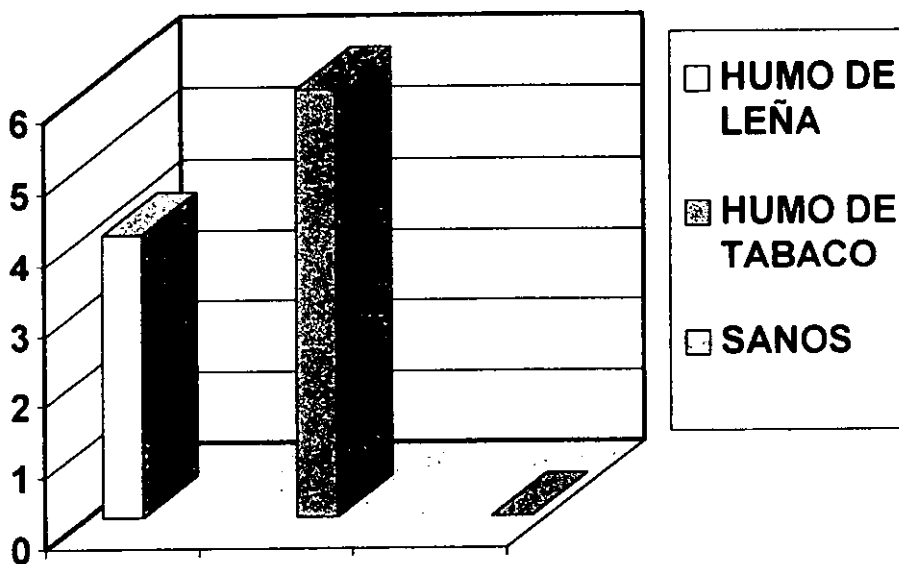
** U. Man-Whitney:

*** EPOC / HL Versus SA: $p = 0.01$

*** EPOC / TA Versus SA: $p = ns$

*** EPOC / HL Versus TA: $p = ns$

Figura 6
Porcentaje De Neutrófilos En El LBA



* Kruskal Wallis: $p = 0.000$

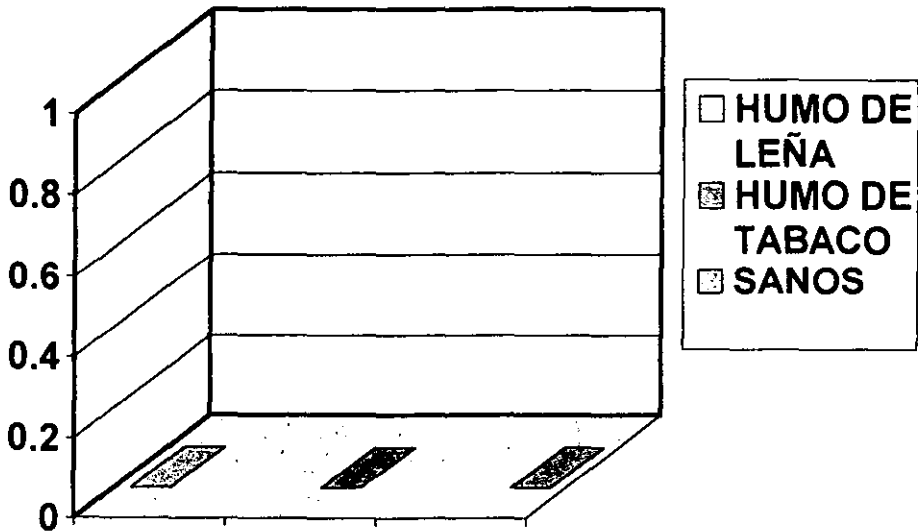
** U. Mann-Whitney

** EPOC / HL Versus SA: $p = 0.000$

** EPOC / TA Versus SA: $p = 0.000$

** EPOC / HL Versus EPOC / TA: $p = ns$

Figura 7
Porcentaje De Eosinófilos En El LBA



* Kruskal Wallis: $P = 1.00$

** U. Mann-Whitney: ns

DISCUSIÓN

Las enfermedades del aparato respiratorio asociadas a la exposición crónica al humo de leña han sido estudiadas desde diferentes puntos de vista (9,10,11,12,13,14,26,27,28). Los estudios epidemiológicos que han probado las relaciones que existen entre la limitación crónica del flujo de aire y la exposición al HL son probablemente los más importantes.

