

# LAVADO BRONCOALVEOLAR: ANÁLISE DE PERFIS CELULARES EM DOENÇAS DO INTERSTÍCIO PULMONAR

## BRONCHOALVEOLAR LAVAGE: ANALYSIS OF CELL PROFILES IN INTERSTITIAL LUNG DISEASES

### **Autor**

Marisa Catarino, *MSc*

### **Centro de execução do trabalho**

Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, E.P.E

### **Local de atividade na altura da execução do trabalho**

Laboratório de Hematologia, Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, E.P.E – Hospital de Santa Maria

### **Conflitos de interesse**

Declaro que não possuo conflito de interesses de ordem financeira, comercial, político, académico ou pessoal

### **Fontes de Financiamento**

Não existiu qualquer fonte de financiamento para a realização do estudo

### **Contacto do autor responsável**

marisa\_catarino@hotmail.com

### **Tipo de estudo**

Estudo retrospectivo não interventivo

## Resumo

### Introdução

A lavagem broncoalveolar é uma técnica aceita como meio complementar de diagnóstico em várias patologias do pulmão. Nas últimas três décadas, vários trabalhos confirmaram que ela reflete a celularidade existente no alvéolo e no interstício.

### Objetivos

A fim de compreender melhor a composição dos diferentes perfis celulares, que podem ser encontrados no lavado broncoalveolar e tentar apurar o interesse preditivo deste teste, na evolução e prognóstico das doenças do interstício pulmonar, foram estudadas várias doenças tais como a sarcoidose, a pneumonia, a fibrose pulmonar, a tuberculose, a alveolite, as neoplasias e o lúpus eritematoso sistêmico.

### Material e Métodos

Foi efetuada a determinação do número de células/mL, da % de linfócitos, da determinação da razão CD4/CD8 e da observação da morfologia celular, durante o período compreendido entre Março de 2010 e Março de 2011. A determinação dos perfis celulares e a observação da morfologia foram executados em citoesfregaços corados com a coloração de Leishman. A razão entre as subpopulações linfocitárias CD4/CD8 foi determinada por citometria de fluxo.

### Resultados

Nos doentes com sarcoidose encontraram-se diferenças estatisticamente significativas relativamente ao número de células encontrados no lavado broncoalveolar ( $296,4 \times 10^6/\text{mL}$ ) e nº de leucócitos no sangue periférico ( $7,8 \times 10^6/\text{mL}$ ) quando comparados com os valores de referência. As patologias que recorreram ao estudo do lavado broncoalveolar, apresentaram todas um aumento do nº de células, sendo a pneumonia a que apresentou o valor mais elevado ( $830 \times 10^6/\text{mL}$ ). A % de linfócitos (20,4%) e a razão CD4/CD8 (6,9) encontradas no grupo com diagnóstico de sarcoidose foram superiores aos valores normais (respetivamente 9,4% e 1,7). A fibrose pulmonar apresentou uma razão CD4/CD8 (0,8) inferior ao normal (6,9), com  $p=0,002$ . **Discussão/Conclusão:** Quando interpretado no contexto clínico e radiológico e associado a outros exames complementares de diagnóstico, o lavado broncoalveolar, acompanhado da correta informação clínica e dos dados fornecidos pela citometria de fluxo e pela análise morfológica, fornece uma informação valiosa para o estabelecimento do diagnóstico das doenças do interstício pulmonar.

### Palavras-chave

Lavagem broncoalveolar. [E05.927.100]; Citometria de fluxo. [E05.200.500.386.350]; Contagem de células. [E01.370.225.500.195];

## Abstract

### Introduction

Bronchoalveolar lavage is a technique accepted as a complementary diagnostic in various diseases of the lung. In the last four decades, several studies confirmed that reflects the existing cellularity in alveolar and interstitial area.

### Objectives

In order to better understand the composition of the different cellular profiles that can be found in bronchoalveolar lavage and to try to establish the predictive interest of this test in the evolution and prognosis of interstitial lung diseases, several diseases were studied, such as sarcoidosis, pneumonia, pulmonary fibrosis, tuberculosis, alveolitis, neoplasms and systemic lupus erythematosus.

### Methods

Was performed the determination of the number of cells /ml, % of lymphocytes, determination of the CD4/CD8 ratio and the observation of cell morphology. The determination of cell profiles and observation of the morphology were performed on cytospin smear stained with Leishman stain. The ratio between the CD4/CD8 lymphocyte populations was determined by flow cytometry.

