

Estudio de marcadores de activación de mastocitos, eosinófilos y fibroblastos en el lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón

F.L. Márquez Pérez, R. Blasco Ferrándiz^a, L. Callol Sánchez^b, T. Chivato Pérez^c, F. Villegas Fernández^b, F.J. Gómez de Terreros Sánchez^b

Sección de Neumología. Hospital Universitario Infanta Cristina. Badajoz.
Servicios de ^aMedicina Nuclear, ^bNeumología y ^cAlergia. Hospital Universitario del Aire. Madrid.

El objetivo de nuestro estudio es valorar la participación de algunas células proinflamatorias en los procesos inflamatorios asociados al cáncer de pulmón, mediante la determinación en el lavado broncoalveolar de sus respectivos marcadores de actividad, y analizar los valores de dichos marcadores en las diferentes fracciones del lavado.

Realizamos un estudio prospectivo en un hospital universitario. Se llevaron a cabo 52 lavados broncoalveolares: 37 en pacientes con cáncer de pulmón y 15 en individuos de un grupo control. En el líquido recogido se analizaron la triptasa, el ácido hialurónico y la proteína catiónica de los eosinófilos, mediante radioinmunoanálisis, de forma separada en la fracción bronquial y en la bronquioloalveolar. Los datos estadísticos se obtuvieron del programa R-SIGMA.

En los pacientes tumorales, existen valores significativamente superiores de triptasa y ácido hialurónico del lavado broncoalveolar en relación a los sujetos considerados como controles, tanto en la fracción bronquial, como en la bronquioloalveolar. Respecto a las fracciones del lavado broncoalveolar, en los pacientes con cáncer de pulmón existen valores incrementados en la fracción bronquioloalveolar, respecto de la bronquial, de triptasa y proteína catiónica de los eosinófilos.

Concluimos que en el cáncer de pulmón existe participación de, al menos, mastocitos y fibroblastos, siendo ésta mayor en las zonas más distales del árbol bronquial.

Palabras clave: Lavado broncoalveolar. Triptasa. Cáncer de pulmón.

(Arch Bronconeumol 1998; 34: 484-488)

Study of mast cell, eosinophil and fibroblast activation markers in bronchoalveolar lavage fluid from patients with lung cancer

To assess the role of some pro-inflammatory cells in inflammatory processes in lung cancer by measuring their respective activation markers in different portions of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid.

Prospective study in a university hospital. We studied 52 BAL samples, 37 from patients with lung cancer and 15 from a control group, using a radioimmunoassay technique to analyze for tryptase (T), hyaluronic acid (HA) and eosinophil cationic protein (ECP) in separate bronchial and bronchoalveolar samples from BAL fluid. Statistical analysis was performed using the R-SIGMA program.

Patients with tumors had significantly higher T and HA levels in BAL fluid than did control patients, in both bronchial and bronchoalveolar portions. Lung cancer patients had higher T and ECP levels in bronchoalveolar portions.

Mast cells and fibroblasts, at least, play a part in lung cancer, mainly in the distal portions of the bronchial tree.

Key words: Bronchoalveolar lavage. Tryptase. Lung cancer.

Introducción

Las investigaciones más recientes nos demuestran la importancia de los fenómenos inflamatorios en los procesos cancerosos, como una vía más del abordaje multidisciplinario de su tratamiento. Por este motivo, el co-

nocimiento de la posible participación de diferentes células inflamatorias en los mismos puede ser de gran interés, no solamente desde un punto de vista diagnóstico, sino del de posibles nuevos enfoques terapéuticos.

La inflamación de las vías aéreas puede ser estudiada mediante biopsias bronquiales que nos aportan una información cualitativa de las mismas, pero no nos permiten acceder con facilidad a la porción más distal del árbol respiratorio. Ésta puede ser explorada mediante el análisis del líquido procedente del lavado broncoalveolar (LBA) el cual, además, nos informa de una manera

Correspondencia: Dra. Márquez Pérez.
Sección de Neumología. Hospital Universitario Infanta Cristina.
Ctra. Portugal, s/n. 06080 Badajoz.

