



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O. D.

**EXPRESIÓN DEL FACTOR TRANSFORMADOR DE CRECIMIENTO β 1 EN 66
CASOS DE ENFERMEDADES INTERSTICIALES DIFUSAS PULMONARES, EN
EL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O. D., DURANTE 1999 A 2003**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

PRESENTA:

DR. HIRIAN ALONSO MOSHE BARRERA PÉREZ



TUTORA DE TESIS: *DRA. MARÍA VIRGILIA SOTO ABRAHAM*

MÉXICO, D. F.

JUNIO/2009



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.

DEDICATORIA

A mi madre

Por su cariño infinito, ánimo y comprensión

A mis hermanos

Rommel y José, por el eterno apoyo que me han dado

A mis abuelitos

Adda, Olayo, Nelly y Alonso, por la experiencia que de ellos he aprendido

A mis primos

Fernando, Israel, Ignacio, por enseñarme a reír

A mis primas

Betty y Lydia, por la alegría de vivir

A Claudia y a Julio

Por enseñarme a creer en la amistad y en el amor

A París y a Fernando

Por su amistad y apoyo en momentos difíciles, y también en momentos alegres

A Karla, Humberto y Miguel Ángel

Por todos los momentos que compartimos juntos y por ser como han sido conmigo.

A la Dra. Virgilia Soto Abraham

Por enseñarme a emplear el orden, la constancia, la dedicación y el esfuerzo en todo lo que
emprenda.

ÍNDICE

	Pág.	
i	Abreviaturas	1
ii	Índice de tablas	2
iii	Índice de figuras	3
iv	Resumen	4
1.	ANTECEDENTES	5
2.	JUSTIFICACIÓN	21
3.	OBJETIVO	22
4.	CASOS, MATERIAL Y MÉTODOS	23
4.1.	Diseño del estudio	23
4.2.	Universo de trabajo	23
4.3.	Descripción de las variables	23
4.4.	Selección de la muestra	24
4.4.1.	Criterios de selección	24
4.4.1.1.	Criterios de inclusión	24
4.4.1.2.	Criterios de no inclusión	24
4.4.1.3.	Criterios de eliminación	24
4.5.	Procedimientos	25
4.6.	Morfometría	26
4.7.	Estudios de inmunohistoquímica	27
4.8.	Consideraciones éticas	28
4.9.	Análisis estadísticos	29
5.	RESULTADOS	30
6.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	35
7.	BIBLIOGRAFÍA	36

i. ABREVIATURAS

NIJ: neumonías intersticiales idiopáticas

FPI: Fibrosis pulmonar idiopática

NINE: Neumonía intersticial no específica

NOC: Neumonía organizada criptogénica

NIA: Neumonía intersticial aguda

BR-EIP: Bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial pulmonar

NID: Neumonía intersticial descamativa

NIL: Neumonía intersticial linfoide

TAC: Tomografía axial computarizada

RMN: Resonancia magnética nuclear

EIPD: Enfermedades intersticiales difusas del pulmón

FCV: Volumen máximo espirado o capacidad vital forzada

FVE1: Espiración forzada

TLC: Capacidad pulmonar total

DLCO: Difusión de monóxido de carbono en respiración única

Ig: Inmunoglobulina

LBA: Lavado bronquioloalveolar

TGF- β 1: Factor transformador de crecimiento β 1

FNT: Factor de necrosis tumoral

IL: Interleucinas

KDa: KiloDaltons

Rb: Retinoblastoma

CDC: Cinasas dependientes de ciclinas

HAP: Hipertensión arterial pulmonar

ii. ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Características demográficas de 66 casos de enfermedades intersticiales difusas pulmonares	30
Tabla 2: Tipo de enfermedad intersticial difusa pulmonar	31
Tabla 3: Grado de hipertensión pulmonar	31
Tabla 4: Características clínicas	32
Tabla 5: Características radiológicas	33
Tabla 6: Pruebas funcionales respiratorias	33

iii. ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1:	Muestra de pulmón teñida con tricrómico de Masson (10X) para evaluar la fibrosis. 25
Fig. 2:	Fotomicrografía de una muestra de tejido con fibrosis, teñido con tricrómico de Masson (10X) con fibrosis (azul), digitalizado y medido a través del analizador de imágenes en unidades píxel (amarillo). 27
Fig. 3:	Corte histológico de una muestra de pulmón con fibrosis marcada con TGFβ-1 (10X) en la que se seleccionó el color café de la inmunohistoquímica para obtener una medición en unidades píxel y en porcentaje de área con positividad para el anticuerpo. 28
Fig. 4:	Muestras de pulmón teñida con tricrómico de Masson (40X) para evaluar la hipertensión pulmonar 31
Fig. 5:	Relación entre el porcentaje de fibrosis pulmonar y la expresión del TGF-β1. 34
Fig. 6:	Coefficiente de correlación con el método de Pearson $r= 1.00$ con un nivel de $p= 0.01$ entre el porcentaje de fibrosis intersticial dado por morfometría y el grado de expresión del TGF-β1. 34

iv. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El intersticio pulmonar puede verse afectado por una serie de enfermedades y afecciones que originan daño por inflamación y fibrosis, éstas se presentan con mayor frecuencia entre los decenios 3° y 4° de la vida y son causa importante de morbilidad pulmonar. El diagnóstico se realiza mediante correlación clínico-radio-patológica y en la fisiopatogenia de la fibrosis están incluidos diversos mediadores proinflamatorios entre los que destaca el factor transformador de crecimiento $\beta 1$ cuya función es incrementar, en los fibroblastos, la síntesis de colágeno, aumentar la producción de proteínas de tejido conectivo e inducir la secreción de inhibidores de proteasas, entre otras funciones. El resultado final desemboca en la fibrosis pulmonar.

OBJETIVO: Conocer la frecuencia de las diferentes neumopatías intersticiales y demostrar que en la fibrosis intersticial pulmonar hay expresión de TGF- $\beta 1$, mediante reacción de inmunohistoquímica realizada en biopsias pulmonares de pacientes del Hospital General de México, O. D., con diagnóstico patológico confirmado de enfermedades intersticiales difusas.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se efectuó un estudio transversal descriptivo con todos los casos de enfermedades pulmonares difusas, con biopsia pulmonar confirmatoria, del periodo de 1999 a 2003. Se utilizó un corte de tejido fijado en formalina al 10% e incluido en parafina, de 2 micras de espesor. A través de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta convencional se marcaron las zonas que expresaron positividad para TGF- $\beta 1$. Esta positividad fue medida a través de un analizador de imágenes con el que se obtuvo un promedio de 10 campos no cruzados de pulmón a 100 aumentos.

RESULTADOS: Se analizaron 66 casos cuya edad promedio fue de 52.51 años (77.27 % mujeres), el 89.39 % correspondió a neumonía intersticial usual. Todos manifestaron hipertensión pulmonar con grados 3 (36.36 %) y 2 (25.75 %) como los más frecuentes; la disnea grave se manifestó en el 46.96 %. Radiológicamente predominaron los patrones nodular y reticular en el 86.36 % y en las pruebas funcionales respiratorias el 54.54 % presentó resultados normales seguido por el 19.69 % con afección muy importante. Finalmente, la correlación entre fibrosis intersticial obtenida por análisis morfométrico y la expresión del TGF- $\beta 1$ medida para cada caso, se analizó con el método de Pearson $r=1.00$ con un nivel de $p= 0.01$ y fue casi perfecta.

CONCLUSIONES: La NII más frecuente es la NIU, la relación hombre-mujer fue de 1:4, probablemente debido a la instalación más rápida de la enfermedad en aquellos. Todos los pacientes manifestaron hipertensión pulmonar, quizá relacionado con el momento de la referencia. No hay una relación entre la HAP y las pruebas funcionales respiratorias y la correlación entre el porcentaje de fibrosis y la expresión del TGF-B1, es prácticamente perfecta, lo que refleja la relación entre los mecanismos inflamatorios y profibróticos con esta molécula.

1. ANTECEDENTES.

1.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

El intersticio pulmonar puede verse afectado por una serie de causas y enfermedades que desencadenan una serie de eventos de daño inflamatorio y de fibrosis. Las enfermedades intersticiales difusas del pulmón suelen afectar a la población comprendida entre los 50 a los 70 años ⁽¹⁾. Se estima que la prevalencia en los estados unidos es de al menos 10 casos por 100,000 habitantes ⁽²⁾.

Hamman y Rich en 1945 fueron los primeros en describir 4 casos de Fibrosis pulmonar idiopática con *cor pulmonale* y evolución fatal a corto plazo ⁽³⁾. Debido a la confusión y al uso de los diferentes términos a veces para una misma entidad, en 2001 se realizó un consenso multidisciplinario entre la Sociedad Americana de Tórax y la Sociedad Europea Respiratoria. Los principales objetivos de dicha reunión fueron estandarizar la clasificación de las Neumonías intersticiales idiopáticas (NII), y unificar criterios para el diagnóstico de las mismas ⁽²⁾. Esta clasificación incluye siete entidades clínico-radiológico-patológicas: 1) Fibrosis pulmonar idiopática (FPI) o Neumonía intersticial usual (NIU), 2) Neumonía intersticial no específica (NINE), 3) Neumonía organizada criptogénica (NOC), 4) Neumonía intersticial aguda (NIA), 5) Bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial pulmonar (BR-EIP), 6) Neumonía intersticial descamativa (NID) y 7) Neumonía intersticial linfoide (NIL).