### Results

The pathologies studied showed an increase in the number of cells, pneumonia being the one with the highest value ( $830 \times 10^6/\text{mL}$ ). In the group of patients with sarcoidosis, statistically significant differences were found regarding the number of cells found in the bronchoalveolar lavage ( $296,4 \times 10^6/\text{mL}$ ) and the number of leukocytes in the peripheral blood ( $7,8 \times 10^6/\text{mL}$ ) when compared to the reference values. The % of lymphocytes (20,4%) and the CD4/CD8 ratio (6.9) found in the group with sarcoidosis were higher than the normal values (9,4% and 1.7). Pulmonary fibrosis had a CD4/CD8 ratio (0.8) lower than normal (6.9), with  $p=0.002$ .

### Discussion/Conclusions

When interpreted in the clinical and radiological context and associated with other diagnostic exams, bronchoalveolar lavage, accompanied by the correct clinical information and data provided by flow cytometry and morphological analysis provides valuable information for establishing the diagnosis of interstitial lung diseases.

### Keywords

Bronchoalveolar lavage. [E05.927.100]; Flow Cytometry. [E05.200.500.386.350]; Cell Count. [E01.370.225.500.195];

## Introdução

A análise do lavado broncoalveolar (LBA) começou por ser desenvolvida como técnica de investigação, mas atualmente consiste num meio de diagnóstico valioso na recolha e pesquisa de células envolvidas nos mecanismos celulares e inflamatórios da patogénese das doenças do interstício pulmonar (DIP). Quando em 1967 Shigeto Ikeda introduziu pela primeira vez o uso do broncofibroscópio flexível o seu impacto na prática clínica foi imediato. Bem tolerado por humanos, este método seguro e pouco invasivo, permitiu que se realizasse de forma rotineira a análise de amostras do pulmão com instalação de pequenas quantidades de solução de lavagem permitindo diferenciar diferentes tipos de DIP<sup>1</sup>. A análise citológica do LBA possibilita a investigação dos fenómenos imunológicos e inflamatórios do trato respiratório de indivíduos normais, bem como estabelecer o diagnóstico diferencial das diferentes DIP e ao mesmo tempo excluir infeções e malignidade com elevado grau de confiança<sup>2</sup>. O objetivo da realização da contagem diferencial no LBA de um doente com suspeita de DIP é a identificação ou exclusão de um padrão celular, cujo predomínio de células inflamatórias específicas está correlacionado como o aumento da probabilidade de certos tipos de DIP<sup>3</sup>. A boa tolerância ao procedimento e a relativa ausência de complicações são fatores que contribuíram para a expansão da sua utilização, revelando ser um método vantajoso, em detrimento de métodos invasivos como a biópsia pulmonar e em situações em que estas estão contraindicadas (alterações da coagulação)<sup>4</sup>. Atualmente a análise citológica, em conjunto com os dados fornecidos pela citometria de fluxo contribui para o diagnóstico diferencial das DIP, monitoriza o percurso da doença, identifica fatores de prognóstico, avalia a eficácia terapêutica e complementa o diagnóstico feito por outros métodos desde que a clínica, os exames imagiológicos e funcionais também revelem alterações substanciais e compatíveis<sup>5-7</sup>. Com o objetivo de interpretar e compreender melhor os diferentes perfis celulares encontrados em patologias que recorrem à análise do LBA, estudamos esses perfis para avaliar o seu interesse preditivo na evolução e prognóstico das DIP.

## Métodos

Foi obtido um parecer favorável pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, E.P.E para publicação deste trabalho.

### Análise estatística

A análise estatística efetuou-se com o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows v. 17.0 e foram utilizados os testes de Wilcoxon e Mann-Whitney.

### Receção e acondicionamento de amostras

As seringas de LBA foram transportadas em gelo e rececionadas pelo Serviço de Patologia Clínica num período máximo até 2h após a colheita.

### Processamento de amostras para contagens celulares

O conteúdo das seringas foi homogeneizado, misturado e passado através de 2 gazes esterilizadas dentro de um funil de vidro, diretamente para uma proveta graduada. Anotou-se o volume em mL. Do volume total separou-se uma alíquota para um tubo de hemograma (2,7 mL aproximadamente) e procedeu-se à contagem celular total, em contador hematológico (Modelo Sysmex XE 2100™), registando-se o número de leucócitos / mL de LBA recuperado. Em seguida, realizaram-se dois citoesfregaços identificaram-se as lâminas e adaptaram-se ao suporte metálico para citofunil. Pipetaram-se 3 gotas de LBA para o citofunil e foi efetuada uma citocentrifugação a 800 rpm, durante 5 minutos. As células presentes na amostra ficaram concentradas numa zona circular. Após secagem breve, as lâminas foram coradas com corante de Leishman, durante 1 minuto e em seguida, cobertas com água tamponada (pH 6,6), durante 10 minutos. Os resultados da contagem dos diferentes tipos de células presentes efetuadas num total de 200 foram expressos em percentagem.