Recibido: 29-12-97; aceptado para su publicación: 16-6-98.

cuantitativa de los fenómenos inflamatorios presentes en esta zona menos accesible del sistema bronquial. En el líquido recogido del LBA pueden realizarse determinaciones diversas, fundamentalmente referentes a las poblaciones celulares presentes en dicho líquido. Muchos han sido los solutos analizados en el líquido del LBA, en un intento de acercarnos a la patogenia de algunas enfermedades, o en un intento de conseguir "marcadores" de ciertas situaciones patológicas. De entre estos marcadores, se han estudiado en el lavado algunas sustancias que, por estar relacionadas con el grado de activación de las células que las producen, son conocidas como marcadores de actividad de las mismas. Éste es el caso de la triptasa (T) marcador de actividad de los mastocitos¹, la proteína catiónica del eosinófilo (PCE) de dichas células² y el ácido hialurónico (AH) de los fibroblastos³, todas estas células relacionadas con fenómenos inflamatorios. La existencia de concentraciones elevadas de estas sustancias en el LBA del cáncer pulmonar, indicaría una activación de sus células de origen, por lo que éstas podrían estar intrínsecamente relacionadas con la inflamación en el cáncer de pulmón (CP).

Actualmente se reconocen dos tipos distintos de muestras resultantes del LBA: los primeros mililitros instilados y recogidos, que representan la muestra bronquial denominada *fracción bronquial*, y los siguientes, que serían más representativos de los alvéolos, y que denominamos por ello *fracción bronquioloalveolar*^{2,4,5}. El estudio por separado de estas 2 fracciones puede dar resultados diferentes, pero complementarios y, por lo tanto, interesantes de analizar.

Los objetivos que nos hemos marcado en el presente estudio, son los siguientes: a) conocer si existe participación de los mastocitos, eosinófilos y fibroblastos en la patología tumoral pulmonar, mediante la determinación de sus respectivos marcadores: triptasa, proteína catiónica del eosinófilo y ácido hialurónico, en el líquido procedente del LBA de sujetos diagnosticados de CP, y b) cuantificar los valores de los marcadores descritos en las diferentes fracciones del LBA (bronquial y bronquioloalveolar), para ver si existen diferencias entre ellas.

Pacientes y métodos

El estudio fue diseñado con carácter prospectivo y durante un período de 31 meses (entre diciembre de 1991 y junio de 1994), se realizaron 64 LBA en otros tantos pacientes con diagnóstico nuevo de cáncer de pulmón y 24 en individuos considerados como grupo control.

En el grupo tumoral el criterio de inclusión fue diagnóstico *de novo* de CP confirmado mediante métodos histológicos. En el grupo control se incluyeron individuos sin enfermedad actual respiratoria clínica, radiológica y funcionalmente demostrable. Los criterios de exclusión fueron cualquiera de las causas que constituyen contraindicación de broncofibroscopia, siguiendo las normativas de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)⁶.

De los 88 sujetos inicialmente incluidos en el estudio, solamente completaron el mismo 52 por las siguientes razones: imposibilidad de recuperar una cantidad de líquido del LBA

superior al 15% de lo instilado en 6 casos (todos pertenecientes al grupo tumoral), presencia de un líquido de LBA hemorrágico según visión macroscópica en 17 casos (11 cánceres y 6 sujetos del grupo control), y/o presencia de líquido obtenido del LBA, con aspecto turbio en 13 casos (10 enfermos y 3 sanos).

