

# La suberosis: implicación de los mastocitos broncoalveolares en la génesis de la afectación intersticial

L. Delgado, C. Cuesta, J.C. Winck\*, J.M. Sapage\*, J. Moura e Sá\* y J.A. Fleming Torrinha

Servicio de Inmunología. Facultad de Medicina. Hospital de Sao João. Oporto.

\*Departamento de Neumología. Centro Hospitalario de Vila Nova de Gaia. Portugal.

La enfermedad respiratoria de los trabajadores de la industria del corcho –suberosis– puede presentarse clínicamente bajo la forma de neumonitis de hipersensibilidad (NH) o de enfermedad pulmonar obstructiva (EPO), con un cuadro asmático o de bronquitis crónica. Los mastocitos son importantes células inflamatorias del pulmón que están particularmente implicadas en la liberación rápida de mediadores broncoconstrictores y en la producción de citocinas y mediadores que modulan la actividad de los fibroblastos. Se ha descrito un aumento del número de mastocitos en el lavado broncoalveolar (LBA) en las enfermedades pulmonares intersticiales, indicando su participación en la inflamación crónica y la fibrosis pulmonar.

**OBJETIVOS:** El objetivo fue valorar la participación de los mastocitos en la inflamación pulmonar intersticial en los trabajadores de la industria del corcho analizando su presencia en el LBA por métodos histoquímicos. Con la posibilidad de una implicación de los mastocitos broncoalveolares en la patogénesis de la suberosis, también estudiamos su relación con los distintos cuadros clínicos de la enfermedad, con los parámetros funcionales respiratorios y con la intensidad de la alveolitis.

**PACIENTES Y MÉTODOS:** Treinta y un trabajadores de la industria del corcho con síntomas respiratorios relacionados con la exposición ocupacional, evaluados por la historia clínica y ocupacional, examen físico, radiografía de tórax, ple-tismografía corporal/espirometría, difusión de CO (DLCO), gasometría arterial en reposo y broncofibroscopia con LBA. La clasificación de los enfermos –20 con NH y 11 con EPO– se realizó según criterios clínicos, funcionales y del análisis del líquido del LBA. La cuantificación de los mastocitos fue realizada en frotis de citocentrifugado del LBA comparando dos tinciones distintas –May-Grunwald-Giemsa (MGG) y azul de toluidina (AzTol)– y los recuentos de dos observadores.

**PRINCIPALES RESULTADOS:** Se confirmó una buena correlación entre los dos métodos de tinción ( $r_s = 0,86$ ;  $p < 0,0001$ ) y entre los recuentos de dos observadores (MGG [ $r_s = 0,86$ ] y AzTol [ $r_s = 0,87$ ];  $p < 0,0001$ ). El número de mastocitos en el LBA estaba significativamente más elevado en pacientes con

NH ( $\bar{X} \pm EPM$ ,  $13,4 \pm 4,5$ ) que en los que tenían EPO ( $0,9 \pm 0,3$ ;  $p < 0,002$ , test de Mann-Whitney). El subgrupo de 8 pacientes con mayor compromiso funcional respiratorio –capacidad vital (CV) y/o DLCO  $< 80\%$  del valor esperado– presentaba también un número significativamente más elevado de mastocitos en el LBA ( $19,9 \pm 7,7$  frente a  $3,5 \pm 1,7$ ;  $p = 0,002$ ). También encontramos una correlación negativa entre el número de mastocitos en el LBA y los parámetros funcionales respiratorios: capacidad pulmonar total (CPT) ( $r_s = -0,63$ ;  $p = 0,005$ ) y DLCO ( $r_s = -0,54$ ;  $p = 0,008$ ). El número de mastocitos recuperados en el LBA se correlacionó directa y significativamente con la intensidad de la alveolitis, la celularidad total ( $r_s = 0,62$ ;  $p = 0,002$ ), el número absoluto de linfocitos ( $r_s = 0,56$ ;  $p = 0,006$ ) y las concentraciones de albúmina ( $r_s = 0,68$ ;  $p = 0,003$ ).

**CONCLUSIONES:** Los resultados obtenidos indican que los mastocitos participan en la respuesta celular del intersticio pulmonar a la inhalación de polvos orgánicos del corcho, caracterizando particularmente las formas de NH. Por otro lado, su reclutamiento a la superficie broncoalveolar parece estar relacionado con la intensidad de la linfocitosis y de la inflamación del intersticio pulmonar, así como en el deterioro de la función respiratoria en estos pacientes.

**Palabras clave:** Mastocitos. Suberosis. Neumonitis de hipersensibilidad. Lavado broncoalveolar.

(Arch Bronconeumol 1999; 35: 71-78)

## Suberosis: involvement of bronchoalveolar mast cells in the etiology of interstitial disease

Suberosis –the lung disease suffered by cork industry workers– may present in the form of either hypersensitivity pneumonitis (HP) or obstructive pulmonary disease (OPD) with asthma-like symptoms or chronic bronchitis. Mast cells play an important role in pulmonary inflammation and are particularly implicated in the rapid release of mediators in bronchoconstriction and the production of cytokines and mediators of fibroblast activity. Increased numbers of mast cells are present in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in interstitial lung diseases, suggesting that these cells also participate in chronic inflammatory processes and in pulmonary fibrosis.

Correspondencia: Prof. Dr. L. Delgado.  
Serviço de Inmunologia. Faculdade de Medicina do Porto.  
4200 Porto, Portugal.  
E-mail: jdelgado@mail.telepac.pt

Recibido: 21-4-98; aceptado para su publicación: 1-9-98.

**OBJECTIVES:** To assess the participation of mast cells in interstitial pulmonary inflammation in cork industry workers by histochemically analyzing their presence in BAL fluid. Foreseeing the possible implication of bronchoalveolar mast cells in the pathogenesis of suberosis, we also studied their relation to various signs and symptoms of the disease, to respiratory function parameters and to degree of alveolitis.

**PATIENTS AND METHODS:** Thirty-one cork industry workers with respiratory symptoms related to occupational exposure were enrolled. Occupational and case histories were taken. Physical examinations were complemented by chest X-rays, plethysmography/spirometry, fiberoptic bronchoscopy with BAL, and determination of carbon monoxide diffusing capacity (DLCO) and arterial blood gases at rest. Patient classification (20 with HP and 11 with OPD) was based on clinical and functional criteria and analysis of BAL fluid. Mast cells in cytospinned samples treated with two different stains [May-Grunwald-Giemsa (MGG) and Toluidine Blue (Tol.Bl.)] were counted by two observers and the results were compared.