### Processamento de amostras para aquisição por citometria de fluxo

Após a contagem total e diferencial das células do LBA homogeneizou-se o restante volume de amostra e distribuiu-se por vários tubos de plástico de fundo redondo (capacidade 10 mL) que foram tapados e centrifugados a 1800 rpm, durante 5 minutos. Após centrifugação decantaram-se os tubos por inversão ficando só o sedimento. Foi adicionado ao primeiro

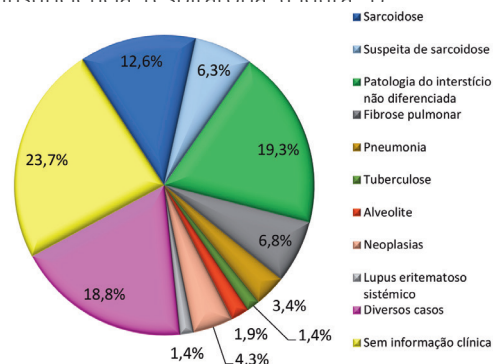
tubo cerca de 1 a 2 mL de tampão de fosfato-salino (PBS) para ressuspender o pellet obtido, sendo esta suspensão transferida para o próximo tubo, repetindo este procedimento para os tubos seguintes até chegar ao último. Centrifugou-se o último tubo da suspensão contendo a totalidade do material, durante 5 minutos e a 1800 rpm. Após centrifugação, o sedimento celular obtido foi novamente ressuspensionado em 1 a 2 mL de PBS e transferiu-se para um tubo de hemograma, ficando desta forma disponível para processamento. Com as repetidas ressuspensões celulares, estima-se que ocorra perda de células durante o processamento (+/- 25%). Foram usados de tubos de plástico para evitar perda de células, uma vez que a utilização de material de vidro favorece a adsorção das mesmas à sua superfície<sup>8</sup>. O preparador automático PrepPlus™ pipetou 10µL do reagente monoclonal CD45-FITC/CD4- RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 para um tubo de plástico e 10µL de reagente monoclonal CD45- FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 para um segundo tubo de plástico. Em ambos os tubos foram colocados 100 µL da amostra, previamente preparada. As amostras foram homogeneizadas no vórtex durante uns segundos, depois colocaram-se no escuro, durante 15 minutos e à temperatura ambiente. Após a incubação as amostras foram introduzidas no preparador automático TQ Prep™, onde foram tratadas com o reagente de lise (IMMUNOPREP™) para destruir os eritrócitos, obtendo-se assim os leucócitos para posterior análise por citometria de fluxo. Adquiriram-se 100.000 células de cada suspensão para análise no citômetro. Utilizou-se a solução de PBS, por não conter íons de cálcio nem de magnésio e minimizar a agregação celular<sup>8</sup>.

## Resultados

### Patologias analisadas

A informação clínica associada aos LBA analisados permitiu-nos subdividi-los em diferentes grupos, de acordo com as respetivas patologias: sarcoidose, suspeita de sarcoidose, patologia do interstício não definida (PIND), fibrose pulmonar (FP), pneumonia, tuberculose, alveolite, neoplasias, lúpus eritematoso sistémico (LES), e diversos casos e sem informação clínica. O grupo sem informação clínica associada foi o mais representativo (23,77%), da totalidade dos LBA analisados, seguindo-se o das PIND (19,3%), o grupo “diversos casos” representado por 18,8%

e a sarcoidose (12,6 %). O grupo das neoplasias (4,4%) incluiu 1 do pulmão, 1 do mediastino e 7 de origem hematopoiética. No grupo das pneumonias (3,5%) constavam 2 casos de pneumonia eosinofílica, 1 por adenovírus e 4 adquiridas na comunidade. O subconjunto “diversos casos”, que incluiu 39 LBA (18,8%), apresentou informação clínica variável, nomeadamente alterações imagiológicas, tosse, nódulos pulmonares, hipereosinofília pulmonar, esclerodermia, conectivite, asbestose, vasculite, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e insuficiência respiratória (Figura 1)