A todos estos individuos se les realizó historia clínica y exploración física completas, así como analítica sanguínea: hemograma, bioquímica sérica y estudio de coagulación, radiografía posteroanterior y lateral de tórax, TAC torácico y ECG. Ninguna de estas personas había tenido infección respiratoria durante al menos un mes previo a la realización de la prueba. Los individuos del grupo control fueron seguidos durante un mínimo de 10 meses posteriormente a la realización del LBA, comprobándose la ausencia de patología respiratoria.

Grupo control (grupo A)

El grupo control lo constituyen 15 sujetos, con edades comprendidas entre 26 y 71 años (media $51,2 \pm 17,7$), de ellos, 10 varones (66,7%) y 5 mujeres (33,3%). Fumaban el 40% (6/15). En estas personas no se objetivó patología neumológica (ni en ninguna otra localización) tras haber completado el estudio médico, ni referían antecedentes de enfermedad pulmonar aguda en un período previo de 6 meses. El motivo por el que se realizó la broncoscopia fue: en 4 casos tos pertinaz, hemoptisis con estudio radiológico normal en otros cuatro, prueba de Mantoux positiva en tres, elevación de hemidiafragma en dos, uno con sospecha de estenosis traqueal, y uno con pinzamiento residual de un seno costofrénico lateral en la radiografía de tórax.

Grupo tumoral (grupo B)

El grupo de 37 enfermos incluidos en el estudio cumplía las siguientes características: 32 eran varones (86,5%) y 5 mujeres (13,5%), con una media de edad de $68,5 \pm 6,9$ (51-79) años. El 78,4% (29/37) tenían hábito tabáquico. La estirpe histológica de estos tumores era: 56,7% (21 casos) epidermoides; 13,5% (5 casos) adenocarcinomas, 10,8% (4 casos) anaplásicos de células pequeñas, 5,4% (2 casos) anaplásicos de células grandes, 8,1% (3 casos) tumores metastásicos únicos y 5,4% (2 casos) carcinomas no clasificables.

Siguiendo el protocolo de estudio, los parámetros estudiados han sido iguales para cada uno de los grupos a los que nos hemos referido con anterioridad. En cada uno de ellos se analizaron: sexo, edad y hábito tabáquico, volumen total de líquido recogido, número de células por mililitro de líquido del LBA, el componente citológico (macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos), y el componente bioquímico; en este sentido, se determinaron los valores en el LBA de los siguientes marcadores: mieloperoxidasa (MPO), T, AH, PCE y proteínas totales (PT).

Se realizó en todos los individuos broncofibroscopia con lavado broncoalveolar que se llevó a cabo en cada caso según las normativas recomendadas y estandarizadas⁶, mediante broncofibroscopio (BFC) marca Olympus BF tipo 10. En todos los casos se utilizó premedicación con atropina y anestesia tópica de la vía aérea. El LBA en los sujetos del grupo control se realizaba en cualquier territorio pulmonar, de preferencia en un segmento o subsegmento del lóbulo medio o lingula. En los pacientes tumorales, el LBA se llevó a cabo en el bronquio afectado macroscópicamente por el tumor. Se instiló en cada caso un total de 150 ml de solución salina al 0,9% estéril y a temperatura ambiente, procesándose por separado el líquido recuperado de los primeros 50 ml (fracción bronquial), de los restantes (fracción bronquioloalveolar).

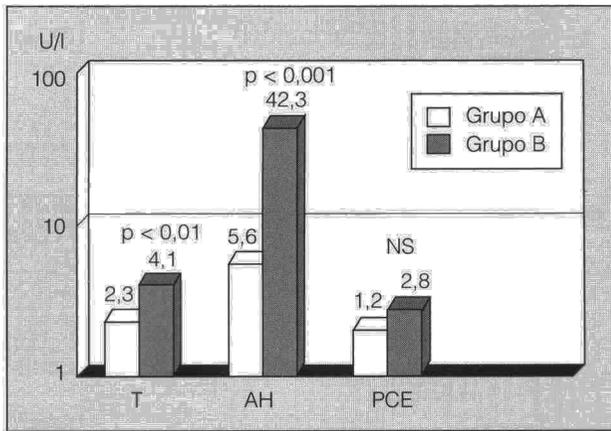


Fig. 1a. Comparación de medias de los valores de los marcadores inflamatorios de la fracción bronquial (Fb) del lavado broncoalveolar expresados en relación al volumen, entre grupo A (control) y B (tumoral). T triptasa (U/ml), AH ácido hialurónico (µg/ml), PCE proteína catiónica del eosinófilo (µg/ml).