Sin embargo, poco se conoce de los mecanismos fisiopatológicos asociados a la obstrucción del flujo aéreo. Las alteraciones inflamatorias, el perfil y el conteo celular, en pacientes con EPOC por de Humo de Leña no se han estudiado, como se a hecho en los pacientes con EPOC por tabaquismo. En los fumadores que desarrollan EPOC, la celularidad observada en el LBA está aumentada 2 a 4 veces por arriba del valor de que se observa en controles normales (4,5,31,32,33,38). Tanto los macrófagos como los neutrófilos están aumentados y se les ha identificado una diversa cantidad de actividades funcionales (elastolítica, proteolítica, quimiotáctica, formación de radicales libres del oxígeno, desequilibrio en el comportamiento de las inmunoglobulinas, etcétera. (3,16,18,19,21,22,23,24,38)

En el presente estudio hemos postulado que la celularidad total y sus diferentes poblaciones en el LBA de pacientes con EPOC asociada a la exposición crónica del HL (EPOC/HL) es igual a la de los pacientes con EPOC asociado al tabaquismo (EPOC/TAB). Esta teoría, daría una explicación de los fenómenos que suceden en la vía aérea de pacientes con exposición al humo de leña y permitiría un análisis comparativo (entre tabaquismo y humo de leña) en el estudio de la inflamación asociada al fenómeno obstructivo en EPOC.

La EPOC asociada al tabaquismo, es un proceso crónico degenerativo cuya sintomatología aparece en forma florida en las fases tardías cuando el sujeto ya no es fumador. El mismo fenómeno se observa en EPOC/HL.

Generalmente, el paciente ya no tiene exposición al humo de leña y ésta exposición se convierte en un antecedente patológico, de la misma forma como ocurre en los fumadores que ya dejaron de fumar. En este sentido, los dos grupos de pacientes con EPOC, son en principio parecidos.

Cuando se hace un LBA, el volumen total de líquido recuperado guarda una relación directa con la severidad de la obstrucción del flujo aéreo, de modo que a menor VEF₁, menor cantidad recuperada de líquido. En los pacientes con EPOC/TAB, el porcentaje de líquido se ve afectado por varios factores. En principio, la lesión tanto del tejido pulmonar, como de la vía aérea se traduce en el colapso del árbol bronquial al aspirar el fluido del LBA.

De acuerdo a la literatura en éstos pacientes podría recuperarse de 30 al 40 % del líquido del LBA (39). Otro factor podría ser la severidad de la inflamación.

Debido a que tanto los pacientes con EPOC/HL como los pacientes con EPOC/TAB dejaron de exponerse muchos antes de buscar ayuda médica, es posible que la inflamación encontrada en estos pacientes ya no sea tan marcada como cuando están activamente expuestos a la agresión. En este sentido, nuestra población no fue significativamente diferente, ya que en los dos grupos de pacientes con EPOC, el VEF₁ y el tiempo que habían dejado de exponerse a la agresión fueron similares. Por lo tanto, el hecho de que el líquido que en promedio se recuperó de los pacientes con EPOC/HL y EPOC/TA (66 y 40 % aproximadamente), le da una razonable solidez a nuestros hallazgos. Sin embargo si hubo diferencia con EPOC/TA y los SANOS debido al daño pulmonar de los fumadores. En relación a EPOC/HL se observó una tendencia a recuperar mucho más volumen en las pacientes de humo de leña y no hubo diferencias en relación a los otros dos grupos. Esto probablemente debido a que 9 pacientes cursaban con bronquitis crónica y no presentaban enfisema, mientras que en los pacientes EPOC/TAB, ocho tenían enfisema y es posible que en la pérdida de la fuerza de retracción elástica el colapso sea más acentuado.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos con respecto al número total de células recuperadas. Esto seguramente se debió a que en los sujetos sanos se recuperó significativamente mayor cantidad de líquido que en los pacientes con EPOC. Sin embargo, cuando se utiliza como denominador la cantidad de líquido que se recuperó (células / mililitro) entonces, en los sujetos sanos se observó una cantidad significativamente menor de células que cualquiera de los dos grupos con EPOC, es decir, los dos grupos de pacientes con EPOC presentaron grados variables en el incremento de las células inflamatorias que fue significativo con respecto al grupo control. Estos resultados señalan que a pesar de ya no estar en contacto con el humo de leña, de alguna forma que no podemos explicar, porque la celularidad quedó crónicamente aumentada, como ocurre en los fumadores, que aunque dejan de fumar la celularidad queda aumentada y ésto, aún no se sabe porque razón sucede. Los resultados muestran que independientemente de la cantidad de líquido recuperado, la cantidad total de células está elevada en relación al grupo de sujetos sanos. Este incremento de la celularidad no es significativamente diferente entre los dos grupos de pacientes con EPOC. Con respecto a las diferentes poblaciones celulares presentes en el LBA se encontró que los pacientes con EPOC (tanto asociado a tabaquismo como a HL) tienen un porcentaje significativamente menor de macrófagos en comparación al grupo de sujetos sanos. Sin embargo, no hay diferencias entre los pacientes con EPOC/TAB y los pacientes con EPOC/HL.

