

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**FACULTAT DE MEDICINA**

**DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRÍCIA I GINECOLOGIA, MEDICINA  
PREVENTIVA I SALUT PÚBLICA**

**ÀREA DE PEDIATRIA**

**TIPIFICACIÓN DEL FENOTIPO INFLAMATORIO EN EL ASMA BRONQUIAL  
EN NIÑOS DE 7 A 14 AÑOS, MEDIANTE RECuento CELULAR Y  
DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS EN ESPUTO INDUCIDO**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA  
Y CIRUGÍA POR EL LICENCIADO EN MEDICINA Y CIRUGÍA**

**GERARDO VIZMANOS LAMOTTE**

**TUTOR  
Prof. ANTONIO CARRASCOSA LEZCANO  
DIRECTOR  
Dr. ANTONIO MORENO GALDÓ**

**BARCELONA, 2010**

Don Antonio Carrascosa Lezcano, Catedrático de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: **Tipificación del fenotipo inflamatorio en el asma bronquial en niños de 7 a 14 años, mediante recuento celular y determinación de citoquinas en esputo inducido**, ha sido realizado por Don Gerardo Vizmanos Lamotte bajo la dirección del Dr. Antonio Moreno Galdó, siendo yo tutor de la misma. El mencionado trabajo se encuentra en condiciones de ser presentado como tesis para optar al grado de doctor en Medicina y Cirugía.

Barcelona, 29 de octubre de 2010.

Profesor Antonio Carrascosa Lezcano



Don Antonio Moreno Galdó, Doctor en Medicina y Cirugía,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: **Tipificación del fenotipo inflamatorio en el asma bronquial en niños de 7 a 14 años, mediante recuento celular y determinación de citoquinas en esputo inducido**, ha sido realizado por Don Gerardo Vizmanos Lamotte bajo mi dirección. El mencionado trabajo se encuentra en condiciones de ser presentado como tesis para optar al grado de doctor en Medicina y Cirugía.

Barcelona, 29 de octubre de 2010.

Doctor Antonio Moreno Galdó

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer en primer lugar al Dr. Antonio Moreno Galdó, director de la tesis y maestro, su dedicación, ejemplo y amistad.

Al Profesor Antonio Carrascosa Lezcano, tutor de la tesis, por su apoyo y estímulo.

A los Dres. Santos Liñán Cortés, Nicolás Cobos Barroso y Silvia Gartner por haber compartido conmigo su pasión por la Neumología Pediátrica.

A los médicos (Dr. Carlos Martín de Vicente, Dra. Inés de Mir Messa), enfermeras (Maite, Dolors y Dolores), enfermero (Ángel), auxiliares (Ascen y Pepi) y secretaria (Pili) de la Unidad de Neumología Pediátrica y Fibrosis Quística del Hospital Materno-Infantil Vall d' Hebron de Barcelona por su apoyo constante.

Al Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Materno-Infantil Vall d' Hebron de Barcelona, por facilitarme los sueros hipertónicos.

A las Dras. M<sup>a</sup> Jesús Cruz, Susana Gómez Ollés y al Dr. Xavier Muñoz Gall, sin los que este proyecto no hubiera visto la luz.

A Lola y Leire por su ayuda inestimable en el laboratorio.

Al Hospital Nostra Senyora de Meritxell de Andorra y en especial al Servicio de Pediatría – Dres. Manuel Medina, Manuel Carranza, Eduardo Aísa y Josep Estrada – , al Servicio de Laboratorio – Dres. Toni Pérez y Javier Casal – y al Servicio de Farmacia Hospitalaria – Dra. Elvira Gea -, por apoyarme y ayudarme a acabar este proyecto.

A todos los niños y niñas que han participado en este proyecto y a sus madres y padres.

Agradecer también a mis maestros en la Pediatría - Dres. Ricardo Closa, José Moralejo, Adolfo Gómez Papí, Desiderio Martín, Xavier Allué, Xavier Batlle, Agustí Tarrés, Juan Carretero, Ferran Gómez, Xavier Lucaya, Salvador Salcedo, Eduardo González Pérez-Yarza, Constantino Sábado y Gerardo Vizmanos López– por acercarme a la ciencia pediátrica.

A la Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP) y a la Sociedad Española de Neumología Pediátrica (SENP) por su apoyo económico para la realización de este proyecto.

Agradecer también a todos los amigos que me habéis acompañado y ayudado durante estos años tan importantes de mi vida.

Os quiero agradecer a vosotros, Papá y Mamá, por habérmelo dado todo y por estar siempre a mi lado.

A Bárbara, Domi, Rafael y Tino, vuestro apoyo incondicional en todo momento. Gracias también a vuestros hijos: Mariana, Álvaro, Lucía y Tomás.

A Rosa y Juan (qepd), a Carlos, Carmen, Claudia y Álvaro, por su ayuda y su cariño.

A mis hijos – Gerardo, Lola y Rita – por vuestra alegría y por dar plenitud a mi vida.

A ti, Yoya, por todo lo que has aguantado y por creer en mí en los momentos más duros.

# ÍNDICE

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	10
I.1. Definición y prevalencia del asma en niños.....	10
I.2. Etiopatogenia del asma .....	11
I.3. Fisiopatología del asma .....	12
I.3.1. Obstrucción reversible de la vía aérea.....	13
I.3.2. Inflamación.....	13
I.3.3. Remodelado bronquial.....	14
I.4. Fenotipos de asma .....	16
I.4.1. Antecedentes y definiciones.....	16
I.4.2. Enfoque epidemiológico de los fenotipos asmáticos en los niños ....	18
I.4.3. Evolución a largo plazo y predicción de fenotipos .....	21
I.4.4. Fenotipos de asma e inflamación bronquial.....	24
I.5. Mecanismos inmunológicos y celulares implicados en la inflamación en el asma .....	26
I.5.1. Mastocitos .....	27
I.5.2. Eosinófilos .....	28
I.5.3. Neutrófilos .....	28
I.5.4. Linfocitos .....	29
I.5.5. Macrófagos.....	30
I.5.6. Fibroblastos y miofibroblastos.....	30
I.5.7. Citoquinas .....	31
I.5.8. Quemoquinas.....	37
I.5.9. Leucotrienos.....	38
I.5.10. Óxido nítrico .....	40
I.6. Diagnóstico del asma bronquial.....	40
I.6.1. Espirometría forzada y prueba broncodilatadora (reversibilidad de la obstrucción).....	40
I.6.2. Prueba de provocación bronquial (hiperrespuesta bronquial) con metacolina o adenosina .....	41
I.6.3. “Inflamometría” o medición de la inflamación en el asma .....	42
I.7. Esputo inducido .....	47
I.7.1. Antecedentes .....	47
I.7.2. Esputo inducido y citología en cáncer de pulmón.....	47
I.7.3. Esputo inducido y tuberculosis pulmonar.....	48
I.7.4. Esputo inducido y neumonía.....	49
I.7.5. Esputo inducido y reflujo gastroesofágico.....	49
I.7.6. Esputo inducido en fibrosis quística.....	50
I.7.7. Esputo inducido en enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).....	51
I.7.8. Esputo inducido en enfermedades pulmonares intersticiales y ocupacionales .....	51
I.7.9. Esputo inducido en el asma .....	51
I.7.10. Técnica y metodología de la inducción de esputo .....	54
I.7.11. Selección de la muestra de esputo obtenida por inducción.....	55
II. HIPÓTESIS .....	57
III. OBJETIVOS .....	59
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
IV.1. Diseño del estudio .....	61

IV.2. Sujetos objeto del estudio .....	61
IV.3. Variables del estudio .....	62
IV.4. Técnicas de inducción de esputo y de laboratorio .....	63
IV.4.1. Inducción de esputo .....	63
IV.4.2. Procesado de la muestra .....	64
IV.4.3. Determinación de citoquinas .....	73
IV.5. Análisis estadístico .....	73
V. RESULTADOS .....	75
V.1. Estudio piloto .....	75
V.2. Grupos de estudio .....	78
V.3. Inducción del esputo .....	78
V.3.1. Seguridad de la inducción de esputo .....	79
V.4. Características de la celularidad en el esputo inducido .....	80
V.5. Concentración de citoquinas en el esputo inducido .....	83
V.6. Comparación del perfil inflamatorio entre los pacientes asmáticos atópicos y no atópicos .....	84
V.7. Comparación entre asmáticos según recibieran o no tratamiento con glucocorticoides inhalados (GCI) .....	98
V.8. Determinación de FENO y eosinófilos en esputo inducido en asmáticos antes y después de tratamiento con GCI .....	102
VI. DISCUSIÓN .....	106
VI.1. Técnica de la inducción de esputo: tasa de éxito, viabilidad y contaminación celular .....	106
VI.2. Efectos adversos de la inducción de esputo .....	107
VI.3. Celularidad del esputo inducido en los diferentes grupos de niños ....	107
VI.4. LTB <sub>4</sub> y eosinófilos en esputo inducido después de tratamiento con GCI .....	109
VI.5. Recuento celular total en esputo inducido y peso del esputo .....	110
VI.6. Características esputo en pacientes asmáticos según si recibían o no tratamiento con GCI .....	111
VI.7. Concentración de citoquinas en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles .....	111
VI.7.1. Concentración de IL-10 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles .....	112
VI.7.2. Concentración de IL-4 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles .....	113
VI.7.3. Concentración de IL-5 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles .....	114
VI.7.4. Concentraciones de IL-8, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles .....	115
VI.7.5. Concentración de IL-1 $\beta$ en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles .....	118
VI.7.6. Concentración de IL-2 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles .....	119
VI.7.7. Concentración de IL-6 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles .....	119
VII. CONCLUSIONES .....	122
VIII. BIBLIOGRAFÍA .....	124

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Definición y prevalencia del asma en niños**

El asma, según la definición de la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA) de 2009, es un síndrome que incluye diversos fenotipos que comparten manifestaciones clínicas similares pero de etiologías probablemente diferentes (1).

Es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, condicionada por factores genéticos y ambientales, que cursa con hiperrespuesta bronquial y con una obstrucción variable al flujo aéreo.

La prevalencia del asma en adultos varía en las diferentes zonas geográficas y oscila entre el 2% de Tartu (Estonia) y el 11,9% de Melbourne (Australia). En niños, la prevalencia de sibilancias en los últimos 12 meses varía entre el 4,1% de Mumbai (India) y el 32% de Dublín (Irlanda) o Costa Rica (1;2). En España, durante los nueve años transcurridos entre 1993 y 2002, la prevalencia de síntomas de asma en niños entre 13 y 14 años se ha mantenido constante en torno al 9%. Sin embargo, en los niños de 6 a 7 años existió un aumento significativo, del 6,2 al 9,4% (3) (tabla 1). El cambio anual en la prevalencia de asma entre las fases I y III del estudio ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) fue de + 0,44 para niños y adolescentes (4).



**Tabla 1.** Prevalencia de síntomas de asma en niños españoles(3).

		Niños 6-7 años		Niños 13-14 años	
Años		1993	2002	1993	2002
Prevalencia en algún momento de la vida	Sibilancias	20,9%	29,5%	18,0%	17,8%
	Diagnóstico de asma	6,3%	10,9%	10,4%	12,8%
Prevalencia en el último año	Sibilancias	6,2%	9,4%	9,3%	9,2%

En cuanto a la prevalencia de atopia entre los niños asmáticos, García-Marcos y cols. encuentran un 62,4% en una población de niños asmáticos españoles (5), una cifra similar al 58% que observaron Pearce y cols. (6) y al 62,5% de Castro-Rodríguez y cols. (7).

Las tasas más altas de prevalencia de asma y sibilancias se dan tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (8), por lo que parece que hubieran dejado de existir las diferencias descritas por von Mutius y cols. (9) y Flynn (10), que dieron pie a la “teoría de la higiene”, entre alta prevalencia de asma en los “países ricos” y menor prevalencia de asma, aunque mayor de infecciones respiratorias, bronquitis y/o tos crónica en “países pobres”. La hipótesis que Castro-Rodríguez y cols. lanzan para explicar estos datos es que posiblemente, en los países desarrollados exista una tasa más alta de niños con asma atópica y que en los países en vías de desarrollo la relación se vea invertida a favor del asma no atópica (2).

## **I.2. Etiopatogenia del asma**

El asma es una enfermedad poligénica cuyas manifestaciones fenotípicas dependen de la susceptibilidad del individuo a unas condiciones medioambientales determinadas. En el estudio genético del asma se han encontrado regiones genéticas candidatas en los cromosomas 5 (5q34), 6, 11 (11q13), 12 (12q) y 20 (20p) (11) (tabla 2), llegándose a relacionar casi 120 genes distintos con su desarrollo o con la alergia (12).

En la etiopatogenia del asma intervienen diferentes agentes y mecanismos que serán analizados en detalle en los siguientes apartados.

El órgano diana de la enfermedad asmática es el pulmón y más concretamente los bronquios, en los que tienen lugar los cambios que generan los síntomas de los pacientes asmáticos: tos, sibilantes y disnea.

**Tabla 2.** Principales regiones genéticas candidatas en el asma (11).

Zona	Gen candidato	Función
5q34	IL-4, IL-5 IL-9, IL-13 GM-CSF	Interleuquinas proinflamatorias  Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
	Receptor $\beta$ 2	Broncodilatación
6p	HLA	Presentación de antígenos
6p21.3	TNF- $\alpha$ y $\beta$	Factor de necrosis tumoral
7q	TCR- $\alpha$	Receptor del linfocito T
11q13	Fc $\epsilon$ R1 $\beta$	Receptor IgE alta afinidad
12q14	IFN- $\gamma$	Interferón gamma
12q24	NOS1	Sintetasa 1 del NO
14q11.2	TCR- $\alpha$	Receptor del linfocito T
20p	<i>ADAM33</i>	Metaloproteinasa

### I.3. Fisiopatología del asma

Conceptualmente, en la fisiopatología del asma intervienen tres mecanismos que actúan sobre la vía aérea: la obstrucción reversible, la inflamación y el remodelado, que condicionan la hiperrespuesta bronquial.

### **I.3.1. Obstrucción reversible de la vía aérea**

Desde las primeras descripciones del asma se resaltó la obstrucción reversible de la vía aérea como el mecanismo fisiopatológico principal responsable de la sintomatología en el asma. En respuesta a un estímulo determinado y mediante la liberación de mediadores inflamatorios, la fibra muscular lisa de los bronquios se contrae, disminuyendo el diámetro de la luz bronquial. Esta obstrucción, causante de la sensación de ahogo en el paciente y de los sibilantes por la generación de un flujo de aire turbulento, suele ser reversible en el asma, siempre que ceda el estímulo que la inició y que se trate la crisis con medicación broncodilatadora y/o antiinflamatoria.

En algunos casos de asma grave, la obstrucción puede ser fija (no reversible) debido a una inflamación crónica y al remodelado bronquial.

### **I.3.2. Inflamación**

Desde la década de los años 80 del siglo XX, el concepto de inflamación cobró relevancia en la definición y comprensión de la fisiopatología del asma (13). A partir de estudios y ensayos clínicos en los que se realizaban biopsias bronquiales en pacientes asmáticos (14) se objetivó la existencia de células inflamatorias en la mucosa bronquial. Los hallazgos revolucionaron tanto el concepto como el manejo y tratamiento de los pacientes asmáticos, en el que los corticoides inhalados cobraron un papel terapéutico fundamental. En la población infantil se ha demostrado también la existencia de la inflamación bronquial en los niños asmáticos mediante biopsias bronquiales, lavados broncoalveolares y otras técnicas.

La inflamación bronquial en el asma es responsable de la obstrucción, tanto de forma directa (por engrosamiento de la mucosa bronquial) como por interacción con las células de la musculatura lisa de los bronquios.

A nivel celular, las células efectoras que están implicadas de forma directa en la fisiopatología del asma, son los eosinófilos y los mastocitos.

En los últimos años se ha profundizado en el estudio de la inflamación en el asma, descubriendo que es mucho más compleja que una simple inflamación eosinofílica (15). Así, en la inflamación asmática se ven implicadas todas las

células de las vías aéreas: células T, eosinófilos, mastocitos, macrófagos, células epiteliales, fibroblastos y células de la musculatura lisa bronquial.

Después de un estímulo directo (neumoalergeno en el asma atópica, metacolina en las pruebas de broncoprovocación inespecíficas) o indirecto (ejercicio físico, adenosina), las células presentes en el epitelio bronquial, liberan una serie de moléculas (leucotrienos, citoquinas y quemoquinas) que serán las responsables de la respuesta broncoconstrictora e inflamatoria.

Las citoquinas interleuquinas (IL) 4 y 5, secretadas por células Th2 efectoras, son responsables respectivamente, de la activación de la síntesis de IgE por parte de las células B y de la maduración y reclutamiento de eosinófilos hacia la vía respiratoria.

Por otra parte, la IL-13, otra citoquina secretada por células Th2, juega un papel importante en la hiperrespuesta bronquial (16;17).

Otras citoquinas de la vía Th2 son la IL-10, la IL-9 y la IL-12p70.

También pueden estar implicadas las células T CD4<sup>+</sup> con perfil de activación tipo Th1 que producen interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-2, IL-8, IL-1  $\beta$  y factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ), cuya función se describe más adelante.

### **I.3.3. Remodelado bronquial**

En el estudio del asma y en la comprensión de su fisiopatología, las técnicas invasoras: biopsias bronquiales y lavado broncoalveolar mediante fibrobroncoscopio, han sido determinantes (14;18-20).

El examen de la ultraestructura de los bronquios en adultos y niños asmáticos ha permitido conocer mejor los mecanismos responsables de la inflamación, la hiperrespuesta y el remodelado bronquial en el asma (21). Algunos autores han observado que el número de eosinófilos activados en la mucosa bronquial – considerados marcadores de inflamación- se correlaciona con la hiperrespuesta bronquial, lo que demostraría que existe una relación directa entre la inflamación de la mucosa bronquial (caracterizada por la activación de eosinófilos) y la disminución del diámetro de la vía aérea (22). Sin embargo, otros autores no sólo no encuentran esta relación, sino que consideran que puede existir inflamación en la vía aérea sin que se observen síntomas de

asma o hiperrespuesta bronquial, (23) o incluso que en ausencia de inflamación, los pacientes pueden presentar hiperrespuesta bronquial (14).

En los últimos años se han publicado estudios en lactantes y niños asmáticos, en los que, a través de biopsias bronquiales, se demuestra que, ya en fases iniciales de la enfermedad, se observa el engrosamiento de la capa reticular por debajo de la membrana basal verdadera (lámina reticular) y la presencia de eosinófilos en la mucosa bronquial –hechos que facilitan el despegamiento del epitelio bronquial-, así como la hiperplasia de las células caliciformes (24). Otros cambios descritos, que forman parte del remodelado bronquial, son la hipertrofia de la musculatura lisa bronquial, la hiperplasia de fibroblastos y miofibroblastos (25-27) y la angiogénesis (28).

La inflamación en el asma, determinada por marcadores inflamatorios como eosinófilos en mucosa bronquial (29;30), eosinófilos en esputo inducido y/o aumento de FENO (fracción exhalada de óxido nítrico), es reversible con tratamiento, mientras que el remodelado bronquial persiste y determina la hiperrespuesta remanente cuando ha desaparecido la inflamación (31).

Hoshino y colaboradores (32) demostraron la correlación entre el grosor de la *lamina reticularis* subepitelial y el número de fibroblastos en la submucosa de pacientes asmáticos. Encontraron también en los pacientes asmáticos una correlación positiva entre el grosor de la capa subepitelial y la puntuación total resultante de la suma de 8 síntomas (puntuados de 0 a 3) durante los 6 días previos (“attack score”), así como una correlación inversa entre el grosor del colágeno subepitelial y la dosis mínima de metacolina como indicador de hiperrespuesta bronquial (a mayor grosor, menor dosis mínima de metacolina o mayor hipersensibilidad de la vía aérea).

Ward y colaboradores (33) determinaron en un grupo de 35 asmáticos la función pulmonar, la inflamación de la vía aérea (presencia de eosinófilos, mastocitos y células epiteliales en lavado broncoalveolar), el remodelado bronquial (grosor de la membrana basal subepitelial reticular determinada a partir de biopsias bronquiales) y la hiperrespuesta bronquial (definida por la dosis de metacolina que produce un descenso del 20% sobre el FEV<sub>1</sub>: PD<sub>20</sub>) antes, a los 3 meses y a los 12 meses de iniciar tratamiento con fluticasona inhalada. Concluyeron que la fisiología, la inflamación de la vía aérea y el remodelado en el asma, están interrelacionados y mejoran con corticoides

inhalados. Se necesitó más tiempo (12 meses) para disminuir el grosor de la membrana basal y la PD<sub>20</sub>. Los autores sugieren que determinar la dosis necesaria de corticoides para tratar un paciente asmático basándose en criterios de síntomas, de función pulmonar e incluso de inflamación, puede llegar a ser simplista.

## **I.4. Fenotipos de asma**

### **I.4.1. Antecedentes y definiciones**

En la década de 1960 se estableció que el asma era una enfermedad bronquial inflamatoria, considerándose que existía un sustrato inflamatorio común en todos los pacientes (34). Sin embargo, los estudios clínicos, epidemiológicos y patológicos han puesto de manifiesto que el asma es una enfermedad heterogénea, y que no es posible considerar a todos los pacientes como afectados de una misma enfermedad. En este sentido algunos autores prefieren hablar del síndrome asmático (35) e incluso otros abogan por considerar el asma como un síntoma relacionado con enfermedades diversas aún no bien definidas (34).

En los niños, los estudios de la cohorte de Tucson determinaron la existencia de diferentes fenotipos, de forma que no todos iban a desarrollar un “asma clásica” (asma atópica o IgE dependiente) (36). Esto ha traído consigo que en la literatura anglosajona el término asma en los niños pequeños se haya sustituido ampliamente por el término “pre-school wheeze”, que podríamos traducir por bronquitis sibilantes en los preescolares (34).

La palabra fenotipo se define como la “realización visible del genotipo en un determinado ambiente” (37). Desde este punto de vista se puede definir el asma como una enfermedad crónica influenciada por la interacción de una serie de genes relacionados con el asma, con numerosos factores ambientales. El consenso actual, tanto en niños como en adultos, es que el asma no es una enfermedad única y que se pueden distinguir diferentes fenotipos y subfenotipos (35;36;38-41). A pesar de que existen diferencias entre los

fenotipos de niños y adultos, existen cada vez más evidencias de que el asma del adulto tiene su origen en la infancia (42). Estos fenotipos se suelen agrupar bajo el término común de asma porque reúnen los criterios clínicos simples para el diagnóstico de la enfermedad. Tradicionalmente realizamos el diagnóstico de asma basados en la presencia de los síntomas típicos de la enfermedad (sibilantes, disnea, opresión torácica) acompañados de obstrucción reversible de las vías aéreas. El “Tercer Consenso Internacional Pediátrico” define el asma como “una enfermedad crónica de las vías aéreas en la que se producen episodios recurrentes de sibilantes y/o tos persistente en una situación donde el asma es muy probable y en la que se ha descartado otras causas menos frecuentes” (43).

En los niños pequeños, sobre todo en los lactantes en los que no es fácil realizar pruebas de función pulmonar, el diagnóstico es puramente clínico. Una buena definición operativa para los niños de menos de 5 años de edad es el haber presentado tres o más episodios de sibilancias de al menos 1 día de duración, con aceptable respuesta a tratamiento broncodilatador (44). En los niños mayores es necesario además demostrar en algún momento de su evolución la presencia de una obstrucción bronquial reversible, siendo improbable el diagnóstico de asma en su ausencia.

La primera clasificación del asma en fenotipos se realizó a principios del siglo XX con la división entre asma intrínseco y asma extrínseco (45), concepto que aún es ampliamente utilizado. Aunque los clínicos reconocemos diferentes fenotipos de asma, aún no se han identificado marcadores biológicos que nos permitan identificar los diferentes fenotipos (39), por lo que es bastante complicado distinguirlos desde el punto de vista clínico. Por otro lado, existen algunas evidencias de que la identificación del fenotipo del paciente con asma puede ayudar en su tratamiento y existen propuestas para orientar el tratamiento del asma en relación al fenotipo (46;47) aunque nuestras herramientas para distinguir unos fenotipos de otros son muy limitadas actualmente (48-50) y necesitamos mejores instrumentos para diferenciarlos.

La clasificación del asma en diferentes fenotipos se puede abordar desde diversos puntos de vista: criterios clínicos o fisiológicos, criterios relacionados

con los factores desencadenantes, y criterios relacionados con los hallazgos patológicos (39)(tabla 3).

**Tabla 3.** Clasificación de los fenotipos asmáticos (39)

---

**Fenotipos clínicos o fisiológicos**

Definidos por la gravedad  
Con predominio de exacerbaciones  
Definido por limitación crónica al flujo aéreo  
Resistente al tratamiento  
Definidos por la edad de inicio

**Fenotipos relacionados con los siguientes desencadenantes**

Alergenos ambientales  
Ejercicio  
Aspirina y otros fármacos anti-inflamatorios no esteroideos  
Irritantes o alergenos ocupacionales  
Menstruaciones

**Fenotipos inflamatorios**

Eosinofílico  
Neutrofílico  
Pauci-granulocítico

---

Como es lógico, existe una amplia superposición entre las diferentes categorías y además es probable que un fenotipo específico no sea permanente sino que pueda variar con el tiempo. Por ejemplo, un niño prematuro de padres atópicos que padece una bronquiolitis por virus respiratorio sincitial tiene al menos 3 causas posibles para presentar un “síndrome asmático” (35).

En los siguientes apartados nos centraremos en los fenotipos clínicos basados en los estudios epidemiológicos y en los fenotipos inflamatorios.

#### **I.4.2. Enfoque epidemiológico de los fenotipos asmáticos en los niños**

A partir de los datos del seguimiento de la cohorte de Tucson se han definido tres tipos de síndromes que cursan con bronquitis sibilantes (36;51-54).