**MAIN RESULTS:** Good correlation between the two staining methods was confirmed ( $r_s = 0.86$ ,  $p < 0.0001$ ). Correlation between the two observers was also good (MGG  $r_s = 0.86$ , Tol.Bl.  $r_s = 0.87$ ,  $p < 0.0001$ ). The number of mast cells in BAL fluid was significantly higher in patients with HP [ $13.4 \pm 4.5$  ( $x \pm SEM$ )] than in those with OPD ( $0.9 \pm 0.3$ ;  $p < 0.002$ , Mann Whitney test). The subgroup of eight patients with poorer respiratory function (CV and/or DLCO  $< 80\%$  of reference value) also had higher mast cell counts in BAL ( $19.9 \pm 7.7$  versus  $3.5 \pm 1.7$ ;  $p = 0.002$ ). We also saw a negative relation between mast cell counts in BAL fluid and lung function parameters: total lung capacity ( $r_s = -0.68$ ,  $p = 0.005$ ) and DLCO ( $r_s = -0.54$ ,  $p = 0.008$ ). Mast cell recovery from BAL fluid was positively related to severity of alveolitis in terms of total cell counts ( $r_s = 0.62$ ,  $p = 0.002$ ), absolute lymphocyte counts ( $r_s = 0.56$ ,  $p = 0.006$ ) and albumin levels ( $r_s = 0.68$ ,  $p = 0.003$ ).

**CONCLUSIONS:** Our findings suggest that mast cells participate in interstitial lung cell response to the inhalation of organic cork dust, particularly when HP is the form of presentation. Moreover, mast cell recruitment on the alveolar surface seems to be related to the intensity of lymphocytosis and interstitial pulmonary inflammation and to lung function deterioration in affected patients.

**Key words:** Mast cells. Suberosis. Hypersensitivity pneumonitis. Bronchoalveolar lavage.

## Introducción

La suberosis es una enfermedad pulmonar ocupacional asociada a la exposición al polvo de corcho con moho. Habitualmente, está descrita como una enfermedad pulmonar intersticial —una neumonitis de hipersensibilidad (NH) o una alveolitis alérgica extrínseca<sup>1-4</sup>—, con la presencia de granulomas y sensibilización inmunológica a *Penicillium frequentans*<sup>2,5</sup>. Aun así, la participación predominante de las vías aéreas en algunas formas clínicas de la enfermedad, ya reconocida por Ávila y Villar<sup>1,2</sup> en la descripción original de esta patología, condiciona la aparición de cuadros clínicos del tipo bronquitis crónica o asma bronquial, cuyos mecanismos etiopatogénicos no están aún bien establecidos.

El lavado broncoalveolar (LBA) es un método simple para el estudio y la caracterización de la inflamación intersticial<sup>6</sup> y su utilidad en la evaluación diagnóstica de la patología del intersticio pulmonar está bien establecida<sup>7,8</sup>. Más recientemente, el LBA también se ha utilizado en la evaluación de las enfermedades respiratorias con implicación de las vías aéreas<sup>9-11</sup>. El hallazgo más característico en el LBA de las NH de los trabajadores de la industria del corcho es una intensa "alveolitis" linfocítica, predominantemente de linfocitos CD8+<sup>12</sup>, con diferentes fenotipos de linfocitos citotóxicos<sup>13</sup>.

Los mastocitos son importantes células inflamatorias que están involucradas en diversas situaciones de inmunopatología pulmonar<sup>14</sup>, donde han sido particularmente implicados en las formas de hipersensibilidad inmediata, a través de su unión de alta afinidad a la inmunoglobulina E (IgE) y liberación de mediadores broncoconstrictores después del contacto con el antígeno. A pesar de no estar descrita esta forma de hipersensibilidad inmunológica en la patogénesis de las NH<sup>3,4</sup>, datos recientes apuntan también hacia la participación de los mastocitos humanos en la inflamación crónica y la fibrosis pulmonar, posiblemente a través de la producción de citocinas y mediadores que modulan la actividad de los fibroblastos<sup>15,16</sup>. En este sentido, los mastocitos están habitualmente presentes en los alveolos del pulmón normal<sup>17,18</sup> y se ha descrito un aumento de su número en el LBA en enfermedades pulmonares intersticiales, especialmente en las NH<sup>19-22</sup>. De hecho, el número de mastocitos pulmonares está también aumentado en modelos experimentales de NH<sup>23</sup> y el desarrollo de esta enfermedad en los ratones deficientes en mastocitos (W/W<sup>v</sup>) depende del trasplante de mastocitos derivados de la médula ósea<sup>24</sup>.

El objetivo del presente estudio es valorar la presencia de mastocitos en el LBA de pacientes con síntomas respiratorios asociados a la exposición ocupacional en la industria del corcho y relacionarlos con las diferentes formas de presentación clínica. Además, en un intento de dilucidar la implicación de estas células en la patogénesis de la suberosis, estudiamos también la relación entre el número de mastocitos en el LBA y la gravedad de la enfermedad, cuando es valorada por parámetros clínicos y de laboratorio.

## Métodos

### Pacientes

Se realizó un LBA con fines diagnósticos en 31 pacientes (23 varones y 8 mujeres, edad media  $37.5 \pm 9.9$  años) con una exposición ocupacional en la industria del corcho de  $19.3 \pm 10.9$  años. Para valorar los síntomas respiratorios relacionados con la exposición, todos los pacientes fueron analizados mediante historia clínica y ocupacional, examen físico, radiografía de tórax, pletismografía corporal/espirometría (Erich Jaeger), difusión pulmonar de CO (DLCO), gasometría arterial en reposo y broncofibroscopia con LBA.

La clasificación de los pacientes en los diversos grupos estudiados fue hecha de acuerdo con criterios clínicos, funcionales y de análisis del líquido del LBA. Veinte pacientes fueron diagnosticados de NH por la presencia de tos y disnea de esfuerzo asociadas a síntomas generales de mialgias, astenia

TABLA I  
Características clínicas y funcionales respiratorias (% del valor esperado) en los 2 grupos de pacientes con síntomas respiratorios y exposición ocupacional en la industria del corcho

Diagnóstico	Sexo	Edad (años)	Exposición (años)	CV (%)	CVF (%)	VEMS (%)	IT (%)	CPT (%)	DLCO (%)
NH (n = 20)	16M/4F	34 ± 9	17,3 ± 9,8	82,6 ± 14,7	90,3 ± 18,9	85,8 ± 19,2	82,8 ± 10,6	97,7 ± 13,7	81,8 ± 23,7
EPO (n = 11)	7M/4F	44 ± 7	23,0 ± 12,3	102,0 ± 18,2	109,5 ± 16,5	94,3 ± 24,2	73,5 ± 10,8	108,9 ± 8,5	130,4 ± 20,0
p*	–	< 0,01	NS	< 0,005	< 0,005	NS	< 0,02	< 0,02	< 0,001

\*Por el test de Mann-Whitney. M: masculino; F: femenino; CV: capacidad vital; CVF: capacidad vital forzada; VEMS: volumen espiratorio máximo en el primer segundo; IT: índice de Tiffeneau; CPT: capacidad pulmonar total; DLCO: difusión pulmonar de CO; NS: no significativo.