**Figura 1** - Situações patológicas cujos lavados broncoalveolares foram analisados.

Para a totalidade dos LBA analisados (n=203) o valor médio, obtido para a contagem celular foi de  $407 \times 10^6/\text{mL}$ . Encontraram-se valores médios de 70,3% para os macrófagos alveolares, de 14,7% para os linfócitos, de 10,2% para os neutrófilos e de 2,4% para os eosinófilos. Para a razão CD4/CD8 foi obtido um resultado médio de 6,9 (n=68). Como controlo normal foram usados valores médios de Autores, que analisaram o LBA de indivíduos saudáveis, obtendo-se assim o valor usado como controlo normal de  $116,3 \times 10^6/\text{mL}$ <sup>9-18</sup>. Nos LBA estudados foram analisados os seguintes parâmetros: volume (em mL), contagens totais de leucócitos, contagens diferenciais de linfócitos e determinação da razão CD4/CD8.

### Volume recuperado e células/mL obtidas

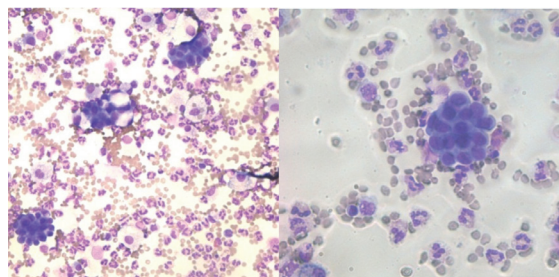
Foi observada uma grande variação nos volumes de LBA rececionados no laboratório (de 0,5 a 100 mL). Observou-se que quanto maior o volume recuperado, mais elevada foi a contagem do número de células/mL ( $r=0,307$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Contagem do número de leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$  e volume de lavado broncoalveolar recuperado (mL)

Volume recuperado no LBA mL	Número de amostras d LBA	Valor médio do nº de células $\times 10^6/\text{mL}$ (LBA)
0-20	42	250,45
21-40	57	304,96
41-60	49	428,75
61-80	26	444,30
81-100	3	781,00
Total	177	

### Contagens celulares

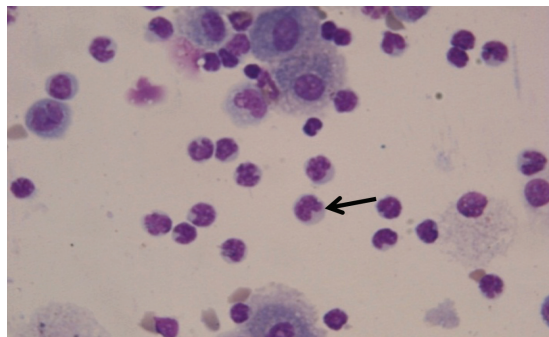
Em todas patologias estudadas com  $N < 10$  (pneumonia, neoplasias, tuberculose, alveolite e LES) foi observado um valor médio do nº de células obtidas no LBA superior ao valor normal encontrado na literatura ( $\bar{x} = 116,3 \times 10^6$  células/mL). Os valores obtidos para o nº de células totais foi de  $830 \times 10^6/\text{mL}$  para os pacientes com pneumonia ( $n=6$ ) e as neoplasias ( $n=9$ ) apresentaram o valor médio de  $247,3 \times 10^6$  células/mL. Nos esfregaços destes pacientes, por vezes e ocasionalmente foram observadas células neoplásicas no LBA (Figura 2).



**Figura 2** - Lavado broncoalveolar com presença de ninhos de células com morfologia sugestiva de células neoplásicas. Ampliação de 400x (esquerda) e de 1000x (direita). Coloração de Leishman.

As contagens das células totais foram de  $362,3 \times 10^6/\text{mL}$  para o grupo com tuberculose ( $N=3$ ), de  $352,3 \times 10^6/\text{mL}$  para o grupo com alveolite ( $n=4$ ) e de  $802,3 \times 10^6/\text{mL}$  para o grupo com LES ( $N=3$ ). Para as pneumonias, neoplasias, tuberculoses, alveolite e LES não se observaram diferenças estatisticamente significativas quando os respetivos resultados foram comparados com os controlos normais. Na análise da morfologia de alguns esfregaços de DIP

foram, eventualmente, observados linfócitos com chanfradura nuclear (figura 3) compatíveis com achados encontrados em LBA de doentes com pneumonite de hipersensibilidade<sup>19</sup>.