1.- **Bronquitis sibilantes precoces transitorias** asociadas a infecciones víricas, y limitadas a los 3 a 5 primeros años de vida. Su factor de riesgo principal es la existencia de unas vías aéreas pequeñas (niveles disminuidos



de función pulmonar antes de presentar infecciones respiratorias). Son también factores de riesgo para este grupo: tabaquismo materno durante el embarazo y tabaquismo pasivo tras el nacimiento, hijos de madres jóvenes, asistencia a guardería, el tener más de un hermano y lactancia artificial. Como grupo no tienen antecedentes familiares de atopia ni presentan marcadores personales de atopia (36;52).

En este grupo estarían más del 80% de los lactantes que presentan bronquitis sibilantes el primer año de vida, 60% de los que las presentan el segundo año y un 30-40% de los niños de 3 años con bronquitis sibilantes (52).

Estos niños no tienen hiperrespuesta a la metacolina a los 11 años de edad, pero mantienen hasta la adolescencia una función pulmonar disminuida frente a los controles, aunque no tienen más frecuencia de bronquitis sibilantes que los controles a esta edad (53). Es posible que este grupo de niños tengan un mayor riesgo en la vida adulta de desarrollar una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, particularmente si fuman, debido a sus vías aéreas más pequeñas (52).

2.- Bronquitis sibilantes de base no atópica, asociadas también con infecciones víricas, que pueden persistir hasta los 11-13 años (**asma no atópica persistente de inicio precoz**). En este grupo de niños, los primeros episodios de bronquitis sibilantes se suelen presentar durante el primer año de vida, a diferencia de en los “persistentes atópicos”, en que es más frecuente que se inicien en el segundo o tercer año de vida (36;52).

Este grupo de niños tiene una función respiratoria normal al nacer que en su evolución posterior disminuye y se mantiene a los 11 años y a los 16 inferior al grupo control (53).

Es conocido que los niños que presentan una bronquiolitis por virus respiratorio sincitial en los primeros 3 años de vida tienen un riesgo aumentado de presentar bronquitis sibilantes recurrentes en los años posteriores que se reduce con la edad (55). Parece que estos niños presentarían una obstrucción de la vía aérea desencadenada por infecciones víricas en relación con una alteración del tono del músculo liso bronquial (hiperrespuesta bronquial).

La alteración del tono muscular de la vía aérea podría ser congénita debida a factores genéticos (aumento de labilidad de la vía aérea genéticamente determinado y presente antes de que presentaran la primera bronquiolitis), o adquirida tras presentar una infección por virus respiratorio sincitial, por la lesión que éste pueda originar a nivel de la pared bronquial. También es posible que pueda existir una combinación de los dos factores. Estudios realizados en ratas (56) sugieren que la infección por VRS produce un incremento de la reactividad a la sustancia P -mediador broncoconstrictor del sistema no-adrenérgico no-colinérgico (NANC)- que se traduce por más extravasación, más vasodilatación y mayor adhesión de leucocitos al endotelio que se matienen incluso pasada la infección por VRS (57).

Este fenotipo no se asocia con atopia, y en los países desarrollados representa una forma más leve y menos persistente de bronquitis sibilantes (36).

De los niños que iniciaron sus episodios de bronquitis en los 3 primeros años de edad y a los 6 años los continúan presentando, un 40% corresponderían a asma no atópica persistente y un 60% a asma atópica (54).

3.- Bronquitis sibilantes asociadas a sensibilización alérgica, que corresponderían al fenotipo clásico de asma (**asma atópica**). Su base parece estar en una alteración del sistema inmune y se asocian a sensibilización alérgica. Hay que tener en cuenta que sólo una minoría de los niños que posteriormente se clasificarán como asma atópica tienen en la edad de lactantes pruebas cutáneas (prick test) o IgE específica positiva contra aeroalergenos locales, a los que se sensibilizarán más tarde. De esta manera se da la paradoja de que en el momento de sus primeros episodios de bronquitis muchos de estos niños no son atópicos, y estas pruebas serán positivas sólo meses o años después de sus primeros episodios.

Los niños con asma atópica nacen con una función pulmonar normal y con el paso de los años y la aparición del asma muestran una hiperrespuesta bronquial.

Dentro de este grupo podemos encontrar 2 subgrupos: asma atópica precoz (inicio los 3 primeros años de vida) y asma atópica de inicio tardío (después de

los 3 años de edad). Ambos presentan una frecuencia similar de sensibilización a los aeroalergenos a los 6 años de edad. En cambio existen diferencias importantes desde el punto de vista funcional: los niños del grupo que inició la clínica durante los 3 primeros años de vida presentan ya una función pulmonar disminuida a los 3 años de edad y mantienen niveles disminuidos de función pulmonar a los 6, 11 y 16 años de edad, mientras que los del grupo de inicio tardío no muestran una disminución de la función pulmonar a los 11 y 16 años en relación con el grupo control (53). Parece pues que el inicio precoz del asma atópica iría asociado a una mayor gravedad del asma.

Aunque menos frecuente, existiría también la posibilidad de presentación de un fenotipo de asma no atópica de inicio tardío en los niños, aunque la mayoría de niños en nuestro medio que desarrollan asma de forma tardía corresponden al grupo de asma atópica (58).

Recientemente, Castro-Rodriguez y cols. (2), basándose en las observaciones de la cohorte de Tucson (59) y de un estudio de Varraso y cols. (60), han propuesto un cuarto fenotipo de asma en los niños: el de las niñas no atópicas con sobrepeso u obesidad y menarquia temprana. En estas niñas, la interacción entre un índice de masa corporal elevado y una menarquia temprana produciría una alteración en la producción de hormonas y, secundariamente, una alteración del desarrollo pulmonar y del tono bronquial (2).

#### **I.4.3. Evolución a largo plazo y predicción de fenotipos**

A pesar del evidente interés de esta clasificación epidemiológica de los fenotipos, especialmente desde el punto de vista pronóstico, la separación clínica de los subgrupos no está muy clara, y con frecuencia resulta imposible distinguir en un niño dado a qué subgrupo pertenece.

Si pudiéramos predecir qué lactante con sibilantes en los primeros años de vida tiene riesgo de tener asma persistente en el futuro, tendríamos la posibilidad de mejorar el tratamiento de estos niños, y así reducir la morbilidad del asma a largo plazo.

Aunque como hemos visto existen diferencias evolutivas en los distintos fenotipos en cuanto a la presencia o ausencia de hiperrespuesta bronquial a los 11 años de edad, la determinación de la hiperrespuesta bronquial en la época de lactante o preescolar no tiene un valor predictivo. En nuestro grupo hemos estudiado la presencia de hiperrespuesta bronquial en niños menores de 4 años de edad con bronquitis sibilantes de repetición, observando que tienen un aumento de la respuesta a la metacolina en relación al grupo control de niños sanos, aunque hay un tercio de los niños que no presentan esta hiperrespuesta (61). En el seguimiento prospectivo de los niños hemos comprobado que la hiperrespuesta estaba presente por igual en el grupo de niños con bronquitis sibilantes transitorias y en el grupo de niños con bronquitis sibilantes persistentes (62).

En la cohorte de Tucson, se elaboró un índice para predecir el asma o índice de Castro-Rodríguez, que combina criterios clínicos y de laboratorio, aplicable a los niños de 3 años de edad (48;50) (tabla 4).

**Tabla 4.** Algoritmo para definir en los primeros 3 años de vida el riesgo de asma (48)

---

Criterios mayores:

Antecedentes paternos de asma

Dermatitis atópica en los primeros 3 años de vida

Criterios menores:

Rinorrea no explicable por catarros (Rinitis alérgica)

Sibilancias no asociadas a catarros de vías altas

Eosinofilia ( $\geq 4\%$ )

---

El índice es positivo si un niño tiene más de 3 episodios de bronquitis sibilantes al año durante sus 3 primeros años (índice estricto), y 1 criterio mayor o 2 de los 3 criterios menores.

El valor predictivo positivo es del 77% (probabilidad de que los niños con índice (+) tengan asma atópica en la edad escolar). Por tanto no detecta un 23% de los sibilantes persistentes.

El valor predictivo negativo es del 68% (probabilidad de que en los lactantes con índice (-) desaparezcan las bronquitis sibilantes en la edad escolar) Por tanto, no detecta a un 30% de los sibilantes transitorios.

Se ha desarrollado un índice modificado a partir del Índice de Castro, que sería aplicable a los 2 años de edad y que se ha utilizado en algunos ensayos clínicos para seleccionar niños con alto riesgo de asma atópica (49) (tabla 5).

**Tabla 5.** Índice Predictivo de Asma Modificado (49). Aplicable a los 2 años de edad

---

Criterios mayores:

- Historia de asma en alguno de los padres
- Dermatitis atópica diagnosticada por un médico
- Sensibilización alérgica al menos a un aeroalergeno

Criterios menores:

- Sibilancias no relacionadas con resfriados
  - Eosinófilos en sangre  $\geq 4\%$
  - Sensibilización alérgica a proteínas de leche, huevo o frutos secos
- 

Actualmente podemos asumir que, si el niño con bronquitis sibilantes tiene menos de 2 años de edad, tiene un 60-70% de posibilidades de que estos cuadros se autolimiten con la edad durante los años siguientes, no desarrollando nunca asma.

Si tiene entre 2 y 6 años, entonces hay más probabilidades de que los sibilantes sean inducidos por virus y el niño probablemente deje de tener bronquitis durante la infancia o la adolescencia.

Si el niño es mayor de 6 años, hay una alta probabilidad de que el problema sea realmente un asma atópica verdadera, aunque estudios que llegan a la vida adulta sugieren que al menos en la mitad de estos individuos posiblemente desaparecerá su asma.

#### **I.4.4. Fenotipos de asma e inflamación bronquial**

Como se ha comentado anteriormente, desde el punto de vista fisiopatológico, los 2 aspectos subyacentes en el asma son las alteraciones funcionales respiratorias (hiperrespuesta bronquial y obstrucción bronquial reversible) y la inflamación bronquial. Hasta hace poco se pensaba que estaban estrechamente relacionados, originando la inflamación cambios estructurales en las vías aéreas, que determinarían las alteraciones funcionales. Sin embargo, como hemos comentado, parece que la relación no es tan directa entre ambas, sino que podrían tener un papel independiente en el asma, contribuyendo de forma diferente a sus manifestaciones clínicas. La hiperrespuesta bronquial estaría más relacionada con los síntomas diarios (tos, sibilancias), y la inflamación con las exacerbaciones (63).

Los primeros estudios patológicos, tanto en estudios postmortem, como en biopsias, pusieron de relieve el papel central de los eosinófilos en la inflamación asmática, demostrando un infiltrado por eosinófilos en la mucosa bronquial, que se comprobó mejoraba con el tratamiento con corticoides inhalados (64).

Sin embargo, estos estudios iniciales fueron relativamente pequeños y no totalmente representativos de la población asmática general. El estudio del esputo inducido ha permitido ampliar el estudio de la inflamación asmática a pacientes con asma leve y moderado. En adultos con asma sintomática, un 70-80% de los que no toman corticoides inhalados y un 50% de los que están tratados tienen aumento de eosinófilos en el esputo (63). Por tanto, existe una proporción de pacientes que tienen un tipo de inflamación diferente a la eosinofílica, que constituirían el fenotipo de asma no eosinofílico (recuento de eosinófilos en esputo menor al 1,9% en 2 o más ocasiones en pacientes sintomáticos). Dentro de ellos se podrían distinguir 2 subgrupos: inflamación neutrofílica (recuento de neutrófilos en esputo > 61%) y paucigranulocítica (recuento de neutrófilos normal, < 61%). Existiría un cuarto grupo con aumento tanto de eosinófilos como de neutrófilos (inflamación granulocítica mixta) (63). La diferenciación entre estos fenotipos tiene importancia clínica ya que el asma eosinofílico en general presenta una buena respuesta a corticoides inhalados, mientras que en el asma no eosinofílico la respuesta sería peor.

En los niños podemos aplicar estos conceptos de forma similar y, aunque en los niños en edad escolar con asma atópica podría predominar la inflamación eosinofílica (65), algunos estudios sugieren que las formas de asma no eosinofílico podrían representar hasta el 50% del asma pediátrico independientemente de la edad (66). En los estudios preliminares en nuestro grupo con esputo inducido en niños en edad escolar con asma, la inflamación eosinofílica predomina en los niños con asma atópica, y la neutrofílica en los no atópicos (67). Por último, también se han descrito casos de asma en ausencia de inflamación (68). Por tanto, la asunción de que todas las asmas en los niños se deben a una inflamación eosinofílica o incluso de que son todas de origen inflamatorio, puede ser un error.

En los preescolares y lactantes se dispone también de algunos datos procedentes de estudios realizados en niños en los que se ha practicado una intervención quirúrgica o broncoscopia por otro motivo, y de estudios en niños con asma de control difícil.

Krawiec y cols. estudiaron 20 niños con sibilantes persistentes (edad 4,5 – 48 meses) encontrando que tenían una inflamación significativa comparados con controles normales, reflejada en un aumento del número global de células en el lavado broncoalveolar, pero sin diferencias en los tipos celulares individuales (porcentaje respecto a las células totales) (69). En los estudios de Marguet y cols. (70) y en el de Le Bourgeois y cols. (71) en niños preescolares con bronquitis recurrentes, también se observó la presencia de inflamación en el lavado broncoalveolar con aumento del número total de células con predominio de inflamación de tipo neutrofílico, no existiendo aumento de eosinófilos. Stevenson y cols. (72) encontraron un aumento de eosinófilos en el lavado broncoalveolar en niños con asma atópica, tanto en los mayores de 5 años como en los menores de 5 años, mientras que no encontraron eosinofilia en los niños con sibilantes asociados con infecciones víricas, ni en los niños atópicos no asmáticos.

En un estudio con niños entre 3 meses y 5 años de edad con bronquitis sibilantes recurrentes de control difícil, Saglani y cols. (73) encontraron eosinofilia en la biopsia en un 44% de los niños (33% de los menores de 18

meses, 40% de los niños entre 18 y 36 meses y 64% de los niños mayores de 36 meses).

En conclusión, los niños pequeños con sibilantes persistentes presentan inflamación de las vías aéreas con un patrón de inflamación diferente al de los adultos y los niños mayores con asma, con mayor predominio del fenotipo neutrofílico.

### **I.5. Mecanismos inmunológicos y celulares implicados en la inflamación en el asma**

En las tablas 6 y 7 se resume el papel de las principales células inflamatorias y elementos estructurales de la vía aérea implicados en el asma, que se detalla a continuación.

**Tabla 6.** Células inflamatorias implicadas en el asma

---

**Mastocitos:** están aumentados, tanto en el epitelio como infiltrando el músculo liso de la pared, lo que se relaciona con el desarrollo de hiperrespuesta bronquial(74). Su activación da lugar a liberación de mediadores con efecto broncoconstrictor y proinflamatorio. Producen citoquinas que mantienen y promueven la inflamación.

---

**Eosinófilos:** están elevados en la vía aérea de la mayoría de los asmáticos y su número se relaciona con la gravedad. Están activados y su apoptosis inhibida. Contienen enzimas inflamatorias responsables del daño epitelial y generan mediadores que amplifican la respuesta inflamatoria(75).

---

**Neutrófilos:** están elevados en la vía aérea de algunos pacientes con asma grave, durante exacerbaciones, en caso de tabaquismo y en casos de asma relacionada con el trabajo(76).

---

**Linfocitos T (LT):** están elevados en la vía aérea, con un desequilibrio en la relación LTh1/Th2, con predominio del ambiente Th2(77). Los LT reguladores están disminuidos y los LT NK elevados.

---

**Células dendríticas:** son presentadoras de antígeno que interactúan con células reguladoras de los ganglios linfáticos y estimulan la producción de linfocitos Th2.

---

**Macrófagos:** pueden ser activados por alérgenos a través de receptores de baja afinidad para la IgE y liberar sus mediadores que amplifican la respuesta inflamatoria(78).

---



**Tabla 7.** Células y elementos estructurales de la vía aérea implicados en el asma

---

**Epitelio bronquial:** está dañado, con pérdida de las células ciliadas y de células secretoras. El epitelio libera mediadores que fomentan la inflamación. Agentes contaminantes e infección por virus respiratorios pueden estimular su producción y dañar el epitelio. El proceso de reparación que sigue al daño epitelial suele ser anormal, aumentando las lesiones obstructivas que ocurren en el asma(79).

---

**Musculatura lisa bronquial:** contribuye a la obstrucción por su hipertrofia, contracción y producción de mediadores proinflamatorios similares a los de las células epiteliales.

---

**Células endoteliales:** en la circulación bronquial participan en el reclutamiento de células inflamatorias desde los vasos a la vía aérea mediante la expresión de moléculas de adhesión.

---

**Fibroblastos y miofibroblastos:** estimulados por mediadores inflamatorios y factores de crecimiento, están implicados en la remodelación de la vía aérea.

---

**Nervios colinérgicos de la vía aérea:** se pueden activar, causar broncoconstricción y secreción de moco. Los nervios sensoriales pueden causar síntomas como la tos y la opresión torácica y pueden liberar neuropéptidos inflamatorios(80).

---

### **I.5.1. Mastocitos**

En los últimos años, diversos estudios han confirmado que los mastocitos desarrollan un importante papel en la fisiopatología del asma (81). Los mastocitos - que expresan en su superficie receptores de alta afinidad para la fracción constante de la IgE circulante - serían responsables de la inflamación en el asma a través de la liberación de histamina y citoquinas Th2 (IL-4 e IL-5) (82-84), provocando broncoconstricción, edema y secreción de moco bronquial. Otros estudios han implicado a los mastocitos en el remodelado bronquial que se produce en el asma, ya sea por estímulo de la proliferación y migración de fibroblastos (85) o por la liberación de componentes de la membrana basal (86). Hallazgos recientes indican que los mastocitos infiltran el músculo liso de las vías respiratorias (74). La interacción entre mastocitos y células de la musculatura lisa bronquial a través de proteasas, citoquinas y quemoquinas, induce la contracción y la proliferación de las células de la musculatura lisa bronquial, lo que favorece la hiperrespuesta y el remodelado bronquial (87;88).

### **I.5.2. Eosinófilos**

Los eosinófilos se encuentran en la lámina propia de los bronquios de los pacientes asmáticos alérgicos y no alérgicos, existiendo una correlación entre el grado de eosinofilia y de gravedad del asma (89). Después de un estímulo alérgico, los eosinófilos liberan eicosanoides, citoquinas Th2 y factores de crecimiento (90), que una vez activados producen broncoconstricción, aumento de la permeabilidad vascular e hiperreactividad bronquial (91). También liberan sustancias tóxicas (proteína básica mayor, proteína catiónica eosinofílica y radicales libres de oxígeno) que producen alteración y daño en la superficie del epitelio bronquial (81).

Del mismo modo que los mastocitos, los eosinófilos participan en el remodelado bronquial mediante liberación de factores de crecimiento, elastasa (92) y a través de la estimulación de fibroblastos (93).

Diversos estudios han encontrado una asociación entre la existencia de eosinofilia en las vías aéreas de pacientes asmáticos y el engrosamiento de la membrana basal subepitelial tanto en el asma grave (94), como en la moderada o leve (95), comparando con pacientes con asma no eosinofílica en los que el grado de engrosamiento de la membrana basal es menor o inexistente.

Sin embargo, algunos autores han cuestionado el papel de los eosinófilos en la fisiopatología del asma, al demostrar que el bloqueo de la IL-5 (principal citoquina responsable de la diferenciación y maduración de los eosinófilos) no tiene repercusión sobre los parámetros clínicos [hiperreactividad bronquial, FEV<sub>1</sub> (volumen espiratorio forzado en el primer segundo) y flujo espiratorio máximo (FEM)] en pacientes asmáticos (96).

### **I.5.3. Neutrófilos**

En algunos estudios se ha comprobado que existe un aumento en el número de neutrófilos en las vías aéreas en pacientes asmáticos, durante la fase tardía de la inflamación (entre 6 y 9 horas después de la provocación por un alérgeno) (97). Sin embargo, el papel exacto que desarrollan en la fisiopatología del asma

permanece desconocido. Se ha descrito la presencia de neutrófilos en las vías aéreas de pacientes con asma grave y en pacientes con asma córtico-dependiente (81;98). Existen evidencias sobre el papel de los neutrófilos en las exacerbaciones del asma, en las que se puede observar un aumento de neutrófilos y eosinófilos, o sólo de neutrófilos (76;99). Maneechotesuwan y cols. realizaron un ensayo clínico con 24 pacientes afectados de asma persistente moderada, a los que a 12 de ellos se les intentó inducir una exacerbación de su asma mediante la suspensión de la corticoterapia de base. En los pacientes que sufrieron una exacerbación (9 en total), observaron que existía un aumento de los neutrófilos totales en esputo, del porcentaje de neutrófilos en esputo y de la IL-8, 2 semanas antes de la exacerbación y durante la misma, respecto a los pacientes que no la sufrieron. A partir de estos resultados, sugirieron que la monitorización de la IL-8 y de los neutrófilos en esputo podría ser útil para predecir un episodio de exacerbación aguda de asma tras la suspensión de la corticoterapia de base (100). Estos datos contrastan con los estudios que sugieren que la disminución progresiva de corticosteroides en pacientes asmáticos induce una inflamación eosinofílica (101;102). Así, existirían diferentes mecanismos fisiopatológicos en la exacerbación desencadenada tras retirada total de corticosteroides (inflamación neutrofílica) y en la exacerbación desencadenada tras disminución progresiva de corticosteroides (inflamación eosinofílica) (103).

Los neutrófilos se han asociado con la obstrucción en el asma. Shaw y cols. encontraron que en asmáticos con un FEV<sub>1</sub> basal disminuido existía en las vías respiratorias un aumento tanto de los neutrófilos como de los eosinófilos, sin embargo, sólo los neutrófilos se asociaban con un FEV<sub>1</sub> posbroncodilatador disminuido (104). Esto sugeriría que los neutrófilos se asocian a un asma más grave y a la obstrucción crónica en estos pacientes (105).

#### **1.5.4. Linfocitos**

Los linfocitos, y en su gran mayoría los linfocitos T CD4, se encuentran aumentados en las vías aéreas de los pacientes asmáticos, tras una provocación alérgica (106) y juegan un papel determinante en la

fisiopatología del asma (105). En los últimos años, los linfocitos Th2 han adquirido protagonismo gracias a la identificación en pacientes asmáticos de factores de transcripción (GATA3, T-bet y Foxp3) que controlan su diferenciación y su respuesta (107). Los linfocitos Th1 se han relacionado con el desarrollo de una inflamación grave de la vía aérea en asmáticos (108) y en los últimos años se han descrito los linfocitos Th17 que producen IL-17 como responsables del reclutamiento de neutrófilos en el asma grave (109).

### **I.5.5. Macrófagos**

Los macrófagos alveolares se han correlacionado con la gravedad del asma (110) y se han aislado principalmente en pacientes con asma no atópica (111). Los macrófagos participan en la obstrucción y la inflamación bronquial mediante liberación de enzimas y de citoquinas (112) y podrían estar implicados en la regulación del remodelado bronquial a través de la estimulación de los fibroblastos.

### **I.5.6. Fibroblastos y miofibroblastos**

En los últimos años, se ha atribuido un papel cada vez más activo a los fibroblastos en la fisiopatología del asma. De las descripciones iniciales como células aparentemente sólo de sostén, han pasado a ser unas de las más importantes tanto en la broncoconstricción como en la inflamación y el remodelado bronquial en el asma. Los fibroblastos son capaces de liberar citoquinas proinflamatorias (113), sintetizar colágeno, fibras reticulares, elásticas y proteoglicanos que contribuyen al remodelado bronquial y transformarse en miofibroblastos y células musculares lisas (81). Como muestra de la complejidad de las interrelaciones entre inflamación y remodelado, Kelly y cols. demostraron que un antagonista de los receptores de los cisteinil-leucotrienos era capaz de disminuir el número de miofibroblastos presentes en las vías aéreas de pacientes asmáticos (114).