TABLA II  
Características del lavado broncoalveolar (LBA) en los 2 grupos de pacientes con síntomas respiratorios y exposición ocupacional en la industria del corcho. Recuento diferencial en 500 células con el objetivo de 100x

Diagnóstico	Volumen (ml)	Células totales (×10 <sup>5</sup> ml <sup>-1</sup> )	Macrófagos alveolares (%)	Linfocitos (%)	PMN (%)	Eosinófilos (%)	Mastocitos (%)
NH (n = 20)	107 ± 24	11,1 ± 7,0	23,3 ± 14,1	71,1 ± 13,0	4,4 ± 4,0	0,7 ± 1,1	0,24 ± 0,32
EPO (n = 11)	101 ± 28	1,7 ± 0,8	71,6 ± 14,0	24,1 ± 3,9	3,1 ± 3,4	1,2 ± 2,2	0,05 ± 0,09
p*	NS	< 0,00001	< 0,0001	< 0,00001	NS	NS	0,07

\*Por el test de Mann-Whitney. NH: neumonitis de hipersensibilidad; EPO: enfermedad pulmonar obstructiva; PMN: polimorfonucleares neutrófilos; NS: no significativo.

y/o adelgazamiento, relacionados con la exposición, con o sin un síndrome ventilatorio restrictivo o defecto de difusión, y una celularidad aumentada en el LBA con alveolitis linfocítica intensa (≥ 40%)<sup>25,26</sup>. Los 11 pacientes restantes presentaron cuadros de enfermedad pulmonar obstructiva (EPO), con participación de las vías aéreas: 8 enfermos tenían asma bronquial, cursando con episodios de disnea en el trabajo con obstrucción reversible de las vías aéreas y/o hiperreactividad bronquial inespecífica significativa (Pc20 histamina ≤ 8 mg/dl), y se verificaron en 6 pacientes variaciones significativas de los débitos espiratorios en los períodos de trabajo (asma ocupacional); en 3 pacientes se hizo el diagnóstico de bronquitis crónica por tos y expectoración, la mayor parte de los días durante más de 3 meses, por lo menos 2 años, con obstrucción no reversible de las vías aéreas (sólo un ex fumador de 3 paquetes/año).

#### Lavado broncoalveolar

El LBA se realizó en el lóbulo medio o la llingula de acuerdo con las recomendaciones del European Task Group on BAL<sup>27</sup>. Se instilaron 4 × 50 ml de suero fisiológico, a 37 °C, aspirando suavemente el líquido después de cada instilación. El volumen recuperado después de la primera instilación fue medido y desechado. El líquido recuperado de las restantes muestras fue mezclado, y se valoraron la celularidad total (cámara de Neubauer) y la viabilidad (exclusión del azul tripano). El recuento diferencial fue realizado en preparaciones de citocentrifugado (Labofuge AE, Heraeus, Alemania), obtenidas con 40 µl de la muestra que contenían 500 células en microscopía de luz con el objetivo de 100x (teñidas por May-Grunwald-Giemsa [MGG]). Para el recuento de mastocitos, una de las preparaciones fue teñida con azul de toluidina (Az-Tol) previa fijación con metanol, siguiendo el método de Xaubet et al<sup>28</sup>; los recuentos se hicieron por dos observadores independientes, sin conocimiento del diagnóstico final, contando 20 campos adyacentes con un objetivo de 40x, y se compararon las dos tinciones empleadas (MGG y AzTol). La IgG y la albúmina fueron medidas en los sobrenadantes acelulares del LBA y en una muestra de suero por nefelometría cinética utilizando inmunosueros y calibradores para nefelometría (QM 300, Kallestad).

#### Análisis estadístico

Se utilizaron métodos no paramétricos en las comparaciones entre grupos o variables (test de Mann-Whitney) y correlación de Spearman (r<sub>s</sub>) y se consideró no significativa (NS) una p > 0,05. Los resultados son presentados en media aritmética ± desviación estándar (DE) de la media, excepto cuando esté indicado.

## Resultados

#### Características de los pacientes estudiados

De acuerdo con los resultados de la valoración clínica y del laboratorio, los pacientes fueron clasificados en 2 grupos: NH (n = 20) y EPO (n = 11), grupos que, teniendo en cuenta los criterios de inclusión, difirieron significativamente en los parámetros funcionales respiratorios (tabla I) y en los datos del LBA (tabla II). La edad media de los pacientes con NH fue más baja que en la EPO (34,0 ± 9,5 frente a 43,7 ± 7,4 años; p = 0,007), así como el tiempo medio de exposición, aunque éste no difiriera significativamente entre los 2 grupos (17,3 ± 9,8 frente a 23,0 ± 12,3; p = 0,22).

Seis de los pacientes con NH estaban retirados de la exposición, siendo incluidos en este estudio por mantener síntomas respiratorios y alteraciones en la valoración clínica y del laboratorio; de hecho, en relación a los normalmente expuestos, estos pacientes no diferían en los parámetros del LBA o funcionales respiratorios, presentando alguna disminución de los valores de IgG séricos y del LBA (media ± DE: suero, 2.290 ± 290 frente a 1.572 ± 155 mg/dl; LBA, 27 ± 5 frente a 11 ± 4 mg/dl; p = 0,08 en las dos comparaciones).

#### Identificación de los mastocitos en el LBA. Comparación de los dos métodos de tinción

Los mastocitos se identificaron por la presencia de numerosos gránulos citoplasmáticos basófilos adqui-

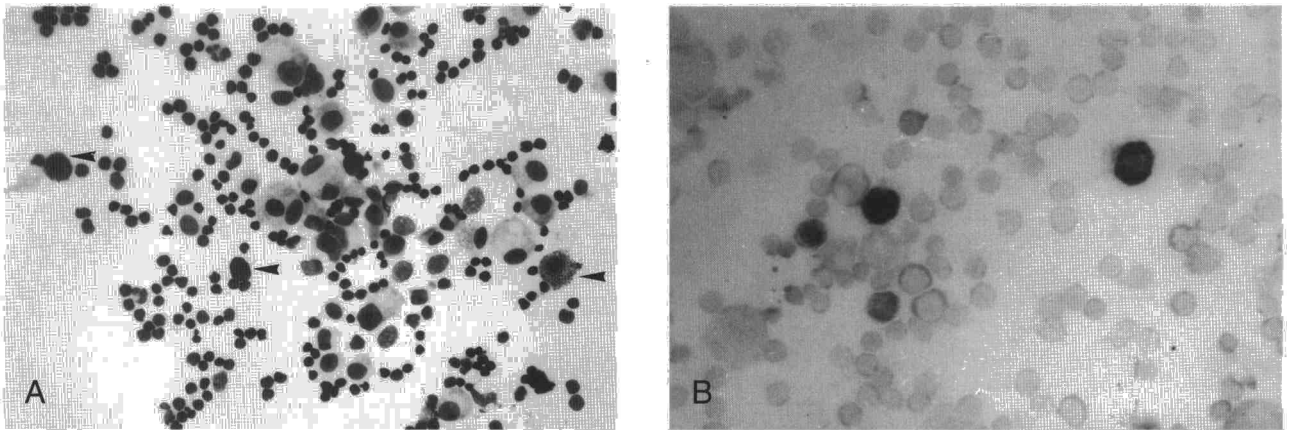


Fig. 1. Mastocitos en el lavado broncoalveolar (LBA) de la suberosis. Los mastocitos fueron identificados (flechas) por la presencia de gránulos citoplasmáticos basófilos en la tinción con May-Grunwald-Giemsa (MGG) (A) adquiriendo, en el caso del azul de toluidina (AzTol) (B), una coloración violeta característica que contrasta con el color azul pálido de las otras células ( $\times 200$  en la ampliación original).