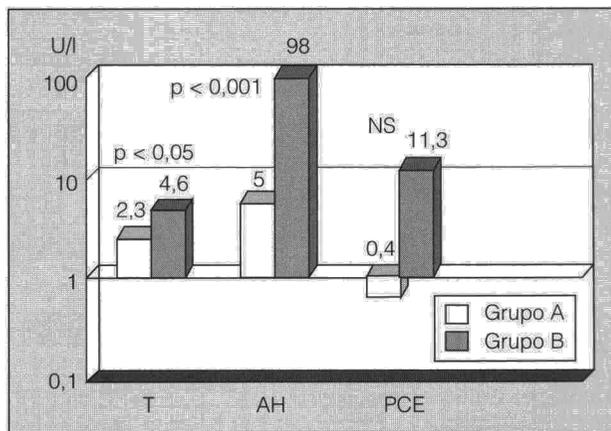


Fig. 1b. Comparación de medias de los valores de los marcadores inflamatorios de la fracción bronquioloalveolar (Fba) del lavado broncoalveolar expresados en relación al volumen, entre grupo A (control) y B (tumoral). T triptasa (U/ml), AH ácido hialurónico µg/ml), PCE proteína catiónica del eosinófilo (µg/ml).

En el sobrenadante se determinaron T, AH y PCE mediante radioinmunoanálisis (RIA) y PT por el método de Lowry. La comprobación se realizó mediante sueros validados internacionalmente de las firmas comerciales Kabi Pharmacia® (AH) y Pharmacia® (T y PCE). Las concentraciones de las sustancias estudiadas se han normalizado en relación a miligramos de PT en el líquido del LBA, de tal forma que los resultados se expresaron tanto en microgramos (PCE y AH) o unidades (T) de la sustancia por unidad de volumen de líquido, como en microgramos o unidades por miligramos de PT. Éstas, se determinaron mediante el método de Lowry⁷ y los valores se expresaron en mg/ml.

Para medir la radiactividad, se utilizó un contador gamma Gamma Chem 9612 (Lab System) y todas las muestras fueron comprobadas por duplicado mediante sueros control valorados internacionalmente, para que las cifras estuvieran dentro de las permitidas. Se aceptaron aquellas que presentaban un coeficiente de variación entre dos lecturas, no superior al 10%.

Estadística

Los datos de la estadística básica se obtuvieron por el programa informático estadístico R-SIGMA de HORUS S.A.: media, desviación típica, error estándar, intervalo y valor máximo y mínimo, prueba de Kolmogorov-Smirnov, comparación de medias pareadas o independientes, y pruebas de Wilcoxon y de Mann-Whitney.

Resultados

En las tablas I y II se expresan los valores medios de cada una de las variables analizadas en los grupos estudiados.

1. Tabaquismo: no encontramos diferencias en los valores de los marcadores de inflamación ni de proteínas en ninguna de las dos fracciones del LBA de los sujetos del grupo control entre fumadores y no fumadores. En el grupo tumoral tampoco encontramos diferencias con significación estadística en ninguna de las sustancias analizadas, entre fumadores y no fumadores, cuando fueron referidas al volumen. Expresadas en relación a las proteínas, encontramos significativamente más ele-

TABLA IA

Valores medios de los marcadores inflamatorios en el lavado broncoalveolar del grupo control expresados en unidades en relación al volumen