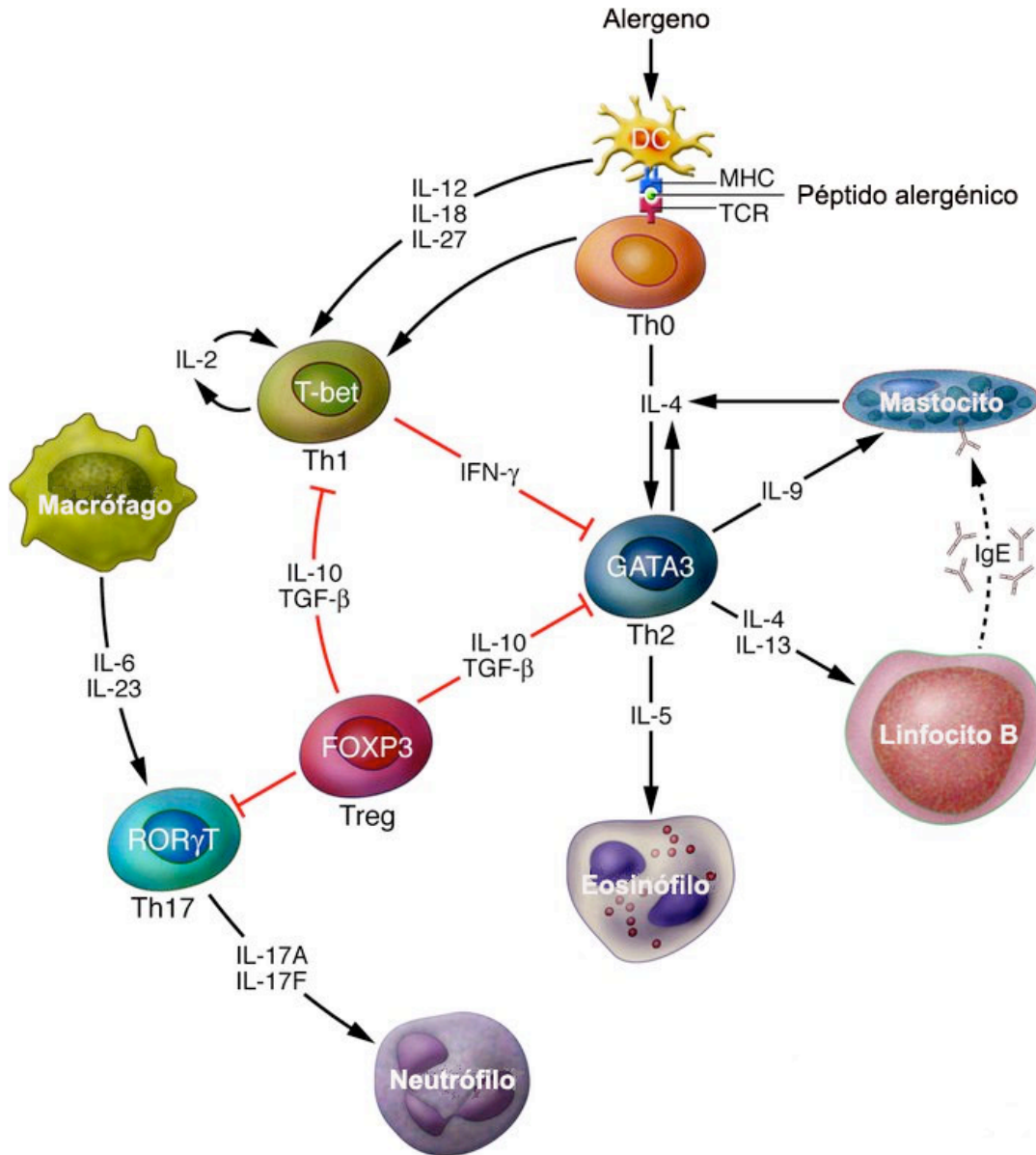
### **I.5.7. Citoquinas**

Las citoquinas son proteínas que regulan la función de las células y son responsables de la comunicación intercelular. Entre sus diversas funciones están la activación de receptores específicos de membrana, la quimiotaxis, la inducción de proliferación y diferenciación celular, la modulación de la secreción de inmunoglobulinas.

En la figura 1 se representan de forma esquemática las células responsables de la secreción de las citoquinas Th1 y Th2. Se incluyen las células Th17, descritas recientemente.

En la tabla 8 se resume la función de las principales citoquinas implicadas en el asma.

**Figura 1.** Representación esquemática de las diferentes células responsables de la secreción de citoquinas Th1/Th2 en el asma (a partir de Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Clin Invest. 2008;118:3546-3556).



DC: célula dendrítica. MHC: complejo mayor de histocompatibilidad. TCR: receptor de la célula T.

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

Factores de transcripción: T-bet; GATA3 (se unen a la secuencia de ADN "GATA"); FOXP3; ROR $\gamma$ T (es un receptor nuclear: "retinoic acid-related orphan receptor"); STAT3 ("signal transducer and activator of transcription 3").

Flecha negra: activación. Línea roja: inhibición.

**Tabla 8.** Función de las principales citoquinas implicadas en el asma

---

IL-5: citoquina sintetizada por linfocitos Th2 y mastocitos. Diferenciación, maduración y reclutamiento de eosinófilos (115).
IL-4: citoquina proinflamatoria. Diferenciación linfocitos Th0 en Th2, producción IgE (células B), aumenta número de receptores para IgE en mastocitos, promueve el reclutamiento de eosinófilos hacia el pulmón y estimula la proliferación de fibroblastos (116-118).
IL-13: comparte receptor y función con IL-4. Hiperplasia células caliciformes e hiperproducción de moco; fibrosis subepitelial. Responsable de la hiperrespuesta bronquial (16;116).
IL-10: citoquina antiinflamatoria secretada por L Treg. Inhibe síntesis de citoquinas Th1 y Th2 (117;119).
IL-9: induce a mastocitos y eosinófilos. Producción de moco y colágeno e hiperrespuesta bronquial (120-122).
IL-33: degranulación eosinófilos (123). Respuesta Th1 y Th2 (124).
IL-6: citoquina antiinflamatoria. Regulación Th1/Th2 (125;126).
IFN- $\gamma$ : citoquina Th1 que inhibe respuesta Th2 y el reclutamiento de eosinófilos, y activa macrófagos y células epiteliales (127-129).
IL-2: estimulación del crecimiento y diferenciación de linfocitos Th1 y Th2 (116;130;131).
IL-8: activación de neutrófilos (132), liberación de histamina y leucotrienos por basófilos (133;134).
IL-12: promueve respuesta Th1 e inhibe Th2 y síntesis de IgE (135;136).
TNF- $\alpha$ : activa las células presentadoras de antígeno, las células epiteliales y los macrófagos (137) e induce hiperrespuesta bronquial (138).
IL-1 $\beta$ : secretada por células epiteliales, implicada en hiperrespuesta bronquial (139) y en gravedad del asma (140).
IL-17: recluta neutrófilos (109) y favorece remodelado bronquial a través de estímulo de IL-6 e IL-8 (141).

---

### **I.5.7.a. Citoquinas Th2** (ver figura 1 y tabla 1)

En el asma, la inflamación crónica latente está dirigida por células T CD4<sup>+</sup> con un fenotipo de activación denominado T *helper*-2 (Th2), que se define por su secreción de citoquinas (117). La presentación de antígeno por parte de las células dendríticas a las células T CD4<sup>+</sup> conduce a su activación Th2, en el caso del asma de origen alérgico o asma atópica. Las células Th2 secretan las citoquinas interleuquina (IL) 4, 5, 9 y 13 (127) que inducen la maduración y el reclutamiento de eosinófilos hacia la vía respiratoria y la producción de inmunoglobulina E (IgE) por células B (142). La IgE se fija en los receptores de los mastocitos, lo que desencadena la liberación de mediadores inflamatorios. Los mastocitos y los basófilos pueden almacenar citoquinas Th2 preformadas, que son liberadas durante su activación y que podrían inducir la síntesis de IgE, de forma independiente de las células T (81;82;143).

La **IL-5** es una citoquina clave en la diferenciación de los eosinófilos y en su maduración en la médula ósea. También es responsable del reclutamiento de eosinófilos hacia los lugares donde se desarrolla la inflamación alérgica (115).

En cuanto a la **IL-4**, interviene en importantes funciones proinflamatorias en el asma, siendo la única citoquina que controla la diferenciación de los linfocitos Th0 en Th2. La IL-4 participa en la producción de IgE, induciendo el cambio de clase de inmunoglobulina hacia IgE en las células B, aumenta el número de receptores para IgE en mastocitos, promueve el reclutamiento de eosinófilos hacia el pulmón y estimula la proliferación de fibroblastos y de células caliciformes productoras de moco (117;118;144). Se han identificado varios polimorfismos genéticos y haplotipos de la IL-4 que se asocian con los niveles de IgE total en suero y con asma (145).

Por otra parte, la **IL-13**, otra citoquina secretada por células Th2, pero también Th1 y en menor medida Th0, comparte numerosas características estructurales y funcionales con la IL-4. A destacar, que la IL-4 puede interactuar además de con su receptor específico, con el de la IL-13, lo que explicaría los efectos comunes de ambas citoquinas. La IL-13, mediante la hiperproducción de moco (por estimular la hiperplasia de células caliciformes) y su participación en la fibrosis subepitelial, es responsable de la hiperrespuesta bronquial (16).

Otras citoquinas de la vía Th2 son la IL-10 y la IL-9.



La **IL-10** es secretada por unas subpoblaciones celulares T que se denominan reguladoras (Treg) (117). Puede inhibir la síntesis de citoquinas por linfocitos Th1 y Th2 (119) y su función es básicamente antiinflamatoria e inmunomoduladora. Su presencia parece ser directamente proporcional a la respuesta a los corticoides: así, en el asma refractaria a corticoides, las células T CD4<sup>+</sup> son incapaces de producir IL-10 en cantidad suficiente (146).

La **IL-9** tiene múltiples efectos en la inflamación alérgica: a nivel de los mastocitos, aumenta su supervivencia e induce la síntesis de proteasas y la expresión del receptor de IgE de alta afinidad, sensibilizándolos para responder al estímulo alérgico; a nivel de los eosinófilos, los estimula a través de la inducción de los receptores de IL-5; y finalmente, estimula la secreción de moco a través de la inducción de la expresión de los genes de mucina y favorece el depósito subepitelial de colágeno (120-122).

A partir de estudios en ratones se ha implicado a las citoquinas IL-5, IL-9 e IL-13, a los factores de crecimiento TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y al factor de transcripción NF-kappaB, en el remodelado bronquial. Se ha demostrado la expresión de todos ellos en biopsias bronquiales en pacientes asmáticos, pero todavía está por definir su papel en el remodelado bronquial (147).

Otra citoquina de perfil Th2, recientemente identificada, es la **IL-33**, citoquina perteneciente a la familia de la IL-1, que induciría la degranulación de los eosinófilos y aumentaría su supervivencia (123). La IL-33 estimula la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 y de factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), por parte de los basófilos, por lo que parece ser una citoquina que participa en las respuestas Th1 y Th2 (124).

La **IL-6**, sintetizada por macrófagos, células dendríticas y células B, actuaría en la vía Th2, antagonizando el efecto inflamatorio de las interleuquinas -4, -5 y -13, por lo que se trataría de una citocina contrarreguladora y antiinflamatoria (125), aunque otros autores le atribuyen un papel en el desarrollo del remodelado bronquial, a partir de la estimulación de su producción por la bradiquinina (mediador inflamatorio secretado por los mastocitos) (148). Investigaciones recientes le atribuyen un papel en la regulación de la diferenciación Th1/Th2 donde promovería la activación de Th2 mediante

estímulo de la producción de IL-4 e inhibiría la respuesta Th1 mediante interferencia con el IFN $\gamma$  (126).

#### **I.5.7.b. Citoquinas Th1** (ver figura 1 y tabla 8)

Las células T CD4<sup>+</sup> con perfil de activación tipo Th1 también desarrollan un papel en la fisiopatología del asma, aunque mucho menos estudiado que el de la vía Th2. Las células Th1 producen interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-2, IL-8, IL-12p70, IL-1 $\beta$  y factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ) los cuales activan macrófagos y son responsables de la inmunidad celular mediada por células. Es evidente que existen múltiples citoquinas imbricadas entre las vías Th1 y Th2, lo que hace mucho más difícil la comprensión total de las vías de la inflamación en el asma.

El **IFN- $\gamma$**  que junto a la IL-12 son los principales promotores de la vía Th1, inhibe la vía Th2 y el reclutamiento de eosinófilos, y activa macrófagos y células epiteliales (127-129).

La **IL-1 $\beta$** , citoquina secretada por las células epiteliales de las vías aéreas, juega un papel en la hiperrespuesta bronquial (139) y está relacionada con la gravedad del asma (140). Investigaciones en modelos animales sugieren que la IL-1 $\beta$  tiene un papel en la respuesta alérgica tipo Th2 en el asma leve pero no en el asma grave (149) y en la migración de células del epitelio respiratorio en humanos en el proceso de reparación en personas sanas, pero no en asmáticos (150). Zeyrek y cols. encuentran asociación entre determinados polimorfismos de los genes de la IL-1 $\beta$  y del antagonista de su receptor (IL-1ra) y la predicción de asma en niños (151).

La **IL-2** actuaría como factor de crecimiento y activador de células Th1 y Th2 y su relación y balance con la IL-10 tendrían un importante papel en el asma (130;131).

La **IL-12** estimula la diferenciación Th1, promueve la producción de IFN- $\gamma$  por células T, induce la producción de IL-10 e inhibe la síntesis de IgE (127;135;136). La inducción de la forma bioactiva **IL-12p70** (heterodímero formado por las subunidades p35 y p40) durante la interacción entre las células dendríticas y Th depende de la activación del CD40 presente en las células Th

activadas por el ligando del CD40 (CD40L; CD154). El IFN- $\gamma$  actuaría como coestimulador para producir niveles altos de IL-12p70 (152).

La **IL-8** activa y recluta neutrófilos en las exacerbaciones asmáticas (153) y estimula la liberación de histamina y leucotrieno B<sub>4</sub> por los basófilos (154).

Numerosas publicaciones han demostrado una correlación entre la gravedad del asma y el aumento de citoquinas IL-8 e IFN- $\gamma$  (155). Es preciso aclarar que la IL-8 se incluye en el grupo de las quemoquinas (citoquinas con actividad quimioatrayente).

El factor de necrosis tumoral alfa (**TNF- $\alpha$** ) activa las células presentadoras de antígeno, las células epiteliales y los macrófagos (137) e induce hiperrespuesta bronquial (138).

Recientemente se ha identificado una línea de células T proinflamatorias, llamada Th17 y que producen **IL-17A**, una citoquina que induce la CXCL8 (IL-8) y que recluta neutrófilos (156). La IL-17 se encuentra aumentada en los asmáticos y Bullens y col. encontraron un aumento tanto de IL-8 como de IL-17 en los pacientes con asma persistente moderada y grave, incluso en los tratados con glucocorticoides inhalados. También demostraron en su trabajo una correlación entre IL-8 e IL-17 y los neutrófilos en esputo. A partir de estos hallazgos sugieren que tanto la IL-17 como la IL-8 serían responsables del reclutamiento de neutrófilos(109). La IL-17 estimula a los fibroblastos que secretan IL-6 e IL-8, lo que amplifica y perpetúa la inflamación y el remodelado bronquial en las vías aéreas (141).

### **I.5.8. Quemoquinas**

Las quemoquinas o quimioquinas son moléculas implicadas en el reclutamiento de células inflamatorias. En el asma, existe una vía quimiotáctica formada por las quimioquinas CCL11 (eotaxina), CCL5 (RANTES: acrónimo de *regulated on activation, normal T cells expressed and secreted*) y CCL13 (proteína-4 quimioatrayente de macrófagos, MCP-4) que se encuentran aumentadas y que interaccionan con el receptor CCR3 (*cysteine-cysteine chemokine receptor-3*), expresado en los eosinófilos, lo que contribuye a su reclutamiento hacia las

vías respiratorias (117). La secreción de quemoquinas por las células epiteliales bronquiales es inducida por el TNF- $\alpha$ .

Las quemoquinas RANTES e IL-8, según recientes estudios, se verían implicadas en la migración de las células de la musculatura lisa bronquial a través del epitelio bronquial, lo que podría jugar un papel importante en el desarrollo del remodelado bronquial (157).

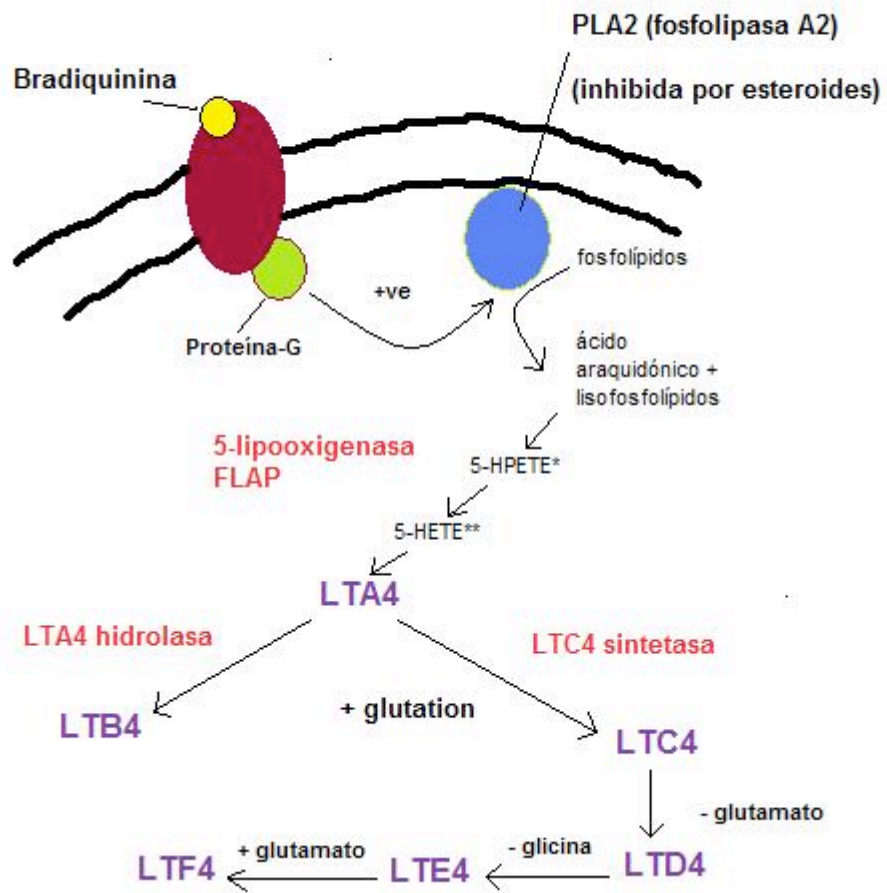
### **I.5.9. Leucotrienos**

Los leucotrienos son unas moléculas que se sintetizan a partir del ácido araquidónico, por acción de la 5-lipooxigenasa, dando lugar al leucotrieno A. A partir de éste se sintetiza el LTB<sub>4</sub>, por acción de una hidrolasa y los cisteinil-leucotrienos: LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> a partir de la LTC<sub>4</sub> sintasa (158) (ver figura 2).

El LTB<sub>4</sub>, también conocido como quimoatrayente de neutrófilos, es un potente quimiotáctico implicado en la inflamación y la respuesta inmune, a través de sus receptores BLT1 y BLT2, localizados en eosinófilos, polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos los primeros y en monocitos, polimorfonucleares y células endoteliales los segundos (159;160). La activación de linfocitos T CD8+ -que expresan en su superficie el receptor BLT1- por LTB<sub>4</sub>, induciría la secreción de IL-13, responsable de la hiperrespuesta bronquial (161).

Los cisteinil-leucotrienos son eicosanoides liberados por mastocitos y eosinófilos que actúan a través de los receptores de los cisteinil-leucotrienos Cis-LT1 y Cis-LT2, ubicados respectivamente en linfocitos B, basófilos, monocitos/macrófagos y eosinófilos los primeros y en las células de la musculatura lisa bronquial, macrófagos alveolares y células endoteliales pulmonares los segundos. Sus efectos comprenden: incremento de la permeabilidad vascular y aumento del edema de la vía aérea, contracción del músculo liso bronquial, incremento de la producción de moco, reclutamiento de eosinófilos del torrente circulatorio a las vías aéreas y cambios estructurales en la vía aérea (remodelado bronquial) (158;160;162).

**Figura 2.** Síntesis de leucotrienos a partir del ácido araquidónico.



\* 5-HPETE: ácido 5-hidroxiieicosatetraenoico

\*\* 5-HETE: ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico

FLAP: proteína activadora de la 5-lipooxigenasa

### **I.5.10. Óxido nítrico**

El óxido nítrico (NO) es un gas que está presente en el aire exhalado y se forma de manera continua en las vías aéreas. Es una molécula sintetizada a partir de L-arginina, mediante la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS). Existen tres isoformas de esta enzima: la NOS neuronal (NOS1 o nNOS), la NOS endotelial (NOS3 o eNOS) y la forma inducible (NOS2 o iNOS) por citoquinas, que tiene mayor actividad que NOS1 y NOS3 (163).

En 1991 se describió la presencia de NO en el aire exhalado de animales y humanos (164), descubriéndose poco después que en pacientes asmáticos se encontraba elevado respecto a los sanos (165) y que con tratamiento corticoideo disminuía (166). En población pediátrica se describieron hallazgos similares a los encontrados en adultos (167).

Existen evidencias de que los pacientes asmáticos muestran un incremento de la expresión de NOS2 en las células epiteliales bronquiales (168).

Hoy en día, a pesar de algunas discrepancias (169), se reconoce la medición de la fracción exhalada de óxido nítrico, o “inflamometría” como una herramienta útil para monitorizar a los pacientes asmáticos, ya sean adultos o niños (170-172).

## **I.6. Diagnóstico del asma bronquial**

El diagnóstico de asma debe sospecharse ante la presencia de tos, sibilancias y/o dificultad respiratoria que suelen ser variables y desencadenados por infecciones víricas, alérgenos, humo de tabaco o ejercicio. Es importante considerar para el diagnóstico, los antecedentes familiares de asma y/o atopia y los antecedentes personales de atopia (1;173), sin obviar la realización de pruebas funcionales respiratorias que darán el diagnóstico.

### **I.6.1. Espirometría forzada y prueba broncodilatadora (reversibilidad de la obstrucción)**

En el niño colaborador (mayor de 6 años), el diagnóstico funcional de asma sigue prácticamente los mismos criterios que en el adulto. Debe realizarse una

espirometría forzada con prueba broncodilatadora tras administración de salbutamol inhalado (400 µg). Se considera una prueba broncodilatadora positiva cuando el incremento del FEV<sub>1</sub> sobre el valor basal es mayor o igual al 12%. En los niños, es difícil obtener una espiración superior a seis segundos, por lo que se admite una espiración de 2-3 segundos.

En niños de 3 a 6 años (preescolares), con la metodología y los valores de referencia adecuados (174;175), es posible realizar pruebas funcionales respiratorias, teniendo en cuenta que en ocasiones debe utilizarse el FEV<sub>0,5</sub> en vez del FEV<sub>1</sub>, por ser el tiempo espiratorio inferior a un segundo.

### **I.6.2. Prueba de provocación bronquial (hiperrespuesta bronquial) con metacolina o adenosina**

Cuando la espirometría con prueba broncodilatadora no es concluyente, se puede realizar una prueba de provocación bronquial para demostrar la presencia de hiperrespuesta bronquial, mediante inhalación de concentraciones conocidas de metacolina o adenosina. La metacolina es un derivado sintético de la acetilcolina que es la sustancia broncoconstrictora natural, por lo que su acción es directa sobre la musculatura lisa bronquial. En cambio, el mecanismo de la broncoconstricción inducida por la adenosina sería a través de la estimulación de los receptores A<sub>2B</sub> de los mastocitos (176), que movilizaría los depósitos intracelulares de calcio e induciría la liberación de histamina y otros mediadores preformados, como cisteinil-leucotrienos, prostaglandinas e IL-8. La respuesta a la adenosina podría ser un marcador más sensible y específico del asma bronquial que la respuesta a la metacolina, tanto en niños mayores y adolescentes, como en preescolares (177).

Los criterios de positividad de las pruebas de provocación bronquial con metacolina o adenosina son dados por el valor de la concentración de metacolina o adenosina que produce un descenso del FEV<sub>1</sub> del 20 % (PC<sub>20</sub>) o de la dosis acumulada de metacolina o adenosina que produce una disminución del 20 % del FEV<sub>1</sub> (PD<sub>20</sub>). Se consideran normales valores de PC<sub>20</sub> > 8 mg/ml y de PD<sub>20</sub> > 7,8 µmol (178).

### **I.6.3. “Inflamometría” o medición de la inflamación en el asma**

#### **I.6.3.a. Fracción exhalada de óxido nítrico (FENO)**

En los últimos años, numerosos estudios han avalado la determinación de la fracción exhalada de óxido nítrico (FENO) como un marcador no invasivo de inflamación eosinofílica de las vías respiratorias (171;179) y el procedimiento para su medición ha sido estandarizado (180).

Durante la espiración se mezcla el óxido nítrico (NO) producido por los alvéolos con el NO generado en las vías aéreas de conducción por lo que las concentraciones de NO en el aire exhalado son flujo – dependientes, estando recomendada su medición a un flujo de 50 ml/seg (180). El NO cumple varios de los requisitos para ser un marcador ideal: es fácil de medir, puede considerarse una muestra directa de las vías aéreas inferiores, es posible realizar medidas repetidas, está aumentado en el asma bronquial y disminuye con el tratamiento antiinflamatorio. Inicialmente, la medición de la FENO se realizaba mediante analizadores con sensores de quimioluminiscencia, de elevado coste, pero en los últimos años han aparecido analizadores con sensores electroquímicos, de pequeño tamaño y bajo coste lo que puede facilitar la generalización de su empleo en el manejo del asma (181).

Existe una relación importante entre el aumento de la FENO y la presencia de inflamación eosinofílica. En este sentido se ha visto una buena correlación en niños con asma entre la FENO y el porcentaje de eosinófilos y los niveles de proteína catiónica del eosinófilo en el lavado broncoalveolar (182). De esta manera la determinación de la FENO (en niños no tratados con corticoides inhalados) es útil para establecer qué niños con asma tienen un fenotipo eosinofílico.

Recientemente se han publicado datos que muestran que la determinación de óxido nítrico exhalado puede ser de ayuda en el diagnóstico de asma:

En pacientes adultos un punto de corte de NO exhalado de 16 ppb mostró una especificidad elevada para el diagnóstico de asma (90%), aunque una baja sensibilidad (69%), y con un punto de corte de 13 ppb se obtuvo una especificidad del 85% y una sensibilidad del 80% (183). Datos similares se observaron en el estudio de Smith y cols. (184), observando una sensibilidad



del 88% y una especificidad del 79% y en el de Warke y cols. en el que obtuvieron una sensibilidad del 81% y una especificidad del 80% para un punto de corte de 17 ppb (182). También en un grupo de niños preescolares (edad 3,8 – 7,5 años), con un punto de corte de 9,7 ppb la sensibilidad del NO exhalado para el diagnóstico de asma fue de 86% y la especificidad del 92%, para discriminar niños con asma de controles sanos (185).

Debe tenerse en cuenta que en el caso de los analizadores electroquímicos (portátiles), los valores de FENO en asmáticos son superiores a los obtenidos con los analizadores de quimioluminiscencia, alcanzando el rango de 20-30 ppb (1;186).