1.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PATRONES HISTOLÓGICOS

1.2.1. NEUMONÍA INTERSTICIAL USUAL

Los hallazgos histológicos son destrucción de la arquitectura, fibrosis en 'panal de abeja', focos de fibroblastos diseminados, distribución en parches, afección periférica del acino; las lesiones son heterogéneas y alternan áreas de pulmón normal con áreas de inflamación, fibrosis y panales de abeja; hay daño subpleural muy importante. La

inflamación intersticial es leve o moderada y está constituida por linfocitos, células plasmáticas e histiocitos, puede observarse además, hiperplasia de neumocitos tipo II mientras que las zonas fibrosadas muestran heterogeneidad temporal con depósito denso de colágena y focos de fibroblastos diseminados. En casos donde se toman dos o más biopsias de sitios diferentes, es factible encontrar otro patrón histológico como el de NINE (2, 4, 5, 6).

1.2.2. NEUMONÍA INTERSTICIAL NO ESPECÍFICA

El patrón incluye un amplio espectro de hallazgos histológicos con grados variables de inflamación en la pared alveolar o fibrosis. El patrón celular consiste en inflamación intersticial crónica de leve a moderada, generalmente con linfocitos y algunas células plasmáticas, las lesiones generalmente se dan en 'parches'. El patrón fibrosante consiste de fibrosis intersticial densa o laxa en grados variables y el tejido conectivo es temporalmente homogéneo, hay ausencia de focos de fibroblastos. En algunos casos, la distribución es en parches causando remodelación de la arquitectura pulmonar; en otros, es más difuso con preservación de la arquitectura alveolar, pero el intersticio septal alveolar está engrosado por fibrosis densa. Algunas biopsias pueden mostrar patrones mixtos, celulares y fibrosantes (7, 8, 9).

1.2.3. NEUMONÍA ORGANIZADA CRIPTOGÉNICA

El patrón histológico es un proceso en parches caracterizado primariamente por neumonía organizada que afecta ductos alveolares y alvéolos con o sin pólipos intraluminales. El tejido conectivo es cronológicamente homogéneo y la mayoría de los cambios se centran en las vías aéreas pequeñas, existe infiltrado inflamatorio intersticial leve, metaplasia de neumocitos tipo II, incremento en el número de macrófagos alveolares con citoplasma espumoso y también se puede encontrar una pequeña cantidad de fibrina en el espacio aéreo y existe preservación relativa de la arquitectura pulmonar (10, 11, 12, 13, 14).

1.2.4. NEUMONÍA INTERSTICIAL AGUDA

Las biopsias pulmonares muestran hallazgos histológicos de las fases agudas y de organización del daño alveolar difuso. Típicamente muestran afección difusa aunque puede haber variación en la gravedad de los cambios entre diferentes campos histológicos. La fase exudativa muestra edema, membranas hialinas, inflamación intersticial aguda; la fase de organización muestra fibrosis organizada, principalmente dentro de los septos alveolares e hiperplasia de neumocitos tipo II. Los trombos son comunes en las arteriolas pulmonares de pequeño y mediano calibre (15, 16, 17).

1.2.5. BRONQUIOLITIS RESPIRATORIA ASOCIADA A ENFERMEDAD INTERSTICIAL PULMONAR

En la bronquiolitis respiratoria los cambios consisten en parches y tienen una distribución bronquiolocéntrica. Los bronquiolos respiratorios, ductos alveolares y los espacios alveolares peribronquiolares contienen cúmulos de macrófagos con pigmento de color café. Los macrófagos intraluminales están acompañados por un infiltrado en parches de linfocitos e histiocitos en la submucosa y en el área peribronquiolar. También puede observarse leve fibrosis peribronquiolar que expande los septos alveolares contiguos con hiperplasia de neumocitos tipo II. Es frecuente encontrar enfisema centrolobulillar (18, 19, 20, 21).

1.2.6. NEUMONÍA INTERSTICIAL DESCAMATIVA

El patrón histológico está caracterizado por afección difusa con cúmulos de numerosos macrófagos en los espacios aéreos distales, los septos alveolares se encuentran engrosados por infiltrado inflamatorio de células plasmáticas y algunos eosinófilos además de hiperplasia de neumocitos tipo II y agregados linfoides. Los principales hallazgos que distinguen a la NID de la bronquiolitis respiratoria es que la primera afecta al pulmón de una manera difusa y uniforme y hay ausencia de distribución bronquiolocéntrica. Los macrófagos intraluminales con pigmento café son idénticos en ambos patrones histológicos y también es frecuente encontrar enfisema (18, 19, 22).

1.2.7. NEUMONÍA INTERSTICIAL LINFOIDE

Se define histológicamente como un denso infiltrado intersticial linfoide asociado a hiperplasia de células tipo II y un leve incremento en el número de macrófagos alveolares. Los septos alveolares pueden estar extensamente infiltrados en donde resaltan folículos linfoides y algunos con centros germinales, generalmente de distribución en los linfáticos pulmonares. Puede encontrarse distorsión de la arquitectura, incluyendo panal de abeja y granulomas no necrosantes (2, 4, 23, 24).

1.3. ASPECTOS CLÍNICOS.

Las neumonías intersticiales se pueden presentar a cualquier edad pero es más frecuente el inicio de los síntomas entre el 3° y 4° decenio de la vida, a excepción de la FPI que se presenta en sujetos mayores de 50 años; en cuanto al sexo, para la BR-EIP y NID predominan los hombres 2:1 en relación a las mujeres, en NIL predomina el sexo femenino, mientras que la FPI se presenta más frecuentemente en los hombres, en NINE, NOC y NIA no existe un predominio de sexo. Los pacientes con BR-EIP y con NID tienen una fuerte relación con el tabaquismo, en NOC existe una relación entre no fumadores/fumadores de 2:1, mientras que los pacientes con FPI, NINE, NIA, NIL no tienen relación con el tabaco.

Las principales manifestaciones suelen ser disnea de esfuerzo y tos seca o con expectoración mucosa escasa. Algunos pacientes pueden presentar síntomas sistémicos incluyendo, entre otros, fiebre, artralgias, fenómeno de Raynaud, anorexia y pérdida de peso. Estos hallazgos clínicos no se suelen correlacionar con ningún proceso histopatológico en particular, aunque la cianosis y las acropaquias son más características de estadios fibrosantes finales (2, 25).

Por lo general, pasan meses o años entre el comienzo de la disnea de esfuerzo y su progresión hasta la disnea de reposo, apareciendo la clínica de insuficiencia respiratoria, hipertensión pulmonar y *cor pulmonale* en estadios finales (2).

A medida que avanza la enfermedad, aparecen estertores secos, o durante la inspiración, principalmente en los lóbulos pulmonares inferiores. En estadios avanzados existe taquipnea de reposo, cianosis y acropaquias en las manos y pies, junto a *cor pulmonale*, con signos de hipertensión pulmonar (acentuación del segundo tono pulmonar o desviación del impulso apical a la derecha) y finalmente signos de insuficiencia cardiaca derecha (26).

1.4. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico final de una enfermedad intersticial debe realizarse en estrecha correlación entre el clínico, el radiólogo y el patólogo. Las bases fundamentales para el diagnóstico son:

El grado de sospecha clínica.

El interrogatorio cuidadoso de la historia ocupacional, ambiental, del uso de medicamentos y ambientes familiares de enfermedades similares y hereditarias.

Diagnóstico por imagen.

Alteraciones funcionales respiratorias típicas.

La biopsia transbronquial no es de ayuda en el diagnóstico de la mayoría de las EIP, a excepción de NIA y ocasionalmente en la NOC. El papel principal de la biopsia transbronquial es para excluir sarcoidosis y ciertas infecciones. En ausencia de contraindicaciones, es aconsejable realizar una biopsia pulmonar.

1.4.1. ESTUDIOS DE IMAGEN.

1.4.1.1. Radiografía convencional de tórax.

A pesar de que la radiografía de tórax posee escasa sensibilidad, continúa siendo valiosa en la detección de patología pulmonar intersticial. Uno de los primeros signos radiológicos sugerentes de enfermedad pulmonar del parénquima es la pérdida de nitidez de los vasos pulmonares (25, 27).

La imagen en 'vidrio deslustrado', es un patrón radiológico que aparece en estadios iniciales y sugiere la presencia de alveolitis relativamente temprana y, por lo tanto, reversible (25, 26). A medida que avanza la enfermedad, puede ir presentando uno o varios de los siguientes patrones:

- 1) *Patrón nodular*: Se caracteriza por lesiones esféricas, homogéneas, bien circunscritas y de varios tamaños. Una forma de patrón nodular está representado por el patrón miliar, en el cual los nódulos son de pocos milímetros de diámetro. La sarcoidosis, la silicosis y la talcosis suelen presentar este tipo de patrón.
- 2) *Patrón reticular*: Semeja una malla o red sobre el pulmón. El retículo puede ser fino o grueso y evoluciona hasta mostrar áreas quísticas de 5-10 milímetros de diámetro visibles en el intersticio engrosado (pulmón en panal) y representa un pulmón en estado terminal de muy mal pronóstico (25, 26, 27). Aunque todas las imágenes tanto nodulares como reticulares pueden observarse de forma pura, lo más frecuente es encontrar una combinación de imágenes que se denomina patrón retículo-nodular.
- 3) *Patrón lineal*: Es producido por el engrosamiento de los septos interlobulares y el intersticio perivenoso.
- 4) *Patrón acinar*: Realmente es el patrón alveolar clásico. En general, la mayoría de las enfermedades intersticiales difusas muestran disminución radiográfica de los volúmenes pulmonares. Exceptuando el pulmón en panal, la radiografía convencional de tórax se correlaciona pobremente con el estadio de este tipo de enfermedades y no ayuda a determinar un pronóstico (25). Otras anomalías radiográficas que se pueden observar de forma grave son: derrame pleural, neumotórax, cardiomegalia, derrame pericárdico y adenopatías.

