



# CELULAS BINUCLEADAS EN EL LAVADO BRONCOALVEOLAR

J.L. Pérez-Arellano, F. Gómez Gómez\*, J.D. García-Palomo, M.C. Alcázar-Montero, J.E. Losa-García, A. Jiménez López y S. de Castro del Pozo

Cátedra de Patología General\* y

\* Sección de Neumología. Hospital Clínico Universitario. Salamanca.

## Binuclear cells in bronchoalveolar lavage

El estudio de las diferentes variedades de macrófagos alveolares no es una práctica usual en el recuento diferencial del lavado broncoalveolar. Sin embargo, en la mayor parte de los líquidos de lavado broncoalveolar, es posible distinguir al menos tres variedades morfológicas de estas células: mononucleadas, binucleadas y multinucleadas. Por ello, hemos estudiado tanto el porcentaje como número total de macrófagos binucleados en cuatro grupos de pacientes portadores de diversas neumopatías: enfermedades granulomatosas, patología intersticial no granulomatosa, tuberculosis y controles. Los resultados obtenidos indican varios hechos: (a) existe una correlación positiva entre el porcentaje de células binucleadas y multinucleadas, dato que puede interpretarse en el sentido que aquéllas constituirían un eslabón intermedio en el proceso de multinucleación; (b) el número total de células binucleadas es significativamente mayor en las enfermedades granulomatosas que en el resto de los grupos; (c) el porcentaje de binucleadas difiere significativamente entre las enfermedades granulomatosas y el grupo de tuberculosis lo que podría tener valor en la distinción de las alveolitis de predominio linfocitario y (d) el hallazgo de un elevado porcentaje de células binucleadas sería de valor en el diagnóstico sindrómico de enfermedad intersticial en circunstancias que artefactúen el recuento diferencial.

The study of the different varieties of alveolar macrophages is not a usual practice in the differential count of bronchoalveolar lavage. However, in most fluids from bronchoalveolar lavage at least three morphological varieties of these cells can be distinguished: mononuclear, binuclear and multinuclear. Therefore, we have evaluated both the percent rate and the overall number of binuclear macrophages in four groups of patients with several lung diseases: granulomatous diseases, nongranulomatous interstitial diseases, tuberculosis and controls. The results suggest several points: (a) There is a positive correlation between the percent rate of binuclear and multinuclear cells; this finding can be interpreted as suggesting that the former might represent an intermediate stage in the multinucleation process; (b) The total number of binuclear cells is significantly higher in granulomatous diseases than in the remaining groups; (c) The percent rate of binuclear cells is significantly different in granulomatous diseases and in tuberculosis; this finding might be valuable for the differentiation of alveolitis with lymphocytic predominance; (d) The finding of a high rate of binuclear cells might be useful in the syndromic diagnosis of interstitial disease in those circumstances inducing artifacts in the differential count.

*Arch Bronconeumol 1989; 25:171-174*

## Introducción

El lavado broncoalveolar (LBA) se ha convertido en las últimas décadas en un importante instrumento diagnóstico en neumología<sup>1</sup>. Por un lado, permite efectuar un diagnóstico positivo de algunos procesos (p. ej. proteinosis alveolar<sup>2</sup>, histiocitosis X<sup>3</sup>, hem siderosis pulmonar<sup>4</sup>, enfermedad de Hermansky-Pudlak<sup>5</sup>, etc.). Por otro lado, las alteraciones en el re-

cuento diferencial citológico (elevación aislada o combinada de linfocitos, neutrófilos y/o eosinófilos) permiten orientar hacia el diagnóstico de diferentes grupos de enfermedades.

El estudio de las variedades de macrófagos alveolares no ha sido empleado de forma rutinaria en el diagnóstico de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID). En general, los macrófagos son cuantificados de forma total, no realizándose una distinción entre diferentes tipos morfológicos, en concreto entre células uninucleadas, binucleadas o multinucleadas. Constituye una excepción a esta afirmación, la ocasional detección —aunque sin cuan-

Recibido el 23-1-1989 y aceptado el 21-2-1989.

+ Prof. S. de Castro



tificación precisa— de células multinucleadas en algunas enfermedades granulomatosas<sup>6-8</sup>.

El propósito de este trabajo ha sido la cuantificación del número de células binucleadas de estirpe macrofágica en diversas EPID, buscando la existencia de variaciones en diferentes neumopatías y el posible significado de las mismas.