Los valores predictivos de 2 de los estudios en adultos antes citados, fueron muy similares a los encontrados utilizando el recuento de eosinófilos en el esputo inducido (183;184). En estos estudios las pruebas diagnósticas tradicionales de función pulmonar tuvieron un rendimiento menor para el diagnóstico de asma que la determinación de la FENO. Al tratarse de una mayoría de pacientes con asma leve, las pruebas de función pulmonar con frecuencia son normales lo que favorece la mayor utilidad de la FENO.

No obstante, hay que recordar que hay pacientes que pueden cumplir los criterios convencionales para el diagnóstico de asma y tener una FENO normal, especialmente los niños con asma no atópica. Por tanto los valores normales de FENO no excluyen el diagnóstico de asma, que se debe confirmar en estos casos mediante las pruebas funcionales respiratorias (prueba de broncodilatación o prueba de hiperrespuesta bronquial).

En niños mayores y adultos, además de la utilidad diagnóstica, la determinación de FENO sirve para la monitorización del tratamiento corticoideo (187).

En los niños preescolares y lactantes la medición de la FENO nos podría permitir distinguir aquellos lactantes en los que las bronquitis serían de causa vírica y aquellos con asma de comienzo precoz que pueden responder al tratamiento con corticoides inhalados (188) o montelukast (189;190).

En el estudio de Gabriele y cols. (191), en lactantes de 4 a 25 meses de edad, los niños con bronquitis sibilantes recurrentes y atopia presentaron un nivel de FENO elevado, mientras que en los niños con bronquitis sibilantes recurrentes no atópicas el valor medio de FENO fue igual al de los controles. El área bajo

la curva ROC para un punto de corte de 14,1 ppb comparando los lactantes con bronquitis sibilantes recurrentes con los controles sanos fue de 0,71 (sensibilidad del 63% y especificidad del 63%), por lo que a pesar de que existen dificultades técnicas, la determinación de la FENO en los lactantes se muestra prometedora para identificar de forma no invasiva aquellos con un fenotipo eosinofílico. En el estudio de nuestro grupo, en niños menores de 4 años de edad con bronquitis de repetición, el valor de la FENO fue superior al de los controles sanos, aunque existió una superposición de valores muy importante con los niños normales sin llegar a obtener un valor discriminativo para diferenciarlos de los niños sanos, lo que iría a favor de una inflamación no eosinofílica en este grupo de pacientes (192).

### **I.6.3.b. Aire exhalado condensado**

La recogida de aire exhalado condensado (AEC) es una técnica no invasiva novedosa para la obtención de muestras de las vías respiratorias bajas ya sea de pacientes con respiración espontánea o sometidos a ventilación mecánica. La técnica se basa en la hipótesis que las partículas exhaladas durante la respiración reflejan la composición del líquido alveolar. El aire exhalado contiene aerosoles y vapores que se pueden condensar al respirar a través de un sistema de refrigeración y analizar con el objeto de estudiar los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades pulmonares: asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística o discinesia ciliar primaria. El principal componente del AEC es el vapor de agua condensado que representa más del 99% del fluido recogido. Entre los compuestos que se han aislado se encuentran sustancias implicadas en la cascada inflamatoria como  $H_2O_2$ , prostaglandinas, óxidos de nitrógeno ( $NO_2$  y  $NO_3$ ), leucotrienos (cisteinil-leucotrienos y  $LTB_4$ ), 8-isoprostano y citoquinas, por lo que su determinación es una herramienta útil en la demostración y la monitorización de la inflamación de las vías respiratorias (193).

No existen todavía métodos estandarizados para el cálculo de la dilución de las gotitas respiratorias y no se conoce con exactitud el origen anatómico de los biomarcadores. Sin embargo, otras técnicas como el esputo inducido, el lavado

broncoalveolar y en menor medida, la FENO, comparten con el AEC algunas de estas cuestiones sin resolver. Todavía no se ha validado ningún biomarcador en AEC para su uso en la práctica clínica aunque el pH del AEC es uno de los marcadores más estudiados y su determinación guarda características similares con la FENO. El pH disminuye con el asma, la EPOC y la fibrosis quística, por lo que su valor diagnóstico es limitado, al igual que la FENO. Sin embargo, al ser un marcador que se modifica con la corticoterapia, es útil para la monitorización y la optimización del tratamiento en el asma.

Para la técnica de la recogida de AEC es preciso respirar a volumen corriente durante 10-15 minutos a través de un dispositivo por lo que la única limitación en niños es que tengan capacidad de sostener una boquilla durante 10-15 minutos. Se aconseja la utilización de pinzas nasales para evitar que entre fluido nasal en orofaringe durante la inspiración y para conseguir que todo el aire exhalado salga por la boca. En algunos estudios en los que la inhalación se hace por la nariz y la exhalación por la boca se obtiene una mayor muestra de AEC, y no se encuentran diferencias en las concentraciones de adenosina, tromboxano  $TxB_2$  ni amoníaco. Sin embargo, en pacientes con inflamación de las vías respiratorias superiores existe un aumento de la concentración de adenosina en aquellos que inhalan por nariz y exhalan por boca, respecto a aquellos que inhalan y exhalan por boca. Es importante evitar la contaminación de la muestra obtenida con saliva, por lo que se aconseja enjuagues bucales o la colocación de reservorios para la saliva.

No se han descrito efectos adversos en la recogida de AEC, ni siquiera en pacientes con exacerbación de su asma y se han obtenido tasas de éxito elevadas en niños, a partir de los 4 años (194). En un reciente estudio, Robroeks y cols. encontraron niveles más altos de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IFN- $\gamma$ , IL-8 (o CXCL10) y otras quimioquinas y moléculas de adhesión en el aire exhalado de niños asmáticos (n=31) comparándolo con el de niños sanos (n=29) (195).

La recogida de AEC no influye en la función pulmonar ni en los niveles de los diferentes mediadores por lo que se puede repetir en el mismo paciente a intervalos cortos de tiempo.

Existen diferentes dispositivos para la recogida del AEC, algunos hechos a medida y otros comercializados. Todos tienen en común que el aire exhalado

circula por un circuito refrigerado en el que el se condensa y que el paciente realiza la inspiración a través de una válvula unidireccional para evitar la recirculación del aire exhalado previamente. De esta forma se obtiene en unos 10 minutos entre 1 y 2 ml de líquido que se congela a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la posterior determinación de mediadores de la inflamación.

Las principales limitaciones del AEC son:

- La obtención de concentraciones muy bajas de los marcadores que se quieren estudiar, por lo que su medición se encuentra limitada por la sensibilidad de las técnicas de inmunoensayo utilizadas
- La concentración de los diferentes biomarcadores es dependiente del flujo de exhalación, lo que hace difícil la estandarización de la técnica.

## **I.7. Esputo inducido**

El objetivo de la inducción de esputo es recoger una muestra adecuada de las secreciones respiratorias de las vías aéreas inferiores. La inducción de esputo se ha utilizado en el estudio de diferentes patologías respiratorias, y su aplicación en el estudio de la fisiopatología del asma ha renovado el interés por esta técnica.

### **I.7.1. Antecedentes**

Desde tiempos de Hipócrates (196), que lo consideraba uno de los cuatro humores esenciales del organismo, el esputo ha sido estudiado para intentar comprender la fisiopatología de las enfermedades pulmonares. Con el desarrollo de la citología y la microbiología, el esputo adquirió protagonismo en el diagnóstico de cáncer o de enfermedades infecciosas como la tuberculosis pulmonar.

### **I.7.2. Esputo inducido y citología en cáncer de pulmón**

En los años 50 del siglo XX se empezó a utilizar la inducción de esputo en pacientes con sospecha de cáncer de pulmón, en los que se estudiaba la citología obtenida. Bickerman y cols. (197) y posteriormente, Barach y cols. (198) introdujeron la nebulización de suero salino hipertónico calentado para la obtención de muestras en pacientes con sospecha de cáncer de pulmón.

Recientemente, se ha comparado el rendimiento de la inducción de esputo y el esputo no inducido respecto a la broncoscopia, en la obtención de citología positiva en pacientes con cáncer de pulmón. La muestra obtenida por inducción de esputo es superior al esputo no inducido y algunos autores encuentran que tiene un rendimiento igual al de la broncoscopia (199).

### **I.7.3. Esputo inducido y tuberculosis pulmonar**

A partir de los trabajos de estos autores, se introdujo la inducción de esputo mediante inhalación de suero salino hipertónico como técnica diagnóstica en la tuberculosis pulmonar. Diversos autores demostraron que esta técnica era tan efectiva o más que el lavado gástrico en la obtención de muestras de secreciones respiratorias con resultado positivo para el cultivo del bacilo tuberculoso. Es interesante el trabajo que publicaron Yue y Cohen en 1967 (200) en el que a lo largo de tres años, comparan el rendimiento de la inducción de esputo mediante inhalación de suero salino hipertónico al 10% y mediante inhalación de otras sustancias (dióxido de sulfuro, dornasa pancreática, acetilcisteína y agua estéril) en la obtención de muestras positivas (cultivo positivo) en pacientes tuberculosos. Concluyen que la sustancia con la que se obtiene un mayor rendimiento es el suero salino hipertónico. Por otro lado comparan la técnica de la inducción de esputo con las diferentes sustancias inhaladas con el lavado gástrico y obtienen un mayor rendimiento de la inducción de esputo en la obtención de muestras positivas.

En niños, la dificultad en la obtención de muestras de esputo ha hecho que durante mucho tiempo, la técnica de elección para la obtención de muestras en los pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar, fuera el lavado gástrico, por la facilidad con que los niños se tragan las secreciones respiratorias. Sin embargo, en los últimos años se ha desarrollado la técnica de la inducción de esputo en niños e incluso en lactantes con resultados superiores a los obtenidos por lavado gástrico. Zar y cols. estudiaron 250 niños de entre 1 mes y 5 años de edad a los que se sometió a inducción de esputo mediante inhalación de suero salino hipertónico al 5%. Encontraron que el rendimiento obtenido era mayor con la inducción de esputo y que el rendimiento en una sola muestra de esputo inducido era similar al de tres muestras de lavado gástrico. En la mayoría de los niños se obtuvo la muestra por succión a través de nasofaringe u orofaringe, ya que a estas edades, muchos son incapaces de expectorar (201).

#### **I.7.4. Esputo inducido y neumonía**

Otra de las utilidades de la inducción de esputo en patología infecciosa, es la obtención de muestras para el diagnóstico de neumonía por *Pneumocystis jiroveci* y para el diagnóstico etiológico en neumonía adquirida en la comunidad. En una revisión de 15 artículos en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), Oliveira y cols. encontraron que la inducción de esputo en estos pacientes tenía una sensibilidad del 55,5% y una especificidad del 98.6% para el diagnóstico de neumonía por *Pneumocystis jiroveci*, una sensibilidad del 60% y una especificidad del 40% para el diagnóstico de neumonía bacteriana y una sensibilidad del 36% y especificidad del 100% para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar (202). Lahti y cols. realizaron inducción de esputo a 101 niños con sospecha diagnóstica de neumonía adquirida en la comunidad y encontraron el posible agente causal (bacteriano o vírico) en el 90% de las muestras obtenidas, siendo el neumococo y el rinovirus los más frecuentes. Concluyen estos autores que el estudio del esputo inducido puede ser útil para el diagnóstico etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad en niños (203).

#### **I.7.5. Esputo inducido y reflujo gastroesofágico**

En el diagnóstico de tos crónica secundaria a reflujo gastroesofágico se ha considerado la presencia de macrófagos alveolares cargados de lípidos en muestras obtenidas por lavado broncoalveolar o esputo inducido, como una característica de reflujo gastroesofágico acompañado de aspiración (204). Se utiliza el índice de macrófagos cargados de lípidos (calculando la cantidad de lípidos intracelulares en una escala de 0 a 4, que contienen 100 macrófagos) tanto en adultos como en niños para determinar si la patología respiratoria es secundaria a reflujo gastroesofágico (205;206). Sin embargo, algunos autores concluyen que también pueden observarse en patología pulmonar no aspirativa por lo que su valor como diagnóstico de patología respiratoria secundaria a reflujo gastroesofágico queda cuestionado (204). En un estudio realizado en niños con sospecha de patología respiratoria secundaria a reflujo

gastroesofágico (diagnósticos iniciales de asma, neumonía recurrente, tos crónica y otros) se observó que los niños a los que se les había sometido a funduplicatura y que no mejoraron seguían presentando un índice de macrófagos cargados de lípidos elevado, por lo que concluyen que podría tratarse de un marcador de inflamación pulmonar y de gravedad de la enfermedad de base, más que un marcador de enfermedad secundaria a reflujo gastroesofágico (207).

#### **I.7.6. Esputo inducido en fibrosis quística**

En los pacientes afectados de fibrosis quística –la enfermedad genética grave más frecuente en la población de origen caucásico-, la colonización de las secreciones respiratorias por *Pseudomonas aeruginosa* marca la evolución de la enfermedad (208;209). Por ello es muy importante disponer de muestras de secreciones respiratorias, básicamente esputos, con el objetivo de realizar un seguimiento microbiológico periódico (209). Los pacientes adultos afectados de fibrosis quística suelen expectorar sin dificultad, sin embargo, menos de un 50% de los niños enfermos menores de 11 años son capaces de hacerlo incluso con la ayuda de un fisioterapeuta respiratorio (210). Con la inducción de esputo mediante inhalación de suero salino hipertónico, hasta el 100% de los niños afectados de fibrosis quística de entre 4 y 15 años de edad, es capaz de expectorar (211). La inducción de esputo en pacientes afectados de fibrosis quística es segura aunque Suri y cols. encontraron una correlación positiva entre incremento de edad y porcentaje de caída del FEV<sub>1</sub> con la inhalación de suero salino hipertónico (212). Además del cultivo del esputo, la muestra obtenida permite estudiar las características inflamatorias del esputo en pacientes con fibrosis quística, en los que predomina la inflamación neutrofílica con aumento de IL-8 (210;213;214).



### **I.7.7. Esputo inducido en enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)**

En los pacientes afectados de EPOC y en los fumadores sanos, el estudio del esputo inducido permite averiguar las características inflamatorias que diferencian a estos dos grupos de fumadores, lo que puede ser de gran ayuda para el mejor conocimiento de la enfermedad y para la optimización del tratamiento (215). En los pacientes con EPOC existe un aumento de IL-8 y de TNF- $\alpha$  respecto a los pacientes fumadores sanos (216). Por otro lado, se ha demostrado un mayor porcentaje de eosinófilos en el esputo inducido de los enfermos de EPOC con hiperrespuesta bronquial, hallazgo que se solapa con el asma eosinofílica (217). En cuanto a la terapéutica, Culpitt y cols. demostraron que la teofilina disminuye el recuento de neutrófilos, la IL-8 y la mieloperoxidasa en el esputo inducido de pacientes con EPOC (218).

### **I.7.8. Esputo inducido en enfermedades pulmonares intersticiales y ocupacionales**

Otro campo en el que el esputo se ha convertido en una importante herramienta diagnóstica es en el estudio de patología pulmonar intersticial y ocupacional. Así, en los pacientes con neumoconiosis, se aprecia un aumento significativo de linfocitos, con presencia de partículas de sílice o de metales pesados (asbesto) tanto en el citoplasma de los macrófagos como fuera de las células y en la sarcoidosis, además del aumento de linfocitos, se observa una relación CD4+/CD8+ aumentada, que se correlaciona con los hallazgos en el lavado brocoalveolar (219).

En el esputo de pacientes afectados de fibrosis pulmonar idiopática se detectan eosinófilos y linfocitos, así como una inversión del cociente CD4+/CD8+ (219).

### **I.7.9. Esputo inducido en el asma**

En el estudio del asma, y más en concreto, de la inflamación de las vías aéreas en el asma, se utilizan técnicas invasoras como la broncoscopia y otras no invasoras como la determinación de la FENO, y el estudio del aire exhalado

condensado y en las que se incluye la inducción de esputo. Ya en 1958 Morrow Brown reconoció que la eosinofilia en esputo era un factor predictor de respuesta a corticoides (220). Sin embargo, no es hasta los últimos 10-15 años –durante los cuales han mejorado notablemente tanto la metodología como la técnica- cuando el esputo inducido se ha convertido en un método de referencia en la determinación de la inflamación de la vía aérea.

Desde el que se podría considerar artículo seminal sobre la inducción de esputo en asmáticos (221), en el que se comparan las poblaciones celulares en esputo inducido de 17 pacientes asmáticos y 17 controles (sanos) hasta el día de hoy, se han publicado numerosos artículos sobre la inducción de esputo y la gran utilidad que adquiere en el estudio y la monitorización de la inflamación en el asma y se ha demostrado que las células que se obtienen en la inducción de esputo en asmáticos son las responsables de la inflamación bronquial a través de la secreción de citoquinas y leucotrienos (153;222-224). Existen también referencias y trabajos sobre la inducción de esputo en niños sanos y asmáticos. Wilson y cols. (225) realizaron la inducción de esputo mediante inhalación de suero salino hipertónico al 4,5% a 60 niños asmáticos y 27 controles, y obtuvieron un 54% de muestras con una buena viabilidad celular y baja contaminación. Jones y cols. (226) demostraron la seguridad y eficacia de la inducción de esputo y prueba de broncoprovocación con suero salino hipertónico al 4,5%, en niños asmáticos de entre 7 y 16 años. Posteriormente, Gibson y cols. (227) demostraron después de realizar la inducción de esputo en 183 niños (146 asmáticos y 37 controles) y obtener un 78% de rendimiento, que la gravedad del asma se correlacionaba con el grado de eosinofilia en esputo.

Cai y colaboradores (228) establecieron los valores de normalidad de células en el esputo inducido de niños, comparando una población de niños sanos (N=72) y una de niños asmáticos (n=50) en tratamiento corticoideo.

La muestra de esputo obtenida mediante inducción permite examinar las células presentes en las vías aéreas inferiores (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y mastocitos) y categorizar a los pacientes según exista o no predominio de eosinófilos en esputo (226-229). En pacientes asmáticos, en los que suele existir eosinofilia en esputo, se puede realizar diagnóstico, seguimiento y monitorización del tratamiento corticoideo a través de la

inducción de esputo. Numerosos autores han destacado la importancia del estudio del esputo inducido en asmáticos, por la divergencia que puede existir entre sintomatología y eosinófilos en esputo (230;231). Así, en pacientes asintomáticos, clínicamente en fase estable, se puede encontrar un número elevado de eosinófilos en esputo, lo que puede traducir o bien una resistencia al tratamiento de base (228) o la necesidad de aumentar el mismo.

Simpson y cols. establecieron 4 subtipos de inflamación en el asma, basándose en un punto de corte de 1% de eosinófilos en esputo inducido (232). Otros autores han establecido que puntos de corte entre 2 y 3% indicarían el tratamiento con glucocorticoides inhalados (GCI) (230;233). Muy recientemente, Simpson y cols. han publicado un trabajo en el que realizan inducción de esputo a 18 adultos con asma no eosinofílica y a 8 adultos con asma eosinofílica. Repiten la inducción en cada paciente a lo largo de 5 meses (una inducción por mes) y confirman que un punto de corte de 3% de eosinófilos en esputo inducido distingue entre asma eosinofílica y no eosinofílica, que este punto de corte se asocia con respuesta a GCI y que es estable y reproducible en un período de 5 meses (234).

En comparación con otros marcadores de inflamación bronquial, como la FENO, la eosinofilia en esputo inducido parece predecir de forma más fiable la inminencia de una crisis grave de asma (102).

A pesar de las numerosas ventajas (incluida la de ser una prueba no invasora) y de la precisión con que mide la inflamación bronquial, la inducción de esputo es una técnica que requiere tiempo, entrenamiento y una mínima infraestructura, por lo que no se puede realizar en cualquier centro (235).

Además del estudio de la celularidad bronquial, con la inducción de esputo se pueden determinar marcadores de inflamación como citoquinas, quemoquinas, eicosanoides y leucotrienos. Los estudios realizados hasta la fecha en los que se han determinado citoquinas (Th1 y Th2) en esputo, mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) y técnica ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), han permitido elucidar algunos de los mecanismos implicados en la fisiopatología del asma. Truyen y colaboradores (108) determinaron los niveles (mRNA) de citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10) en esputo inducido de 39 adultos asmáticos y 15 controles. En sus conclusiones destaca el aumento de IFN- $\gamma$  e IL-4 en los asmáticos, lo

que indicaría una activación simultánea de las vías Th1 y Th2. El IFN- $\gamma$  se encontraba más aumentado en los pacientes con asma no atópica y en las formas moderadas y graves. También encontraron una correlación positiva entre eosinófilos en esputo e IL-4 e IL-5, confirmando el papel que juegan las citoquinas IL-4 e IL-5 en la maduración y el reclutamiento de eosinófilos en el asma.

Otra de las citoquinas estudiada con profusión en patología respiratoria y en particular en el asma, es la IL-8. Clasificada como citoquina Th1, es principalmente reclutadora de neutrófilos. Algunos autores sugieren una interconexión entre el reclutamiento de neutrófilos por IL-8 y la activación de los eosinófilos en el esputo inducido de niños con exacerbación de su asma (153).

Otra interleuquina que se ha estudiado es la IL-13, que se correlaciona con la hiperreactividad bronquial. Park y colaboradores (236) encontraron una correlación inversa entre la PC<sub>20</sub> y la concentración de IL-13 en el esputo inducido de pacientes asmáticos.

#### **I.7.10. Técnica y metodología de la inducción de esputo**

Desde la primera descripción de un método estandarizado para la inducción de esputo, llevada a cabo por Pin y colaboradores en 1992 (221) hasta la publicación en 2002 de la Task Force de la ERS y la ATS (237;238) se han utilizado diferentes variantes técnicas para conseguir un objetivo: una muestra de esputo o secreción bronquial, previa inhalación de suero salino hipertónico.

La inhalación de suero salino hipertónico estimula la secreción bronquial y facilita la expectoración, con lo que en pacientes incapaces de generar un esputo de forma espontánea, se puede obtener una muestra con una mayor viabilidad celular (células vivas) y una mejor calidad que las obtenidas de forma espontánea(239;240). Algunos grupos han demostrado que no existen diferencias respecto al recuento celular o la determinación de algunos mediadores de inflamación (proteína catiónica eosinofílica, albúmina o metaloproteinasas de matriz) en esputo inducido con suero salino hipertónico o suero salino isotónico (241;242).

La inhalación de suero salino hipertónico en la inducción de esputo se realiza mediante un nebulizador ultrasónico, que permite un mayor débito y consigue un mayor tamaño de partículas que los nebulizadores tipo jet, lo que redundaría en un mejor rendimiento de la prueba (243).

En cuanto a la duración de la inhalación, se sabe que tanto los componentes celulares como los bioquímicos cambian a lo largo de la misma (244). Los neutrófilos y eosinófilos predominan en las muestras que se obtienen al inicio de la inducción, mientras que los linfocitos y los macrófagos aumentan con el tiempo de inducción. Esto sugeriría que las muestras obtenidas en los primeros minutos de la inducción provienen de las vías respiratorias centrales y las que se obtienen más tarde, provienen de las vías periféricas y de los alvéolos (239;245).

#### **I.7.11. Selección de la muestra de esputo obtenida por inducción**

Existen 2 métodos en la selección de la muestra para el procesado del esputo, recogidos por Efthimiadis y colaboradores (246): uno de ellos consiste en seleccionar los tapones de moco presentes en el esputo, con una cantidad mínima de 50 mg, y el otro, en procesar todo el material expectorado (esputo y saliva). Las ventajas de la selección de los tapones de moco respecto al procesado de todo el material expectorado son las siguientes: se puede expresar el recuento celular total por gramo de secreciones de vías respiratorias inferiores, la contaminación por células escamosas suele ser inferior al 5% -lo que facilita el reconocimiento de las células al microscopio- y, finalmente, se puede determinar con mayor precisión las concentraciones de sustancias en el sobrenadante, ya que no se ven afectadas por la dilución variable que causa la saliva (247).

## **II. HIPÓTESIS**

## **II. HIPÓTESIS**

1. Existen diferentes fenotipos inflamatorios en los niños de 7 a 14 años de edad, con asma atópica y no atópica, basados en el recuento celular y en la determinación de citoquinas en el esputo inducido.

2. El fenotipo inflamatorio - definido por la composición celular del esputo y la determinación de citoquinas - de los niños asmáticos, debe permitir una categorización o gradación más precisa de su enfermedad, así como un mejor tratamiento.

### **III. OBJETIVOS**



### III. OBJETIVOS

1. Establecer valores de normalidad del recuento celular en esputo inducido en niños sanos de 7 a 14 años de nuestra población.
2. Estudiar el fenotipo inflamatorio de los niños de 7 a 14 años de edad diagnosticados de asma atópica y no atópica, con diferentes estadios de gravedad, en fase estable, mediante la determinación en el esputo inducido del recuento celular y de citoquinas en el sobrenadante del esputo, y del óxido nítrico en aire exhalado.
3. Comparar los resultados obtenidos en los niños con asma atópica y no atópica, y en función de la gravedad del asma que presentan los niños.
4. Determinar la evolución dinámica de la inflamación bronquial realizando una segunda determinación a los 3 meses de la primera, analizando el efecto del tratamiento en aquellos casos en que clínicamente se haya considerado indicado.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **IV.1. Diseño del estudio**

Se ha realizado un estudio observacional descriptivo transversal, utilizando un muestreo de conveniencia.

### **IV.2. Sujetos objeto del estudio**

Se han incluido durante un período de tres años (2005 a 2008) niños afectados de asma bronquial, procedentes de la Unidad de Neumología y Fibrosis Quística del Hospital Universitari Vall d' Hebron de Barcelona y niños sanos procedentes de las revisiones del niño sano de una consulta de Pediatría general, e hijos de personal del Hospital Nostra Senyora de Meritxell de Andorra.

#### **Criterios de inclusión**

Para la inclusión de un niño en el estudio se requirió tener una edad comprendida entre 7 y 14 años de edad y estar diagnosticado de asma bronquial.