1.4.1.2. Tomografía axial computarizada (TAC)

La TAC permite determinar con mayor precisión el tipo, la distribución y la gravedad de las anomalías del parénquima pulmonar.

En general se aconseja el uso combinado de la TAC convencional con la TAC de alta resolución porque, si bien la TAC de alta resolución origina una óptima visualización del parénquima pulmonar, puede perder algunas anomalías, a menos que se realice también una TAC convencional.

Análogamente, las imágenes de la TAC de alta resolución pueden ser difíciles de interpretar, si no se comparan con la TAC convencional ⁽²⁷⁾.

Las principales anomalías que se pueden observar en las distintas enfermedades intersticiales incluyen:

- 1.- Imagen en vidrio despulido.
- 2.- Imágenes nodulares.
- 3.- Opacidades lineales irregulares.
- 4.- Zonas de interconexión anormal entre bronquios, vasos y pleura visceral, con el parénquima pulmonar.
- 5.- Imágenes quísticas.

En términos generales, estas imágenes se interpretan de la misma manera que la radiografía convencional.

La densidad en vidrio deslustrado resulta de anomalías morfológicas que reflejan, o un mínimo engrosamiento del intersticio alveolar, o un llenado de los espacios alveolares. La presencia de opacidades en vidrio despulido en ausencia de dilataciones de la vía aérea por tracción es un indicador confiable de inflamación pulmonar.

Los nódulos pulmonares intersticiales tienden a ser densos y bien definidos. Nódulos pequeños, miliares, de 1 a 2 mm de diámetro se pueden observar en la sarcoidosis, silicosis o tuberculosis.

La TAC de alta resolución aumenta la rentabilidad diagnóstica de la biopsia transbronquial, y la biopsia pulmonar abierta, al poder discernir correctamente las zonas más afectadas

⁽²⁸⁾.

1.4.1.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La aplicación clínica de la RMN en las enfermedades intersticiales difusas del pulmón (EIDP) no se ha extendido, principalmente, debido al movimiento fisiológico de los pulmones en inspiración y espiración, así como la peculiar combinación de aire y tejidos que constituye un pulmón, todo lo cual altera la calidad de la imagen.

1.4.2. PRUEBAS DE FUNCIÓN PULMONAR.

El estudio de la función pulmonar reviste interés en tres aspectos:

- 1) En la mayoría de los casos constituyen un elemento básico para el diagnóstico. La alteración de la función pulmonar puede ser la primera manifestación de esta enfermedad (15 % de los casos), incluso antes de las manifestaciones clínicas.
- 2) La exploración funcional respiratoria se correlaciona bien con el grado de desestructuración del parénquima pulmonar; por tanto, constituye una información esencial para conocer la gravedad de estas enfermedades y es una buena guía para el control evolutivo.
- 3) El patrón espirométrico característico de las neumopatías intersticiales es la alteración ventilatoria tipo restrictivo (no obstructivo), caracterizada por la disminución del volumen máximo espirado o capacidad vital forzada (FCV) con indemnidad de flujos espiratorios máximos como el volumen de aire espirado durante el primer segundo de la espiración forzada (FEV1), o el flujo espiratorio máximo entre el 25 y el 75 % de la FVC (FEV 25-75 %). Se observa una característica elevación del cociente FEV1/FCV (> 85 %) (índice de Tiffeneau).

Otra característica es la disminución de la capacidad pulmonar total (TLC) y de las diferentes subdivisiones de los volúmenes pulmonares ⁽²⁹⁾. Las alteraciones más sensibles de la funcionalidad pulmonar y del intercambio gaseoso en este tipo de enfermedades incluyen el descenso de la PaO₂, un aumento del gradiente alveolo-arterial de oxígeno al esfuerzo y una disminución de la capacidad de difusión de monóxido de carbono en respiración única (DLCO) ^(29, 30).

Se ha objetivado que, excepto en el estadio de enfermedad avanzada, existe una pobre correlación entre la afección radiológica y los estudios de función pulmonar incluyendo la espirometría y la DLCO. Se describen, así mismo, casos con extensos infiltrados radiológicos y leves alteraciones de la función pulmonar ⁽³¹⁾.

1.4.3. ESTUDIOS ANALÍTICOS.

Las pruebas de laboratorio son, en general, bastante inespecíficas. Normalmente se detecta un aumento de la velocidad de sedimentación globular y de las inmunoglobulinas (Ig), sobre todo de la IgG y, a veces, la presencia de inmunocomplejos circulantes. Con frecuencia aparecen también títulos aumentados de anticuerpos antinucleares (7-25 %) factor reumatoide (14 %), crioglobulinas (41 %), y bajos niveles de complemento (6 %) ^(26, 28, 29).

La presencia de los marcadores inmunológicos anteriormente descritos en suero no parece modificar la historia natural de la fibrosis pulmonar idiopática y aparecen con mayor frecuencia en pacientes que responden al tratamiento.

1.4.4. LAVADO BRONQUIOLOALVEOLAR.

El lavado bronquioloalveolar (LBA), se ha propuesto específicamente en EIDP, como una prueba de utilidad para analizar la actividad inflamatoria y fibrogénica, para tomar decisiones terapéuticas y evaluar el seguimiento de la enfermedad. No permite recoger las células del intersticio, en el que predominan linfocitos T, células plasmáticas, mastocitos, y macrófagos con el fenotipo diferente a los alveolares ⁽²⁸⁾.

El LBA, si bien ha generado ciertos conocimientos sobre los componentes celulares y moleculares intrapulmonares, así como de algunos eventos fisiopatológicos, su utilidad clínica en el estudio de las EIDP es, hasta la fecha limitada.

En condiciones normales y en sujetos no fumadores, aproximadamente el 85-90 % de las células recuperadas por LBA son macrófagos alveolares, el 10-15 % restante son linfocitos y los polimorfonucleares constituyen menos del 1 %. El tabaquismo produce cambios importantes en el número total de células inflamatorias, así como de sus proporciones

porcentuales induciendo, generalmente, una disminución en el porcentaje de linfocitos (25).

Una de las neumopatías intersticiales más estudiada con este procedimiento ha sido la FPI. Aparece un aumento del número total de células inflamatorias en LBA. Frecuentemente se observan alteraciones de dos o más líneas celulares, entre las que predomina la neutrofilia, asociada habitualmente a eosinofilia. Un 10% de FPI pueden presentar linfocitosis y los mastocitos pueden hallarse en un 2-3 % (32).

La eosinofilia en el LBA se presenta en un 45-50 % de los casos alcanzando hasta un 75 % con microscopia electrónica. Su presencia parece asociarse a una pobre respuesta a los corticosteroides, así como a enfermedad evolucionada; si bien algunos autores encuentran solamente una correlación entre eosinofilia mayor al 5 % con alteración pulmonar severa (33).

En algunos trabajos se ha demostrado cómo un aumento del recuento linfocitario en el fluido alveolar de enfermos con FPI se asocia con un mejor pronóstico y una respuesta más favorable (34, 35). Parece ser que estas células se encuentran elevadas en las primeras fases de la enfermedad. Como regla general, el LBA ocupa un lugar muy limitado en el diagnóstico específico de las EIDP.

1.4.5. BIOPSIA PULMONAR.

La biopsia pulmonar, conduce a un diagnóstico definitivo. Se puede considerar como la herramienta diagnóstica más precisa en una EIDP de etiología desconocida. No sólo sirve para establecer el diagnóstico preciso, sino que también desempeña un papel en la planificación del tratamiento, permite estadificar la enfermedad, orienta el pronóstico, y es útil para la investigación sobre mecanismos patógenos (25, 29, 31).

Los principales métodos que se utilizan actualmente para la realización de una biopsia pulmonar son, principalmente, dos:

1.4.5.1. Biopsia transbronquial.

Su papel diagnóstico en este tipo de enfermedades es muy limitado; presentando una sensibilidad y especificidad relativamente bajas.

La biopsia transbronquial presenta varios problemas. En primer lugar, las muestras son tomadas a ciegas con fuertes posibilidades de muestreo erróneo. Asimismo, el tejido es generalmente maltratado y el tamaño de la muestra es pequeño (1-3 mm) ⁽³⁶⁾.

1.4.5.2. Biopsia pulmonar abierta por toracoscopia o minitoracotomía.

La biopsia pulmonar abierta se sigue considerando la técnica de elección a causa, principalmente, de la gran cantidad de tejido que permite obtener y a la posibilidad, en la mayoría de los casos, en poder tomar muestras en más de un lugar. La biopsia pulmonar abierta posee la mayor rentabilidad en la confirmación diagnóstica de las EIDP ^(25, 29, 31).

Es relativamente segura con poca morbilidad y menos del 1 % de mortalidad. Habitualmente se contraindica en pacientes ancianos o que padecen una enfermedad cardiovascular o pulmonar grave. En estos casos, puede realizarse una fibrobroncoscopia con toma de biopsia transbronquial.

En los últimos años se está realizando, cada vez más, la biopsia pulmonar por videotoracoscopia, presentando una alta especificidad diagnóstica, comparable con la que se espera en la biopsia a cielo abierto ⁽³⁷⁾. Esta técnica representa mayor comodidad y menos riesgos para el paciente por lo que está reemplazando a la biopsia a cielo abierto.