	Total (n = 15)	Grupo control no fumadores (n = 9)	Grupo control fumadores (n = 6)
Tb	2,3 ± 0,7	2,5 ± 0,4	2,1 ± 0,9
Ta	2,3 ± 0,6	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,8
AHb	5,6 ± 4,2	5,1 ± 3,8	6,2 ± 4,9
AHa	4,9 ± 5,2	4,8 ± 2,6	5,3 ± 8,7
PCEb	1,9 ± 2,5	1,4 ± 1,6	2,8 ± 3,4
PCEa	0,6 ± 0,9	0,6 ± 0,8	0,7 ± 1,1
Prot b	0,093 ± 0,08	0,068 ± 0,05	0,12 ± 0,11
Prot a	0,047 ± 0,04	0,033 ± 0,40	0,074 ± 0,04

Tb: triptasa de fracción bronquial; Ta: triptasa de la fracción bronquioloalveolar; AHb: ácido hialurónico de la fracción bronquial; AHa: ácido hialurónico de la fracción bronquioloalveolar; PCEb: proteína catiónica del eosinófilo de la fracción bronquial; PCEa: proteína catiónica del eosinófilo de la fracción bronquioloalveolar; Prot b: proteínas de la fracción bronquial; Prot a: proteínas de la fracción bronquioloalveolar.

TABLA IB

Valores medios de los marcadores inflamatorios en el lavado broncoalveolar del grupo tumoral expresados en unidades en relación al volumen

	Total (n = 37)	Grupo tumoral no fumadores (n = 8)	Grupo tumoral fumadores (n = 29)
Tb	4,1 (3)	3,6 ± 0,9	4,3 (2,9)
Ta	4,6 ± 9,7	3,3 ± 1	4,9 (2,8)
AHb	42,3 (12,8)	39,6 ± 35,5	43,1 (22,8)
AHa	98,5 (15,44)	42,5 ± 47,7	114 (14,9)
PCEb	2,8 ± (0,8)	2,2 ± 2,3	3 (0,82)
PCEa	11,3 (0,4)	0,3 ± 0,4	14,4 (0,4)
Prot b	0,23 (0,14)	0,22 ± 0,2	0,23 (0,14)
Prot a	0,13 ± 0,2	0,17 ± 0,2	0,12 (0,07)

*Las variables que no siguen una distribución normal, se expresan con la mediana entre paréntesis. Abreviaturas como en la tabla IA.

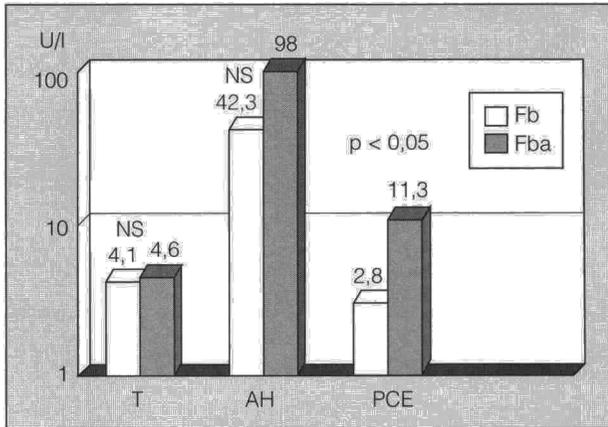


Fig. 2a. Comparación de medias de los valores de los marcadores inflamatorios del lavado broncoalveolar expresados en relación al volumen, de los pacientes con cáncer de pulmón, entre las dos fracciones (Fb: fracción bronquial; Fba: fracción bronquioloalveolar/ml), T: triptasa (U/ml); AH: ácido hialurónico ($\mu\text{g/ml}$); PCE: proteína catiónica del eosinófilo ($\mu\text{g/ml}$).