En el caso de los niños sanos (controles), el niño no debía tener antecedente personal de asma, rinitis o atopia.

Se estableció el diagnóstico de asma si el paciente presentaba clínica compatible, con una prueba broncodilatadora positiva (aumento del FEV<sub>1</sub> ≥ 12% respecto al valor inicial o aumento del FEV<sub>1</sub> ≥ 9% respecto al valor teórico) y/o prueba de esfuerzo con caída del FEV<sub>1</sub> ≥ 15% o prueba de metacolina con PC<sub>20</sub> < 8 mg/ml o PD<sub>20</sub> < 7,8 μmol (1).

Se clasificó a los niños asmáticos en atópicos si presentaban test cutáneos (prick test) positivos y/o IgE específica elevada (técnica RAST: *radioallergosorbent test*) a alguno de los neuroalergenos testados (*dermatophagoides pteronyssinus*, *dermatophagoides farinae*, epitelios de perro y gato, alternaria, pólenes de olivo, gramíneas, parietaria y plátano).

### **Criterios de exclusión**

Se excluyeron los niños afectados de otras patologías respiratorias crónicas (fibrosis quística, bronquiectasias, bronquiolitis obliterante, discinesia ciliar primaria, neumopatías intersticiales), así como los niños que hubieran presentado durante el último mes una infección de vías respiratorias o una exacerbación aguda de asma en las últimas 4 semanas, definida como dificultad respiratoria y necesidad de corticoides orales.

Durante el período de inclusión se admitió que hasta un 50% de los niños estuviera recibiendo tratamiento de base de su asma.

### **IV.3. Variables del estudio**

En todos los niños se recogieron los siguientes datos de la **anamnesis**:

Edad, sexo, antecedentes familiares de asma, atopia (rinitis, dermatitis atópica) y bronquitis en la infancia, ambiente de tabaquismo, edad de inicio de las crisis asmáticas, tipo de crisis (precedidas o no de infecciones de vías respiratorias altas), número de crisis al año, sintomatología entre crisis, clasificación de la gravedad del asma (episódica ocasional, episódica frecuente, persistente moderada o persistente grave según la guía GEMA 2003)(248), tratamiento recibido y fecha de la última crisis y del último tratamiento corticoideo oral.

A todos los pacientes se les realizó el **protocolo clínico** siguiente: hemograma, IgE total, IgE específica y pruebas cutáneas (prick test) a los siguientes **neumoalergenos**: *dermatophagoides pteronyssinus*, *dermatophagoides farinae*, epitelios de perro y gato, alternaria, pólenes de olivo, parietaria, gramíneas y plátano.

Se determinó la FENO mediante un analizador de quimioluminiscencia (modelo NIOX; Aerocrine, Suecia), siguiendo las recomendaciones de la American Thoracic Society (ATS) y de la European Respiratory Society (ERS) (180).

## **IV.4. Técnicas de inducción de esputo y de laboratorio**

### **IV.4.1. Inducción de esputo**

Se realizó la inducción de esputo mediante nebulización de suero salino hipertónico utilizando una ligera modificación del método descrito por Pizzichini y cols. (240;249).

Quince minutos antes de la inducción de esputo se realizó a los niños una espirometría basal y a continuación inhalaron 400 µg de salbutamol a través de una cámara espaciadora. En el caso de niños con asma persistente grave se añadió además 500 µg de salbutamol al suero hipertónico para evitar la broncoconstricción.

Se nebulizó suero salino hipertónico a concentraciones crecientes (alícuotas de 14 ml de 3, 4 y 5%).

Los niños inhalaron durante 5 minutos cada concentración, a través de una boquilla y una tubuladura conectadas a un nebulizador ultrasónico.

Se realizó una fase inicial del estudio para valorar si era más adecuado utilizar un nebulizador ultrasónico de bajo flujo (1 ml/min), o de alto flujo (> 2 ml/min), con 2 objetivos:

- Averiguar con qué tipo de nebulizador se obtenía un mayor rendimiento de la inducción de esputo (mayor número de muestras obtenidas).
- Comparar la seguridad de ambas técnicas.

Los nebulizadores ultrasónicos utilizados fueron de bajo flujo (OMRON NE-U07®, Vernon Hills, USA; débito de flujo 1 ml/min, capaz de generar partículas con un diámetro de masa media aerodinámico (MMAD) de 3,5 µm), y de alto flujo (OMRON NE-U12®, Vernon Hills, USA; débito 3 ml/min, MMAD 4 µm y DeVilbiss Ultraneb 3000®, Somerset, USA; débito 2,5 ml/min, MMAD 4 µm).

Después de cada período de 5 minutos se midió el FEV<sub>1</sub> mediante espirometría forzada. Se interrumpió la prueba cuando el FEV<sub>1</sub> disminuyó ≥ 15%.

El niño debía enjuagarse la boca con agua antes de la inducción y entre cada período de 5 minutos, para minimizar la contaminación de la muestra por saliva. Después de cada período de 5 minutos se animó al niño para que tosiera y arrancara el esputo para depositarlo en un contenedor estéril.

**Figura 3.** Inducción de esputo con nebulizador ultrasónico DeVilbiss Ultraneb 3000® (Somerset, USA).



#### **IV.4.2. Procesado de la muestra**

##### **IV.4.2.a. Preparación de la muestra**

En la muestra de esputo obtenida se seleccionaron los tapones de moco de origen bronquial, bien diferenciados de la saliva, que contiene numerosas células escamosas.

Los tapones se pesaron (peso mínimo aceptado: 0,05 g) en báscula de precisión y se añadió un volumen (en ml) de solución de DTT (dithiotreitol) al 0,1% (Calbiochem®, La Jolla, CA, USA) igual a 4 veces el peso del esputo (en gramos).

Se agitó la mezcla durante 10-15 segundos utilizando un mezclador Vortex a una velocidad media de 2.500 rpm. Posteriormente se colocó el tubo en banco mecedor durante 10 minutos. Se añadió un volumen de PBS (solución salina de Dulbecco tamponada con fosfatos) igual al de la solución de DTT empleada.

La suspensión resultante se filtró a través de una gasa de nylon de 48  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporate Headquarters, MA, USA), centrifugándose a continuación durante 10 minutos a 2.500 rpm.

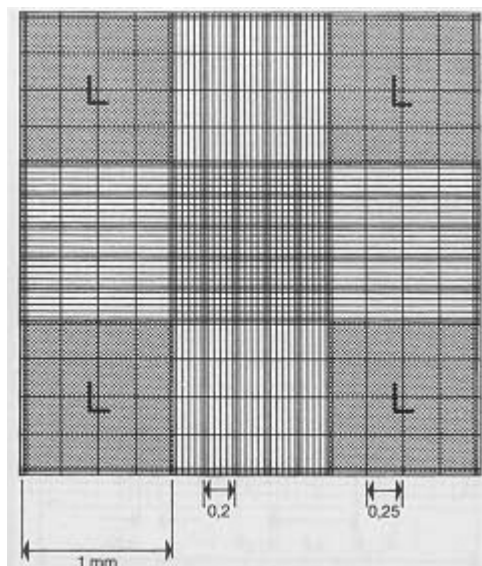
Después de la centrifuga se obtuvo un sobrenadante bien diferenciado del sedimento de células (“pellet”). Mediante una pipeta se aspiró el sobrenadante y se depositó en un tubo eppendorf que se colocó en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A partir de este sobrenadante se realizaron posteriormente las determinaciones de citoquinas y  $\text{LTB}_4$ .

#### IV.4.2.b. Análisis microscópico de la muestra

Se añadió al sedimento celular 0,5 ml de PBS y se procedió a la observación de la muestra con un microscopio óptico Olympus CX 21. Las lecturas se realizaron con un objetivo de 40 y la amplificación final a 400 aumentos.

Se determinó la contaminación y la viabilidad de la muestra en una cámara de Neubauer.

**Figura 4.** Cuadrícula de la cámara de Neubauer.

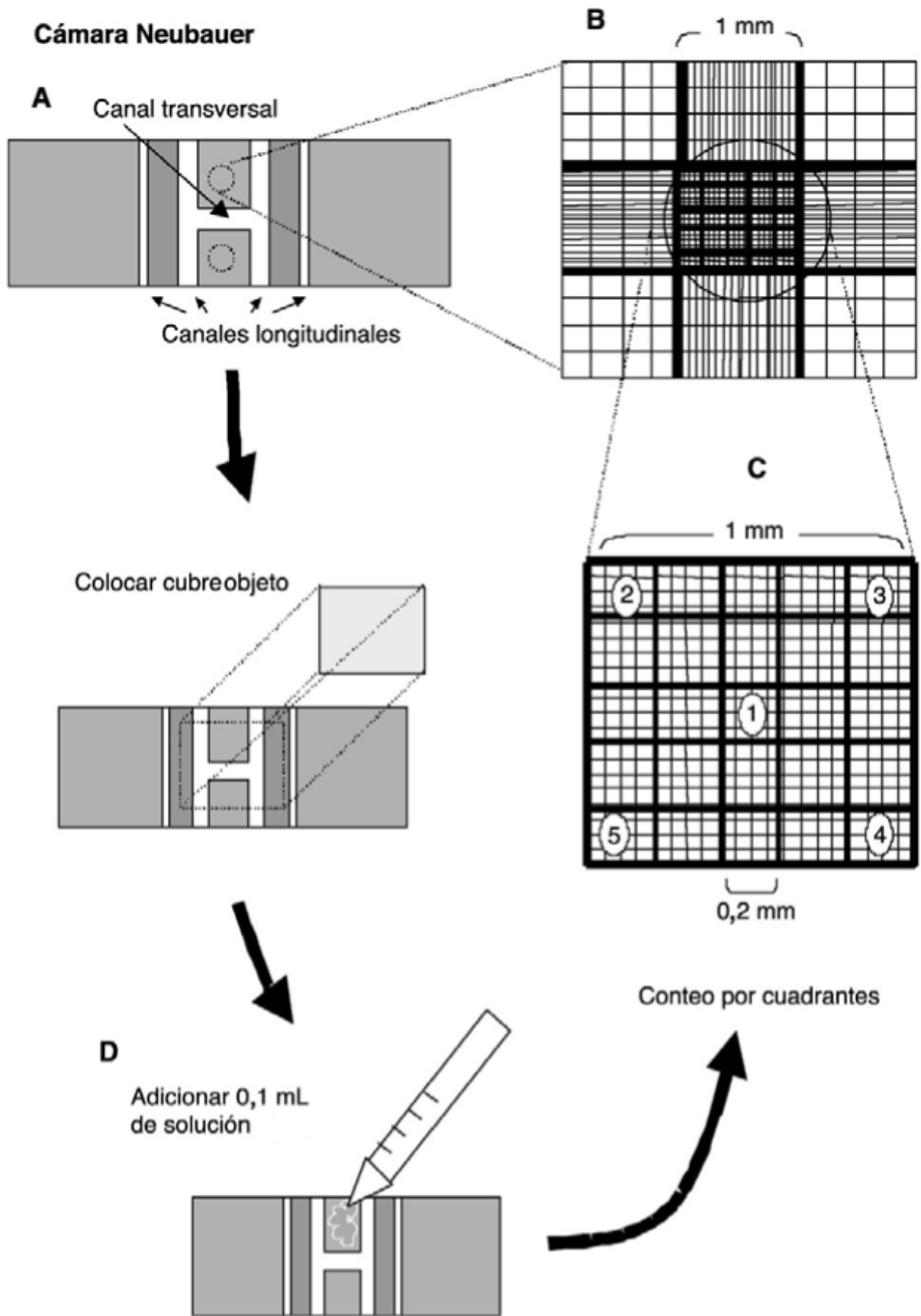


La cámara de Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de

un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen (figura 4). Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0,25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0,1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0,1 milímetro cúbico, es decir 0,1 microlitro (250). Para determinar la viabilidad celular se cuentan todas las células presentes en las cuatro áreas sombreadas L y en el área central.



**Figura 5.** Representación esquemática de la cámara de Neubauer y de su utilización.



Se realizó recuento de todas las células presentes en las 5 áreas de la cámara de Neubauer descritas previamente a la vez que se clasificaron en viables (V), no viables (NV) y escamosas (E).

El recuento celular total (RCT) es la suma de células viables (V) y no viables (NV) menos las células escamosas contaminantes (E)(251):

$$\text{RCT} = (V+NV)-E$$

El porcentaje de células contaminantes es(251):

$$\%E = E/(V+NV) \times 100$$

El porcentaje de células viables o la viabilidad se obtuvo a partir de la siguiente fórmula(251):

$$\%V = V/\text{RCT} \times 100$$

Se consideró **contaminación** de la muestra a partir de un 20% de células escamosas, procedentes de la saliva (ver figura 6).

La **viabilidad celular** se determinó mediante el método de exclusión del azul de tripano, coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Se consideró una muestra con una **buena viabilidad** a partir de un 60% de células viables.

La **muestra** fue **válida** cuando reunía las dos condiciones anteriores: células escamosas < 20% y células viables  $\geq 60$ .

A partir del recuento celular total y conociendo el volumen de líquido utilizado (cantidad total de DTT y PBS que era igual a 8 veces el peso de los tapones de moco seleccionados) se calculó la concentración celular en la preparación.

Una vez calculada la concentración, se multiplicó ésta por el peso del esputo y se obtuvo el número total de células por gramo de esputo.

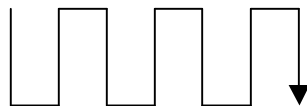
Para poder realizar el recuento diferencial de las células de la muestra se realizó la citocentrifugación. Este método consiste en colocar la muestra en el portaobjetos mediante una centrifuga, de manera que las células se sitúan, de forma ordenada, en un área circular determinada del portaobjetos y el fondo de

la preparación queda algo más nítido. La citocentrífuga consta de unos soportes que sostienen el portaobjetos y una cámara donde se coloca la muestra en suspensión. Entre el portaobjetos y la cámara se coloca un filtro con un orificio de un diámetro igual o superior al de la cámara que permite dejar pasar la muestra al portaobjetos y absorbe el líquido y los restos de células, de moco, de bacterias, etc. Se colocaron 100  $\mu$ l y 60  $\mu$ l de células resuspendidas en PBS a partir del pellet celular, en dos cámaras de la citocentrífuga y se centrifugó durante 6 minutos a 450 rpm. A partir de cada muestra procesada se obtuvieron dos preparaciones de células en dos portas.

Después de dejarlas secar al aire, se fijaron las preparaciones con metanol (durante 10 minutos) y posteriormente se tiñeron (tinción de May-Grünwald-Giemsa) para poder realizar el **recuento diferencial celular** mediante el recuento de 400 células de la preparación (figuras 7 a 10).

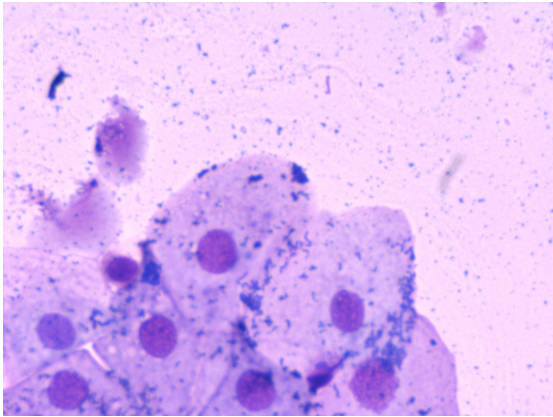
La sistemática que se siguió para el recuento celular diferencial fue la siguiente(251):

1. Se realizó examen rápido de toda la preparación a 100 aumentos (objetivo de 10x y visor de 10x) teñida, para identificar las zonas donde hubiera una distribución homogénea de las células.
2. Se procedió al recuento en una zona adecuada de la preparación y desde una de sus esquinas se contaron todas las células que aparecían en el campo. Una vez contadas, se cambiaba al siguiente campo describiendo un trayecto sinusoidal (de arriba hacia abajo y hacia la derecha, y después desde abajo hacia arriba y luego a la derecha, etc.) (ver esquema).

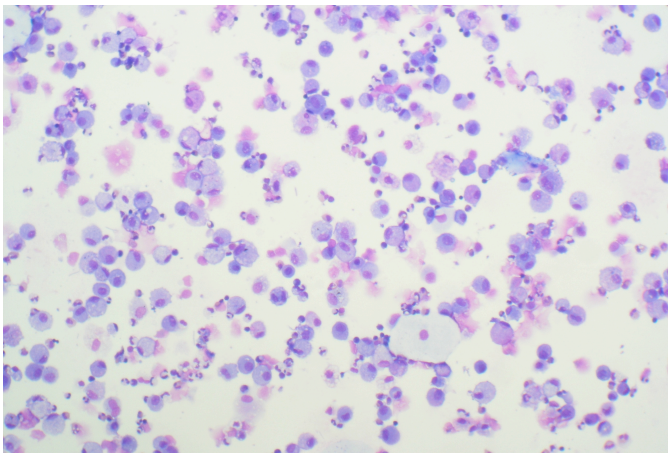


3. El recuento se realizó a 400 aumentos (objetivo de 40x y visor de 10x) y los porcentajes relativos se obtuvieron a partir de las 400 células. No se incluyeron las células escamosas.

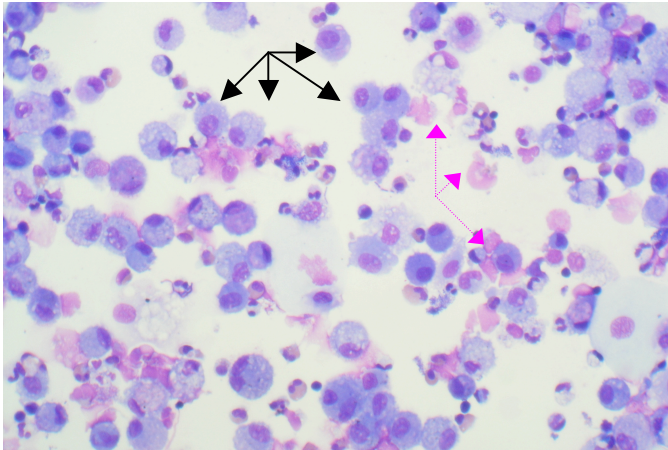
**Figura 6.** Células escamosas (x 100; tinción de May-Grünwald-Giemsa) que se reconocen por su gran tamaño y su citoplasma claro, que les da un aspecto en “huevo frito”. Son células provenientes de la saliva, consideradas contaminación de la muestra de esputo inducido.



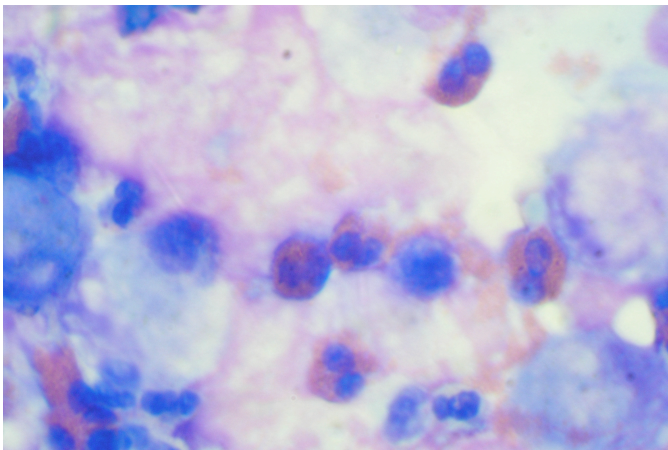
**Figura 7.** Extensión de células de paciente asmático atópico al microscopio óptico (x 10) con tinción de May-Grünwald-Giemsa.



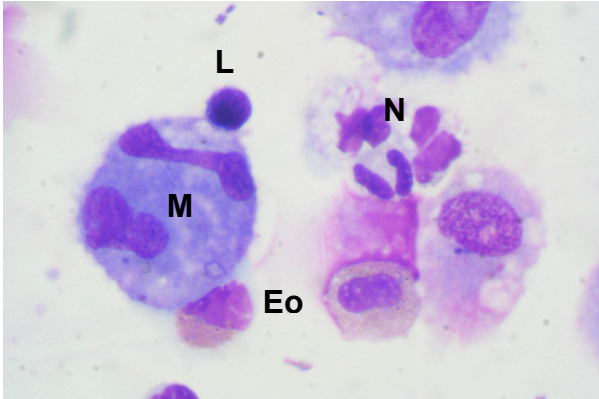
**Figura 8.** Extensión de células de paciente asmático atópico al microscopio óptico (x 20) con tinción de May-Grünwald-Giemsa. Destaca la abundante presencia de macrófagos (flechas negras) y de eosinófilos (flechas fucsia). Puede verse alguna célula escamosa (de la saliva), con su citoplasma claro (aspecto de “huevo frito”).



**Figura 9.** Detalle de la extensión de células del esputo inducido de paciente asmático atópico al microscopio óptico (x 40) en la que se observa claramente la presencia de un agrupamiento de 5 eosinófilos. Se reconocen los eosinófilos por su núcleo arriñonado o doble y sus gránulos citoplasmáticos refringentes, que adoptan una coloración anaranjada.



**Figura 10.** Extensión de células de esputo inducido con tinción de May-Grünwald-Giemsa, vistas al microscopio óptico (x 100). El macrófago (**M**) se reconoce por ser la célula de mayor tamaño y adoptar una coloración violácea. El linfocito (**L**) es la célula de menor tamaño y contiene un núcleo de aspecto denso, que ocupa la práctica totalidad del citoplasma. Los neutrófilos (**N**) contienen núcleos polimorfos que suelen ser bilobulados. Los eosinófilos (**Eo**) se reconocen por su núcleo arriñonado y sobre todo, por la presencia de gránulos refringentes en su citoplasma.



#### **IV.4.3. Determinación de citoquinas**

La determinación de los niveles de IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 en el sobrenadante de las muestras de esputo se realizó mediante citometría de flujo (Bender Medsystem, USA). Los límites de sensibilidad de la técnica (pg/ml) fueron 20,8; 1,6; 1,9; 1,2; 1,6; 16,4; 4,2; 0,5; 3,2 y 1,5 respectivamente. En las muestras con niveles indetectables (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 en los controles) se utilizó el valor del límite de sensibilidad para poder realizar las comparaciones estadísticas.

La concentración de LTB<sub>4</sub> se determinó mediante un enzimoimmunoensayo competitivo (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). El límite de sensibilidad del método fue de 13 pg/ml.

#### **IV.5. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con la ayuda del programa estadístico SPSS® versión 15.0. Se aplicaron los siguientes tests paramétricos o no paramétricos según los grupos seguían o no una distribución normal (prueba de normalidad de Kolmogorow-Smirnov), y según fuera apropiado: t de Student para datos no apareados, análisis de la varianza de una vía, test no paramétricos de la U de Mann-Witney, y de Kruskal-Wallis, Chi-cuadrado, prueba exacta de Fisher y correlación lineal de Pearson. Se consideraron significativos valores de  $p < 0,05$ . Los resultados se expresaron como media, desviación estándar (DE), e intervalo de confianza al 95% (IC 95%) o mediana y rango intercuartílico en el caso de que las variables no siguieran una distribución normal.

## **V. RESULTADOS**



## V. RESULTADOS

### V.1. Estudio piloto

Se realizó una fase inicial del estudio para valorar si era más adecuado utilizar un nebulizador ultrasónico de bajo flujo (1 ml/min), o de alto flujo (> 2 ml/min), con 2 objetivos(252):

- Averiguar con qué tipo de nebulizador se obtenía un mayor rendimiento de la inducción de esputo (mayor número de muestras obtenidas).
- Comparar la seguridad de la inducción de esputo con los 2 tipos de nebulizadores.

En esta fase piloto se realizaron 49 inducciones de esputo en 49 niños (27 varones) asmáticos (34 con asma atópica y 15 con asma no atópica) con una edad mediana de 11 años (rango de 7 a 15 años). Catorce pacientes presentaban asma episódica ocasional, 12 episódica frecuente, 14 persistente moderada y 9 persistente grave. El porcentaje del FEV<sub>1</sub> respecto al valor teórico medio antes de la inducción de esputo fue del 97,7% (IC 95% 91,2% - 104,2%).

No se observaron diferencias entre los grupos de bajo flujo y alto flujo en cuanto a la edad, sexo, y FEV<sub>1</sub> basal (tabla 9).

**Tabla 9.** Estudio piloto. Comparación de las características basales entre los grupos “bajo flujo” y “alto flujo”

	BAJO FLUJO	ALTO FLUJO	Valor de p
<b>Sexo</b>			
<b>Varones</b>	6	21	0,27
<b>Mujeres</b>	9	13	
<b>Edad media (años)</b>	11,1 (2,0)	10,8 (2,5)	0,64
<b>FEV<sub>1</sub> basal (% respecto al valor teórico)</b>	99,4% (24,6)	97% (20,9)	0,73

Valores expresados como media y desviación estándar (entre paréntesis)

FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo

En 15 niños se realizó la inducción de esputo utilizando un nebulizador ultrasónico de bajo flujo (Omron NE-U07®) y en 34 niños se hizo con un nebulizador ultrasónico de alto flujo (OMRON NE-U12® 6 casos, DeVilbiss Ultraneb 3000® 28 casos). Se obtuvieron 37 muestras (75,5% del total de las inducciones), de las que 36 tenían células escamosas < 20% y 26 una viabilidad ≥ 60%, lo que supone un total de 25 muestras válidas (51% de todas las inducciones).

El rendimiento de la prueba fue mayor con los nebulizadores de alto flujo, con los que se obtuvo un 85,3% de muestras, frente al 53% (p = 0,04) con los de bajo flujo. El 62,5% de las muestras obtenidas con el nebulizador de bajo flujo fueron válidas, frente al 69% con los de alto flujo (p = 0,7) (tabla 10), lo que resulta en un 33% de muestras válidas respecto al total de intentos de inducción con los nebulizadores de bajo flujo, frente al 59% con los de alto flujo (p = 0,22).