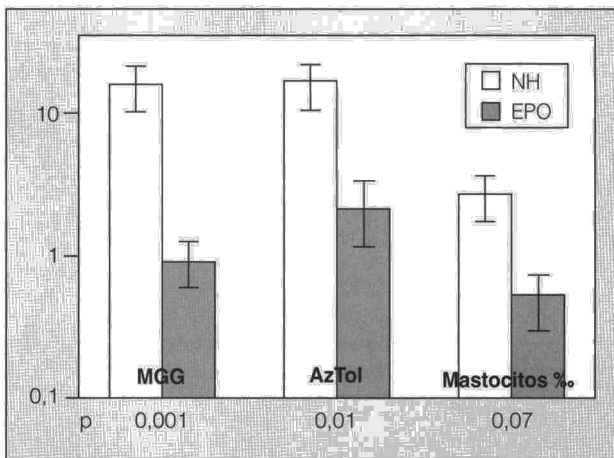


Fig. 2. El número relativo de mastocitos en el lavado broncoalveolar (LBA) (en 20 campos de ampliación/40 µl de LBA) fue significativamente más elevado en los pacientes con neumonitis de hipersensibilidad (NH) que en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva (EPO). Esta representada la media y la desviación estándar de la media de los recuentos con la tinción de May-Grunwald-Giemsa (MGG) y del azul de toluidina (AzTol), y la p del test de Mann-Whitney. El número relativo de mastocitos obtenido en el recuento diferencial de 500 células es también superior en el grupo NH, aunque la diferencia entre los grupos no sea estadísticamente significativa.

riendo, en el caso del AzTol, una coloración violeta característica, contrastando con el color azul pálido de las restantes células del LBA (fig. 1). A pesar de ser más fácil la identificación de los mastocitos después de la tinción con AzTol, hallamos una buena correlación entre los recuentos realizados por los dos observadores en ambos métodos de tinción: MGG ( $r_s = 0,855$ ) y AzTol ( $r_s = 0,866$ );  $p < 0,0001$ . El recuento de mastocitos fue ligeramente mayor con el AzTol (media  $\pm$  EPM:  $10,1 \pm 3,4$  frente a  $8,4 \pm 3,0$  mastocitos/20 campos/40 µl;  $p = \text{NS}$ ), encontrando también una excelente correlación entre los dos métodos de tinción ( $r_s = 0,862$ ;  $p < 0,0001$  en la media de recuentos de los dos observadores para AzTol y MGG). El porcentaje de mastocitos en el LBA, obtenido por el recuento diferencial en 500 células del frotis de citocentrifugado, se correlacionó significativamente con el obtenido en 20 campos con la ampliación de  $40\times$  ( $r_s = 0,738$ ;  $p = 0,0002$ ).

Cuando se compararon los 2 grupos de pacientes, el número de mastocitos en el LBA fue significativamente más elevado en los pacientes con NH que en aquellos que presentaron cuadros de asma bronquial o bronquitis crónica (MGG =  $13,4 \pm 4,5$  frente a  $0,9 \pm 0,3/20$  campos de ampliación/40 µl de LBA;  $p < 0,002$ ) (fig. 2).

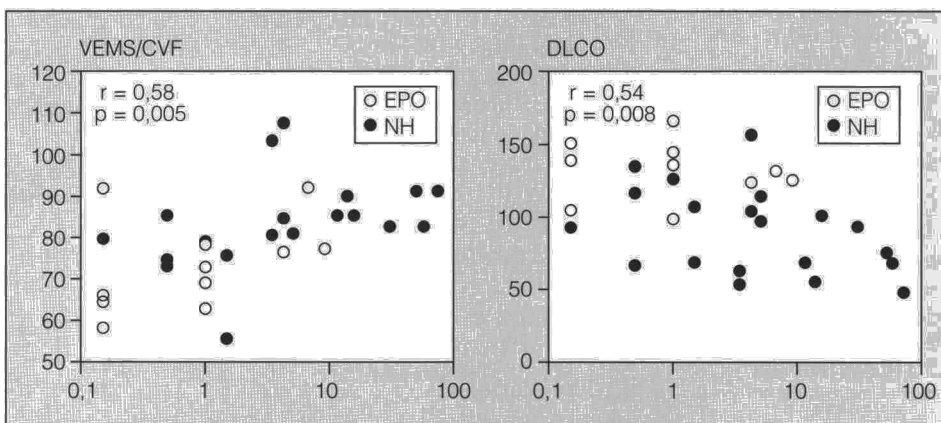


Fig. 3. Correlación entre el número de mastocitos en el lavado broncoalveolar (LBA) (en abscisas y escala logarítmica) y el índice de Tiffenau (IF) (volumen espiratorio máximo en el primer segundo [VEMS]/capacidad vital forzada [CVF]) o la difusión pulmonar (DLCO). Están representados los valores de r y p obtenidos en la correlación de Spearman. EPO: enfermedad pulmonar obstructiva; NH: neumonitis de hipersensibilidad.

*Relación de los mastocitos broncoalveolares con las alteraciones de la función respiratoria*

Cuando estudiamos la relación entre la presencia de mastocitos en el LBA y los parámetros funcionales respiratorios, encontramos una correlación significativa con la disminución de los volúmenes pulmonares –capacidad vital (CV),  $r_s = -0,62$ , capacidad vital forzada (CVF),  $r_s = -0,60$ , y capacidad pulmonar total (CPT),  $r_s = -0,63$ ;  $p < 0,005$  en todas– y con la DLCO ( $r_s = -0,54$ ;  $p = 0,008$ ), indicando que su presencia en el espacio alveolar está relacionada con un mayor deterioro de la función respiratoria y con la perturbación de los intercambios gaseosos en el pulmón. Por otro lado, cuanto menor es la relación volumen espiratorio máximo en el primer segundo (VEMS)/CVF (lo que caracteriza esencialmente a la enfermedad de las vías aéreas), menor es el número de mastocitos en el LBA (fig. 3).