1.5. PATOGÉNESIS DE LA FIBROSIS PULMONAR DIFUSA.

Dependiendo del agente agresor, cualquier célula del parénquima pulmonar puede ser dañada o estimulada y la respuesta pulmonar representa un balance entre el tipo de células afectadas, la magnitud de la agresión y el comportamiento de los mecanismos de defensa iniciados por el daño. En términos generales, el daño puede iniciarse con la necrosis del epitelio o del endotelio capilar, aumento de la permeabilidad de los

neumocitos tipo I y células endoteliales adyacentes, o con la estimulación exagerada de células inflamatorias o inmunocompetentes (38).

Especial importancia presenta la pérdida de integridad de las membranas basales; lo cual facilitaría la salida de fibroblastos a los espacios alveolares y representaría un estímulo para la fibrogénesis tanto intersticial como intraalveolar. El estímulo desencadenante es probable que puede iniciar una respuesta inmunitaria (26, 31).

Este hecho se refleja en un aumento de las subclases de IgG, IgG1 e IgG3, un aumento de células secretoras de IgG y por la formación de inmunocomplejos, detectables en el suero y pulmón de estos pacientes. (26, 28).

La presencia dentro de las estructuras alveolares de estos inmunocomplejos, podría iniciar y mantener la respuesta inflamatoria al atraer varias poblaciones celulares. (28, 38).

Los macrófagos son los componentes celulares esenciales en la respuesta inflamatoria y en la fibrosis. En la etapa inicial (alveolitis), son fagocitos activos y los encargados de segregar factores que contribuyen al reclutamiento de células inflamatorias en el sitio de la lesión y factores que contribuyen a la adhesión de dichas células (39).

Entre los factores secretados se encuentran: Factor transformador de crecimiento β 1, factor de necrosis tumoral (FNT), factor de crecimiento plaquetario, IL-1, IL-6, interferón y factor de crecimiento semejante a la insulina (40, 41, 42).

La lesión pulmonar sería resultado de la acción de las citoquinas macrofágicas descritas directamente, FNT, o a través del reclutamiento y activación de neutrófilos y otras células. El factor transformador de crecimiento β 1 liberado por macrófagos y células epiteliales, incrementaría la síntesis de colágena por los propios fibroblastos y activaría la expresión de los genes codificadores de proteínas del tejido conectivo y de inhibidores de proteasas, contribuyendo decisivamente a la instauración de la fibrosis (25).

En los últimos años, ha tomado especial relevancia el efecto de los oxidantes/antioxidantes en la patogenia de las EIDP, así como en otros procesos respiratorios. La secreción de oxidantes está incrementada y se lleva a cabo por los macrófagos alveolares y neutrófilos activados. El hecho responsable de la secreción de

estos oxidantes, parece ser la presencia de inmunocomplejos en los pulmones de los pacientes ⁽⁴³⁾.

1.6. FACTOR TRANSFORMADOR DE CRECIMIENTO β 1.

1.6.1. HISTORIA Y FUNCIÓN.

Durante los años 70 hubo grandes inquietudes por definir factores de crecimiento peptídico individuales que podían conferir un fenotipo transformado en células no malignas; dicha transformación era posible en células que crecían en cultivo de una manera independiente del anclaje. Lo más prominente fue la descripción en 1978 de un factor de crecimiento del sarcoma, el cual provenía de un extracto de células transformadas por virus, que causaba que los fibroblastos de riñón de rata normal crecieran en medio con agar. Cuando este extracto fue purificado, se encontró que la habilidad para causar el crecimiento era el resultado de dos péptidos nombrados posteriormente TGF- α y TGF- β ; pero no fue sino hasta 1981 cuando Anita Roberts y colaboradores en su laboratorio identificaron al TGF- β 1 como una molécula envuelta en un sin número de procesos biológicos.

Originalmente el TGF- β 1 fue el primero en purificarse de plaquetas y placentas humanas, y riñón de bovino, caracterizado como un homodímero de 25 KDa ⁽⁴⁴⁾.

El TGF- β es una superfamilia de proteínas integrada por más de 35 citoquinas que incluye a las activinas, inhibinas, proteína morfogénica de hueso, hormona anti-mülleriana y al factor transformador de crecimiento β 1 propiamente dicho, que regulan una gran cantidad de actividades biológicas como proliferación, migración y apoptosis en diferentes tipos celulares, tanto en el estado adulto como durante el desarrollo embrionario ⁽⁴⁴⁾.

Todos estos factores de crecimiento comparten un grupo de residuos de cisteína altamente conservados que forman una estructura común sostenida por enlaces disulfuro intramoleculares ^(45, 46).

El TGF- β 1 es considerado como una citoquina multifuncional (pleiotrópica) debido a los efectos que tiene sobre los diferentes tipos celulares. Es el inhibidor más potente de

proliferación en células mieloides, mesenquimales, epiteliales, linfoides, endoteliales y en varios tipos de células malignas. Alternativamente, puede estimular la proliferación de fibroblastos normales en células no epiteliales y cierto tipo de células mesenquimales. Es un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales; además, induce la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de matriz extracelular. Particularmente el TGF- β 1 también induce otros eventos intracelulares como la regulación de factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular; induce cambios de expresión de los genes *jun-B*, *c-fos*, y *c-myc*; induce recambio de IP3; evita la fosforilación de la proteína Rb (retinoblastoma), dependiente del contacto célula-célula e induce la formación de proteínas G ⁽⁴⁷⁾.

1.6.2. ESTRUCTURA.

Existen cinco isoformas del TGF- β en diferentes organismos. Adicionalmente, un heterodímero del TGF- β (TGF- β 1.2) se ha identificado en plaquetas porcinas. En mamíferos se han descrito tres formas del TGF- β ($-\beta$ 1, $-\beta$ 2, $-\beta$ 3) las cuales residen en diferentes cromosomas (19q13, 1q41 y 14q24 respectivamente), pero poseen 80% de homología en secuencia de aminoácidos, mientras que las isoformas 4 y 5 se han identificado en aves y anfibios, respectivamente ^(47, 48, 49).

El TGF- β es producido como un precursor dimérico de 25 KDa secretado en forma latente (anclado a la superficie celular o a la matriz extracelular), que posee 390 aminoácidos, en la cual la porción C-terminal de 112-114 aminoácidos posee nueve residuos de cisteína y es la región activa después de que es cortada proteolíticamente en el aminoácido 278 ^(47, 48, 50).

Muchos tipos celulares expresan los TGF- β 1 y TGF- β 2 con 70 % de homología en su secuencia de aminoácidos, mientras que el TGF- β 3 es sintetizado por células mesenquimales y posee 79 % de homología con el TGF- β 2. Entre los mamíferos, la secuencia de aminoácidos del TGF- β 1 es altamente conservada (100 %), ya que es idéntica en humanos, cerdos, vacas y monos y difiere sólo en un aminoácido en ratones.

La estructura tridimensional de la proteína TGF- β 1 comienza con el extremo N-terminal con una cadena α -hélice (α 1) seguida por una cadena β -plegada (β 1) y una cadena β -plegada antiparalela irregular. En segundo término, sigue una segunda cadena α -hélice (α 2) y un asa larga con numerosos contactos hidrófobos. Se continúa con una segunda cadena β -plegada (β 2), otra asa larga y una tercera cadena α -hélice (α 3) la cual termina con un giro β -tipo II y un asa larga. El extremo C-terminal de la molécula forma una estructura β -antiparalela extensa con un giro β -tipo II. Las cadenas β 3 a β 7 plegadas se forman por apareamiento de residuos intercatenarios del extremo C-terminal de la proteína ⁽⁴⁷⁾.

1.6.3. TGF- β EN LAS ENFERMEDADES.

Se sabe que el TGF- β 1 tiene un importante papel en la regulación del ciclo celular. En muchas células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas actúa inhibiendo la progresión de la fase G1 del ciclo mitótico, ya que estimula la producción de p15, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (CDC). Estos cambios resultan en un decremento en la fosforilación de la proteína Rb, la cual se une y secuestra miembros de familia de factores de transcripción E2F e inhibe, de esta forma, la expresión de genes que regulan el ciclo celular como los *c-myc* y *c-myb*. En las células cancerosas, mutaciones en la vía de señalización del TGF- β confieren resistencia a la inhibición del crecimiento y, consecuentemente, disparan un crecimiento celular descontrolado.

Además de los efectos antes mencionados el TGF- β 1 también juega un importante papel en la metástasis, ya que induce la expresión, tanto de matriz extracelular como de proteínas de adhesión celular, así como también decrece la producción de enzimas que degradan la matriz, o incrementa los inhibidores de dichas proteínas. Por todo lo anterior, es de suponerse que el TGF- β 1 puede incrementar la invasión de las células malignas. Además, el TGF- β 1 también induce la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y la motilidad celular, y suprime al sistema inmune.

La sobreproducción del TGF- β 1 puede inducir la acumulación de una cicatriz fibrosa en diferentes órganos (hígado, riñón, pulmón), culminando con un estado patológico muy

grave que en muchos casos lleva a la muerte. El TGF- β 1 inhibe la proliferación y migración de células endoteliales y de músculo liso.

Aunado a todo lo anterior, parece haber una relación el grado de expresión del TGF- β 1 y la hipertensión arterial, debido a varios factores como elevación en la concentración de angiotensina II, incremento en la presión sanguínea sistémica y polimorfismos en el promotor del TGF- β 1 ⁽⁴⁵⁾.

2. JUSTIFICACIÓN.

Bajo el termino de enfermedades intersticiales difusas del pulmón (también denominadas neumopatías intersticiales difusas o enfermedades fibrosas del pulmón), se agrupan un gran número de procesos respiratorios normalmente subagudos y crónicos que se caracterizan por afectar de manera difusa el parénquima pulmonar, afectando primordialmente al intersticio y a los espacios alveolares, aunque muchas de ellas también producen lesiones de vías aéreas periféricas.