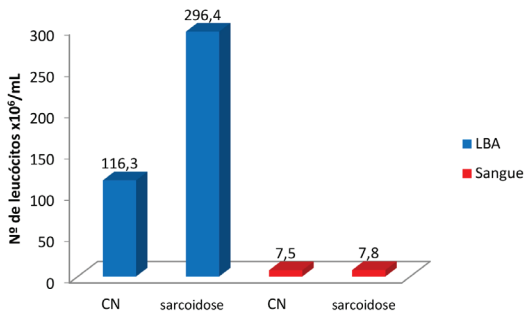
**Figura 3** - Linfócitos com dismorfia do núcleo ( ← ) (celularidade total:  $189 \times 10^6/\text{mL}$ ). Coloração de Leishman.

Nas patologias com número de casos estudados superior a 10 ocorreu sempre o aumento do nº de células/mL de LBA. O grupo Sarcoidose incluiu 26 amostras de sarcoidose com diagnóstico confirmado e 13 amostras com diagnóstico aguardando a confirmação ( $N=39$ ). Neste grupo, o valor médio do nº de células/mL foi de  $297,4 \times 10^6/\text{mL}$  e o dos controlos normais foi de  $116,3 \times 10^6/\text{mL}$ . Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes e os controlos normais ( $p < 0,001$ ). Os doentes com PIND ( $N=40$ ) apresentaram um valor médio de  $343,9 \times 10^6/\text{mL}$  para a contagem celular e na FP ( $N=14$ ) o valor encontrado foi de  $421,5 \times 10^6/\text{mL}$ . Nestas situações estudadas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes e os controlos normais ( $p < 0,001$ ).

### Sarcoidose

#### Contagens celulares totais em lavado broncoalveolar e no sangue periférico

As amostras de LBA com diagnóstico de sarcoidose confirmada ( $N=26$ ) incluíram 14 homens e 12 mulheres e apresentaram o valor médio de  $296,4 \times 10^6$  células/mL, superior ao valor normal encontrado pelos Autores selecionados ( $\bar{x} = 116,3 \times 10^6/\text{mL}$ ) (Figura 4).

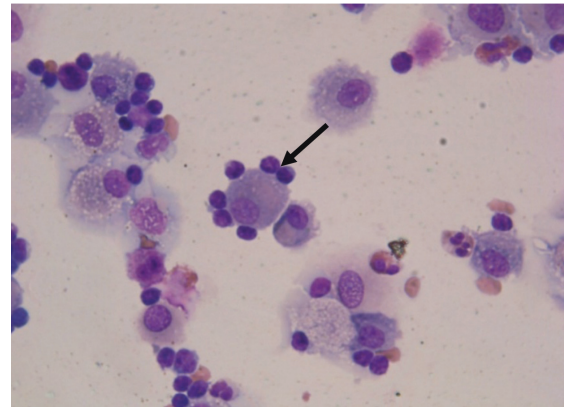


**Figura 4** - Contagens celulares obtidas em lavados broncoalveolares e em sangues de controles normais (CN) e indivíduos com sarcoidose.

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados encontrados para os pacientes e os dos controles normais ( $p=0,002$ ). A totalidade das amostras de sangue periférico analisadas ( $N=106$ ) revelaram um valor médio de  $8,7 \times 10^6$  leucócitos/mL. As amostras de sangue dos doentes com sarcoidose ( $N=14$ ) incluíram 9 indivíduos do sexo masculino e 5 do sexo feminino tendo os pacientes apresentado o valor médio igual a  $7,8 \times 10^6$  leucócitos/mL, ligeiramente superior ao normal médio encontrado na literatura ( $7,5 \times 10^6$ /mL). Não foram encontradas diferenças significativas entre estes valores, contrariamente ao que aconteceu no LBA. Os resultados sugerem que a utilização do LBA para estudo da sarcoidose é mais útil que as amostras sanguíneas.

### Linfócitos

No grupo Sarcoidose ( $N=39$ ), incluiu 26 amostras de sarcoidose confirmada e 13 amostras com diagnóstico de sarcoidose aguardando confirmação, e apresentou o valor médio da % de linfócitos (20,4 %) superior ao normal (9,4%), sendo  $p=0,003$  (Fig.8). Os dados analisados mostram que, nesta patologia, o nº de linfócitos no LBA se encontram frequentemente aumentados. No esfregaço destes pacientes por vezes ocorre a formação de rosetas (conjuntos de linfócitos revestindo os macrófagos) (Figura 5).



**Figura 5** - Lavado broncoalveolar de indivíduo com linfocitose (81% de linfócitos) evidenciando rosetas de linfócitos/macrófagos ( ← ). Coloração de Leishman. Ampliação 1000x.