Los macrófagos son células funcionalmente muy activas. Estimulan el proceso inflamatorio por medio de la liberación de interleucinas (ILs), factor de necrosis tumoral, interferón gama, entre otros productos, que a su vez promueven la inflamación a través de quimiotaxis de linfocitos y polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos) (40). Además en forma individual pueden contribuir al daño tisular a través de moléculas activas (radicales de oxígeno, enzimas elastolíticas, proteolíticas, etc) que pueden desempeñar un papel importante en la enfermedad.

Es posible que el humo de leña origine la activación de los macrófagos de la misma manera como ocurre con el humo del cigarro y su efecto consecuente sea la liberación de moléculas quimiotácticas y de esta manera generar el desequilibrio celular que se observa en EPOC. Nuestros resultados señalan que esto es posible puesto que existen similitudes en la población celular.

Con respecto a la población de los linfocitos, en los grupos de pacientes con EPOC/HL y Sanos si hubo significancia estadística de estas células. No se encontro diferencias significativas entre el grupo de sujetos sanos y el grupo de pacientes con EPOC secundario a tabaquismo, así como tampoco entre éstos y el grupo de pacientes con EPOC/HL. La razón por la que en los pacientes con EPOC/HL hayamos encontrado un porcentaje significativamente mayor de linfocitos podría deberse a que en 6 pacientes de este grupo se observó una cantidad de linfocitos, que es mayor del 15%. Esta linfocitosis podría tener un significado patológico adicional (33,41). En la vía aérea los linfocitos son la primera línea celular de defensa (3) y en los alvéolos la segunda (29,30,33,39,40,42,43,44). Actualmente se postula que estas células participan activamente en el desarrollo de la EPOC por un lado por ser el tipo celular prevalente en toda la vía aérea y en segundo lugar por la interrelación que guardan con el sistema inmune de la mucosa (3,15,43,44). El incremento de los linfocitos podría ser secundario al estímulo de las interleucina liberadas por los macrófagos alveolares.

El incremento de los linfocitos a nivel alveolar podría dar lugar a un desequilibrio entre los linfocitos CD4+/CD8+ perpetuando la inflamación y daño tanto a la vía aérea como al tejido pulmonar. De esta forma, en la vía aérea la activación celular puede ser directamente provocada por el humo de leña como se ha descrito que lo produce el tabaco (3,6,).

La linfocitosis podrían también ser causada por una infección viral. Aunque en estos pacientes no se realizaron cultivos para la detección de virus si se hicieron para bacterias y todos fueron negativos. Además, no se registraron alteraciones en la celularidad periférica como se demostró en los estudios hematológicos que se hicieron. Además, ninguno de los pacientes presentaba al momento del estudio datos compatibles con una infección bronquial, de acuerdo a nuestros criterios de inclusión.

Otra posibilidad es que hayan cursado con un proceso viral subclínico, aunque esta es una posibilidad que remotamente ocurriría exclusivamente en 6 de las 12 pacientes con EPOC asociada a la exposición crónica al humo de leña. No sabemos con exactitud porque sucede este fenómeno en nuestros pacientes.