## Material y métodos

Se estudiaron 36 pacientes distribuidos en cuatro grupos. El grupo I estaba compuesto por 12 pacientes afectados de enfermedades granulomatosas pulmonares (9 sarcoidosis y 3 neumonitis por hipersensibilidad). El diagnóstico de sarcoidosis fue sustentado por: a) existencia de granulomas no caseificantes en la biopsia ganglionar y datos morfológicos compatibles con sarcoidosis; b) ausencia de infección micobacteriana, fúngica o parasitaria y c) ausencia de exposición a material orgánico e inorgánico capaz de originar enfermedad granulomatosa<sup>9</sup>. Los criterios diagnósticos de neumonitis por hipersensibilidad fueron los descritos por Salvaggio y Karr<sup>10</sup> encontrándose además en todos los casos una alveolitis a expensas de linfocitos T con características de activación (HLA-DR+)<sup>11</sup>.

El grupo II estaba constituido por seis casos de tuberculosis pulmonar demostrada por la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en el esputo, broncoaspirado y/o LBA. En todos los casos existía una elevación de linfocitos en el LBA superior al 11%.

El grupo III lo formaban seis pacientes afectados de patología pulmonar no granulomatosa (4 fibrosis pulmonares idiopáticas y 2 fibrosis post-neumónicas). El diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática fue realizado con los criterios habituales de a) biopsia pulmonar demostrativa de fibrosis de la pared alveolar con cambios inflamatorios en ausencia de granulomas; b) infiltrados intersticiales en la radiografía de tórax; c) patrón restrictivo en la exploración funcional respiratoria; y d) ausencia de otros agentes capaces de ocasionar enfermedad pulmonar intersticial<sup>12</sup>. Adicionalmente, se demostró la existencia de alveolitis a expensas de polimorfonucleares en el lavado broncoalveolar. El diagnóstico de fibrosis postneumónica se basó en una historia de neumonía lobar con tardía resolución radiológica constatándose en el líquido de lavado una alveolitis mixta linfocitaria y neutrófila. También en estos casos la biopsia pulmonar demostró la presencia de fibrosis intersticial.

El grupo IV o grupo control constaba de doce pacientes; nueve eran portadores de neoplasias pulmonares (4 carcinomas epidermoides, 3 adenocarcinomas y 2 *oat cell*) y tres presentaban criterios clínicos de bronquitis crónica. En los pacientes neoplásicos se realizó el LBA en el lado contralateral al tumor, siendo el árbol bronquial en todos los casos macroscópicamente normal. En este grupo, el recuento diferencial citológico fue normal excepto en los pacientes con bronquitis crónica, en los que se constató un discreto aumento de neutrófilos (< 5%).

En los grupos I, II y III se excluyeron del estudio los pacientes fumadores. El grupo IV incluía nueve pacientes fumadores; no obstante, todos habían abandonado el hábito tabáquico al menos dos semanas previas a la broncoscopia. Ninguno de los enfermos estaba sometido a tratamiento corticoideo o inmunosupresor en el momento del LBA.

## Métodos

### 1. Lavado broncoalveolar y procesamiento inicial.

El LBA se realizó en todos los pacientes siguiendo el mismo protocolo. Todos los enfermos fueron informados de los aspectos técnicos obteniéndose su autorización escrita. Se instilaron 200 ml de suero salino fisiológico a temperatura ambiente en 4 alícuotas de 50 ml. El líquido se recuperó mediante aspiración suave con jeringa, no despreciándose ninguna porción. La mezcla recuperada se mantuvo en un baño de hielo hasta su procesamiento ulterior (tiempo inferior a 1 hora). El líquido recuperado se cuantificó y filtró a través de 2 capas de gasa quirúrgica estéril. Posteriormente, fue centrifugado a 500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente separándose el sobrenadante del botón celular. Este último se resuspendió en medio RPMI (RPMI 1640 Grand Island Biological Co, New York USA) + 10% FCS (Fetal Calf Serum, Grand Island Biological Co, New York USA). Se determinó la viabilidad mediante tinción de exclusión vital con Tripan blue, cuantificándose el número total de células en una cámara de Neubauer.