### Razão CD4/CD8

No grupo Sarcoidose analisado foram incluídas 15 amostras com diagnóstico de sarcoidose confirmada e 9 amostras com diagnóstico de sarcoidose aguardando confirmação ( $N=24$ ) e apresentou um valor médio para a razão CD4/CD8 (6,9) superior ao normal (1,7) ( $p=0,001$ ).

### Fibrose pulmonar

O nº de amostras com FP analisadas foi bastante reduzido ( $N=3$ ). A razão CD4/CD8 apresentou o valor médio de 0,4 inferior ao do controlo normal (1,7) com  $p=0,002$ . Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,003$ ) entre os valores obtidos do grupo Sarcoidose (6,9) e o grupo FP (0,4).

### Discussão

#### Volume recuperado

Nas diferentes amostras de LBA analisadas foi observada uma grande variedade patologias, sendo as de maior representatividade as patologias do interstício não determinadas (PIND) (19,3%) e a sarcoidose (12,6%). Foi verificado uma grande discrepância nos volumes rececionados (volume recuperado de LBA após broncofibroscopia

variou entre 0,5 e 100 mL), tendo se observado que a um maior volume recuperado (81-100 mL) correspondeu, também, um maior nº de células ( $781 \times 10^6/\text{mL}$ ). A discrepância observada nos volumes rececionados ocorre porque o volume recuperado sofre variações, dependentes da experiência do operador na realização da técnica, da boa ou má “encravação” do broncofibroscópio nos brônquios, da fácil colapsidade destes, do grau de tolerância do doente à técnica, da indução de tosse pelo paciente, da deterioração funcional e do tipo de patologia subjacente que condicionam a % de LBA recuperado. Particularmente nas doenças pulmonares, vários fatores podem influenciar a recuperação do LBA e podem levar a dificuldade na recuperação do fluido instilado, que ocorre principalmente nas doenças obstrutivas. Apesar deste facto, a maioria dos Autores menciona que uma % de volume recuperado entre os 40 a 70%, correlaciona-se com o número total de células obtidas<sup>1,20</sup>.

#### Valor de controlo normal

Nas patologias analisadas, todos os parâmetros estudados (contagem celular, % de linfócitos e razão CD4/CD8) foram comparados com controlos normais (CN). O valor do CN utilizado neste estudo foi obtido a partir da média de resultados referenciados por diversos Autores na literatura, que realizaram o LBA em indivíduos saudáveis. Os LBA disponíveis para execução deste trabalho não incluíram amostras normais dado que este exame foi apenas realizado em situações em que existe suspeita de DIP.

#### Valor médio do nº de células

O valor médio do nº de células no LBA em todas as patologias estudadas foi superior ao normal ( $\bar{x} = 116,3 \times 10^6/\text{mL}$ ), tendo os resultados mais elevados ocorrido na pneumonia ( $830,00 \times 10^6/\text{mL}$ ) e no LES ( $802,33 \times 10^6/\text{mL}$ ) verificando-se diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ).

As diferentes DIP apresentam alterações nos perfis celulares do LBA que refletem transformações patológicas no parênquima pulmonar. Estes resultados sugerem que a determinação da celularidade total no LBA nas várias DIP é uma ferramenta útil de diagnóstico diferencial uma vez que a presença de valores normais poderão excluir a presença de doenças específicas.

#### Valor médio do nº de células no sangue e no LBA de doentes com sarcoidose

Uma vez que a sarcoidose está amplamente caracterizada na literatura por um aumento do número absoluto e relativo dos linfócitos e por um aumento da relação CD4/CD8 no LBA, teve interesse estudar-se neste grupo de doentes a contagem celular (no LBA e no sangue), a % de linfócitos e a determinação da razão CD4/CD8.

Na determinação da contagem celular os doentes com sarcoidose confirmada (N=26) apresentaram um valor médio do nº de células no LBA de  $296,4 \times 10^6/\text{mL}$  superior ao normal ( $\bar{x} = 116,3 \times 10^6/\text{mL}$ ), verificando-se diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,002$ ). As amostras de sangue (n=14) apresentaram uma contagem de  $7,8 \times 10^6/\text{mL}$ , valor próximo do normal ( $7,5 \times 10^6/\text{mL}$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre estes valores, contrariamente ao que aconteceu no LBA. Tal constatação sugere que o estudo do LBA, em pacientes com sarcoidose é mais interessante que a contagem celular sanguínea. O aumento do nº de células no LBA de doentes com sarcoidose reflete a inflamação intersticial subjacente, semelhante ao processo inflamatório que é encontrado em todos os órgãos afetados pela doença<sup>21</sup>.