**Tabla 10.** Estudio piloto. Rendimiento de los diferentes nebulizadores utilizados para la inducción de esputo

	<b>BAJO FLUJO</b> (Omron NEU07®)	<b>ALTO FLUJO</b> (Omron NEU12®, DeVilbiss Ultraneb 3000®)	<b>Valor de p</b>
<b>Flujo</b>	1 ml/min	2,5 - 3 ml/min	
<b>MMAD</b>	3,5 µm	4 µm	
<b>Número de inducciones</b>	15	34	
<b>Muestras obtenidas</b>	8 (53%)	29 (85,3%)	0,04
<b>Muestras contaminadas*</b>	1 (12,5%)	0	0,21
<b>Muestras viables*</b>	6 (75%)	20 (69%)	1
<b>Muestras válidas*</b>	5 (62,5%)	20 (69%)	0,70

MMAD: diámetro aerodinámico de la mediana de la masa

\*: Porcentajes expresados sobre las muestras obtenidas en cada grupo

No hubo diferencias en el rendimiento de la técnica entre los niños con diferente gravedad del asma ( $p = 0,13$ ), ni en relación a la edad de los pacientes comparando los niños de 7-9 años con los de mayor edad ( $p = 0,26$ ) No hubo diferencias en el rendimiento entre los dos tipos de nebulizadores de alto flujo ( $p = 0,26$ ).

En cuanto a los efectos adversos observados, fueron de tipo local y leves en todos los casos (tabla 11). En ninguno de los 49 niños se observó caída del  $FEV_1 > 15\%$ , y sólo en 4 casos fue superior al 10% (3 con el nebulizador de bajo flujo y 1 con los de alto flujo).

Con el nebulizador de bajo flujo se presentó tos en el 47% de los pacientes, picor de garganta en el 40% y picor de ojos en el 20%. Con los nebulizadores de alto flujo disminuyó la incidencia de tos (17,6%) y de picor de ojos (0%), aunque se vio aumentado el sabor desagradable (82,3%) y la sialorrea (14,7%).

**Tabla 11.** Estudio piloto. Efectos secundarios de los diferentes nebulizadores utilizados para la inducción de esputo

	<b>BAJO FLUJO</b> (Omron NEU07) (n = 15)	<b>ALTO FLUJO</b> (Omron NEU12 DeVilbiss Ultraneb 3000) (n = 34)	<b>Valor de p</b>
<b>Tos</b>	7 (47%)	6 (17,6%)	0,08
<b>Picor garganta</b>	6 (40%)	8 (23,6%)	0,3
<b>Picor ojos</b>	3 (20%)	0	0,02
<b>Sabor desagradable</b>	0	28 (82,3%)	< 0,001
<b>Sialorrea</b>	0	5 (14,7%)	0,3
<b>Sibilantes</b>	1 (6%)	0	0,3

Una vez finalizado el estudio piloto, el resto de inducciones se realizó con el nebulizador de alto flujo DeVilbiss Ultraneb 3000®.

## V.2. Grupos de estudio

Se han estudiado un grupo de niños sanos (n = 31), y un grupo de niños asmáticos (n = 77). La edad de los niños sanos osciló entre 7 y 14 años y la de los niños con asma entre 7 y 15 años. En la tabla 12 se muestran comparadas las características demográficas y de función pulmonar de ambos grupos. Los 2 grupos fueron comparables en cuanto a edad, sexo, peso y talla. El grupo de niños con asma, como era esperable, tuvo una peor función pulmonar basal que el grupo control, reflejada en un menor valor del cociente FEV<sub>1</sub>/FVC (capacidad vital forzada), indicativo de obstrucción bronquial.

**Tabla 12.** Características demográficas y de función pulmonar basal del grupo control y del grupo de niños asmáticos

	<b>Controles</b> (n = 31)	<b>Asmáticos</b> (n = 77)	<b>Valor de p</b>
<b>Edad</b>	11 (2)	11 (2)	0,93
<b>Sexo (% varones)</b>	17 (55%)	52 (68%)	0,21
<b>Peso (kg)</b>	44 (11)	49 (15)	0,09
<b>Talla (cm)</b>	150 (13)	150 (15)	0,97
<b>FVC(%)</b>	93% (12)	92% (15)	0,63
<b>FEV<sub>1</sub>(%)</b>	95% (11)	90% (21)	0,11
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC</b>	89% (4)	81% (10)	< 0,0001

Valores expresados como media y desviación estándar (entre paréntesis)

FVC: capacidad vital forzada; FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo

## V.3. Inducción de esputo

La tasa de éxito de la inducción fue similar entre los dos grupos: en más del 75% de inducciones se obtuvo una muestra, con una viabilidad superior al 60%. El porcentaje de muestras válidas fue alrededor del 60% en ambos grupos (tabla 13).

**Tabla 13.** Características de la inducción de esputo y de la muestra obtenida en los controles y en los asmáticos

	<b>Controles</b> (n = 31)	<b>Asmáticos</b> (n = 77)	<b>Valor de p</b>
<b>Obtención muestra</b>	24 (77%)	64 (83%)	0,49
<b>Viabilidad muestra (sí)</b>	19 (61%)	52 (68%)	0,83
<b>Células viables</b>	71% (DE 16)	73% (DE 18)	0,66
<b>Ausencia de contaminación de la muestra</b>	88%	97%	0,09
<b>Células escamosas</b>	8% (DE 12)	3% (DE 6)	0,18
<b>Muestra válida</b>	75%	77%	0,88

DE: desviación estándar

### V.3.1. Seguridad de la inducción de esputo

Los efectos secundarios observados, fueron de tipo local y leves en todos los casos (tabla 14).

Los niños asmáticos presentaron más tos, picor de garganta y sialorrea que los controles. No existieron diferencias entre los 2 grupos para el resto de efectos adversos (picor de ojos, sabor desagradable y sibilantes).

Sólo 5 niños (2 con asma episódica ocasional y 3 episódica frecuente) presentaron una caída del FEV<sub>1</sub> ≥ 15% que revirtió con la administración de salbutamol (400 µg) inhalado.

**Tabla 14.** Efectos adversos de la inducción de esputo en el grupo control y en el grupo de pacientes asmáticos

	<b>Controles</b> (n = 31)	<b>Asmáticos</b> (n = 77)	<b>Valor de p</b>
<b>Tos</b>	2 (7%)	22 (29%)	0,01
<b>Picor de garganta</b>	6 (19%)	32 (42%)	0,03
<b>Picor de ojos</b>	0	4 (5%)	0,20
<b>Sabor desagradable</b>	16 (52%)	43 (56%)	0,69
<b>Sialorrea</b>	5 (16%)	29 (38%)	0,03
<b>Sibilantes</b>	0	1 (1%)	0,52

#### **V.4. Características de la celularidad en el esputo inducido**

El peso del esputo fue mayor en los asmáticos que en los controles, así como el número total de células por mm<sup>3</sup> y de células por gramo de esputo (tabla 15). En el recuento celular diferencial existieron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los asmáticos en el porcentaje de eosinófilos (superior en el grupo de asmáticos), y en el de linfocitos y macrófagos (mayor en el grupo control). No hubo diferencias significativas entre ambos grupos en el porcentaje de neutrófilos (ver tabla 15).

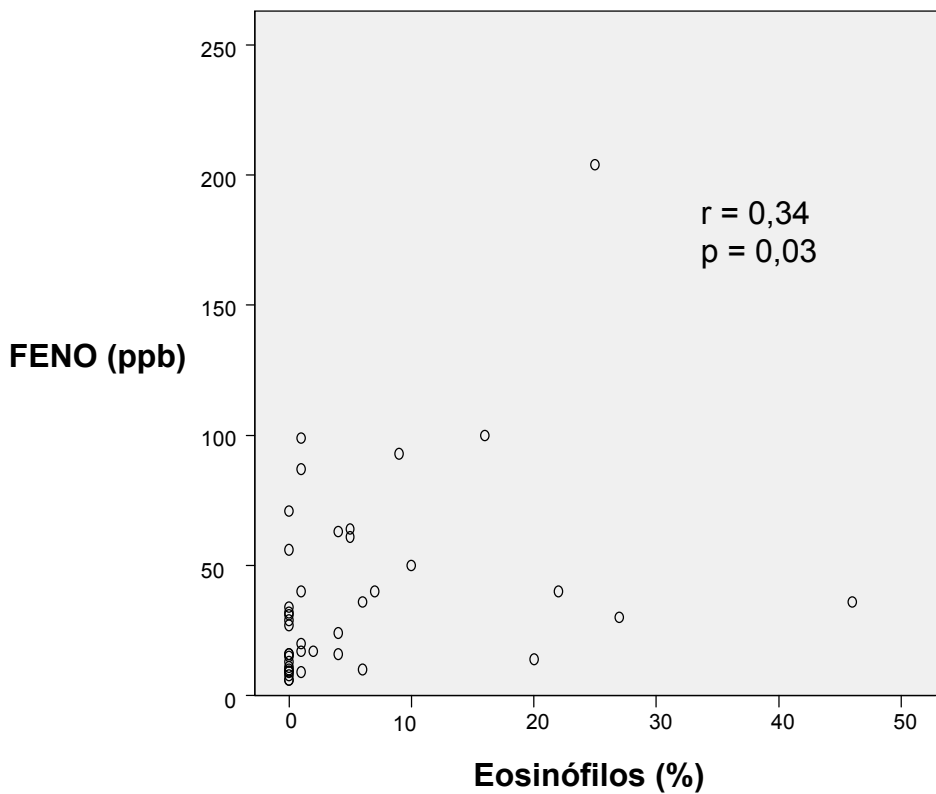
**Tabla 15.** Características del recuento celular en el grupo control y en el grupo de pacientes asmáticos

	<b>Controles</b> (media y desviación estándar)	<b>Asmáticos</b> (media y desviación estándar)	<b>Valor de p</b>	<b>Controles</b> (mediana y rango intercuartílico)	<b>Asmáticos</b> (mediana y rango intercuartílico)	<b>Valor de p</b>
<b>Células muestra x10<sup>6</sup> cels.ml<sup>-1</sup></b>	0,2 (0,1)	0,8 (1,3)	0,001	0,13 (0,07 a 0,22) (n=24)	0,35 (0,10 a 1,11) (n=63)	0,001
<b>Peso esputo (g)</b>	0,14 (0,11)	0,2 (0,2)	0,02	0,10 (0,05 a 0,21) (n=25)	0,15 (0,10 a 0,26) (n=63)	0,02
<b>Células x10<sup>6</sup>/g de esputo</b>	1,7 (1,4)	3,7 (4,5)	0,037	1,38 (0,45 a 2,77) (n=24)	2,31 (0,86 a 4,8) (n=63)	0,04
<b>Eosinófilos (%)</b>	0,6 (1,0)	6,8 (12,8)	0,015	0 (0 a 1) (n=21)	1 (0 a 7) (n=51)	0,02
<b>Neutrófilos (%)</b>	36,6 (20,8)	45,5 (27,8)	0,14	37 (21,5 a 48,5) (n=21)	41 (20 a 67) (n=51)	0,20
<b>Linfocitos (%)</b>	3,8 (2,7)	2,5 (4,0)	0,004	3 (1 a 6) (n=21)	1 (0 a 3) (n=51)	0,004
<b>Macrófagos (%)</b>	59,0 (21,0)	45,2 (25,9)	0,035	58 (48 a 75,5) (n=21)	40 (22 a 69) (n=51)	0,02

Nota: En los controles, todas las variables excepto el porcentaje de eosinófilos en esputo, siguen una distribución normal. En los asmáticos, sólo siguen una distribución normal los porcentajes de neutrófilos y macrófagos en esputo inducido. A pesar de estas diferencias entre grupos, se ha incluido tanto la media como la mediana para facilitar la comparación con otros estudios de la literatura.

En el grupo de pacientes asmáticos encontramos una correlación positiva, pero débil, entre el porcentaje de eosinófilos en el esputo inducido y el valor de la FENO ( $r = 0,34$ ,  $p = 0,03$ ) (figura 11).

**Figura 11.** Correlación entre FENO y eosinófilos (%) en esputo inducido de asmáticos





## V.5. Concentración de citoquinas en el esputo inducido

En la tabla 16 se muestran las concentraciones (en pg/ml) de citoquinas en el esputo inducido de los controles y los asmáticos.

No existieron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones en esputo inducido de IL-1 $\beta$  ni IL-6 entre los controles y los asmáticos. El IFN- $\gamma$ , las IL-2, IL-4, IL-5, IL-8 e IL-12p70 fueron superiores en los asmáticos. La IL-10 y el TNF- $\alpha$  fueron superiores en los controles respecto a los asmáticos.

**Tabla 16.** Concentración de citoquinas (pg/ml) en el esputo de los controles y los asmáticos

	Controles	Asmáticos	Valor de p
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1,6 (1,6 a 1,6) (n=18)	257,6 (113,5 a 429,8) (n=40)	< 0,0001
<b>IL-2</b>	112,2 (42,3 a 144,9) (n=18)	490,8 (342,4 a 642,9) (n=40)	< 0,0001
<b>IL-10</b>	34,9 (12,9 a 55) (n=18)	12,35 (7,0 a 24,2) (n= 31)	0,01
<b>IL-8</b>	988,2 (741,7 a 1869,2) (n=17)	4743,3 (3510,7 a 8016,3) (n=40)	< 0,0001
<b>IL-6</b>	62,2 (39,9 a 77,3) (n=18)	34,1 (28,5 a 83,4) (n=31)	0,31
<b>IL-4</b>	152,4 (89,9 a 285,3) (n=18)	1602,7 (715,7 a 2657,4) (n=40)	< 0,0001
<b>IL-5</b>	47,5 (24,6 a 71,9) (n=17)	229,7 (63,5 a 347,7) (n=40)	< 0,0001
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	74,9 (33,0 a 98,2) (n=18)	48,8 (32,4 a 77,3) (n=39)	0,47
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	11,2 (4,7 a 84,9) (n=18)	5,4 (3,2 a 8,8) (n=30)	0,04
<b>IL-12p70</b>	12,3 (7,4 a 29,2) (n=17)	58,4 (34,5 a 112,6) (n=40)	< 0,0001

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

## **V.6. Comparación del perfil inflamatorio entre los pacientes asmáticos atópicos y no atópicos**

De los 77 asmáticos, 60 (78%) presentaban asma atópica y 17 (22%) no atópica.

Las características de los asmáticos atópicos y no atópicos, las medidas de los diferentes parámetros efectuadas en el esputo inducido y las comparaciones entre grupos (asmáticos atópicos versus asmáticos no atópicos por un lado y comparación entre los 3 grupos por otro: controles, asmáticos atópicos y asmáticos no atópicos) se recogen en las tablas 17 a 25 y en las figuras 12 hasta la 26.

Los grupos estudiados fueron comparables sin que se observasen diferencias en sus características basales, con excepción del cociente FEV<sub>1</sub>/FVC que fue mayor en los controles que en los asmáticos atópicos y no atópicos y de la FENO, que fue mayor en los asmáticos atópicos que en los no atópicos. No se realizó determinación de FENO en los controles.

En cuanto al recuento diferencial celular del esputo, encontramos los siguientes resultados:

El número de eosinófilos en esputo inducido fue mayor en los asmáticos atópicos que en los controles y que en los asmáticos no atópicos. No hubo diferencias entre los controles y los asmáticos no atópicos.

No existieron diferencias en el número de neutrófilos entre los 3 grupos.

En cuanto a los linfocitos, su número fue más elevado en los controles respecto a los asmáticos, tanto atópicos como no atópicos, sin que se observaran diferencias entre estos 2 grupos.

Finalmente, el porcentaje de macrófagos fue mayor en los controles que en los asmáticos atópicos, sin que se observaran diferencias entre controles y asmáticos no atópicos ni entre asmáticos atópicos y no atópicos.

En la determinación de la concentración de citoquinas en el sobrenadante del esputo inducido, se obtuvieron los siguientes resultados:

Las concentraciones de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-8 fueron mayores en los asmáticos tanto atópicos como no atópicos, que en los controles, siendo el IFN- $\gamma$  indetectable en los controles. En el caso de la IL-8 no existieron diferencias entre asmáticos, sin embargo fueron mayores las concentraciones de IFN- $\gamma$  e IL-2 en los atópicos que en los no atópicos.

Las concentraciones de IL-4 e IL-5 fueron mayores en los asmáticos atópicos que en los asmáticos no atópicos y en los controles. No hubo diferencias entre controles y asmáticos no atópicos.

La concentración de IL-12p70 fue más elevada en los asmáticos atópicos que en los controles y que en los asmáticos no atópicos, sin que se observasen diferencias entre controles y asmáticos no atópicos.

La concentración de IL-10 fue mayor en los controles que en los atópicos sin que se observasen diferencias entre asmáticos o entre controles y asmáticos no atópicos, aunque en este último caso rozara la significación estadística ( $p=0,05$ ) y fuera mayor en los controles.

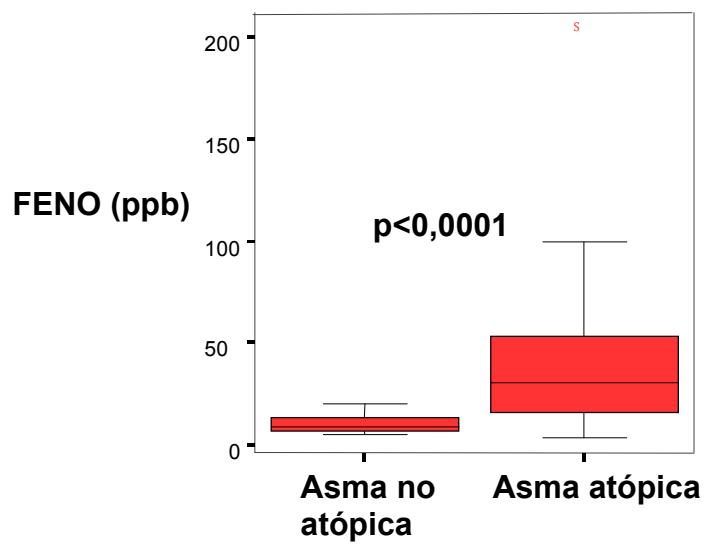
No se observaron diferencias entre los grupos en las concentraciones de IL-6, IL-1 $\beta$  ni TNF- $\alpha$ , aunque para esta citoquina se rozó la significación estadística ( $p=0,05$ ), siendo mayor en controles respecto a asmáticos atópicos.

**Tabla 17.** Características demográficas y clínicas del grupo control y los pacientes asmáticos atópicos y no atópicos

	<b>Controles</b> (n = 31)	<b>Asmáticos atópicos</b> (n = 60)	<b>Asmáticos no atópicos</b> (n = 17)	<b>Valor de p</b>
<b>Edad</b>	11 (2)	11 (2)	11 (2)	0,64
<b>Sexo</b> (% varones)	55%	68%	65%	0,45
<b>Peso (kg)</b>	44 (11)	49 (16)	48 (15)	0,32
<b>Talla (cm)</b>	150 (13)	150 (15)	148 (14)	0,81
<b>FVC (%)</b>	93% (12)	93% (16)	88% (12)	0,47
<b>FEV<sub>1</sub> (%)</b>	95% (11)	91% (21)	86% (20)	0,29
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC</b>	89% (4)	82% (9)	81% (12)	< 0,0001
<b>Caída FEV<sub>1</sub> SSH 5%</b>	2% (1)	5% (14)	3% (11)	0,52
<b>FENO (ppb)</b>		40 (37)	11 (5)	< 0,0001

Valores expresados como media y desviación estándar (entre paréntesis)

**Figura 12.** Fracción exhalada de óxido nítrico (FENO) en asmáticos atópicos y no atópicos



**Tabla 18.** Celularidad en esputo inducido en los controles, en los asmáticos atópicos y en los asmáticos no atópicos

	<b>Controles</b> (media y desviación estándar)	<b>Asmáticos atópicos</b> (media y desviación estándar)	<b>Asmáticos no atópicos</b> (media y desviación estándar)	<b>Valor de p</b>	<b>Controles</b> (mediana y rango intercuartílico)	<b>Asmáticos atópicos</b> (mediana y rango intercuartílico)	<b>Asmáticos no atópicos</b> (mediana y rango intercuartílico)	<b>Valor de p</b>
<b>Eosinófilos(%)</b>	0,6 (1,0) (n=21)	7,8 (13,5) (n=44)	0,1 (0,4) (n=7)	0,001	0 (0 a 1) (n=21)	1,5 (0 a 9) (n=44)	0 (0 a 0) (n=7)	0,001
<b>Neutrófilos(%)</b>	36,6 (20,8) (n=21)	43,4 (27,7) (n=44)	58,7 (26,7) (n=7)	0,15	37 (21,5 a 48,5) (n=21)	39,5 (16,3 a 63,5) (n=44)	60 (31 a 85) (n=7)	0,19
<b>Linfocitos(%)</b>	3,8 (2,7) (n=21)	2,8 (4,2) (n=44)	0,9 (1,6) (n=7)	0,006	3 (1 a 6) (n=21)	1 (1 a 3) (n=44)	0 (0 a 2) (n=7)	0,01
<b>Macrófagos(%)</b>	59,0 (21,0) (n=21)	46,0 (26,0) (n=44)	41,0 (26,3) (n=7)	0,095	58 (48 a 75,5) (n=21)	39,5 (23,3 a 69,8) (n=44)	40 (15 a 69) (n=7)	0,07

Nota: En los controles, todas las variables excepto el porcentaje de eosinófilos en esputo, siguen una distribución normal. En los asmáticos atópicos, sólo siguen una distribución normal los porcentajes de neutrófilos y macrófagos en esputo inducido. En cuanto al grupo de asmáticos no atópicos son muy pocos casos. A pesar de estas diferencias entre grupos, se ha incluido tanto la media como la mediana para facilitar la comparación con otros estudios de la literatura.

**Tabla 19.** Comparación de la celularidad en esputo inducido entre los controles y los asmáticos atópicos

	<b>Controles</b>	<b>Asmáticos atópicos</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Eosinófilos(%)</b>	0 (0 a 1) (n=21)	1,5 (0 a 9) (n=44)	0,003
<b>Neutrófilos(%)</b>	37 (21,5 a 48,5) (n=21)	39,5 (16,3 a 63,5) (n=44)	0,32
<b>Linfocitos(%)</b>	3 (1 a 6) (n=21)	1 (1 a 3) (n=44)	0,01
<b>Macrófagos(%)</b>	58 (48 a 75,5) (n=21)	39,5 (23,3 a 69,8) (n=44)	0,03

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

**Tabla 20.** Comparación de la celularidad en esputo inducido entre los controles y los asmáticos no atópicos

	<b>Controles</b>	<b>Asmáticos no atópicos</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Eosinófilos(%)</b>	0 (0 a 1) (n=21)	0 (0 a 0) (n=7)	0,41
<b>Neutrófilos(%)</b>	37 (21,5 a 48,5) (n=21)	60 (31 a 85) (n=7)	0,10
<b>Linfocitos(%)</b>	3 (1 a 6) (n=21)	0 (0 a 2) (n=7)	0,002
<b>Macrófagos(%)</b>	58 (48 a 75,5) (n=21)	40 (15 a 69) (n=7)	0,13

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

**Tabla 21.** Comparación de la celularidad en esputo inducido entre los asmáticos atópicos y los asmáticos no atópicos

	<b>Asmáticos atópicos</b>	<b>Asmáticos no atópicos</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Eosinófilos(%)</b>	1,5 (0 a 9) (n=44)	0 (0 a 0) (n=7)	0,02
<b>Neutrófilos(%)</b>	39,5 (16,3 a 63,5) (n=44)	60 (31 a 85) (n=7)	0,17
<b>Linfocitos(%)</b>	1 (1 a 3) (n=44)	0 (0 a 2) (n=7)	0,15
<b>Macrófagos(%)</b>	39,5 (23,3 a 69,8) (n=44)	40 (15 a 69) (n=7)	0,66

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

**Tabla 22.** Concentración de citoquinas (pg/ml) en el esputo inducido de los controles, los asmáticos atópicos y los asmáticos no atópicos

	<b>Controles</b>	<b>Asmáticos atópicos</b>	<b>Asmáticos no atópicos</b>	<b>Valor de p</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1,6 (1,6 a 1,6) (n=18)	261,2 (155,7 a 436,5) (n=35)	40,7 (29,4 a 201,6) (n=5)	< 0,0001
<b>IL-2</b>	112,2 (42,3 a 144,9) (n=18)	507,7 (369,1 a 655,9) (n=35)	281,8 (236,1 a 324,6) (n=5)	< 0,0001
<b>IL-10</b>	34,9 (12,9 a 55) (n=18)	14,5 (7,0 a 26,4) (n=26)	9,4 (6,6 a 15,4) (n=5)	0,03
<b>IL-8</b>	988,2 (741,7 a 1869,2) (n=17)	4717,8 (3502,2 a 8209,6) (n=35)	5360,3 (3641,6 a 8572,4) (n=5)	< 0,0001
<b>IL-6</b>	62,2 (39,9 a 77,3) (n=18)	34,1 (27,9 a 91,2) (n=26)	32,9 (26,4 a 119,3) (n=5)	0,60
<b>IL-4</b>	152,4 (89,9 a 285,3) (n=18)	1749,3 (1097,7 a 2934,7) (n=35)	362,8 (161,6 a 615,2) (n=5)	< 0,0001
<b>IL-5</b>	47,5 (24,6 a 71,9) (n=17)	249,4 (82 a 370) (n=35)	26,8 (20,2 a 64,1) (n=5)	< 0,0001
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	74,9 (33,0 a 98,2) (n=18)	59,1 (33,1 a 117,8) (n=35)	29,9 (16,4 a 48,3) (n=4)	0,15
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	11,2 (4,7 a 84,9) (n=18)	5,4 (3,2 a 9,6) (n=26)	5,4 (3,7 a 6,2) (n=4)	0,11
<b>IL-12p70</b>	12,3 (7,4 a 29,2) (n=17)	63,2 (38,9 a 126,8) (n=35)	30,6 (6,0 a 42,2) (n=5)	< 0,0001