Sin embargo, debido a que estas células pueden ser las responsables de cuando menos, parte de los cambios inflamatorios que se observan en la vía aérea en los pacientes con bronquitis crónica asociada al consumo de tabaco, esta mayor prevalencia de linfocitos en la vía aérea podría explicar el mayor compromiso de la vía aérea que se observa en los pacientes con EPOC asociado a la humo de leña (3,43,44). La hipótesis de la participación de los linfocitos como células mediadoras de la respuesta inflamatoria en estos pacientes requiere sin duda de más investigación.

Los neutrófilos son células que han sido tradicionalmente asociadas a EPOC y bronquitis crónica. Particularmente se les ha involucrado con el daño proteolítico que caracteriza al enfisema pulmonar que se observa en los pulmonares.

Nuestra hipótesis postula que si el HL es capaz de provocar cambios funcionales compatibles con EPOC, entonces los neutrófilos en el LBA debían encontrarse como en los pacientes con EPOC por tabaquismo. Los resultados mostraron que efectivamente estas células están elevadas y que no hay diferencia con el grupo de tabaco pero si con el grupo de los sanos como lo esperábamos. Este resultado sugiere que al menos parcialmente hemos obtenido evidencia de que los neutrófilos están directamente involucrados en la fisiopatología de estos enfermos, y consideramos que los fenómenos de secuestro de los neutrófilos de la microvasculatura pulmonar (18,19,20,22,23,24,37) podrían ocurrir de igual manera como en las otras patologías pulmonares en donde estas células tienen un papel muy importante.

Este hallazgo no es concluyente ya que la inflamación en el árbol respiratorio es un fenómeno muy complejo en el que participan muchas moléculas que favorecen la migración de los neutrófilos así como otras que aumentan el periodo de vida media favoreciendo que estas células tengan su efecto local. Todas ellas podrían ocasionar cierto daño a la vía aérea y la presencia de los neutrófilos ser un epifenómeno. Los estudios en relación a los neutrófilos y su actividad se han realizado también cuando los sujetos fuman, y se ha observado que en ese momento son reclutados (18,19,20,23,24).

Sin embargo, llama la atención que a pesar de que los sujetos ya no estén expuesto al humo del cigarrillo estas células permanecen aumentadas, y aunque no se sabe aún cual es el mecanismo exacto que explique este fenómeno. sin duda es el mismo para los pacientes que se expusieron al humo de leña y ya no lo están.

CONCLUSIONES

Con respecto al lavado bronquioloalveolar, los pacientes con EPOC asociada a la exposición crónica del humo de leña presentan las siguientes características:

- La cantidad de líquido que se recupera del lavado no es significativamente diferente de la que se recupera de los pacientes con EPOC/TAB, pero significativamente menor que la que se recupera en los sujetos normales.
- La cantidad total de células (expresadas en 1×10^4 células/ml), el porcentaje de macrófagos y el porcentaje de neutrófilos que se recuperan del LBA no son significativamente diferentes de los que recuperan de los pacientes con EPOC asociado al consumo de tabaco, sin embargo son significativamente mayores que lo que recupera de los sujetos sanos.
- El porcentaje de linfocitos no es significativamente diferente del porcentaje de linfocitos observados en los pacientes con EPOC/TAB, pero sí lo es de los sujetos normales
- Estos resultados sugieren que los mecanismos celulares que median la inflamación y posiblemente los de la limitación del flujo aéreo en los pacientes con EPOC/HL son probablemente similares a los que ocurren en los pacientes con EPOC/TAB.

APÉNDICE

Espirómetro: spirometric, INC. CDM / PC - Flow.

Microscopio de luz convencional. Cuarto de Cultivo, Campana de flujo laminar, micropipetas de 10, 100, 1000 μ l., probetas de 100 ml, matraz Erlenmeyer de 250 ml, jeringas de 50 ml y llaves de 3 vías estériles.

Cámara de Neubauer, tanque de Nitrógeno líquido, refrigerador y congelador REVCO, Embudos de cristal, papel Parafilm, guantes estériles, cubrebocas, alcohol etílico al 70%, jabón desinfectante.

Reactivos de tinción: Wright - Giemsa, Papanicolaou y Azul de tripano, Carbowax, PBS (Buffer de fosfatos salino, pH 7.3 estéril).

Atropina ampula de 2 mg/1ml. Solución fisiológica al 0.9 %, Xilocaína al 2 % (con epinefrina y simple) en solución y spray, torundas de algodón.