#### Sarcoidose: determinação do valor médio da % de linfócitos e razão CD4/CD8

Para a determinação da % de linfócitos no LBA do grupo sarcoidose (n=39) estes doentes apresentaram um o valor médio de linfócitos de 20,4 %, superior ao normal (9,4%). O aumento de linfócitos observado neste estudo apoia o diagnóstico de sarcoidose embora esta linfocitose se possa encontrar em outras doenças granulomatosas como a pneumonite de hipersensibilidade, berlíose, proteinose alveolar, pneumoconiose, colagenoses, doença de Crohn, tuberculose e pneumonia de origem viral<sup>21</sup>. A determinação da razão CD4/CD8 no grupo sarcoidose (N=24) apresentou um valor médio (6,9) superior ao normal (1,7).

Em suma, no LBA destes doentes foi observado um aumento da celularidade, aumento da % de linfócitos e da razão CD4/CD8 em relação ao normal. O aumento da celularidade, aumento na % de linfócitos e aumento da razão CD4/CD8 no LBA do grupo de doentes estudados com sarcoidose vão de encontro com a hipótese diagnóstica, estando

de acordo com o que vários autores descrevem amplamente na literatura. A % de linfócitos e a razão CD4/CD8 no LBA não são específicos de nenhuma doença pulmonar, contudo, estes dois parâmetros quando combinados aumentam a probabilidade do diagnóstico de sarcoidose eliminando a necessidade de realização de biópsia pulmonar em 40 a 60%<sup>22</sup>. Embora algumas DIP tenham padrões celulares altamente característicos, como é o caso da sarcoidose, estes resultados por si só requerem interpretação junto com outros detalhes clínicos e radiográficos<sup>7</sup>.

Foram observados em alguns esfregaços de LBA com predomínio de linfócitos, rosetas de linfócitos e macrófagos, em que os linfócitos estão aderidos à superfície de macrófagos alveolares, que não caem e não são fagocitados por estes. Este fenômeno é descrito na literatura por Peripolysis e foi descrito pela primeira vez como um provável mecanismo fisiológico envolvido na regulação da resposta imunitária no pulmão. Mais tarde foi colocada a hipótese destas rosetas se formarem devido à apresentação ativa do antigénio no foco de inflamação ou o reflexo de granulomas que libertam mediadores e recrutam outras células do sistema imunológico para o parênquima pulmonar. Todavia, é consensual que rosetas não são específicas de doença granulomatosa, mas estão fortemente associados a patologias com um aumento de linfócitos no LBA<sup>23</sup>.

### Fibrose pulmonar

A FP (n=3) apresentou o valor médio da razão CD4/CD8 de 0,4, sendo inferior ao normal (1,7), verificando-se uma diferença estatisticamente significativa (p=0,003) que ocorreu entre os valores obtidos nestes pacientes e os encontrados nos doentes com sarcoidose (6,9), o que sugere que este parâmetro possa ser relevante para o diagnóstico diferencial destas duas situações patológicas. Contudo será necessária uma amostragem mais expressiva para se obter resultados mais confiáveis.

### Conclusão

O LBA é uma fonte de informação com inúmeras potencialidades, contudo a sua aplicação clínica torna-se um desafio uma vez que para que os dados fornecidos sejam úteis deverão compreender-se melhor os seus aspetos técnicos e limitações (colheita, transporte, quantidade e qualidade da amostra recuperada). A adoção de um procedimento padronizado irá contribuir para aumentar a probabilidade de identificação de diferenças clinicamente relevantes entre doenças e estádios de doença.

Salienta-se também a importância da morfologia celular como um dado relevante que contribui para complementar o diagnóstico na distinção das diferentes DIP. São exemplo disso a presença de rosetas de macrófagos e linfócitos, presença de células neoplásicas, linfócitos com alterações nucleares, entre outros, que em conjunto com os dados da contagem celular e da imunofenotipagem ajudam a estreitar o diagnóstico diferencial. Apesar destes dados não serem específicos de nenhuma doença pulmonar, contribuem para fazer um diagnóstico confiável eliminando a necessidade de recorrer a biópsia pulmonar<sup>7,24</sup>.

Nas últimas décadas, outros novos biomarcadores foram explorados com resultados promissores para pacientes com sarcoidose, mas nenhum biomarcador "gold standard" foi ainda definido para o diagnóstico ou previsão do curso da doença<sup>25</sup>.