El factor transformador de crecimiento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) está implicado en varias enfermedades, incluyendo desórdenes autoinmunes y vasculares, así como también en enfermedades fibrosantes y neoplasias malignas.

El TGF- β es una familia de proteínas que incluye al TGF- $\beta 1$, activinas y a la proteína morfogénica del hueso, que regulan diferentes funciones celulares como proliferación, apoptosis, diferenciación, migración, y tienen un papel clave en el desarrollo del organismo. En la actualidad se están desarrollando numerosas estrategias terapéuticas encaminadas a corregir las alteraciones presentes en enfermedades en las que interviene el TGF- $\beta 1$ como actor principal.

La incidencia y prevalencia de este tipo de enfermedades fibrosantes del pulmón no se conoce con precisión, debido fundamentalmente a que constituyen un grupo extraordinariamente heterogéneo, y para su diagnóstico se requiere un buen grado de sospecha clínica y las estadísticas son poco fiables en la mayoría de los países en vías de desarrollo. De esta manera la magnitud del problema se desconoce.

Sin embargo esta tesis es importante debido a que refleja un panorama real en nuestro país. Los datos que se obtuvieron de piezas quirúrgicas en un periodo de 5 años, de 1999 a 2003, en el Hospital General de México O. D. donde se recibe un promedio de 23,000 biopsias y piezas quirúrgicas de diversa índole al año, y es esta por lo tanto, una institución concentradora de pacientes y casos de todo el país, principalmente del centro y del sur.

3. OBJETIVO.

Conocer la frecuencia de las diferentes neumopatías intersticiales idiopáticas, sus características demográficas (edad de presentación, predominio de sexo) y clínicas y demostrar que en la fibrosis intersticial pulmonar hay expresión de TGF- β 1, mediante reacción de inmunohistoquímica, en biopsias pulmonares de pacientes del Hospital General de México O. D., del período comprendido entre 1999 y 2003.

4. CASOS, MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se efectuó un estudio transversal descriptivo.

4.2. UNIVERSO DE TRABAJO

Se incluyeron todos los casos de enfermedades pulmonares difusas del Hospital General de México, O. D. con diagnóstico histopatológico confirmado, en el periodo de 1999 a 2003.

4.3. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE

1. Expresión de TGF- β 1 en las muestras de pulmón.

VARIABLE DEPENDIENTE

1. Fibrosis del parénquima pulmonar y cambios histológicos asociados.

DESCRIPCIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE

Expresión del factor transformador del crecimiento β 1 en tejido (muestras de pulmón). Se utilizó un corte de tejido fijado en formalina/buffer de fosfatos al 10% e incluido en parafina, de 2 micras de espesor. A través de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta convencional (ABC) se marcaron las zonas que expresaron positividad para TGF- β 1. La positividad fue medida a través de un analizador de imágenes con el que se obtuvo un promedio de 10 campos no cruzados de pulmón a 100 aumentos.

Escala de medición: Cuantitativa de razón.

Tipo de variable: cuantitativa continua.

VARIABLE DEPENDIENTE

Fibrosis del parénquima pulmonar y cambios histológicos asociados (engrosamiento del intersticio pulmonar, cambios vasculares, panalización y formación de nódulos en el parénquima adyacente).

Escala de medición: cualitativa nominal.

Tipo de variable: cualitativa nominal.

4.4. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

4.4.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN

4.4.1.1. Criterios de inclusión

1. Casos de enfermedades pulmonares intersticiales difusas idiopáticas del Hospital General de México O. D. (hombres o mujeres) de cualquier de edad, incluyendo niños, con diagnóstico histopatológico.

4.4.1.2. Criterios de no inclusión

1. Casos de alveolitis alérgica extrínseca, de etiología infecciosa, reactiva u otra causa, que histológicamente pueden semejar algún tipo de enfermedad pulmonar intersticial difusa.

4.4.1.3. Criterios de eliminación

1. Cuando en las muestras obtenidas por biopsia se obtuvieran datos histológicos de enfermedades no diagnosticadas previamente, que explicaran la presencia de fibrosis (a criterio del Patólogo revisor).
2. Cuando en el estudio del caso no se obtuvieran muestras de tejido suficientes para diagnóstico.

4.5. PROCEDIMIENTOS

Se tomó una muestra de tejido pulmonar, de lóbulo o en su defecto de donde se observaran lesiones. El tejido se fijó en formalina al 10% y se incluyó para su estudio en parafina. De todas las muestras se realizaron cortes histológicos a 2 micras y se efectuaron tinciones de hematoxilina y eosina y tricrómico de Masson. Con estas se evaluaron los cambios histológicos tales como: Fibrosis y su localización, alteración de la arquitectura pulmonar, cambios en vasos de pequeño y mediano calibre, presencia de infiltrado inflamatorio y localización del mismo. (**Fig. 1**)

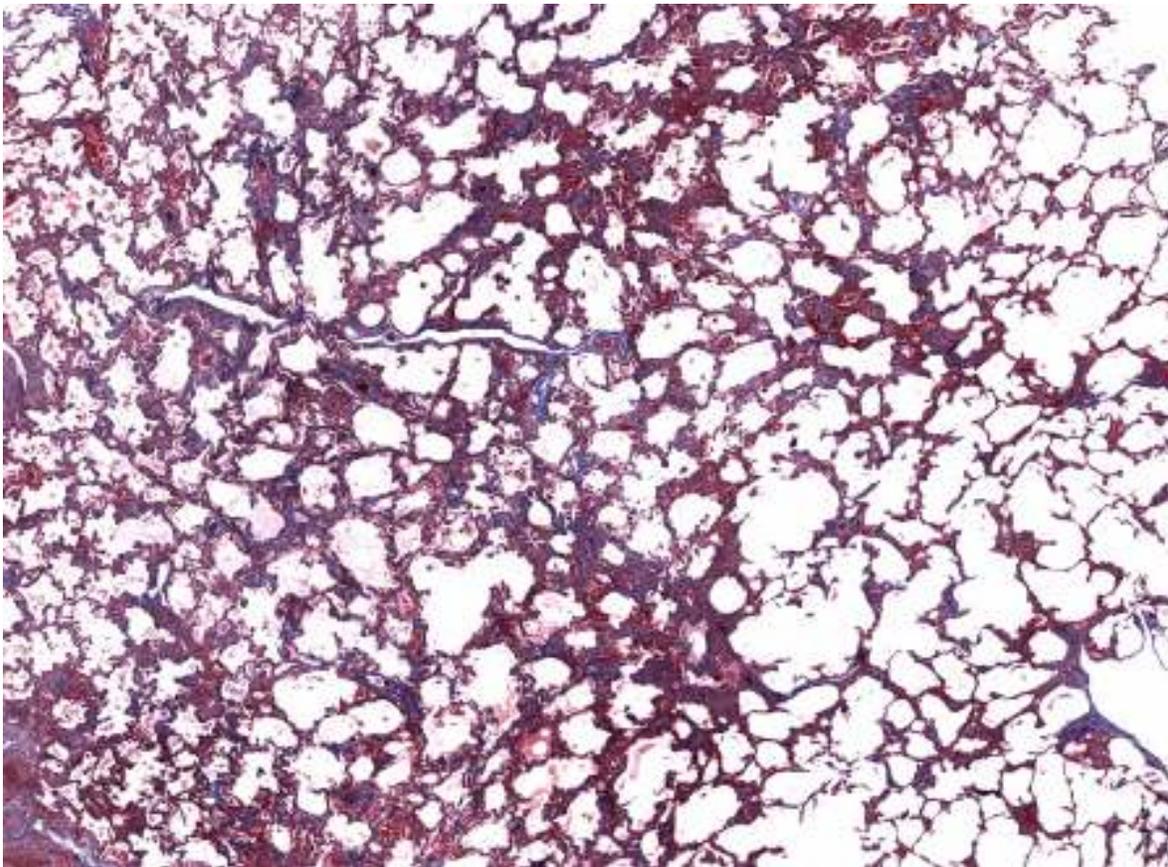


Fig. 1: Muestra de pulmón teñida con tricrómico de Masson (10X) para evaluar la fibrosis.

Se realizó también inmunohistoquímica a través de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta convencional (ABC) con el anticuerpo primario TGF β -1 (molécula profibrótica). El marcador de inmunohistoquímica y la fibrosis teñida con el tricrómico de Masson se

cuantificaron en unidades píxel/área a través de un analizador de imágenes (Image-Pro-Plus, versión 5.1) (se especifica con más detalle en la sección de morfometría).