Del mismo modo, cuando analizamos dentro de la población estudiada a los 8 pacientes con mayor compromiso funcional respiratorio, o sea con CV y/o DLCO  $< 80\%$  del valor esperado, este grupo presentaba un número significativamente más elevado de mastocitos en el LBA (fig. 4).

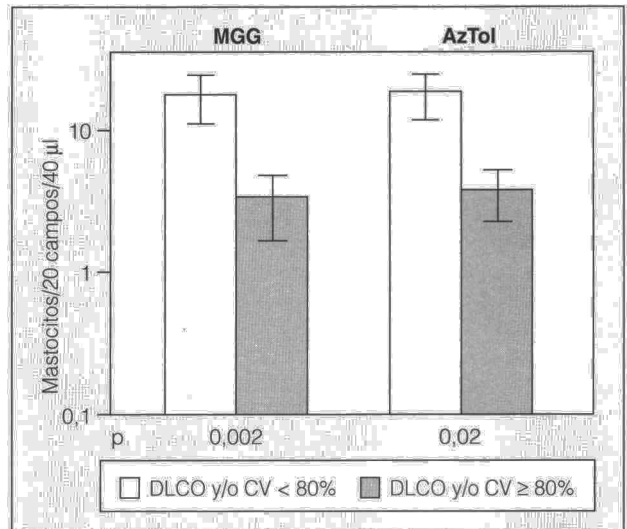


Fig. 4. Los 8 pacientes con mayor compromiso funcional respiratorio (capacidad vital [CV] y/o difusión pulmonar [DLCO]  $< 80\%$  del valor esperado) presentaron un número significativamente más elevado de mastocitos en el lavado broncoalveolar (LBA). Está representada la media y el error estándar de la media de los recuentos en la tinción de May-Grunwald-Giemsa (MGG) y del azul de toluidina (AzTol), y la p del test de Mann-Whitney.

*Relación de los mastocitos broncoalveolares con la intensidad de la alveolitis, evaluada por el LBA*

El número de mastocitos recuperados en el LBA se correlacionó directa y significativamente con la intensidad de la alveolitis, cuando fue evaluada por los parámetros de LBA: la celularidad total ( $r_s = 0,62$ ;  $p = 0,002$ ) y las concentraciones de albúmina ( $r_s = 0,68$ ;  $p = 0,003$ ) e IgG ( $r_s = 0,70$ ;  $p = 0,002$ ). Cuando se analizaron las diferentes células inflamatorias presentes en el LBA, confirmamos también la existencia de una correlación significativa con el número absoluto de linfocitos ( $r_s = 0,56$ ;  $p = 0,006$ ) (fig. 5).

**Discusión**

En este trabajo, podemos comprobar que el aumento de mastocitos en el LBA caracteriza las NH en los trabajadores de la industria del corcho, ya que su número

no está aumentado en pacientes igualmente expuestos, pero sin evidencia de una implicación del intersticio pulmonar (EPO) (fig. 2). También comprobamos que la presencia de mastocitos en el LBA está directamente relacionada con el deterioro de la función pulmonar (fig. 4) y con la intensidad de la inflamación pulmonar (fig. 5), lo que apoya la participación de estas células en la inmunopatogénesis de las NH<sup>20-24</sup>.

Los pacientes evaluados en este estudio presentaban síntomas respiratorios relacionados con la exposición al polvo de la industria del corcho, durante varios años (mediana, 18 años), siendo el LBA realizado en todos ellos con fines diagnóstico<sup>3,7,8,12,25,26</sup>. De acuerdo con los criterios de diagnóstico, los 2 grupos de pacientes diferían significativamente en el perfil del LBA y en la función respiratoria, con la evidencia de participación intersticial en el grupo con NH representada, especialmente, por la disminución de la DLCO y alveolitis lin-

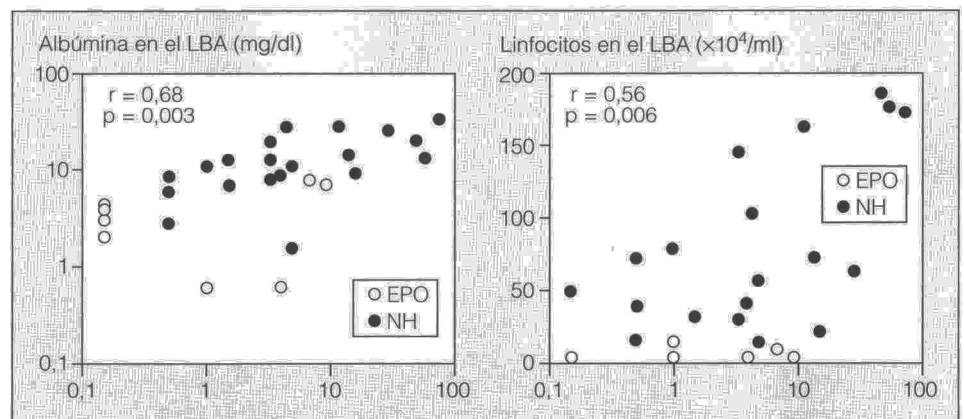


Fig. 5. Correlación entre el número de mastocitos en el lavado broncoalveolar (LBA) (en abscisa y escala logarítmica) y la intensidad de la inflamación intersticial, calculada por las concentraciones de albúmina y el número de linfocitos/ml del LBA. Están representados los valores de r y p obtenidos en la correlación de Spearman. EPO: enfermedad pulmonar obstructiva; NH: neumonitis de hipersensibilidad.

focítica intensa. Seis de estos pacientes mantenían, a pesar de estar retirados, síntomas respiratorios con alteraciones funcionales y del LBA, evolución que ha sido también descrita en otras formas de NH<sup>29,30</sup>. De hecho, al comparar los datos funcionales y del LBA de estos pacientes con los que mantenían la exposición antigénica, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, las concentraciones más bajas de IgG podrían traducir la disminución de la exposición en este grupo, ya que en la suberosis la IgG en el LBA se correlaciona con el título de anticuerpos específicos para *Penicillium frequentans*<sup>31</sup>.

El grupo con NH presentaba un aumento de células con gránulos citoplasmáticos que se tiñeron metacromáticamente con el AzTol (fig. 1). Tal como ha sido descrito<sup>21,32</sup>, estas células en el LBA son semejantes a los mastocitos, debido a que presentan un núcleo ovoide único y no núcleos pleomórficos multilobulados, como es típico de los basófilos<sup>33</sup>. A pesar de ser difícil distinguir clara y absolutamente estos dos tipos celulares por el método utilizado, los estudios de microscopía electrónica han confirmado que las células metacromáticas del LBA son esencialmente mastocitos<sup>17,21,34,35</sup>. Sin embargo, la principal dificultad en la identificación de estas células por histoquímica es la conocida variabilidad de su tinción por los diferentes métodos de fijación<sup>28,36</sup>, característica que ha sido también utilizada para definir la heterogeneidad de estas células<sup>32,37,38</sup>. Además, la eventual degranulación in vivo de los mastocitos podría llevar a la no identificación de sus gránulos metacromáticos. De hecho, en el asma fatal, mientras que los métodos histoquímicos tradicionales han demostrado la disminución del número de mastocitos pulmonares, estudios más recientes, recurriendo a la inmunohistoquímica, han revelado la presencia de basófilos (expresión de FcεRI) y mastocitos (que contienen triptasa [M<sub>T</sub>]) en las vías aéreas<sup>39,40</sup>.