### 2. Estudios citológicos.

En cada caso se realizaron ocho preparaciones con citocentrífuga (Cytospin-2 Shandon) añadiendo en cada cubeta 40.000 células y centrifugado durante 7 minutos a 400 rpm. Rutinariamente se efectuaron las siguientes tinciones: Diff-Quick (May-Grunwald-Giemsá modificado), PAS (ácido periódico de Schiff), tinción de Perls y esterasas inespecíficas (Sigma Kit 91-1).

Sobre las preparaciones teñidas con Diff-Quick se realizó un recuento diferencial convencional (macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos) así como un recuento específico de las células macrofágicas (mononucleares, binucleadas y multinucleadas). En ambos casos se contaron 200 células por dos observadores diferentes, realizándose una media aritmética de los datos obtenidos. Los resultados finales se expresaron de dos formas: porcentaje de macrófagos alveolares binucleados (Bi%) y número total de macrófagos binucleados (Bi<sub>i</sub>) de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$Bi (\%) = \frac{\text{Número de macrófagos binucleados}}{\text{Número de macrófagos totales}} \times 100$$

$$Bi_i = Bi (\%) \times \frac{\text{Número de células totales}}{\text{Número de ml recuperados}}$$

### 3. Estudio estadístico

Se empleó el test de la U de Mann-Whitney en la comparación de las células binucleadas entre los diferentes grupos (Bi% y Bi<sub>i</sub>) y la correlación de Spearman en el estudio de la relación entre el número de células binucleadas y multinucleadas.

## Resultados

### 1. Estudio descriptivo de los lavados

En la tabla I quedan detallados los porcentajes de recuperación y el número de células totales en cada

TABLA I  
Estudio descriptivo de los grupos de pacientes

	N.º de casos	Volumen recuperado (ml) (Media, SD)	Células totales (x 10 <sup>6</sup> ) (Media, SD)	% Bi (Media, SD)	Bi <sub>i</sub> (x 10 <sup>6</sup> /ml) (Media, SD)
Grupo I (Enf. granulomatosas)	12	105,5; 31,95	39,54; 49,0	12,7; 8,62	3,8; 3,01
Grupo II (Tuberculosis)	6	60,0; 36,46	16,45; 7,28	4,2; 2,16	1,1; 0,9
Grupo III (Enf. no granulomatosas)	6	78,33; 30,91	20,75; 18,98	7,33; 2,25	1,66; 1,45
Grupo IV (Controles)	12	69,09; 36,58	15,79; 15,16	4,85; 2,54	0,95; 0,37

Los resultados se expresan como media y desviación estándar (SD).



grupo. Los resultados del recuento diferencial han sido descritos de forma somera en la descripción de los grupos de pacientes. Debemos reseñar que los datos obtenidos eran similares a los ya descritos en la literatura. La tinción de Perls demostró la presencia de hemosiderina en algunas células, aunque siempre en un porcentaje inferior al 20 % de los macrófagos alveolares. En ningún caso se demostró la existencia de proteinosis alveolar mediante tinción de PAS. La tinción de esterasas inespecíficas fue fuertemente positiva, tanto en las células binucleadas como las células multinucleadas, en un porcentaje superior al 97 %.

### 2. Células binucleadas

Los resultados del porcentaje de macrófagos alveolares binucleados (Bi%) y número total de macrófagos binucleados (Bi<sub>t</sub>) quedan expresados en la tabla I. El estudio estadístico de la comparación entre los diferentes grupos (Test de la U de Mann-Whitney) queda expresado en las tablas II y III.

### 3. Correlación entre el número de células binucleadas y multinucleadas

Existía una correlación positiva ( $r_s = 0,428$   $p = 0,014$ ) entre el porcentaje de células binucleadas y el de multinucleadas. Una representación gráfica de esta correlación queda puesta de manifiesto en la figura 1.