Suero Fetal Bovino certificado estéril, Dimetil - sulfóxido, Tubos para centrifuga de 50 ml de polipropileno estériles, Criotubos estériles, Gasas estériles, pipetas estériles 10, 5, y 1 ml, COSTAR, portaobjetos.

INDICE TABAQUICO: (I.T).

Cigarros fumados al día X No. de años de fumar / 20

Factor de Riesgo: > 10 paquetes año.

FACTOR DE EXPOSICION AL HUMO DE LEÑA:

Horas expuestas al día X Años de haber Cocinado

Factor de Riesgo: > 200 Hrs / año.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Standard for the Diagnosis and Care of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am. J. Crit. Care Med. 1995 ; 152 : S 77 - S 120.
- 2.- Murray, J., Et Al: Textbook Of Respiratory Medicine. 2nd Edition. W.B. Saunders. 1994, 1259-1287.
- 3.- Olivieri, D. Immunological Defenses in Airways. Enviromental Impact on the Airways. Chapter 3; 43-69; 299-340.
- 4.- Hunninghake, W.G., et al.: Inflammatory and Immune Processes in the Human Lung in Health and Disease: Evaluation by Bronchioloalveolar Lavage. American Association of Pathologists. 1979 ; 97, (1) : 149-154.
- 5.- Costabel, U. Bronchoalveolar Lavage : a Satandardized procedure or a Techincal Dilemma ?. Eur Respir J. 1991 ; 4 : 776-779.
- 6.- Doerschuk, C.M. Trafficking of Inflammatory Cells. Postgraduate Course 14, Cells of the Lung. American Thoracic Society. 1998 : 1-9
- 7.- Fishman, A., et al.: Pulmonary Diseases. Ed. Interamericana. 2a Edition.1992; II : 1159-1272.
- 8.- Paré, P.D., et al.: Enfermedades del Tórax. 1996 ; 2a. Edición en Español. Editorial. Marban, S.L. Cap. 11. 653-675.
- 9.-Pandey, R. M. Domestic Smoke Pollution and Chronic bronchitis in and Rural Community of the Hill Region of Nepal. Thorax 1984 ; 39 : 337 - 339.
- 10.- Pérez, P. R. et al.: Exposure to Biomass Smoke and Chronic Airway Disease in Mexican Women. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996 ; 154 : 701 - 706.
- 11.-Dennis, J. R. et al.: Woodsmoke Exposure and Risk for Obstructive Airways Disease Among Women. CHEST/109 /1/ January, 1996. 115 - 119.
- 12.- Turhill, R. W. Woodstoves, formaldehyde, and respiratory disease. J Epidemiology. 1984; 120: 952-5.

- 13.- He, XZ. Chen. W. Liu ZY. Chapman RS. An epidemiological study of lung cancer in Xuan Wei Country, China: current progress. Case control study on lung cancer and cooking fuel. *Environmental Health Perspectives*. 1991 ; 94: 9-13.
- 14 - Perez, P. R. Chronic Bronchitis Associated With Domestic Inhalation Of Wood Smoke In México: Clinical, Functional And Pathologic Description. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: A 63
- 15.-Alveolar Macrophages as Mediators of Inflammatory Lung Diseases. Postgraduate Course 14, Cells of the Lung. American Thoracic Society. 1998 : 1-8.
- 16.- Gadek, J.E. Adverse effects of neutrophils on the lung. *American Journal of Medicine*. 1992 ; 92: 27S-31S.
- 17.-Postma, D.S. Association between Nonspecific Bronchial Hyperreactivity and Superoxide Anion Production by Polymorphonuclear Leucocytes in Chronic Air-Flow Obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1988 ; 137 : 57-61.
- 18.- MacNee, W. The effect of Cigarette smoking on Neutrophil Kinetics in Human Lungs. *The New England Journal of Medicine*. 1989 ; 321 : 924-928.
- 19.- Selby, C. Neutrophil Retention in the Lungs of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am Rev Respir Dis*. 1991 ; 143 : 1359-1364.
- 20.- Brown, D.M. Deformability and CD11/CD18 Expression of Sequestered Neutrophils in Normal and Inflamed Lungs. *Am J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 1995 ; 13 : 531-539.
- 21.-Kazzaz, J.A. Cellular Oxygen Toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996 ; 271 : 15182-15186.
- 22.- Root, R. K. The Two Faced Neutrophil: Host Defense Versus Tissues Injury. Part I: Host-Pathogen Interactions in Pulmonary Infections. *American Lung Association*. 1997. 21-37.
- 23.-Hogg, J.C. Leucocyte Traffic in the Lung. *Annu Rev. Physiol*. 1995 ; 57 : 97-114.
- 24.- Brantly, M. Alveolar Neutrophils as Mediators of Tissue Destruction. Postgraduate Course 14, Cells of the Lung. American Thoracic Society. 1998 : 1-7.