4.6. MORFOMETRÍA

La cantidad de fibrosis fue inicialmente evaluada con la tinción tricrómica de Masson de manera nominal. Para determinar la certeza de esta evaluación, la cantidad de fibrosis se cuantificó utilizando morfometría. Este método se basa en el análisis computarizado de imágenes. En concreto, cada muestra se digitalizó a 100 aumentos (10X) completamente por medio de una platina automática que une imágenes, utilizando un microscopio de campo claro (Olimpus BX51, objetivo 10X y oculares 10X). Cada campo se capturó con una cámara de vídeo digital (CoolSnap-Plus). Cada imagen fue procesada en una computadora usando Image-Pro-Plus versión 5.1, un software procesador de imagen (Image-Pro INC, Media Cybernetics). Utilizando la capacidad de reconocimiento de color en este software y la especificidad hacia el azul de la colágena en los cortes teñidos con tricrómico de Masson, la fibrosis se cuantificó (en unidades píxel). **(Fig. 2)**

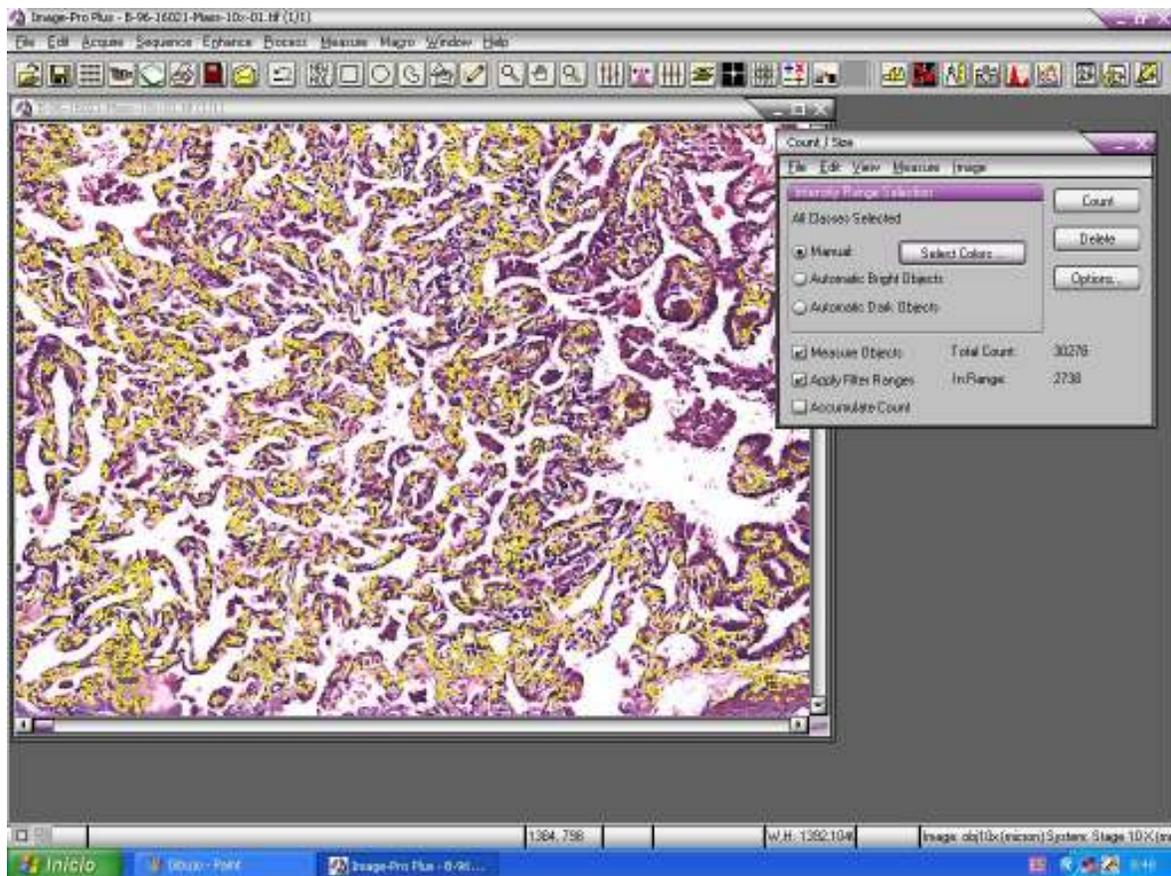


Fig. 2: Fotomicrografía de una muestra de tejido con fibrosis, teñido con tricrómico de Masson (10X) con fibrosis (azul), digitalizado y medido a través del analizador de imágenes en unidades píxel (amarillo).

4.7. ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

De cada muestra se efectuaron cortes a 2 micras de tejido fijado en formalina al 10% y procesado en parafina para estudio de inmunohistoquímica por la técnica de inmunoperoxidasa indirecta convencional utilizando el complejo streptavidina-biotina-peroxidasa (ABC) con el anticuerpo primario TGF- β 1 (Biossec, Santa Cruz Biotechnology, Inc). La interpretación del resultado de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta se llevó a cabo con el analizador de imágenes descrito anteriormente utilizando 10 campos no cruzados examinados a 100 aumentos. El resultado final de cada caso, se expresó en promedio de los 10 campos medidos.

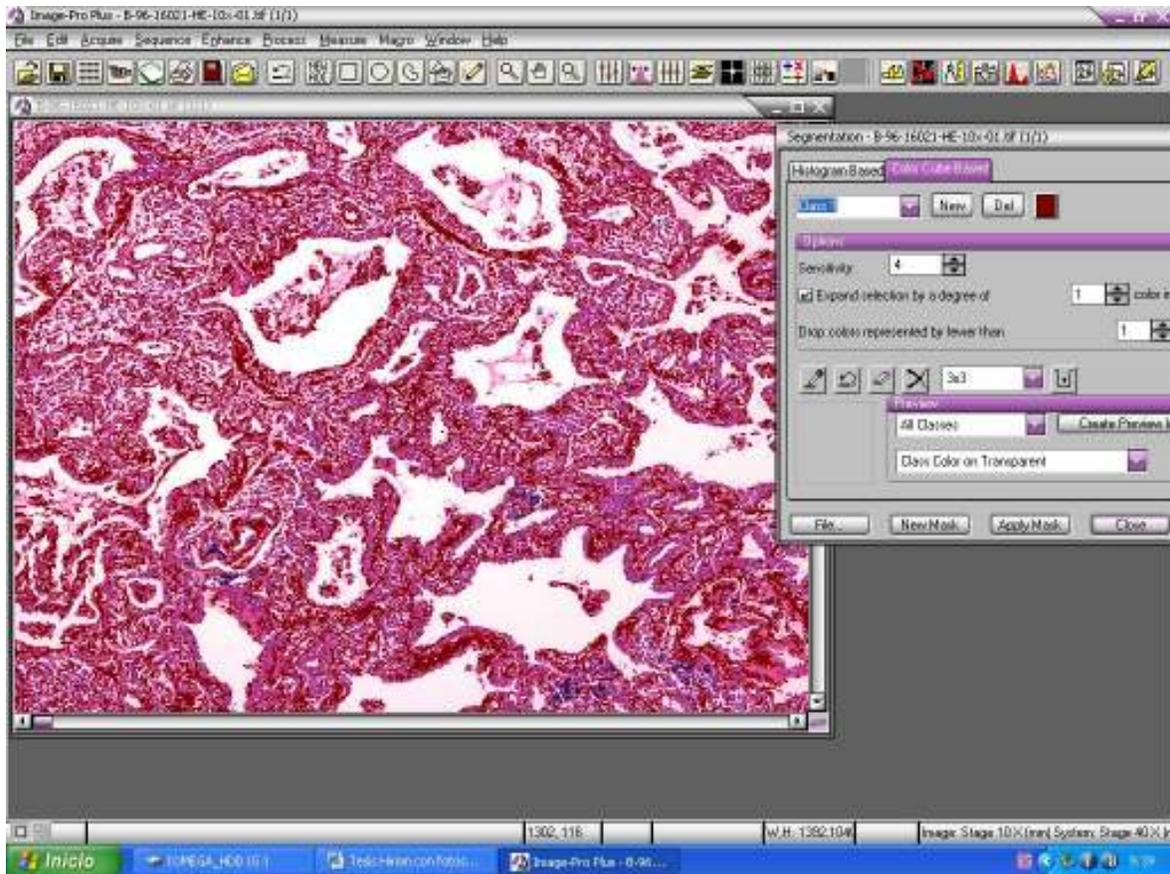


Fig. 3: Corte histológico de una muestra de pulmón con fibrosis marcada con TGFβ-1 (10X) en la que se seleccionó el color café de la inmunohistoquímica para obtener una medición en unidades píxel y en porcentaje de área con positividad para el anticuerpo.

4.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

La realización del estudio no implicó algún procedimiento extra al estudio histopatológico de las biopsias. Todos los estudios de biopsias practicados en el Hospital General de México, O. D. cuentan con previo consentimiento del paciente o de los familiares responsables.

Se tomaron en cuenta los lineamientos para las investigaciones biomédicas vigentes en México, publicadas por la Secretaría de Salud a través del Diario Oficial de la Federación. Además se tomaron en cuenta los artículos para el manejo, procesamiento y eliminación de tejidos y residuos biológicos, vigente, en la Ley General de Salud.

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se expresaron las variables cuantitativas continuas en promedio, como medida de tendencia central y desviación estándar como medida de dispersión. Se utilizó tanto el programa de Excel para el análisis estadístico, SPSS versión 10 para Windows y el programa GraphPad Prism 3.02, para la realización de figuras.

5. RESULTADOS

Se revisaron casos de pacientes con enfermedades intersticiales pulmonares difusas obtenidos por muestreo no probabilístico, que reunieron los criterios de inclusión, hasta completar el tamaño de la muestra (66 casos). Los datos recolectados del resumen de la historia clínica (características clínicas y demográficas) fueron capturados inicialmente en una hoja de cálculo del programa Excel. Se codificó y ordenó la base de datos para posteriormente ser analizada en el programa SPSS para Windows. Primero se efectuó un análisis exploratorio de la base para conocer las características clínicas y demográficas de los casos.