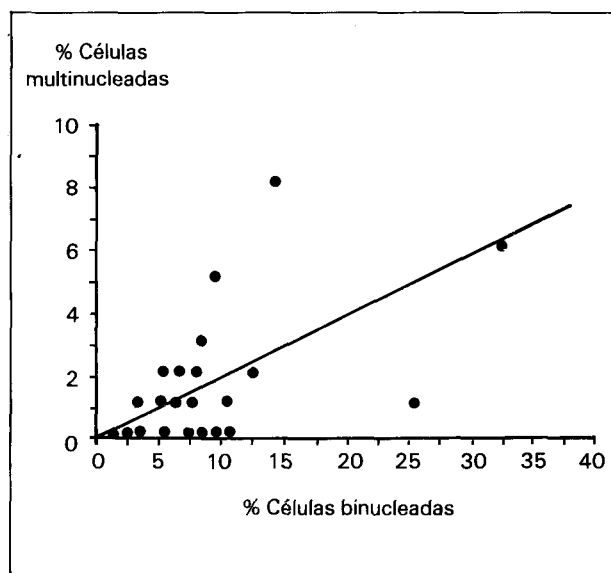


Fig. 1. Representación gráfica de la correlación positiva entre el porcentaje de células binucleadas y multinucleadas.

### Discusión

La presencia ocasional de células multinucleadas en el líquido de lavado broncoalveolar de algunas enfermedades granulomatosas pulmonares es un hecho bien conocido<sup>6-8</sup>. Teóricamente, estas células podrían aparecer por dos mecanismos principales: mitosis de los macrófagos en ausencia de citocinesis o fusión de macrófagos uninucleados<sup>13,14</sup>. La presencia inusual de células en mitosis en la evaluación citológica de los líquidos de LBA y la demostración de que algunas sustancias pueden, en un breve período de tiempo, tanto llevar a la multinucleación (p. ej. gamma-interferón) como inhibirla (p. ej. corticoides), sugiere que el mecanismo más importante de formación de células multinucleadas es la fusión de células uninucleadas<sup>15</sup>. De acuerdo con estos hechos, nuestra hipótesis era que las células binucleadas constituirían un eslabón intermedio en este proceso y que, por lo tanto, se encontrarían aumentadas en los procesos granulomatosos pulmonares.

Los resultados obtenidos indican que prácticamente todas las células bi y multinucleadas son de estirpe fagocítica, como queda demostrado por su positividad en la tinción de esterasas inespecíficas. Este hecho, ya esperable en base a datos puramente morfológicos, puede además interpretarse como una prueba adicional de su elevado carácter de activación<sup>16,17</sup>. La correlación positiva entre el número de células binucleadas y el número de multinucleadas parece confirmar nues-

TABLA II  
Resultados del análisis estadístico (test de la U de Mann-Whitney) en la comparación de % Bi entre los diferentes grupos

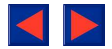
	Grupo I (Enf. granulomatosas)	Grupo II (Tuberculosis)	Grupo III (Enf. no granulom.)	Grupo IV (Control)
Grupo I (Enf. granulomatosas)	—	0,004	0,127	0,006
Grupo II (Tuberculosis)	—	—	0,015	0,309
Grupo III (Enf. no granulomat.)	—	—	—	0,023
Grupo IV (Control)	—	—	—	—

Las cifras expresadas en la tabla corresponden a valores de p.

TABLA III  
Resultados del análisis estadístico (test de la U de Man-n Whitney) en la comparación de Bit entre los diferentes grupos

	Grupo I (Enf. granulomatosas)	Grupo II (Tuberculosis)	Grupo III (Enf. no granulom.)	Grupo IV (Control)
Grupo I (Enf. granulomatosas)	—	0,049	0,050	0,008
Grupo II (Tuberculosis)	—	—	0,147	0,095
Grupo III (Enf. no granulomat.)	—	—	—	0,131
Grupo IV (Control)	—	—	—	—

Las cifras expresadas en la tabla corresponden a valores de p.



tra hipótesis de que aquéllas constituirían una fase intermedia en el proceso de fusión.

Teniendo en cuenta que es mucho más frecuente encontrar células binucleadas que multinucleadas, el siguiente paso fue el estudio del número de células binucleadas en diferentes procesos patológicos pulmonares. Los resultados obtenidos en el porcentaje de macrófagos alveolares binucleados (Bi%) y de las cifras totales (Bit) son diferentes, hecho no sorprendente ya que miden dos aspectos distintos.

Así, el número total de macrófagos binucleados es significativamente mayor en las enfermedades granulomatosas pulmonares que en cualquiera de los otros grupos, dato que apoya la hipótesis ya formulada.