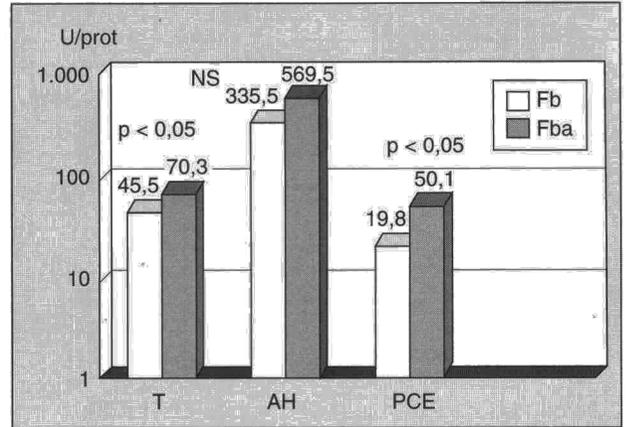


Fig. 2b. Comparación de medias de los valores de los marcadores inflamatorios del lavado broncoalveolar expresados en U/prot. = relación a las proteínas totales (PT), de los pacientes con cáncer de pulmón, entre las dos fracciones, Fb fracción bronquial y Fba fracción bronquioloalveolar. T triptasa (U/mg PT), AH ácido hialurónico (microgramos/ml PT), PCE proteína catiónica del eosinófilo (microgramos/mg PT).

TABLA IIA

Valores medios de los marcadores inflamatorios en el lavado broncoalveolar del grupo control expresados en unidades en relación a proteínas totales

	Total (n = 15)	Grupo control no fumadores (n = 9)	Grupo control fumadores (n = 6)
Tb	35,7 \pm 21,7	42,7 \pm 21,1	28,6 \pm 22,7
Ta	94,6 \pm 92	122,8 \pm 103,2	43,8 \pm 34,4
AHb	71,3 \pm 52,8	78,4 \pm 62,2	64,2 \pm 43,3
AHa	201,5 \pm 229,8	261,1 \pm 243,3	94,4 \pm 176,1
PCEb	25,4 \pm 30,1	29,9 \pm 30,9	23,9 \pm 32,1
PCEa	15,8 \pm 17,4	20,5 \pm 19,5	7,3 \pm 9,7

Abreviaturas como en la tabla IA y B.

TABLA IIB

Valores medios de los marcadores inflamatorios en el lavado broncoalveolar del grupo tumoral expresados en unidades en relación a proteínas totales

	Total (n = 37)	Grupo tumoral no fumadores (n = 8)	Grupo tumoral fumadores (n = 29)
Tb	45,5 \pm 39,2	43,5 \pm 37,8	42,3 \pm 40,6
Ta	70,3 \pm 84,2	52,1 \pm 40,3	75,4 (35,8)
AHb	335,5 (187,4)	410,7 \pm 508,7	314,4 (183,9)
AHa	569,6 (263)	304,4 \pm 267,8	642,7 (263)
PCEb	19,8 (6,48)	15,6 \pm 14,9	21,04 (6,4)
PCEa	50,1 (3,83)	2,88 \pm 2,3	63,6 (6)

Abreviaturas como en la tabla IA y B.

vados los valores de PCE de la fracción bronquioloalveolar en los fumadores ($p < 0,05$).

2. Grupos control y tumoral: hemos encontrado un incremento de los valores en el grupo tumoral en relación al control, de T y AH tanto de la fracción bronquial (0,01 y 0,001, respectivamente, para cada marcador) como en la bronquioloalveolar (0,05 y 0,001, respectivamente), cuando éstos los expresamos en relación al volumen (fig. 1 a y b). Cuando los valores se expresan relacionados a las proteínas totales, únicamente encontramos diferencias estadísticamente significativas en los valores de AH (fracción bronquial, con $p < 0,001$ y bronquioloalveolar, con $p < 0,05$), si bien las cifras del resto de los marcadores de inflamación estudiados en el líquido del LBA están elevadas en relación a los individuos sanos. Se encontraron valores de proteínas del LBA significativamente más elevados en el grupo tumoral respecto a los de los individuos del grupo control, tanto en la fracción bronquial, como en la bronquioloalveolar ($p < 0,05$ en ambas).