De los 66 casos estudiados, el 77.27 % (51 casos) fueron mujeres y el 22.72 % (15 casos) hombres. El grupo de edad más afectado fue el que comprende entre los 40-69 años. La edad promedio de toda la muestra (66 casos) fue de 52.51 años (\pm 10.94). El caso con menor edad fue de 28 años y el de mayor 71. **Tabla 1.**

Tabla 1: Características demográficas de 66 casos de enfermedades intersticiales difusas pulmonares

Intervalo de edad	Casos	Mujeres Num. (%)	Hombres Num. (%)
21 - 30 años	2 casos	2 (3.03)	0 (0)
31 - 40 años	6 casos	6 (9.09)	0 (0)
41 - 50 años	18 casos	14 (21.21)	4 (6.06)
51 - 60 años	17 casos	12 (18.18)	5 (7.57)
61 - 70 años	19 casos	14 (21.21)	5 (7.57)
71 - 80 años	4 casos	3 (4.54)	1 (1.51)

De los 66 casos estudiados, el tipo de enfermedad intersticial difusa predominante es la neumonía intersticial usual con el 89.39 % (59 casos), seguida por la neumonía intersticial descamativa con el 9.09 % (6 casos) y daño alveolar difuso en el 1.51 % (1 caso). **Tabla 2.**

Tabla 2: Tipo de enfermedad intersticial difusa pulmonar

Tipo de enfermedad intersticial	Num. (%)
Neumonía intersticial usual	59 (89.39)
Neumonía intersticial descamativa	6 (9.09)
Daño alveolar difuso	1 (1.51)

Todos los casos estudiados presentaron hipertensión pulmonar (**Fig. 4**), de los cuales, el 36 % (24 casos) manifestó hipertensión pulmonar grado 3, el 25.75 % (17 casos) grado 2, el 15.15 % (10 casos) grado 1, el 10.60 % (7 casos) grado 4 y el 12.12 % (8 casos) grado 5.

Tabla 3.

Tabla 3: Grado de hipertensión pulmonar

Grado de hipertensión pulmonar	Num. (%)
1	10 (15.15)
2	17 (25.75)
3	24 (36.36)
4	7 (10.60)
5	8 (12.12)

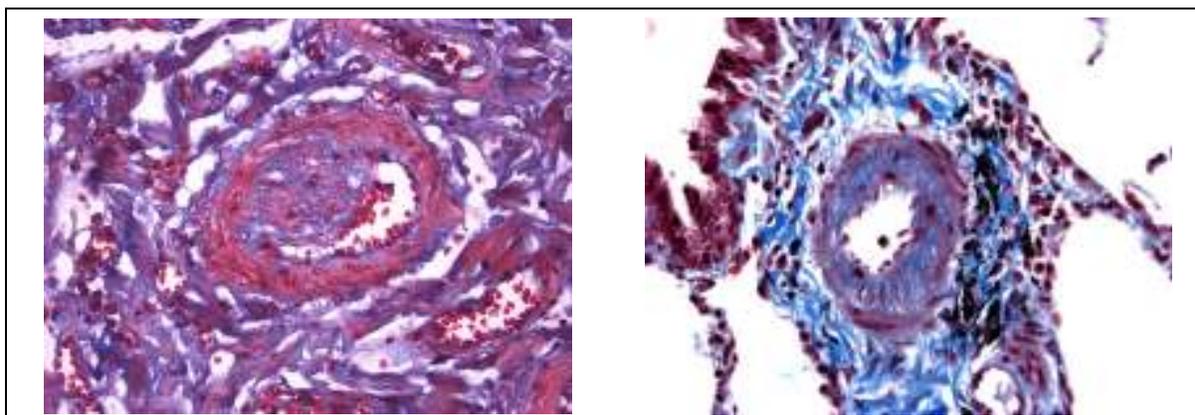


Fig. 4: Muestras de pulmón teñida con tricrómico de Masson (40X) para evaluar la hipertensión pulmonar.

En cuanto a los datos clínicos, cerca del 100 % de los casos estudiados manifestaron algún grado de disnea, y es la disnea grave el síntoma más frecuente al presentarse en el 46.96 % (31 casos), seguida por la disnea moderada con 31.81 % (21 casos) y la disnea leve 15.15 % (10 casos). El 75.75 % (50 casos) de los pacientes presentó cianosis al momento del diagnóstico y el 53.03 % (35 casos) manifestó tener algún tipo de contacto con aves, en tanto que el 24.24 % (16 casos) tuvieron positividad para la serología de precipitinas aviarias. El 18.18 % (12 casos) presentó 2° foco pulmonar audible en la auscultación, otro más *cor pulmonale* compensado y un tercero hipertensión pulmonar (1.15 % cada uno).

Tabla 4.

Tabla 4: Características clínicas

Características clínicas	Num. (%)
Disnea leve	10 (15.15)
Disnea moderada	21 (31.81)
Disnea grave	31 (46.96)
Cianosis	50 (75.75)
Contacto con aves	35 (53.03)
Precipitinas aviarias positivas	16 (24.24)
2° foco pulmonar presente	12 (18.18)
<i>Cor pulmonale</i> compensado	1 (1.15)
Hipertensión pulmonar	1 (1.15)

En los estudios de imagen realizados, en la radiografía de tórax, los patrones nodular y reticular, se presentaron cada uno en el 86.36 % (57 casos), seguidos por el patrón en panal de abeja en el 24.24 % (16 casos) y aspecto en vidrio esmerilado en el 21.21 % (14 casos), se encontró además un caso de bronquiectasia, cabe aclarar que la mayoría de las veces se presentó más de un patrón radiológico por caso. La realización de tomografía computarizada como parte del protocolo de diagnóstico y tratamiento, no se realizó en todos los pacientes, principalmente en los casos más antiguos por lo que no se consideraron en este estudio. **Tabla 5.**

Tabla 5: Características radiológicas

Características radiológicas	Num. (%)
Vidrio esmerilado	14 (21.21)
Patrón nodular	57 (86.36)
Patrón reticular	57 (86.36)
Panales de abeja	16 (24.24)
Bronquiectasias	1 (1.51)

En las pruebas funcionales respiratorias el 54.54 % (36 casos) de los pacientes presentó resultados dentro de lo normal, el 19.69 % (13 casos) presentó afección muy importante al momento del diagnóstico, seguido por el 12.12 % (8 casos) de pacientes con afección importante, 10.60 % (7 casos) con afección grave, el 3.03 % (2 casos) con afección moderada y ninguno de los pacientes presentó datos de afección leve. **Tabla 6.**

Tabla 6: Pruebas funcionales respiratorias

Pruebas funcionales respiratorias	Número de casos y porcentaje
Normal	36 (54.54)
Afección leve	0 (0.00)
Afección moderada	2 (3.03)
Afección importante	8 (12.12)
Afección muy importante	13 (19.69)
Afección grave	7 (10.60)

En cuanto a la correlación observada entre la fibrosis intersticial obtenida por análisis morfométrico y la expresión del TGF- β 1 medida para cada caso, se midió con el método de Pearson, y la relación es casi perfecta (**Fig. 5 y Fig 6**).

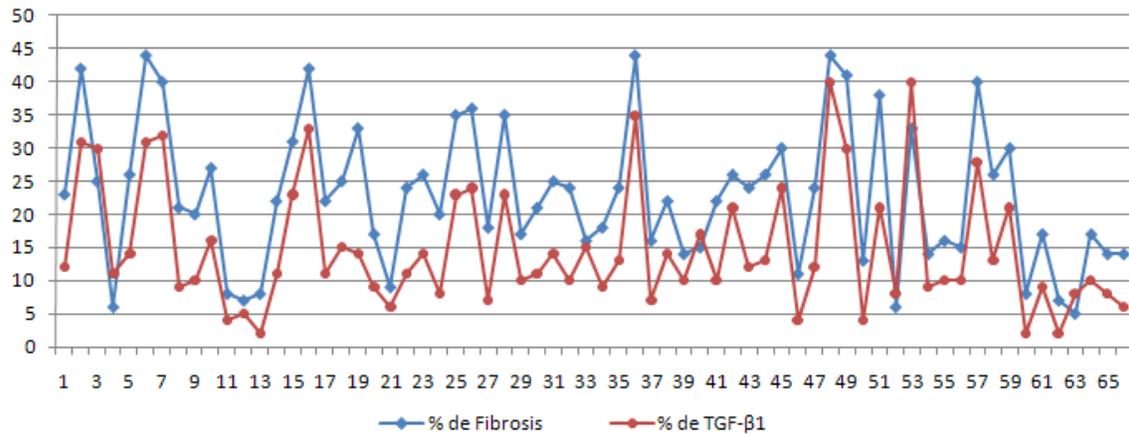


Fig. 5: Relación entre el porcentaje de fibrosis pulmonar y la expresión del TGF-β1.

Correlación entre fibrosis y expresión del TGFβ-1

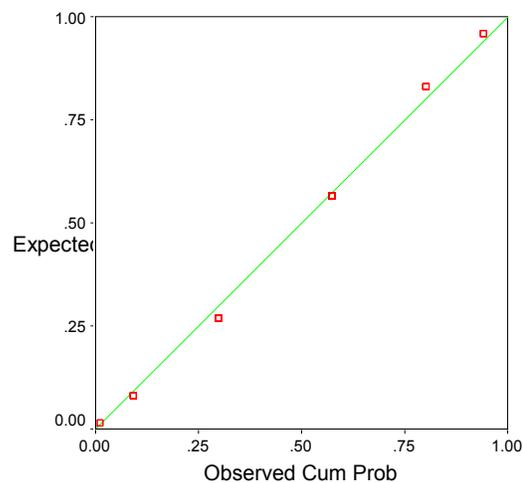


Fig. 6: Coeficiente de correlación con el método de Pearson $r= 1.00$ con un nivel de $p= 0.01$ entre el porcentaje de fibrosis intersticial dado por morfometría y el grado de expresión del TGF-β1.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

De manera similar a otras series realizadas, en esta se observa que la NII mas frecuente es la NIU. La relación hombre-mujer fue de 1:4, cifra considerablemente desproporcionada en comparación con la literatura, en donde se informa un predominio en hombres, principalmente en la NIU (2, 6, 57, 62). La explicación a esta discordancia entre lo observado y la literatura, puede deberse a que como sabemos la NIU tiene peor pronóstico con una progresión más rápida en los hombres que en las mujeres. En los primeros se establece antes el pulmón en 'panal de abejas' y por lo tanto ya no son sometidos tan frecuentemente a biopsia pulmonar.