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)



**Tabla 23.** Comparación de la concentración de citoquinas (pg/ml) en esputo inducido entre controles y asmáticos atópicos

	<b>Controles</b>	<b>Asmáticos atópicos</b>	<b>Valor de p</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1,6 (1,6 a 1,6) (n=18)	261,2 (155,7 a 436,5) (n=35)	< 0,0001
<b>IL-2</b>	112,2 (42,3 a 144,9) (n=18)	507,7 (369,1 a 655,9) (n=35)	< 0,0001
<b>IL-10</b>	34,9 (12,9 a 55) (n=18)	14,5 (7,0 a 26,4) (n=26)	0,02
<b>IL-8</b>	988,2 (741,7 a 1869,2) (n=17)	4717,8 (3502,2 a 8209,6) (n=35)	< 0,0001
<b>IL-6</b>	62,2 (39,9 a 77,3) (n=18)	34,1 (27,9 a 91,2) (n=26)	0,35
<b>IL-4</b>	152,4 (89,9 a 285,3) (n=18)	1749,3 (1097,7 a 2934,7) (n=35)	< 0,0001
<b>IL-5</b>	47,5 (24,6 a 71,9) (n=17)	249,4 (82 a 370) (n=35)	< 0,0001
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	74,9 (33,0 a 98,2) (n=18)	59,1 (33,1 a 117,8) (n=35)	0,69
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	11,2 (4,7 a 84,9) (n=18)	5,4 (3,2 a 9,6) (n=26)	0,05
<b>IL-12p70</b>	12,3 (7,4 a 29,2) (n=17)	63,2 (38,9 a 126,8) (n=35)	< 0,0001

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

**Tabla 24.** Comparación de la concentración de citoquinas (pg/ml) en esputo inducido entre controles y asmáticos no atópicos

	<b>Controles</b>	<b>Asmáticos no atópicos</b>	<b>Valor de p</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1,6 (1,6 a 1,6) (n=18)	40,7 (29,4 a 201,6) (n=5)	0,004
<b>IL-2</b>	112,2 (42,3 a 144,9) (n=18)	281,8 (236,1 a 324,6) (n=5)	< 0,0001
<b>IL-10</b>	34,9 (12,9 a 55) (n=18)	9,4 (6,6 a 15,4) (n=5)	0,05
<b>IL-8</b>	988,2 (741,7 a 1869,2) (n=17)	5360,3 (3641,6 a 8572,4) (n=5)	0,001
<b>IL-6</b>	62,2 (39,9 a 77,3) (n=18)	32,9 (26,4 a 119,3) (n=5)	0,50
<b>IL-4</b>	152,4 (89,9 a 285,3) (n=18)	362,8 (161,6 a 615,2) (n=5)	0,15
<b>IL-5</b>	47,5 (24,6 a 71,9) (n=17)	26,8 (20,2 a 64,1) (n=5)	0,50
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	74,9 (33,0 a 98,2) (n=18)	29,9 (16,4 a 48,3) (n=4)	0,08
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	11,2 (4,7 a 84,9) (n=18)	5,4 (3,7 a 6,2) (n=4)	0,17
<b>IL-12p70</b>	12,3 (7,4 a 29,2) (n=17)	30,6 (6,0 a 42,2) (n=5)	0,65

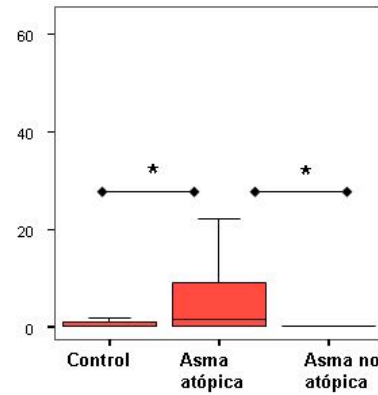
Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

**Tabla 25.** Comparación de la concentración de citoquinas (pg/ml) en esputo inducido entre asmáticos atópicos y asmáticos no atópicos

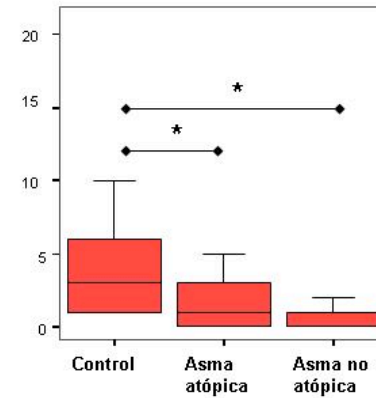
	<b>Asmáticos atópicos</b>	<b>Asmáticos no atópicos</b>	<b>Valor de p</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	261,2 (155,7 a 436,5) (n=35)	40,7 (29,4 a 201,6) (n=5)	0,02
<b>IL-2</b>	507,7 (369,1 a 655,9) (n=35)	281,8 (236,1 a 324,6) (n=5)	0,003
<b>IL-10</b>	14,5 (7,0 a 26,4) (n=26)	9,4 (6,6 a 15,4) (n=5)	0,39
<b>IL-8</b>	4717,8 (3502,2 a 8209,6) (n=35)	5360,3 (3641,6 a 8572,4) (n=5)	0,75
<b>IL-6</b>	34,1 (27,9 a 91,2) (n=26)	32,9 (26,4 a 119,3) (n=5)	0,90
<b>IL-4</b>	1749,3 (1097,7 a 2934,7) (n=35)	362,8 (161,6 a 615,2) (n=5)	0,001
<b>IL-5</b>	249,4 (82 a 370) (n=35)	26,8 (20,2 a 64,1) (n=5)	0,001
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	59,1 (33,1 a 117,8) (n=35)	29,9 (16,4 a 48,3) (n=4)	0,07
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5,4 (3,2 a 9,6) (n=26)	5,4 (3,7 a 6,2) (n=4)	0,66
<b>IL-12p70</b>	63,2 (38,9 a 126,8) (n=35)	30,6 (6,0 a 42,2) (n=5)	0,01

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

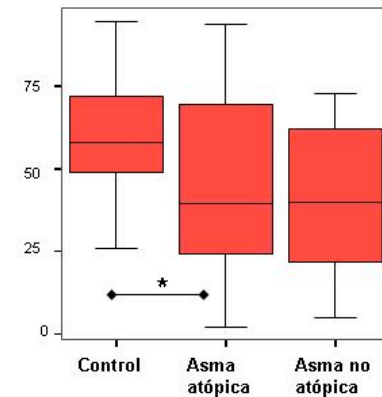
**Figuras 13 a 16.** Recuento celular diferencial en esputo inducido de los controles, los asmáticos atópicos y los asmáticos no atópicos (el asterisco indica que existen diferencias significativas entre los grupos).



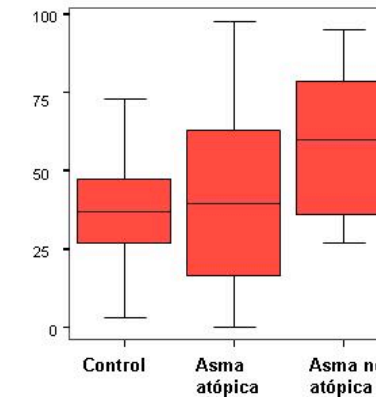
**Figura 13.** Porcentaje de eosinófilos en esputo inducido.



**Figura 14.** Porcentaje de linfocitos en esputo inducido.

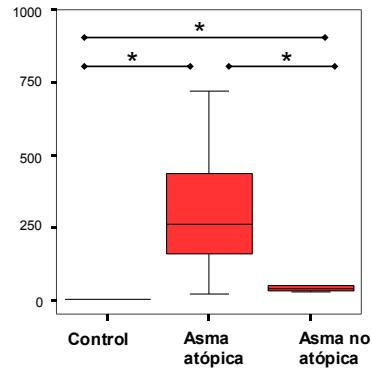


**Figura 15.** Porcentaje de macrófagos en esputo inducido.

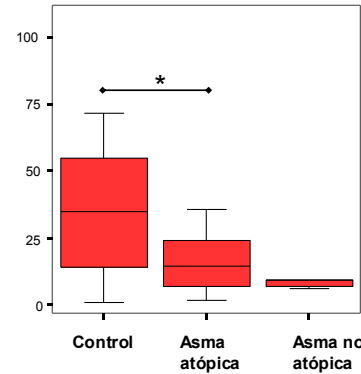


**Figura 16.** Porcentaje de neutrófilos en esputo inducido.

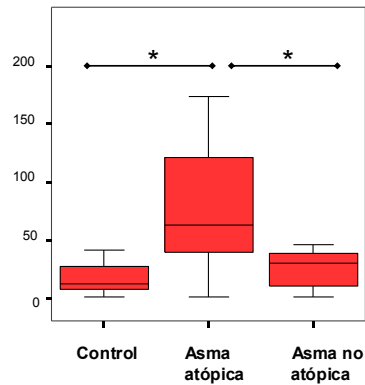
**Figuras 17 a 26.** Concentración de las diferentes citoquinas determinadas en esputo inducido de los controles, los asmáticos atópicos y los asmáticos no atópicos (el asterisco indica que existen diferencias significativas entre los grupos).



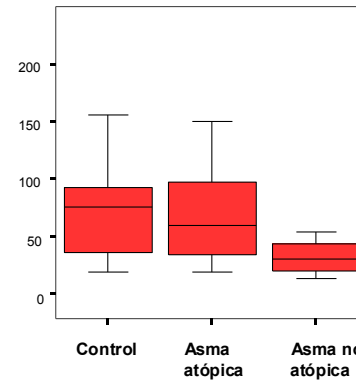
**Figura 17.** Concentración de IFN-γ (pg/ml) en esputo inducido.



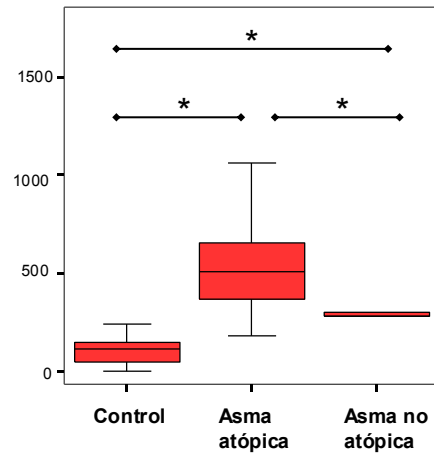
**Figura 18.** Concentración de IL-10 (pg/ml) en esputo inducido.



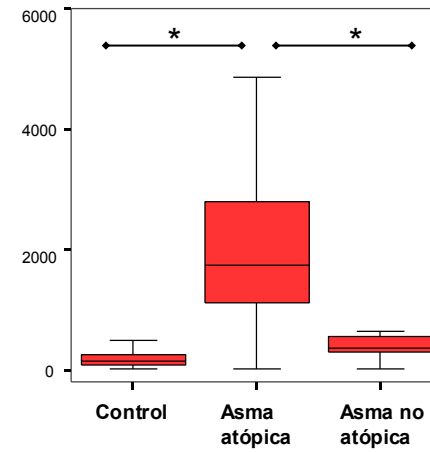
**Figura 19.** Concentración de IL-12p70 (pg/ml) en esputo inducido.



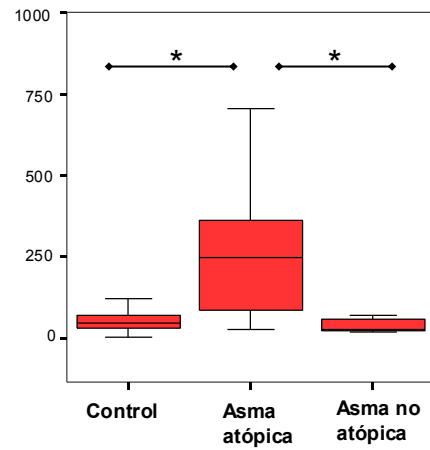
**Figura 20.** Concentración de IL-1β (pg/ml) en esputo inducido.



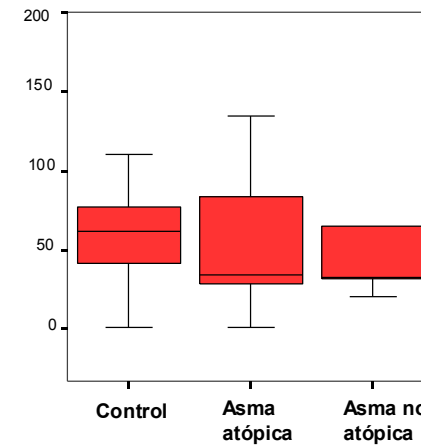
**Figura 21.** Concentración de IL-2 (pg/ml) en esputo inducido.



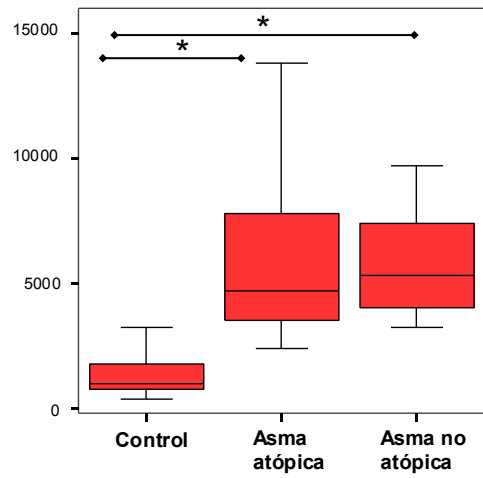
**Figura 22.** Concentración de IL-4 (pg/ml) en esputo inducido.



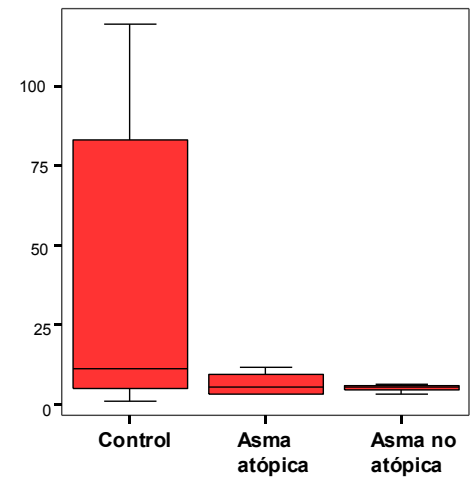
**Figura 23.** Concentración de IL-5 (pg/ml) en esputo inducido.



**Figura 24.** Concentración de IL-6 (pg/ml) en esputo inducido.



**Figura 25.** Concentración de IL-8 (pg/ml) en esputo inducido.



**Figura 26.** Concentración de TNF- $\alpha$  (pg/ml) en esputo inducido.

En asmáticos atópicos (n=35) no encontramos correlaciones significativas entre eosinófilos en esputo e IL-4 o IL-5 ni entre FENO y eosinófilos en esputo ( $r=0,29$ ,  $p=0,088$ ). Tampoco encontramos correlación entre neutrófilos en esputo e IL-8.

En asmáticos no atópicos (n=5) no encontramos correlación entre IL-8 y neutrófilos ( $r= -0,043$ ,  $p=0,945$ ).

### **V.7. Comparación entre asmáticos según recibieran o no tratamiento con glucocorticoides inhalados (GCI)**

Recibían tratamiento de base con glucocorticoides inhalados 26 asmáticos (34%) frente a 51 (66%).

En las tablas 26 a 28 se recogen las características y las medidas de los diferentes parámetros estudiados en los 2 grupos: asmáticos en tratamiento con GCI y asmáticos sin tratamiento con GCI.

La FENO se encontraba más elevada en el grupo de asmáticos que no recibían tratamiento que en el que se encontraban recibiendo GCI. No existieron diferencias en la función pulmonar ni en la edad entre los 2 grupos.

Tampoco existieron diferencias en la celularidad ni en las características del esputo entre los 2 grupos.

En cuanto a las citoquinas, sólo existieron diferencias en la concentración de IL-8, siendo más elevada en los que recibían tratamiento. Para el resto de citoquinas, no existieron diferencias aunque en el caso de la IL-2, IL-4 e IL-5, las concentraciones fueron mayores en los tratados, con un grado de significación estadística de 0,06; 0,06 y 0,08 respectivamente.



**Tabla 26.** Características demográficas y clínicas de los pacientes asmáticos según si recibían o no tratamiento con GCI (glucocorticoides inhalados)

	<b>Asma sin tratamiento</b>	<b>Asma + GCI</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Edad</b>	11 (2) (n=37)	11 (2) (n=23)	0,85
<b>FENO</b>	44,8 (38,4) (n=33)	25,4 (27,8) (n=11)	0,03
<b>FVC%</b>	91,2 (11,8) (n=36)	94,7 (21,7) (n=23)	0,36
<b>FEV<sub>1</sub>%</b>	89,8 (15,0) (n=36)	93,7 (28,5) (n=23)	0,45
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC</b>	81,8 (8,4) (n=36)	81,2 (10,9) (n=23)	0,99
<b>Caída FEV<sub>1</sub></b>	6,0 (11,6) (n=37)	4,5 (18,4) (n=23)	0,64

Valores expresados como media y desviación estándar (entre paréntesis)

**Tabla 27.** Características de la inducción de esputo y de la muestra obtenida de los pacientes asmáticos según si recibían o no tratamiento con GCI

	<b>Asma sin tratamiento</b>	<b>Asma + GCI</b>	<b>Valor de p</b>
<b>%células viables</b>	79 (61 a 85) (n=46)	77 (53,8 a 86) (n=18)	0,82
<b>%células escamosas</b>	1 (0 a 3) (n=46)	1,5 (0 a 5) (n=18)	0,73
<b>Eosinófilos%</b>	1 (0 a 6) (n=36)	0 (0 a 9) (n=15)	0,75
<b>Neutrófilos%</b>	45,5 (20,8 a 66,3) (n=36)	39 (15 a 69) (n=15)	0,66
<b>Linfocitos%</b>	1 (0 a 3) (n=36)	1 (0 a 4) (n=15)	0,59
<b>Macrófagos%</b>	40,5 (22,8 a 69,8) (n=36)	38 (22 a 69) (n=15)	0,89
<b>Células muestra x10<sup>6</sup> cels.ml<sup>-1</sup></b>	0,4 (0,1 a 1,1) (n=45)	0,3 (0,1 a 0,9) (n=18)	0,51
<b>Peso esputo (g)</b>	0,2 (0,1 a 0,3) (n=45)	0,2 (0,1 a 0,3) (n=18)	0,62
<b>Células x10<sup>6</sup> /g esputo</b>	2,4 (1,0 a 7,1) (n=45)	1,8 (0,8 a 3,2) (n=18)	0,27

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

**Tabla 28.** Concentración de citoquinas (pg/ml) en el esputo de los asmáticos según si recibían o no tratamiento con GCI

	<b>Asma sin tratamiento</b>	<b>Asma + GCI</b>	<b>Valor de p</b>
<b>IFN gamma</b>	254,1 (82 a 353,7) (n=31)	409,5 (205,1 a 814,5) (n=9)	0,15
<b>IL-2</b>	468,5 (326,2 a 543,4) (n=31)	653,1 (497,2 a 789,1) (n=9)	0,06
<b>IL-10</b>	14,5 (7,0 a 24,2) (n=28)	7,0 (1,9 a 9,4) (n=3)	0,12
<b>IL-8</b>	4163,8 (3346 a 7415,5) (n=31)	6995,6 (4821,1 a 10628,3) (n=9)	0,04
<b>IL-6</b>	34,6 (28,8 a 106,8) (n=28)	28,5 (20,4 a 34,1) (n=3)	0,18
<b>IL-4</b>	1461,3 (659 a 2058,7) (n=31)	2677,7 (1613,1 a 4187,3) (n=9)	0,06
<b>IL-5</b>	150,9 (59,7 a 284,7) (n=31)	350,3 (149,9 a 577,5) (n=9)	0,08
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	45,5 (31,7 a 82,4) (n=30)	64,2 (39,5 a 113,8) (n=9)	0,38
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5,4 (3,2 a 9,6) (n=27)	3,2 (3,2 a 5,4) (n=3)	0,18
<b>IL-12p70</b>	49,1 (33,3 a 104,2) (n=31)	69,8 (51,1 a 132,5) (n=9)	0,28

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

## V.8. Determinación de FENO y eosinófilos en esputo inducido en asmáticos antes y después de tratamiento con GCI

En 11 asmáticos que no habían recibido tratamiento se realizó determinación de FENO e inducción de esputo en la primera visita (n=11; 10 atópicos y 1 no atópico) y se repitió entre 3 y 5 meses después de haber instaurado tratamiento con GCI (n=9). En el esputo inducido, además de estudiar la celularidad, se determinó LTB<sub>4</sub> (n=10). En la tabla 29 se describen las características de los pacientes.

**Tabla 29.** Características de los casos (pacientes asmáticos) antes y 3 a 5 meses después de instaurar tratamiento

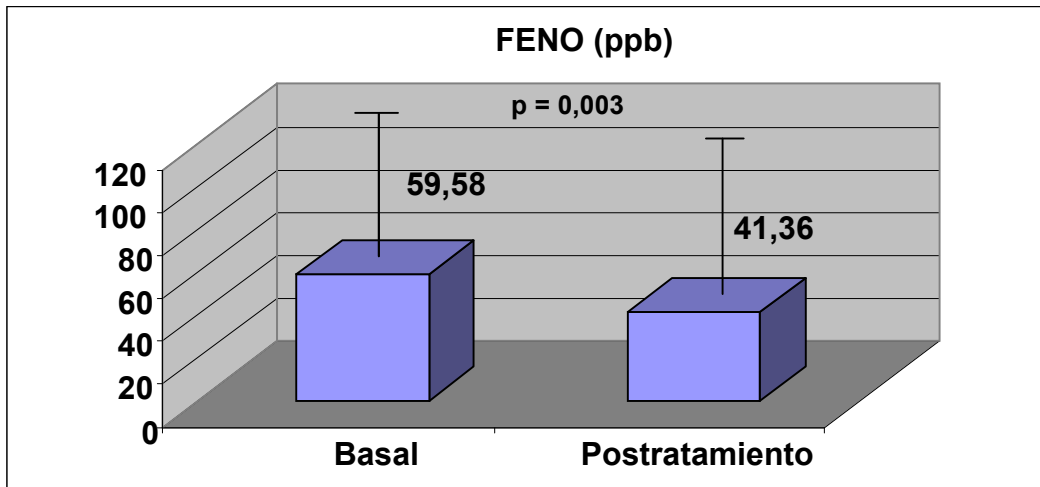
Casos	FENO basal (ppb)	Eosinófilos basal (%)	Tratamiento	FENO postratamiento. (ppb)	Eosinófilos postratamiento. (%)
1	39,5	22	Flut / Salm* (x2)	26	2
2	50	29	Flut / Salm (x2)	11,2	
3	15,5	0	No	4,4	0
4	9,8	6	Bud / Form# (x2)	4,8	5
5	30	27	Bud / Form	7,3	
6	39,5	7	Bud / Form (x4)	19,4	0
7	24,3	4	Bud / Form (x4)	18	1
8	93,3	9	Bud / Form (x4)	44,6	0
9	204	25	Bud / Form (x2)	188,4	3
10	49,5	10	Bud / Form (x4)	55,9	0
11	100	16	Bud / Form (x2)	75	36

\*Fluticasona 125 µg/ Salmeterol 25 µg

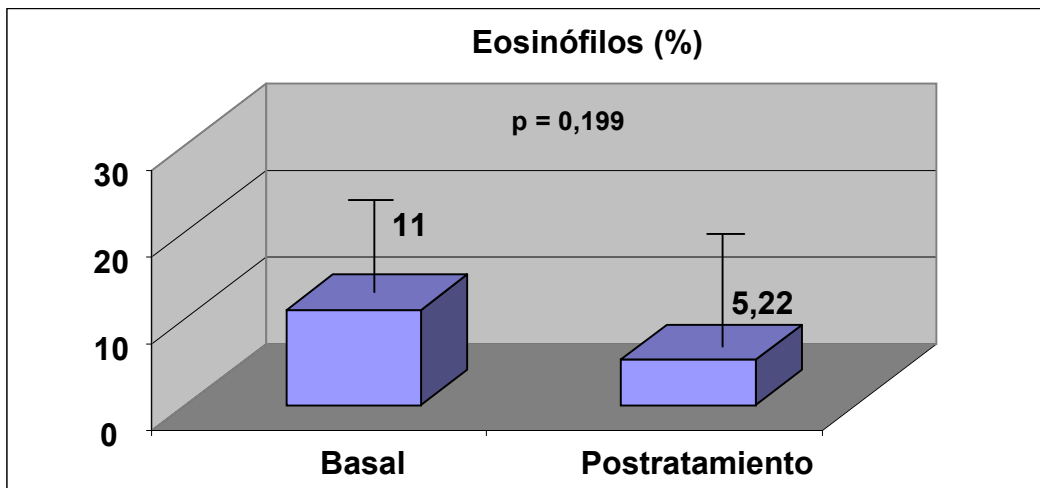
#Budesónida 160 µg/ Formoterol 4,5 µg

Después de instaurar tratamiento, con una monitorización estrecha de los parámetros de inflamación bronquial, se apreció un descenso significativo de FENO (ver figura 27). Los eosinófilos en esputo inducido y LTB<sub>4</sub> en esputo inducido disminuyeron, pero no se alcanzó significación estadística (ver figuras 28 y 29). Sin embargo, hubo pacientes (casos 1 y 9 de la tabla 29) en que sí hubo una disminución clara del número de eosinófilos después de instaurar el tratamiento. Los niños con asma eosinofílica presentaron valores elevados de LTB<sub>4</sub> en el esputo inducido que disminuyeron tras tratamiento corticosteroideo, aunque no se alcanzó significación estadística.