3. Fracciones del LBA: en los enfermos tumorales hemos encontrado valores más elevados en la fracción bronquioloalveolar respecto de la bronquial de T referi-

da a proteínas ($p < 0,05$) y PCE tanto en unidades de volumen como en PT ($p < 0,05$ en cada caso). Se encontraron valores de proteínas significativamente más altos en la fracción bronquial en este grupo de pacientes ($p < 0,05$) (figs. 2a y b).

Discusión

La triptasa es la proteasa neutra más importante de los mastocitos, y sirve como marcador específico de la actividad de dicha célula, ya que se encuentra de una manera casi exclusiva en este tipo celular^{8,9}. La concentración de T en los diferentes fluidos biológicos refleja la mayor o menor participación de los mastocitos en los diferentes procesos patológicos^{1,10}. En el LBA se han encontrado valores incrementados de esta sustancia en pacientes con asma bronquial^{1,11-15}, patología intersticial pulmonar (alveolitis alérgicas intrínsecas, sarcoidosis) y cáncer de pulmón^{16,17}. Se ha descrito un incremento de mastocitos en tejidos y muestras de LBA de pacientes con carcinoma broncogénico. En estos enfermos se demuestra un aumento de los valores de T en el líquido de LBA en relación a sujetos sanos¹⁶. A pesar de estos ha-

llazgos, no se conocen los mecanismos exactos que explican la presencia de mastocitos en el LBA de estos enfermos. Nosotros hemos encontrado valores más elevados de T en el grupo tumoral respecto del control, al igual que el grupo de Walls¹⁶, por lo que parece probable que esta estirpe celular esté relacionada en mayor o menor grado con los procesos inflamatorios que tienen lugar en el CP.

Aunque puede ser sintetizado por muchas células del organismo, la producción de ácido hialurónico (AH) se debe mayoritariamente a los fibroblastos activados, por lo que se le considera como un marcador de actividad de los fibroblastos en los diversos líquidos corporales³. Los valores de AH en el líquido del LBA se encuentran aumentados en individuos con enfermedades fibróticas del pulmón, como es el caso de la fibrosis pulmonar idiopática, en la que existe una correlación entre valores de AH en el LBA y gravedad de la alveolitis por una parte, y compromiso clínico por otra¹⁸. También se encuentran concentraciones elevadas de AH en el LBA de pacientes afectados de sarcoidosis y, en menor grado, con alveolitis alérgicas extrínsecas^{3,17} y asma¹¹. No hemos encontrado referencias bibliográficas en relación a los valores de AH en el LBA en el CP. En nuestro estudio hemos hallado valores más elevados de AH en los pacientes con CP respecto del grupo control, lo que indica un cierto grado de participación de los fibroblastos en los fenómenos inflamatorios de esta enfermedad.

La PCE es una proteína básica presente en la matriz de los gránulos específicos de los eosinófilos y se libera con la estimulación de éstos; por dicho motivo, se considera a la PCE como marcador de actividad de los eosinófilos¹¹. Se encuentran valores elevados de PCE en el LBA de pacientes con asma, tanto alérgico como no^{11,19} y fibrosis pulmonar idiopática²⁰. No se han encontrado estudios en los que se analicen los valores de PCE en el LBA de pacientes con CP. Nosotros hallamos valores significativamente superiores de PCE en los pacientes del grupo tumoral respecto a los del grupo control.

No deja de sorprender el hecho de que los valores de los marcadores estudiados sean superiores en las vías aéreas más distales, en una enfermedad con afectación preferente de las vías aéreas proximales, indicando probablemente la existencia de procesos inflamatorios más allá del tumor, y en ausencia de datos clínicos y radiológicos que sugieran infección distal al mismo.