En nuestro estudio, utilizamos la tinción con AzTol después de la fijación con metanol, método que se ha revelado particularmente útil para la determinación del número de mastocitos en el LBA<sup>21,28</sup>, ya que la mayoría de los mastocitos pulmonares son sensibles a la fijación con formaldehído<sup>21,28,32,37-39</sup>. De hecho, observamos una excelente correlación entre los recuentos de dos observadores y, a pesar de un número ligeramente mayor en la tinción con AzTol, no encontramos diferencias significativas en relación con la tinción habitualmente utilizada de forma sistemática para el recuento diferencial en el LBA (tinción de MGG). Así, esta tinción podrá también permitir la identificación correcta de las células metacromáticas del LBA, por lo menos para observadores experimentados.

Los mastocitos recuperados en el LBA podrían provenir del árbol bronquial y/o de la superficie alveolar. Aun así, algunos datos apoyan su origen en el pulmón profundo. De hecho, estudios histopatológicos<sup>22,40,41</sup> han revelado que los mastocitos de las vías aéreas se localizan esencialmente bajo la membrana basal del epitelio y en la submucosa bronquial, junto a los vasos, adyacentes a las glándulas submucosas y dispersos entre los ejes musculares; en enfermedades pulmonares intersti-

ciales, cerca del 80% de las células metacromáticas se localizan en los septos alveolares y el 10-15%, en los espacios alveolares y entre las células de revestimiento alveolar<sup>22,41</sup>. Estas observaciones llevan a creer que la accesibilidad de los mastocitos de las vías aéreas al LBA será menor que la de los mastocitos del espacio alveolar. También, en la técnica utilizada en el LBA, la eliminación del volumen recuperado en la primera muestra instilada lleva a una menor contaminación por las células inflamatorias presentes en el árbol bronquial y a una mayor representatividad del intersticio pulmonar<sup>9,42-44</sup>. En la comparación de la distribución topográfica de los mastocitos en el tejido pulmonar periférico y el LBA de 15 pacientes con pulmón de granjero, Pesci et al<sup>22</sup> encontraron también una correlación significativa entre el porcentaje de mastocitos en el LBA y el número de mastocitos en el tejido pulmonar, concluyendo que el LBA refleja la intensidad de la presencia de mastocitos en el intersticio pulmonar.

La contribución de los mastocitos en la patogenia de las enfermedades pulmonares intersticiales no está aún totalmente dilucidada, a pesar de las numerosas evidencias clínicas<sup>19-22,35</sup> y experimentales<sup>15,23,24,45</sup> de su participación. El propio origen y las vías de diferenciación de estas células han permanecido oscuros y sólo muy recientemente han sido aclarados<sup>46-49</sup>. Los datos obtenidos hasta hoy apuntan claramente hacia la existencia de relaciones bidireccionales entre mastocitos, linfocitos T y fibroblastos<sup>50-53</sup> y, en este contexto, tenemos que admitir su intervención en la patogenia de enfermedades como la NH, donde la participación de mecanismos de hipersensibilidad retardada y la evolución a fibrosis pulmonar están bien establecidas<sup>2-4,16,30</sup>.

La correlación directa que encontramos en este trabajo entre los mastocitos y el número de linfocitos en el LBA (fig. 5), que se sabe que son esencialmente linfocitos T CD8+<sup>3,12,13</sup>, refuerza la hipótesis de una interrelación entre estas dos poblaciones celulares. Realmente, tanto los mastocitos de las mucosas como los M<sub>T</sub>, subpoblación que en el hombre predomina en los alveolos y el pulmón<sup>38</sup>, parecen ser particularmente dependientes de los linfocitos T, ya que ha sido demostrada su ausencia en las mucosas en situaciones de inmunodeficiencia T<sup>54,55</sup>. Las interacciones entre linfocitos T y mastocitos han sido objeto de intensa investigación y se sabe que diversos mediadores liberados o producidos por los mastocitos pueden influir en la función de los linfocitos T. Es el caso de la histamina que, paralelamente con la degranulación parcial de los mastocitos<sup>21,22,37,41</sup>, ha sido también descrita como aumentada en el LBA en las enfermedades pulmonares intersticiales y en la fibrosis pulmonar<sup>20,21,45</sup>. La histamina podría suprimir la respuesta linfocitaria T por diversos mecanismos: inhibición de la proliferación de linfocitos T auxiliares CD4+<sup>56</sup>, inhibición de la producción de citocinas del tipo TH1 –interleucina 2 (IL-2) y el interferón gamma (IFN-γ)<sup>57</sup> y estimulación de linfocitos T supresores CD8+, que se sabe que tienen receptores H<sub>2</sub> para la histamina<sup>58</sup>. De acuerdo con esta acción inmunosupresora de la histamina, experimentalmente los antihistamínicos H<sub>2</sub> aumentan la formación de granulomas de hipersen-

sibilidad<sup>59</sup>. La degranulación de los mastocitos en el intersticio pulmonar puede ser dependiente de factores liberadores de histamina (HRF), presentes en el LBA en situaciones de fibrosis pulmonar<sup>60,61</sup>, y que los macrófagos alveolares también producen<sup>62</sup>.

En nuestro trabajo, también encontramos una correlación directa entre el número de mastocitos del LBA y el índice de Tiffeneau (IT) (relación VEMS/CVF, fig. 3), o sea un número menor de mastocitos en los pacientes con mayor obstrucción bronquial. Esto podría representar la existencia de células degranuladas en estos pacientes, no identificadas por el método histoquímico utilizado, y/o la asociación de los mastocitos a las formas intersticiales, sin compromiso de las vías aéreas. De todos modos, nuestro estudio no permite excluir completamente la participación de los mastocitos en las formas clínicas con compromiso predominante de las vías aéreas (EPO), pues su completa aclaración necesitará de estudios futuros recurriendo a inmunocitoquímica y al procesamiento de la primera muestra "bronquial" del LBA y, posiblemente, de biopsias bronquiales.