## Referências Bibliográficas

1. Reynolds HY. Use of Bronchoalveolar Lavage in Humans – Past Necessity and Future Imperative. *Lung* 2000; 178(5): 271-293.
2. Alfaro T, Cordeiro C. Bronchoalveolar lavage. *ERS Monogr* 2016; 71: 74–81.
3. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185(9): 1004-14.
4. Gharsalli H, Mlika M, Sahnoun I, Maalej S, Douik El Gharbi L, Mezni FE. The utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung diseases: A clinicopathological perspective. *Semin Diagn Pathol*. 2018; 35(5): 280-287.
5. Cordeiro R. Lavado broncoalveolar – O estado da arte. *Revista portuguesa de Pneumologia*. 2000; 6(4): 283-295.
6. Ward C, Walters EH. Bronchoalveolar Lavage (BAL): Critical Evaluation of Techniques. *Methods Mol Med*. 2001; 56: 31-59.
7. Davidson KR, Ha DM, Schwarz MI, Chan ED. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic procedure: a review of known cellular and molecular findings in various lung diseases. *J Thorac Dis*. 2020; 12(9): 4991-5019.
8. Martin J. Guia de procedimientos – Lavado Broncoalveolar. *Neumosur: Revista de La Asociación de Neumólogos del sur*. 1994; 2(6): 34-39.
9. Pingleton SK, Harrison GF, Stechschulte DJ, Wesselius LJ, Kerby GR, Ruth WE. Effect of location, pH, and temperature of instillate in bronchoalveolar lavage in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis*. 1983; 128(6): 1035-7.
10. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. The BAL Cooperative Group Steering Committee. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 141(5 Pt 2): S169-202.
11. Yeager H Jr, Williams MC, Beekman JF, Bayly TC, Beaman BL. Sarcoidosis: analysis of cells obtained by bronchial lavage. *Am Rev Respir Dis*. 1977; 116(5): 951-4.
12. Low RB, Davis GS, Giancola MS. Biochemical analyses of bronchoalveolar lavage fluids of healthy human volunteer smokers and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis*. 1978; 118(5): 863-75.
13. Merrill WW, Reynolds HY. Bronchial lavage in inflammatory lung disease. *Clin Chest Med*. 1983; 4(1): 71-84.
14. Velluti G, Capelli O, Lusuardi M, Braghiroli A, Azzolini L. Bronchoalveolar lavage in the normal lung. 2. Cell distribution and cytomorphology. *Respiration*. 1984; 46(1): 1-7.
15. Laviolette M, Carreaux M, Coulombe R. Bronchoalveolar lavage (BAL) cell differentials on microscope glass cover. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 138: 451-457.
16. Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Rühle KH, Matthys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest*. 1986; 90(1): 39-44.
17. Etensohn DB, Jankowski MJ, Duncan PG, Lalor PA. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. I. Technical aspects and intersubject variability. *Chest*. 1988; 94(2): 275-80.
18. Merchant RK, Schwartz DA, Helmers RA, Dayton CS, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage cellularity. The distribution in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 146(2): 448-53.
19. Taniuchi N, Ghazizadeh M, Enomoto T, Matsuda K, Sato M, Takizawa Y, et al. Evaluation of fractional analysis of bronchoalveolar lavage combined with cellular morphological features. *Int J Med Sci*. 2009; 6(1):1-8.
20. Collins AM, Rylance J, Wootton DG, et al. Bronchoalveolar lavage (BAL) for research; obtaining adequate sample yield. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2014; (85):4345. Published 2014 Mar 24.
21. Barnard J, Newman LS. Sarcoidosis: immunology, rheumatic involvement, and therapeutics. *Curr Opin Rheumatol*. 2001; 13(1): 84-91.
22. Capelozzi VL, Faludi EP, Balthazar AB, Fernezlian Sde M, Filho JV, Parra ER. Bronchoalveolar lavage improves diagnostic accuracy in patients with diffuse lung disease. *Diagn Cytopathol*. 2013; 41(1): 1-8.
23. Bauer RA, Sawyer RT, Daniloff E, Balkissoon R, Rose CS, Newman LS. Bronchoalveolar lavage macrophage-lymphocyte clusters in granulomatous disease are linked to lymphocytosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2000; 17(2): 174-80.
24. Lee W, Chung WS, Hong K, Huh J. Clinical Usefulness of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis and Lymphocyte Subsets in Diffuse Interstitial Lung Diseases. *Ann Lab Med* 2015; 35: 220-225.
25. Pattnaik B, Sryma PB, Mittal S, Agrawal A, Guleria R, Madan K. MicroRNAs in pulmonary sarcoidosis: A systematic review. *Respir Investig*. 2020; 58(4): 232-238.