En conclusión, hemos encontrado: *a*) valores incrementados de T y AH en el LBA de los pacientes con CP, sugiriendo una participación de mastocitos y fibroblastos en la patología tumoral pulmonar, y *b*) en el CP existen valores más elevados de T y PCE en la fracción del LBA más representativa de las vías aéreas distales, por lo que la activación de estas células en el CP parece ser mayor en esta zona.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schwartz LB. Tryptase, a mediator of human mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 594-598.
2. Escudero Pastor A, Hernández-García J. Diagnostic performance of eosinophil protein quantification. *Allergol Immunopathol* 1993; 21: 233-240.
3. Bjermer L, Engstrom-Laurent A, Thunell M, Hallgren R. Hyaluronic acid in bronchoalveolar lavage fluid in patients with sarcoidosis: relationship to lavage mast cells. *Thorax* 1987; 42: 933-938.
4. Rennard SI, Ghafouri MO, Thompson AB. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage to separate bronchial and alveolar samples. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 208-217.
5. Linden M, Rasmussen JB, Pittulainen E, Tunek A, Larson M, Tegner H et al. Airway inflammation in smokers with nonobstructive and obstructive chronic bronchitis. *Am Rv Respir Dis* 1993; 148: 1.226-1.232.
6. Castella J, Ancochea J, Llorente JL, Puzo MC, Sanchís J, Sueiro A et al. Recomendaciones SEPAR sobre lavado broncoalveolar. En: Recomendaciones SEPAR editores, Barcelona: Doyma SA, 1998; 79-100.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A and Randall RJ. Protein measurement with the phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
8. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase levels as indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med* 1987; 316: 1.622-1.626.
9. Castells MC, Irani AM, Schwartz LB. Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. *J Immunol* 1987; 138: 2.184-2.189.
10. Miller JS, Schwartz LB. Human mast cell proteases and mast cell heterogeneity. *Curr Opin Immunol* 1989; 1: 637-642.
11. Bousquet J, Chané P, Lacoste JY, Enander I, Venge P, Peterson C et al. Indirect evidence of bronchial inflammation assessed by titration of inflammatory mediators in BAL fluid of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 649-660.
12. Broide DH, Gleich GJ, Coumo AJ, Coburn DA, Federman EC, Schwartz LB et al. Evidence of ongoing mast cell and eosinophil degranulation in symptomatic asthma airway. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 637-648.
13. Duddridge M, Ward C, Hendrick DJ, Walters EH. Changes in bronchoalveolar lavage inflammatory cells in asthmatic patients treated with high dose inhaled beclomethasone dipropionate. *Eur Respir J* 1993; 6: 489-497.
14. Weidner N, Austen KF. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract* 1993; 182: 156-162.
15. Pesci A, Foresi A, Bertorelli G, Chetta A, Oliveri D. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 684-689.
16. Walls AF, Bennet AR, Godfrey RC, Holgate ST, Church MK. Mast cell tryptase and histamine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. *Clin Sci* 1991; 81: 183-188.
17. Eklund A, Van Hage-Hamsten M, Skold CM, Johansson SG. Elevated levels of tryptase in bronchoalveolar lavage fluid from patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1993; 10: 12-17.
18. Bjermer L, Lundgren R, Hallgren R. Hyaluronan and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1989; 44: 126-131.
19. Aalbers R, Kaufman HF, Vrugt B, Koeter GH, de Monchy JG. Allergen induced recruitment of inflammatory cells in lavage 3 and 24 h after challenge in allergic asthmatic lungs. *Chest* 1993; 103: 1.178-1.184.
20. Hallgren R, Bjermer L, Lundgren R, Venge P. The eosinophil component of the alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. Signs of eosinophil activation in the lung are related to impaired lung function. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 373-377.