También encontramos una relación inversa entre los mastocitos del LBA y los parámetros funcionales respiratorios habitualmente alterados en pacientes con patología del intersticio pulmonar<sup>63</sup> —la CPT, la CV y la DLCO— (fig. 3), lo que refuerza la hipótesis de la intervención de los mastocitos alveolares en la fisiopatología de las formas clínicas de suberosis con compromiso intersticial. Estos resultados contrastan con los de Pesci et al<sup>22</sup> que, en un grupo de 15 pacientes con pulmón de granjero observados 2 semanas después de un episodio agudo, encontraron un aumento de los mastocitos en el LBA, pero sin correlación con los parámetros funcionales respiratorios. Del mismo modo, otro estudio de 49 pacientes con varias enfermedades fibrosantes del pulmón no encontró correlación entre el aumento de mastocitos en el pulmón y los datos funcionales respiratorios, verificando, aun así, una correlación significativa con la intensidad de la fibrosis<sup>41</sup>. La observación de formas en agudización en el primer estudio y la heterogeneidad de la población del segundo estudio, perteneciente a 5 entidades clínicas distintas, podrían justificar la discrepancia en relación a nuestro estudio. La población estudiada por nosotros tenía sólo una forma de agresión respiratoria exógena —el polvo de la industria del corcho—, generalmente con síntomas que se instauran después de largos períodos de exposición. A pesar de no tener en nuestros pacientes un estudio histopatológico o por imagen que permita una definición de la fibrosis pulmonar existente, el compromiso inflamatorio y la fibrosis intersticial son aspectos comunes en la histopatología de las formas de NH de la suberosis<sup>2</sup>. Siendo bien conocida la capacidad de los mastocitos de influir en la función y proliferación de los fibroblastos<sup>15,45</sup>, y de éstos, recíprocamente, intervenir en la diferenciación tisular de los mastocitos<sup>46,48,49</sup>, es posible que el aumento de mastocitos alveolares en la suberosis y las correlaciones funcionales encontradas estén en parte relacionados con la activación de fibroblastos en el pulmón profundo y la consecuente fibrosis intersticial.

Estudios futuros, analizando en el LBA marcadores solubles de la activación de los fibroblastos, como por ejemplo el hialuronano, la fibronectina o el procolágeno tipo III<sup>64</sup>, podrán aclarar mejor esta relación en la suberosis.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ávila R, Villar TG. Suberosis: respiratory disease in cork workers. *Lancet* 1968; 1: 620-623.
2. Ávila R, Villar TG. Respiratory disease in cork workers (suberosis). *Thorax* 1973; 28: 409-423.
3. Sharma OP. Hypersensitivity pneumonitis. *Dis Month* 1991; 411-471.
4. Fink JN. Hypersensitivity pneumonitis. En: Lynch III JP, DeRemee RA, editores. *Immunologically mediated pulmonary diseases*. Filadelfia: JB Lippincott Company, 1991: 399-412.
5. Ávila R, Lacey J. The role of *Penicillium frequentans* in suberosis (respiratory disease in cork workers). *Clin Allergy* 1974; 4: 109-117.
6. Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* 1979; 97: 149-198.
7. Springmeyer SC. The clinical use of bronchoalveolar lavage. *Chest* 1987; 92: 771-772.
8. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage has extended the usefulness of bronchoscopy. *Eur Respir Rev* 1992; 2: 48-53.
9. Workshop Summary and Guidelines. Investigative use of bronchoscopy, lavage and bronchial biopsies in asthma and other airways diseases. *Eur Respir J* 1992; 5: 115-121.
10. Bousquet J, Chanez P, Campbell A, Lacoste JY, Poston R, Enander I et al. Inflammatory processes in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1991; 94: 227-232.
11. Luisetti M, Meloni F, Ballabio P, Leo G. Role of bronchial and bronchoalveolar lavage in chronic obstructive lung disease. *Monaldi Arch Chest Dis* 1993; 48: 54-57.
12. Delgado L, Winck JC, Sapage JM, Torres S, Ribeiro JI, Sá JM. Respiratory disease in cork workers: characterization of suberosis alveolitis by bronchoalveolar lavage [resumen]. *Eur Respir J* 1992; 5 (Supl): 503-504.
13. Delgado L, Ramos JP, Winck JC, Cuesta C, Torrinha JAF. Cytotoxic lymphocytes in hypersensitivity pneumonitis [resumen]. *Clin Exp Allergy* 1993; 23 (Supl 1): 25.
14. Wasserman SI. Mast cell biology. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 590-597.
15. Jordana M. Mast cells and fibrosis —who's on first? *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 7-8.
16. Salvaggio JE, Millhollon B. Induction and modulation of pulmonary inflammation by organic dusts: cytokines, immune complexes and "all of those things". *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 731-733.
17. Fox B, Bull TB, Guz A. Mast cells in the human alveolar wall: an electronmicroscopic study. *J Clin Pathol* 1981; 34: 1,333-1,342.
18. Irani AA, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal antitryptase and antichymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 1,509-1,515.
19. Flint KC, Leung KBP, Hudspeth BN, Brostoff J, Pearce FL, Geraint-James D et al. Bronchoalveolar mast cells in sarcoidosis: increased numbers and accentuation of mediator release. *Thorax* 1986; 41: 94-99.
20. Soler O, Nioche S, Valeyre D, Basset F, Benveniste J, Burtin C et al. Role of mast cells in the pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Thorax* 1987; 42: 565-572.
21. Haslam PL, Dewar A, Butchers P, Primett ZS, Newman-Taylor A, Turner-Warwick M. Mast cells, atypical lymphocytes, and neutrophils in bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis. Comparison with other interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 35-47.
22. Pesci A, Bertorelli G, Olivieri D. Mast cells in bronchoalveolar lavage fluid and in transbronchial biopsy specimens of patients with farmer's lung disease. *Chest* 1991; 100: 1,197-1,202.