Se observó HAP en todos los pacientes, a diferencia de otras series realizadas en Uruguay y EEUU las cuales informan un 20 a 40% de incidencia (59,63). Probablemente debido a que en este hospital los pacientes son referidos en etapas muy avanzadas de la enfermedad.

Las pruebas funcionales respiratorias reflejan un porcentaje muy significativo (42.41 %) de pacientes que presentan afección importante, muy importante y severa, lo cual también está, muy probablemente, relacionado con el momento de referencia de los pacientes en etapas avanzadas de afectación pulmonar (2, 25).

En cuanto al grado de hipertensión pulmonar es importante señalar que todos los casos presentaron algún grado de hipertensión según la escala de Heath-Edwards, y que más del 50 % de los casos se encuentran entre los tres primeros estadios. Esto también refleja que no hay una correlación entre la HAP y las pruebas funcionales respiratorias; lo que sido anteriormente señalado por otros investigadores. Se refiere que más que la capacidad vital, la disminución en la difusión de CO₂ (DLCO %) se relaciona con HAP (2, 29, 30).

Los hallazgos histológicos fueron similares al los reportados en otros estudios, es decir, aumento del área intersticial, fibrosis, cambios vasculares, etc. (59,60).

Existe una correlación casi perfecta entre el porcentaje de fibrosis y la expresión del TGF-β1, esto, refleja que los mecanismos inflamatorios y profibróticos intersticiales pulmonares están relacionados con esta molécula (45).

En las diferentes NII hay aumento de la expresión del TGF- β 1 en el tejido pulmonar que se correlaciona directamente con la cantidad en la fibrosis en el intersticio.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kam DW. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: The inflammation hypothesis revisited. *Chest*. 2003; 124:1187-90.
2. American thoracic society ATS/ERS internacional consensus classification of idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165:277-304.
3. Hubbard R, Venn A, Smith C, Cooper M, Johnston I, Britton J. Exposure to commonly prescribed drugs and the etiology of cryptogenic fibrosing alveolitis: a case-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:743-747
4. Liebow A.A. Definition and classification of interstitial pneumonias in human pathology. *Prog Respir Res* 1975; 8:1
5. Scadding JG. Fibrosing alveolitis. *Br Med J* 1964; 2:68
6. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1301-1315.
7. Katzenstein AL, Fiorelli RF. Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance. *Am J Surg Pathol* 1994; 18:136-147
8. Cottin V, Donsbeck AV, Revel D, Loire R, Cordier JF. Nonspecific interstitial pneumonia. Individualization of a clinicopathologic entity in a series of 12 patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1286-1293
9. Travis WD, Matsui K, Moss JE, Ferrans VJ. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns. Survival comparison with usual interstitial pneumonia and desquamative interstitial pneumonia. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:19-33
10. Epler GR, Colby TV, McCloud TC, Carrington CB, Gaensler EA. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *N Engl J Med* 1985; 312:152-158
11. Davison AG, Heard BE, McAllister WAC, Turner-Warwick ME. Cryptogenic organizing pneumonitis. *Q J Med* 1983; 207:382-394
12. King TE Jr, Mortenson RL. Cryptogenic organizing pneumonitis. The North American experience. *Chest* 1992; 102:8S-13S

13. Izumi T, Kitaichi M, Nishimura K, Nagai S. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. Clinical features and differential diagnosis. *Chest* 1992; 102:715-719
14. Dina R, Sheppard MN. The histological diagnosis of clinically documented cases of cryptogenic organizing pneumonia: diagnostic features in transbronchial biopsies. *Histopathology* 1993; 23:541-545
15. Katzenstein AL, Myers JL, Mazur MT. Acute interstitial pneumonia. A clinicopathologic, ultrastructural, and cell kinetic study. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:256-267
16. Olson J, Colby TV, Elliot CG. Hamman-Rich syndrome revisited. *Mayo Clin Proc* 1990; 65:1538-1548
17. Tomashefski JFJ. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1990; 11:593-619
18. Heyneman LE, Ward S, Lynch DA, Remy-Jardin M, Johkoh T, Muller NL. Respiratory bronchiolitis, respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease, and desquamative interstitial pneumonia: different entities or part of the spectrum of the same disease process. *Am J Roentgenol* 1999; 173:1617-1622
19. Yousem SA, Colby TV, Gaensler EA. Respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease and its relationship to desquamative interstitial pneumonia. *Mayo Clin Proc* 1989; 64:1373-1380
20. King TE Jr. Respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease. *Clin Chest Med* 1993; 14:693-698
21. Myers JL, Veal CF Jr, Shin MS, Katzenstein AL. Respiratory bronchiolitis causing interstitial lung disease. A clinicopathologic study of six cases. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:880-884
22. Gaensler EA, Goff AM, Prowse CM. Desquamative interstitial pneumonia. *N Engl J Med* 1966; 274:113-128
23. Koss MN, Hochholzer L, Langloss JM, Lazarus AA, Wehunt WD. Lymphoid interstitial pneumonitis: clinicopathologic and immunopathologic findings in 18 patients. *Pathology* 1987; 19:178-185

24. Strimlan CV, Rosenow EC, Weiland LH, Brown LR. Lymphocytic interstitial pneumonitis. Review of 13 cases. *Ann Intern Med* 1978; 88:616-621
25. Selman M. En: *Neumopatías intersticiales difusas*. México: Editorial Médica Panamericana S.A., 1996.
26. Talmadge E. Interstitial lung diseases. In: Casper DL, Fansi AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Hameson JL, et al., editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 16th ed. New York. McGraw-Hill; 2005. p 1554-60.
27. Hansell DM, Kerr IH. The role of high resolution computed tomography in the diagnosis of interstitial lung disease. *Thorax*. 1991;46:77-84.
28. Álvarez-Sala R, Prados C, García FR, Lázaro TC, García Saute JL, Pino JM. Et al. *Fibrosis pulmonar idiopática: nuevas perspectivas diagnósticas y terapéuticas: An Med. Intern.* 1993;10:355-60.
29. Green FH. Overview of pulmonary fibrosis. *Chest*. 2002 ; 122:334-9.
30. Tenholder MF, Rusell MD, Knight E, Rajagopal KR. Orthodeoxia: a new finding in interstitial fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1987;136:170-3.
31. Suerio Bendito A, Gaudó Navarro J. *Fibrosis pulmonar idiopática*. En: Caminero JA, Fernández L, editores. *Manual de Neumología y Cirugía torácica*. SEPAR. Madrid: Editores Médicos D.L. 1998. p 917-40.
32. Cherniak RM. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals interstitial pulmonary fibrosis and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141:S169-93.
33. Walker Ch, Bauer W, Braun RK, Menz G, Braun P, Schwartz F et al. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150:1038-48.
34. Haslam PI, Bauer W, De Rose W. The clinical role of bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Dis*. 1992;2:58-63
35. Stoller JK, Rankin JA, Reynolds HY. The impact of bronchoalveolar lavage cell analysis on clinicians' diagnostic reasoning about interstitial lung disease. *Chest*. 1987;92:839-43.

36. Hunnighake G, Zimmerman MB, Schwartz DA, King TE, Lynch J, Hegele R. et al. Utility of a lung biopsy for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:193-6.
37. Morales J, Selman M, Díaz X. Biopsia pulmonar transpleural por toracoscopia en el diagnóstico de la neumopatía intersticial difusa. *Arch Bronconeumol.* 1986;22:215-8.
38. Strieter RM. Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1206-7.
39. Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP. Idiopathic pulmonary fibrosis: Pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs.* 2004;64:405-30.
40. Persoons J, Schornagel K, Brevé J, Acute stress affects cytokines and nitric oxide production by alveolar macrophages differently. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:619-24.
41. Nacamura H, Fujishima S, Waki Y, Urano T. Priming of alveolar macrophages for interleukin-8 production in patients with pulmonary idiopathic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1579-86.
42. Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, Whidborne M, Eaton V, Bingle C, et al. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor- α gene polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:755-8.
43. Yucesoy B, Johnson VJ, Kashon ML, Fluharty K, Vallyathan V, Luster MI. Lack of association between antioxidant gene polymorphisms and progressive massive fibrosis in coal miners. *Thorax.* 2005;60:492-5.
44. Sporn M. TGF- β : 20 years and counting. *Microbes infect* 1999;1:1251-3.
45. Blobel G, Schiemann W, Lodish H. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000;4:1350-8.

46. Zhu H, Burgess A, Regulation of transforming growth factor B signaling. *Mol Cell Biol Res Community* 2001;4:321-30.
47. Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V. transforming growth factor beta-1: Structure, function, and regulation mechanisms in cáncer. *Salud Publica Mex* 2001;43:340-51.
48. Border W, Noble N. TGF- β . *Sci Am Sci Med* 1995;2:68-77.
49. Bisell M, Roulot D, George J. Transforming growth factor and the liver. *Hepatology*.2001;34:859-67.
50. Hernandez-Cañaveral I, González J, López-Casillas F, Armendáriz-Borunda J. Amplified expression of dominant-negative transforming growth factor beta type II receptor inhibits collagen type I production via reduced Smad-3 activity *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:380-7.