- 25.- Sansores, M. R., Et Al: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. Un Problema Mundial Un Enfoque En México. Edit. Piensa S.A De C.V. 1997: 29-36.
- 26.- Regalado, P. J. Alteraciones Citológicas en la expectoración de pacientes con bronquitis crónica asociada al tabaquismo y a la inhalación del humo de leña. Tesis de Graduación. 1994. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 27.- 13.- Morán, A O. Neumopatía asociada a la inhalación de humo de leña. Descripción clínica, funcional, radiológica y patológica. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas. PUIS. UNAM. México, 1992.
- 28.- Sandoval, J. Pulmonary Arterial Hypertension and Cor Pulmonale Associated with Domestic Wood Smoke Inhalation. Chest 1993., 103 (1) : 12.
- 29.- Reynolds, H. State of Art Bronchoalveolar Lavage. Am Rev Respir Dis. 1987; 135: 250-263.
- 30.-The BAL Cooperative Group Steering Committee. Bronchoalveolar Lavage Constituents in Healthy Individuals, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, and Selected comparison groups. Am Rev Respir Dis. 1990; 141: S 169-S 199.
- 31.- Martin, T. R: The Effect of Chronic Bronchitis and Chronic Air-Flow Obstruccion on Lung Cell Population Recovered by Bronchoalveolar Lavage. Am rev Respir Dis. 1985 ; 132 : 254-260.
- 32.- Kirby, J. G. Bronchoalveolar Cell Profiles of Asmathic and Nonasmathic Subjet. Am Rev Respir Dis. 1987 ; 136 : 379-383.
- 33.- Gerald, S. D. Analyses of Sequential Bronchoalveoloar Lavage Samples from Healthy Human Volunteers. Am Rev Respir Dis. 1982; 126: 611-616.
- 34.- Laviolette, M. Bronchoalveolar Lavage Cell Differential on Microscope Glass Cover. Am Rev Respir Dis. 1988 ; 138 : 451-457.
- 35.- Moumouni, H. Quantification of Cell Loss during Bronchoalveolar Lavage Fluid Procesing. Am Rev Respir Dis. 1994 ; 149 : 636-40.
- 36.- American Thoracic Society. Standadization Of Spirometry . Am Respir Crit Care Med 152; 3: 1107-1136
- 37.-Gerdt , C. Bronchial inflamation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. Thorax 1995; 50: 360-365.

- 38.- Linden, M. Airway Inflammation in Smoker whit Non obstructive and obstructive Cronic Bronchitis. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148:1226-1232.
- 39.- Klech, H. Clinical Guidlines and Indications for bronchoalveolar lavage (BAL) : Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J.* 1990 ; 3 :937-974.
- 40.- Kelly, J. Citokines Of The Lung. Edi Marcel Dekker. 1993 Pat II: Proinflammatory Citokines.
- 41.-Merchant, R. K. Bronchoalveolar lavage Cellularity. The distribution in normal Volunteers. *Am Rev Respir Dis.* 1992 ; 146 : 448-453.
- 42.- Sutinen, S. Alveolar Lavage Fluid (ALF) of Normal Volunteer Subjets : Cylologic, Immunocytochemical, and Biochemical Reference Values. *Respiratory Medicine.* 1995 ; 89 : 85-92.
- 43.- Curtis, J.L. Roles of Alveolar Lynphocytos in Inflammatory Lung Diseases. Poatgraduate Course 14, Cells of the Lung. American Thoracic Society. 1998: 1-8
- 44.-Saetta, M. Activated T- Lymphocytes and Macrophages in Bronchial Mucosa of Subjets with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993 ; 147 : 301-306