23. Haley PJ, Schuley M, Gott K, Casale TB. Mast cell hyperplasia in experimental hypersensitivity pneumonitis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 96: 168-174.
24. Takizawa H, Ohta K, Hirai K, Misaki Y, Horiuchi T, Kobayashi N et al. Mast cells are important in the development of hypersensitivity pneumonitis. A study with mast-cell-deficient mice. *J Immunol* 1989; 143: 1.982-1.988.
25. Richerson HB, Bernstein LI, Fink JN, Hunninghake GW, Novey HS, Reed CG. Guidelines for the clinical evaluation of hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 839-844.
26. Sapage JM, Delgado JL, Torres S, Vicente P, Winck JC, Rodrigues P et al. Suberosa: contributo da lavagem broncoalveolar no diagnóstico da patologia respiratória nos trabalhadores da indústria da cortiça. *Arq SPPR* 1992; 9: 321-327.
27. Klech H, Pohl W, editores. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1989; 2: 561-585.
28. Xaubet A, Moisés JA, Agustí C, Martos JA, Picado C. Identification of mast cells in bronchoalveolar lavage fluid. Comparison between different fixation and staining methods. *Allergy* 1991; 46: 222-227.
29. Mönkäre S, Haahtela T. Farmer's lung – a 5-years follow-up of eighty-six patients. *Clin Allergy* 1987; 17: 143-151.
30. Rodrigues J, Moreira da Silva JP, Delgado JL, Castel-Branco MG. Pneumonites de hipersensibilidade. *Rev Port Imunoalergol* 1992; 1: 34-49.
31. Delgado L, Winck JC, Sapage JM, Torres S, Moura e Sá J, Fleming Torrinha JA. Antibodies to *Penicillium frequentans* in cork worker's respiratory disease (suberosis). Application of the ImmunoCap IgG RAST in sera and bronchoalveolar lavage (BALF) measurements. En: Basomba A, Hernández MD, De Rojas F, editores. Proceedings of the XVI European Congress of Allergy and Clinical Immunology-ECACI'95. Italia: Monduzzi Editore, 1995; 2: 209-214.
32. Walls AF, Roberts JA, Godfrey RC, Church MK, Holgate ST. Histochemical heterogeneity of human mast cells: disease-related differences in mast cell subsets recovered by bronchoalveolar lavage. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 92: 233-241.
33. Hastie R, Heroy JH, Levy DA. Basophil leukocytes and mast cells in human nasal secretions and scrapings studied by light microscopy. *Lab Invest* 1979; 40: 554-561.
34. Ts'ao C, Patterson R, McKenna JM, Susko IM. Ultrastructural identification of mast cells obtained from human bronchial lumens. *J Allergy Clin Immunol* 1977; 59: 320-326.
35. Kawanami O, Ferrans VJ, Fulmer JD, Crystal RG. Ultrastructural of pulmonary mast cells in patients with fibrotic lung disorders. *Lab Invest* 1979; 40: 717-734.
36. Strobel S, Miller HRP, Ferguson A. Human intestinal mucosal mast cells: evaluation of fixation and staining techniques. *J Clin Pathol* 1981; 34: 851-858.
37. Shanahan F, McNiven I, Dyck N, Denburg JA, Bienenstock J, Befus AD. Human lung mast cells: distribution and abundance of histochemically distinct subpopulations. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 83: 329-331.
38. Irani AM, Schwartz LB. Mast cell heterogeneity. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 143-155.
39. Heard BE, Nunn AJ, Kay AB. Mast cells in human lungs. *J Pathol* 1989; 157: 59-63.
40. Koshino T, Teshima S, Fukushima N, Takaishi T, Hirai K, Miyamoto Y et al. Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 919-925.
41. Pesci A, Bertorelli G, Gabrielli M, Olivieri D. Mast cells in fibrotic lung disorders. *Chest* 1993; 103: 989-996.
42. Rennard SI, Chafouri M, Thompson AB, Linder J, Vaughan W, Jones K et al. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage to separate bronchial and alveolar samples. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 208-217.
43. Lam S, Leriche JC, Kijek K, Phillips D. Effect of bronchial lavage volume on cellular and protein recovery. *Chest* 1985; 88: 856-859.
44. Semenzato G, Chilosi M, Ossi E, Trentin L, Pizzolo G, Cipriani A et al. Bronchoalveolar lavage and lung histology: comparative analysis of inflammatory and immunocompetent cells in patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 400-404.
45. Aldenbrog F, Nilsson K, Jarlshammar B, Bjermer L, Enerbäck L. Mast cells and biogenic amines in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 112-117.
46. Galli SJ. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990; 62: 5-33.
47. Hamawy MM, Mergenhausen SE, Siraganian RP. Adhesion molecules as regulators of mast-cell and basophil function. *Immunol Today* 1994; 15: 62-66.
48. Valent P. The riddle of the mast cell: kit(CD117)-ligand as the missing link? *Immunol Today* 1994; 15: 111-114.
49. Galli SJ, Wershil BK, Costa JJ, Tsai M. For better or for worse: does stem cell factor importantly regulate mast cell function in pulmonary physiology and pathology? *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 644-645.
50. Claman HN. Mast cells, T cells and abnormal fibrosis. *Immunol Today* 1985; 6: 192-195.
51. Levi-Schaffer F, Segal V, Nagler A. Mast cell and fibroblast functional activity are affected by immunocompetent cells in chronic graft vs host disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 99: 238-241.
52. Askenase PW, Van Loveren H. Delayed-type hypersensitivity: activation of mast cells by antigen-specific T-cell factors initiates the cascade of cellular interactions. *Immunol Today* 1983; 4: 259-264.
53. Waldorf HA, Alsh LJ, Schechter NM, Murphy GF. Early cellular events in evolving cutaneous delayed hypersensitivity in humans. *Am J Pathol* 1991; 138: 477-486.
54. Irani AM, Craig SS, DeBlois G, Elson CO, Schechter N, Schwartz LB. Deficiency of the tryptase-positive, chymase-negative mast cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. *J Immunol* 1987; 138: 4.381-4.386.
55. Ruitenberg EJ, Elgersma A. Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during *Trichinella spiralis* infection. *Nature (Lond)* 1976; 264: 258-260.
56. Hol BE, Krouwels FH, Bruinier B, Lutter R, Bast A, Wierenga EA et al. Heterogeneous effects of histamine on proliferation of lung and blood-derived T-cell clones from healthy and asthmatic persons. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 647-654.
57. Dohsten M, Sjögren HO, Carlsson R. Histamine acts directly on human T cells to inhibit interleukin-2 and interferon-gamma production. *Cell Immunol* 1987; 109: 65-74.
58. Shibata M, Hoon D, Okun E, Morton D. Modulation of histamine type II receptors on CD8+ T cells by interleukin-2 and cimetidine. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 97: 8-16.
59. Weinstock JV, Chensue SW, Boros DL. Modulation of granulomatous hypersensitivity. V. participation of histamine positive and negative lymphocytes in the granulomatous response of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J Immunol* 1983; 130: 423-427.
60. Teles Araújo A, Valença J, Almeida AB, Costa MF. Release of histamine by cultures of broncho-alveolar adherent cells. En: Herzog H, Perruchod AP, editores. Asthma and bronchial hyperreactivity. Karger, Basilea. *Prog Resp Res* 1985; 19: 35-42.
61. Broide DH, Smith CM, Wasserman SI. Mast cells and pulmonary fibrosis. Identification of a histamine releasing factor in bronchoalveolar lavage fluid. *J Immunol* 1990; 145: 1.838-1.844.
62. Liu MC, Proud C, Lichtenstein LM, McGlashan DW, Schleimer RP, Adkinson NF et al. Human lung macrophage-derived histamine-releasing activity is due to IgE-dependent factors. *J Immunol* 1986; 136: 2.588-2.595.
63. Cherniak RM. Physiologic alterations in interstitial lung disease. En: Schwartz MJ, King TEK Jr, editores. Interstitial lung disease (2.ª ed.). Saint Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1993; 79-90.
64. Bjermer L, Engström-Laurent A, Lundgren R, Rosenhall L, Hällgren R. Bronchoalveolar mastocytosis in farmer's lung is related to disease activity. *Arch Intern Med* 1988; 148: 1.362-1.365.