Sin embargo, el estudio comparativo de los Bi% pone de manifiesto que existen diferencias significativas en el porcentaje de binucleadas entre las enfermedades intersticiales (grupos I y III) con respecto a los otros dos grupos (tuberculosos y controles) mientras que no existen diferencias entre EPID granulomatosas y no granulomatosas ni entre controles y pacientes tuberculosos. Aunque la casuística es reducida, nos parece interesante resaltar que, si en el contexto de una alveolitis linfocitaria se encuentra un número elevado de células binucleadas, será evocador de un proceso granulomatoso (sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, etc.) mientras que un escaso número puede ser sugerente de la existencia de tuberculosis. La ausencia de diferencias entre los porcentajes de células binucleadas entre las enfermedades granulomatosas y no granulomatosas (p. ej. fibrosis pulmonar idiopática) podría explicarse en base a que en los dos grupos de trastornos se generan productos que activan al macrófago (p. ej. gamma-interferón) pudiendo llevar a su fusión. En este sentido, la elevación de células binucleadas podría servir como un índice inespecífico de EPID y servir como ayuda diagnóstica en algunas circunstancias (p. ej. inflamación bronquial, tabaquismo, etc.) que artefactúen otros parámetros citológicos de alveolitis.

Con los datos expuestos, sugerimos que la cuantificación de células binucleadas en el LBA debe realizarse sistemáticamente, ya que, de confirmarse estos resultados en series más amplias, podría añadir datos en la orientación diagnóstica obtenida por lavado broncoalveolar (diferenciar entre las diversas alveolitis linfocitarias, indicador inespecífico de EPID, etc.).

Por otro lado, al ser un método sencillo, sólo añade un mínimo tiempo adicional al recuento diferencial.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:250-263.
2. Singh G, Katyal SL, Bedrossian CWM, Rogers RM. Pulmonary alveolar proteinosis; staining of surfactant apoprotein in alveolar proteinosis and in conditions simulating it. *Chest* 1983; 83:82-86.
3. Basset F, Soler P, Jaurand MC, Bignon J. Ultrastructural examination of bronchoalveolar lavage for diagnosis of pulmonary histiocytosis X. *Thorax* 1977; 32:303-306.
4. Drew WL, Finley TN, Golde DW. Diagnosis lavage and occult pulmonary hemorrhage in the thrombocytopenic immunocompromised patient. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116:215-221.
5. White DA, Smith GJW, Cooper JAD, Glickstein M, Ranlein JA. Hermansky-Pudlak syndrome and interstitial lung disease: report of a case with lavage findings. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:138-141.
6. Wait J. Presence of multinucleated giant cells in bronchoalveolar lavage fluid from sarcoid patients. *Chest* 1982; 81:232.
7. Davidson AG, Haslam PL, Corrin B et al. Interstitial lung disease and asthma in hard metal workers: bronchoalveolar lavage, ultrastructural and analytical findings and results of bronchial provocation tests. *Thorax* 1983; 38:119-128.
8. Hunninghake GW, Garrett KC, Richerson HB et al. Pathogenesis of the granulomatous lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:476-496.
9. Rossi GA, Sacco O, Consulich E, Risso A, Balbi B, Ravazoni C. Helper T-lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. Functional analysis of a lung T-cell subpopulation in patients with active disease. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:1086-1090.
10. Salvaggio JE, Karr RM. Hypersensitivity pneumonitis: state of the art. *Chest* 1978; 75:270-274.
11. Mornex JF, Cordier G, Revillard JP, Brune J. Lymphocyte activation during sarcoidosis and interstitial pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:A 61.
12. Paradis IL, Dauber JH, Rabin BS. Lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage and lung tissue in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:855-860.
13. Winkelmann M, Pfitzer P, Schneider W. Significance of polyploidy in megakaryocytes and other cells in health and tumor disease. *Klin Wochenschr* 1987; 65:1115-1131.
14. Barth J, Kreipe H, Radzun JH, Petermann W, Rudolph P, Heidorn K, Perwaresch MR. Multinucleated giant cells derived from cultured human monocytes: Immunocytochemistry, function and c-fms expression. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:A-206.
15. Nagasawa H, Miyaura Ch, Abe E, Suda T, Horiguchi M, Suda T. Fusion and activation of human alveolar macrophages induced by recombinant interferon-gamma and their suppression by dexamethasone. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:916-921.
16. Cohen AB, Cline MJ. The human alveolar macrophage: isolation, cultivation *in vitro*, and studies of morphologic and functional characteristics. *J Clin Invest* 1971; 50:1390-1398.