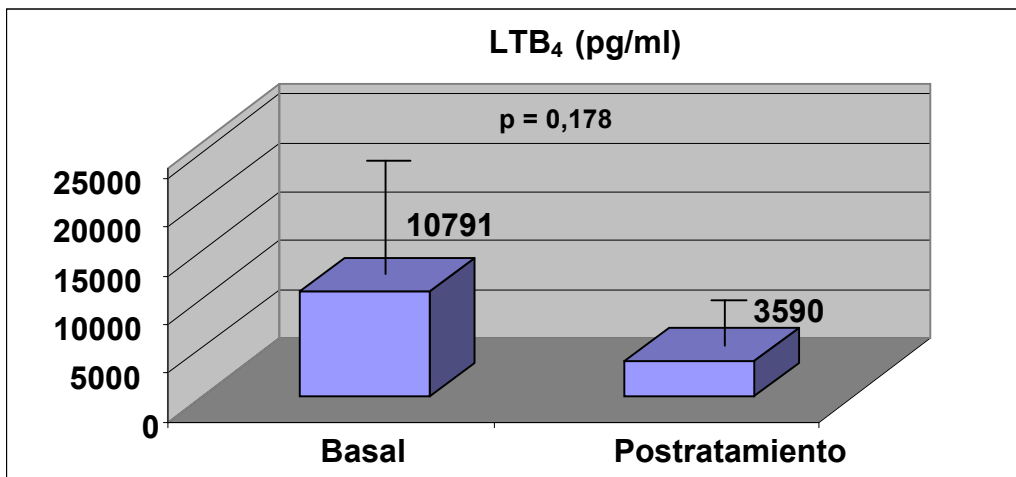
**Figura 27.** FENO (media) antes y después de instaurar tratamiento con GCI.



**Figura 28.** Eosinófilos en esputo (media) antes y después de instaurar tratamiento con GCI.



**Figura 29.** LTB<sub>4</sub> (media en pg/ml) en esputo inducido pre y postratamiento con GCI.



## **VI. DISCUSIÓN**

## VI. DISCUSIÓN

### VI.1. Técnica de la inducción de esputo: tasa de éxito, viabilidad y contaminación celular

En este estudio hemos utilizado el esputo inducido para analizar las células y citoquinas de las vías respiratorias de niños sanos y asmáticos. Comparada con el lavado broncoalveolar o la biopsia bronquial, la inducción de esputo tiene la ventaja de ser una prueba no invasora bien tolerada.

En nuestro trabajo, la tasa de éxito de la inducción de esputo, considerando sólo las muestras válidas (viabilidad celular  $\geq 60\%$  y contaminación  $< 20\%$ ) se sitúa entre el 58% en niños sanos y el 64% en asmáticos, cifras similares a las de Wilson y cols. (253), pero lejos del 77% de Covar y cols.(235) o del 95% de Grootendorst y cols. (254). Debe tenerse en cuenta que en nuestro trabajo, por criterios de calidad de la muestra, consideramos un punto de corte de 60% para determinar que la muestra era viable, lo que elimina muestras con viabilidad celular  $\geq 50\%$ , que otros autores aceptan como adecuadas (226;240). Palomino y cols.(255) obtienen un 67% de muestras válidas en 96 niños asmáticos, considerando la viabilidad celular  $\geq 50\%$  y aceptando un máximo de 80% de células escamosas. Zeibecoglou y cols. realizaron 50 inducciones de esputo a 50 pacientes (adultos sanos y asmáticos) y obtuvieron 31 muestras de viabilidad  $> 50\%$  y contaminación por células escamosas  $< 10\%$  lo que daría un rendimiento prácticamente igual al que obtenemos, con unos criterios de calidad de la muestra exigentes(136). En algunos trabajos en los que se obtiene un alto rendimiento de la inducción de esputo ( $> 70\%$  de muestras válidas), no se contempla la viabilidad celular y se considera contaminación de la muestra cuando el porcentaje de células escamosas es  $>80\%$ , lo que va en detrimento de la calidad de las muestras de esputo obtenidas(235;254). Li y cols.(256) publicaron su experiencia en la inducción de esputo en 130 niños de 6 a 18 años con asma en fase estable. Obtuvieron un rendimiento de 74,5% pero en su trabajo no hacen referencia a la viabilidad de la muestra y consideran contaminación de la muestra a partir de un 50% de células escamosas. Park y cols. consideran una muestra no válida cuando las células



escamosas representan >10%, pero en su trabajo no hacen referencia ni a la viabilidad de la muestra ni al rendimiento de la inducción de esputo(236). Recientemente, Simpson y cols.(234) han publicado un trabajo en el que realizan 130 inducciones de esputo a 26 adultos asmáticos (5 inducciones por paciente en meses consecutivos) y obtienen un 87% de muestras adecuadas. Consideran una muestra de esputo adecuada si se pueden contar más de 400 células no escamosas y si la viabilidad es mayor del 40%. Una vez más, se puede comprobar lo exigente que es considerar –como en nuestro estudio- la viabilidad  $\geq 60\%$ .

## **VI.2. Efectos adversos de la inducción de esputo**

Los efectos adversos con la inducción de esputo fueron leves, siendo más frecuentes la tos, el picor de garganta y la sialorrea en los asmáticos que en los controles(252). Al igual que en otros trabajos(235;237;256;257), tanto en niños como en adultos, la incidencia de efectos adversos graves fue muy pequeña y sólo se observó caída del FEV<sub>1</sub>  $\geq 15\%$  en 5 casos, que revirtió con la administración de salbutamol inhalado (400  $\mu\text{g}$ ). La caída promedio del FEV<sub>1</sub> con la inducción fue del 2% en controles y del 5% en asmáticos, superponible este último al 4,8% que describen Li y cols.(256) y cercano al 3% de Reining y cols.(258).

## **VI.3. Celularidad del esputo inducido en los diferentes grupos de niños**

El recuento celular diferencial en el esputo inducido de los controles es similar al que publicaron Cai y cols.(228) en un estudio realizado en niños (ver tabla 30) y Belda y cols.(259) en un estudio realizado en adultos.

**Tabla 30** Comparación del recuento celular total y diferencial en esputo inducido de niños sanos y asmáticos del estudio de Cai y cols.(228) y de nuestro estudio

	Niños sanos		Niños asmáticos	
	Cai y cols. (n=72)(228)	Vizmanos y cols. (n=24)	Cai y cols. (n=42)(228)	Vizmanos y cols. (n=51)
<b>Recuento celular total</b> <b>x10<sup>6</sup> cels.ml<sup>-1</sup></b>	1,5 (0,8 a 3,9)	0,13 (0,07 a 0,22) (n=24)	2,2 (1,07 a 4,65)	0,35 (0,10 a 1,11) (n=63)
<b>Eosinófilos (%)</b>	0,3 (0 a 1,05)	0 (0 a 1) (n=21)	4,25 (1,5 a 14,1)	1 (0 a 7) (n=51)
<b>Neutrófilos (%)</b>	35 (12 a 88,25)	37 (21,5 a 48,5) (n=21)	43 (26 a 57,3)	41 (20 a 67) (n=51)
<b>Macrófagos (%)</b>	56 (10,5 a 77,25)	58 (48 a 75,5) (n=21)	37 (17,5 a 46,8)	40 (22 a 69) (n=51)
<b>Linfocitos (%)</b>	0,5 (0 a 1,5)	3 (1 a 6) (n=21)	0,5 (0 a 1,5)	1 (0 a 3) (n=51)

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

Así, en niños sanos, el porcentaje de eosinófilos (mediana y rango intercuartílico) en esputo inducido fue de 0% (0 a 1), con un rango de 0 a 3%,

valores superponibles a los que refieren diversos autores: 0,15% en el estudio de Pin y cols.(221) en el que comparan 13 niños asmáticos y 26 controles; 0,3% en el estudio de Gibson y cols.(229) en el que comparan 61 niños asmáticos y 109 controles; 0,4% en el estudio de Mattes y cols.(260) en el que comparan 34 niños asmáticos y 9 controles. La media en nuestro estudio fue de 0,6%, similar al 0,8% del estudio de Oh y cols.(261) en el que comparan 30 niños asmáticos y 14 controles. En cuanto al recuento de eosinófilos en el esputo inducido de los asmáticos, la media y desviación estándar son de 6,8 (12,8) en nuestro estudio, con un rango de 0 a 63%, muy similar al rango de 0-56,8% del trabajo de Li y cols.(256). Ryttilä y cols.(262) obtienen en niños asmáticos (n=60) un rango para los eosinófilos en esputo inducido entre 0 y 39% y encuentran –sin especificar las cifras- que el porcentaje de eosinófilos es mayor en asmáticos atópicos que en los no atópicos, hallazgo que también nosotros hemos descrito: 1,5 (0 a 9) en asmáticos atópicos y 0 (0 a 0) en asmáticos no atópicos. Creemos que el mayor porcentaje de linfocitos [1 (1 a 3)] que encontramos en asmáticos atópicos, respecto a los no atópicos [0 (0 a 2)] y en sanos respecto a los asmáticos [3 (1 a 6)] no tiene significación clínica. Los porcentajes de macrófagos en esputo inducido fueron mayores en los controles que en los asmáticos, sin que se observasen diferencias en los neutrófilos. Es posible que si hubiera habido más pacientes asmáticos no atópicos, se hubiera incrementado en los asmáticos la media de neutrófilos y posiblemente se hubiesen encontrado diferencias significativas respecto a los sanos.

#### **VI.4. LTB<sub>4</sub> y eosinófilos en esputo inducido después de tratamiento con GCI**

En nuestro estudio, después de instaurar tratamiento con GCI en 11 asmáticos (10 atópicos), no encontramos diferencias en la concentración de LTB<sub>4</sub> en esputo inducido, lo que podría explicarse por el escaso o nulo efecto de los GCI sobre el LTB<sub>4</sub>, quimioatrayente de los neutrófilos, en un grupo de pacientes asmáticos atópicos. Sin embargo, Kikuchi y cols. demostraron que la migración trans-membrana basal de eosinófilos incubados con neutrófilos se ve aumentada al estimularlos con IL-8 y que esta migración se inhibe con un

antagonista de receptor de LTB<sub>4</sub> (263), por lo que se establece una interrelación en el asma eosinofílica entre neutrófilos y eosinófilos. Basyigit y cols. realizaron un estudio en adultos en el que sometieron a tratamiento con GCI a 33 asmáticos eosinofílicos y 12 asmáticos no eosinofílicos y encontraron una reducción de los marcadores de inflamación neutrofílica: IL-8, TNF- $\alpha$  y LTB<sub>4</sub> tanto en el grupo de asma no eosinofílico como en el eosinofílico (264). Aunque no obtuvimos diferencias significativas, nos parece que el porcentaje de eosinófilos en esputo inducido es más específico para la determinación de inflamación bronquial, que la determinación de FENO (ver casos 1 y 9 de la tabla 29).

#### **VI.5. Recuento celular total en esputo inducido y peso del esputo**

El número de células por mm<sup>3</sup> de muestra fue mayor en los asmáticos que en los controles. Los valores que obtuvimos tanto en los controles como en los asmáticos fueron inferiores a los referidos en diferentes trabajos publicados(225;226;228;255). Esto puede deberse a varios factores: 1. En el trabajo de Wilson y cols.(225) utilizan un criterio de calidad de la muestra exigente como es que se puedan contar al menos 500 células no escamosas, lo que hace que se necesite una muestra considerable de esputo; 2. Cai y cols.(228) y Jones y cols.(226) nebulizan suero salino hipertónico al 4,5% lo que podría aumentar la secreción bronquial respecto al suero salino hipertónico al 3 y 4%. Además, en el trabajo de Cai y cols. consideran una muestra adecuada si se consiguen al menos 3 tapones de moco; 3. Algunos autores consideran una muestra adecuada cuando obtienen un mínimo de 0,5 ml de esputo(255) o más de 0,5 ml de material mucocelular(227). En nuestro estudio, consideramos una muestra adecuada cuando su peso era  $\geq 0,05$  g. Belda y cols.(259), en adultos sanos, encuentran una cifra del recuento celular total (media y desviación estándar) de 4,13 (4,81)  $\times 10^6$  células/g de esputo, muy superior a la de nuestro estudio. Quaedvlieg y cols. encontraron cifras de recuento celular total en esputo inducido con suero salino hipertónico al 4,5% superiores a las nuestras en un estudio realizado en adultos sanos (n=30; mediana de 0,53 $\times 10^6$ /ml células en esputo, rango 0,05-2,4), asmáticos

eosinofílicos (n=20;  $0,75 \times 10^6$ /ml células, rango 0,12-0,5) y asmáticos no eosinofílicos (n=28;  $0,7 \times 10^6$ /ml células, rango 0,01-22,6). El número de células por gramo de esputo y el peso del esputo fue mayor en los asmáticos que en los controles. Belda y cols. obtuvieron en adultos sanos un peso medio (DE) de esputo inducido de 291 mg (93 mg), algo más del doble del peso medio que obtuvimos en nuestro trabajo en niños sanos: 140 mg (110 mg). No encontramos publicaciones en niños sobre esputo inducido en las que se haga referencia al peso del esputo obtenido.

#### **VI.6. Características del esputo en pacientes asmáticos según si recibían o no tratamiento con GCI**

Respecto al estudio de las características del esputo, el recuento celular total y diferencial y la concentración de citoquinas en el esputo inducido de los niños según estuvieran bajo tratamiento o no con GCI, no existieron diferencias estadísticamente significativas. En un estudio con un diseño y un tamaño muestral similar al nuestro, Palomino y cols. tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos, aunque incluyeron pacientes con exacerbación asmática en los que sí se apreciaba un aumento de neutrófilos respecto a los otros grupos(255).

#### **VI.7. Concentración de citoquinas en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles**

En el estudio y la determinación de las citoquinas en el esputo inducido de niños sanos y asmáticos mediante citometría de flujo, nuestros resultados son consistentes con los trabajos realizados hasta el momento, en los que se demuestra que en el asma existe un aumento de citoquinas proinflamatorias, ya sea Th1 o Th2.

Creemos que es la primera vez que se determinan los valores de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12p70 y TNF- $\alpha$  en el esputo inducido de niños sanos, por lo que podrían constituir los valores de referencia en niños sanos en nuestra población.

### VI.7.1. Concentración de IL-10 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles

En cuanto a la IL-10, citoquina considerada antiinflamatoria, la concentración que encontramos en los controles -en los que está más elevada respecto a los asmáticos-, es superponible a la que describen en adultos Quaedvlieg y cols.(222) (ver tabla 31), pero en los asmáticos es mayor en su estudio respecto al nuestro, aunque ellos no encuentran diferencias significativas entre grupos.

**Tabla 31.** Concentración de IL-10 en esputo inducido

Citoquina (pg/ml)	Controles		Asmáticos atópicos		Asmáticos no atópicos	
	Quaedvlieg (adultos;n=31)	Vizmanos (niños;n=18)	Quaedvlieg (n=20)	Vizmanos (n=26)	Quaedvlieg (n=28)	Vizmanos (n=5)
<b>IL-10</b>	43 (1 a 253)	34,9 (12,9 a 55)	37 (12 a 870)	14,5 (7 a 26,4)	26,4 (0 a 2000)	9,4 (6,6 a 15,4)

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

Takanashi y cols. sí encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-10 en esputo inducido de adultos sanos no fumadores [68 (11,3) pg/ml], fumadores sanos [45,3 (7,8) pg/ml], asmáticos [26,7 (4,0) pg/ml] y pacientes con EPOC [18,0 (2,3)] (265). Zeibecoglou y cols. publicaron un estudio en el que determinaron mediante técnica combinada de inmunocitoquímica e hibridación in situ las células que expresaban mRNA de IL-10 y encontraron que los valores eran más altos en asmáticos respecto a sanos y en asmáticos atópicos respecto a asmáticos no atópicos (136). Truyen y cols. no encontraron diferencias en los niveles de IL-10 en esputo entre adultos asmáticos y controles (108) y Ceyhan y cols. no encontraron diferencias en las concentraciones de IL-10 ni en esputo ni en suero de pacientes asmáticos y controles. Tampoco encontraron diferencias en los niveles de IL-10 según el grado de gravedad del asma o según si recibían o no corticoterapia (131), resultados que también nosotros obtuvimos.

## VI.7.2. Concentración de IL-4 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles

En la tabla 32 se aprecia la gran diferencia entre la concentración de IL-4 en el esputo inducido de adultos(222) y de niños (en nuestro estudio), aunque en los 2 trabajos fue superior en los asmáticos atópicos respecto a los sanos y a los asmáticos no atópicos.

**Tabla 32.** Concentración de IL-4 en esputo inducido

Citoquina (pg/ml)	Controles		Asmáticos atópicos		Asmáticos no atópicos	
	Quaedvlieg (n=31)	Vizmanos (n=18)	Quaedvlieg (n=20)	Vizmanos (n=35)	Quaedvlieg (n=28)	Vizmanos (n=5)
<b>IL-4</b>	0 (0 a 0,25)	152,4 (89,9 a 285,3)	1,6 (0-1183)	1749,3 (1097,7 a 2934,7)	0 (0 a 51)	362,8 (161,6 a 615,2)

Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis)

Truyen y cols.(108) evaluaron la inflamación de la vía aérea en 39 adultos asmáticos (atópicos y no atópicos) y en 15 controles mediante determinación de mRNA por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) de citoquinas Th1/Th2 en esputo inducido. Encontraron un aumento de IL-5 e IL-13 en asmáticos respecto a los controles y de IL-5, IL-4 e IL-13 en los asmáticos atópicos respecto a los no atópicos. Estos resultados, con excepción de la IL-13 que no investigamos, coinciden con nuestros hallazgos. A diferencia de nuestro estudio, no detectaron IL-4 en adultos sanos, lo que confirmaría la diferencia que encontramos con otro estudio en adultos (ver tabla 32) y podría considerarse una diferencia intrínseca de la vía aérea de los niños. Encontraron correlación positiva entre IL-4, IL-5, IL-13 y los eosinófilos en esputo y también entre IL-4 e IFN- $\gamma$  y entre IL-5 e IL-13. La correlación entre IL-4 e IFN- $\gamma$  hablaría de una estimulación simultánea de citoquinas Th1 y Th2 en las vías aéreas de los pacientes asmáticos y podría justificar el hallazgo de un aumento de IFN- $\gamma$  en los asmáticos atópicos de nuestro estudio. Shirai y cols. también encontraron correlación entre IL-4 (a partir de la determinación en plasma de

células CD4+ productoras de IL-4) y FENO y entre IL-4 y eosinófilos en esputo (266). En nuestro trabajo no hubo correlación entre IL-4 o IL-5 y eosinófilos en esputo o FENO. Tampoco encontramos correlación entre IgE e IL-4 ni entre IgE e IL-5. Al igual que en nuestro estudio, Truyen y cols. no encontraron diferencias significativas en la concentración de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$ , IL-10) entre los asmáticos tratados con GCI y los no tratados.

### **VI.7.3. Concentración de IL-5 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles**

Respecto a la IL-5, Kim y cols.(267) presentan un estudio en el que no encuentran diferencias en las concentraciones de IL-5 en esputo inducido de niños con asma en fase estable, niños con rinitis alérgica y niños sanos. Al igual que en nuestro trabajo, y a diferencia de los resultados de Truyen y cols. en adultos (108), no encuentran correlación entre IL-5 y eosinófilos. Sin embargo, Kim y cols. encuentran una correlación entre la eotaxina (quemoquina CC) y los índices eosinofílicos (porcentaje de eosinófilos, neurotoxina derivada de los eosinófilos y proteína catiónica eosinofílica), por lo que sugieren que la eotaxina tendría un papel importante en la degranulación de los eosinófilos(267). Paro-Heitor y cols.(268) estudian 26 niños asmáticos de diferente gravedad, a los que someten a tratamiento con fluticasona. Realizan seguimiento durante 12 semanas con determinación de FENO, celularidad en esputo inducido e interleuquinas (IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$ ) en suero en las visitas 0 (basal), 1 (a las 6 semanas de tratamiento) y 2 (a las 12 semanas de tratamiento). Sólo 2 pacientes consiguieron una buena muestra de esputo en las 3 visitas, por lo que no se pudo realizar análisis estadístico de la celularidad del esputo. Encontraron una correlación positiva entre FENO e IL-5 y un comportamiento similar de las 2 variables a lo largo del estudio. En la mayoría de las muestras (70 a 80%) no se pudo determinar IL-10, IL-13 ni IFN- $\gamma$  por encontrarse las concentraciones por debajo del límite de sensibilidad. Concluyen que tanto la FENO como la IL-5 reflejan bien la acción antiinflamatoria de los GCI en el asma y que el resto de citoquinas estudiadas (IL-10, IL-13 ni IFN- $\gamma$ ) no tienen utilidad en el seguimiento del niño asmático,



además de ser costosas económicamente y precisar de extracciones de sangre. Es posible que si en este trabajo hubiesen determinado la concentración de las mismas citoquinas en el esputo inducido, o lo que es lo mismo, en su lugar de acción en el asma, habrían encontrado niveles por encima del límite de sensibilidad de la prueba. Una prueba de ello es la diferencia que existe entre la concentración de IL-5 en el esputo inducido en asmáticos que hemos observado (422 pg/ml) y la concentración de IL-5 en suero (20 a 80 pg/ml) en el trabajo de Paro-Heitor (determinada mediante técnica de ELISA). En adultos también se observa esta diferencia de concentración de IL-5 en suero y en esputo inducido. Así, en el trabajo de Park y cols. la concentración de IL-5 en esputo inducido de adultos asmáticos determinada mediante técnica de ELISA, es de [mediana (rango intercuartil)] 91,4 (73,5-124,6) pg/ml(236) y en el trabajo de Gayoso y cols. en el que determinan las citoquinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en suero de adolescentes y adultos asmáticos mediante citometría de flujo, la concentración de IL-5 [media (desviación estándar)] es de 2,63 (3,53) pg/ml (269). Gayoso y cols. encontraron niveles más bajos de IL-2 e IL-4 en los asmáticos graves, probablemente secundarios al tratamiento con corticoides inhalados. En un estudio en que los asmáticos graves (n=45) se dividen en 3 grupos (exacerbaciones frecuentes, broncoconstricción persistente y ambas), Dente y cols. encontraron niveles más altos de IL-5 en el esputo de los asmáticos con exacerbaciones frecuentes pero no en el de broncoconstricción persistente y sugieren que existirían diferentes perfiles de citoquinas asociados con diferentes fenotipos de asma grave (270).

#### **VI.7.4. Concentraciones de IL-8, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles**

Existen pocos estudios que midan en los mismos pacientes las citoquinas en suero y en esputo. Colombo y cols. midieron los niveles de IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$  en esputo y suero de pacientes con fibrosis quística antes y después de tratamiento antibiótico. Las citoquinas en suero fueron indetectables y sin embargo existían niveles altos de IL-8 en esputo, lo que reafirma el concepto

de que la respuesta inflamatoria (en este caso en la fibrosis quística) está compartimentalizada en el entorno pulmonar o de las vías respiratorias (214). Ceyhan y cols. no encontraron correlación entre concentración de IL-2 en esputo e IL-2 en suero de pacientes asmáticos y controles sanos pero sí entre concentración de IL-10 en esputo e IL-10 en suero de pacientes asmáticos (131).

Respecto al estudio de Basyigit y cols. (264), las concentraciones en esputo de IL-8 son muy inferiores a las que hemos obtenido y sin embargo la concentración de TNF- $\alpha$  es superior a la de nuestro estudio. Estas diferencias podrían reflejar los diferentes límites de sensibilidad de la técnica en los 2 trabajos o las diferencias de concentración de citoquinas en niños y adultos.

En nuestro trabajo, no encontramos diferencias significativas en la concentración de IL-8 ni en la de TNF- $\alpha$  entre asmáticos atópicos (asma eosinofílica en el trabajo de Basyigit) y asmáticos no atópicos (asma no eosinofílica en el trabajo de Basyigit, incluyendo pacientes atópicos). Esto podría deberse al pequeño tamaño muestral de asmáticos no atópicos en nuestro trabajo. Sí encontramos diferencias significativas para IL-8 entre asmáticos y controles, siendo mayor en los primeros y para TNF- $\alpha$ : mayor en los controles que en los asmáticos. Neveu y cols. describen niveles bajos de TNF- $\alpha$  en esputo de asmáticos y sin diferencias respecto a los controles (271).

Kulkarni y cols. encuentran una correlación positiva entre el porcentaje de neutrófilos en esputo inducido y la concentración de IL-8 en esputo inducido de niños sanos (272). Maneechotesuwan y cols. describen esta correlación en el esputo de pacientes asmáticos que presentaron exacerbaciones (100) y Bullens y cols. encuentran correlación entre IL-8 y neutrófilos en esputo de pacientes asmáticos (109). En nuestro estudio, no pudimos demostrar esta correlación. En un trabajo en el que comparan niños sanos y niños asmáticos durante una exacerbación de su asma y 2 semanas después, Norzila y cols. encuentran una reducción significativa de la IL-8(153). Maneechotesuwan y cols. también describen la utilidad de la monitorización de la IL-8 y de los neutrófilos en la predicción de la exacerbación del asma y sugieren que en la exacerbación desencadenada tras disminución gradual de los GCI existe eosinofilia, mientras que en la exacerbación desencadenada tras retirada

brusca de los GCI predominarían los neutrófilos, lo que conllevaría un manejo terapéutico diferente (100).

Shannon y cols.(155) publicaron un trabajo en el que comparan adultos con asma moderada (n=26) y asma grave (n=24) a los que realizaron inducción de esputo y biopsia bronquial. Determinaron la celularidad en el esputo y mediante técnicas de inmunohistoquímica, cuantificaron las citoquinas IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , IL-8 y la quimioquina eotaxina. La IL-8 y el IFN- $\gamma$  estaban más elevados en el asma grave, sin embargo, la IL-4 lo hacía en el asma moderada. No encontraron diferencias de IL-5 entre los 2 grupos, a pesar de que en los pacientes con asma grave hubo más eosinofilia en esputo. Es posible que si hubiesen hecho determinación de IL-5 en esputo sí que hubiesen encontrado diferencias ya que la muestra de esputo representa a la vía aérea proximal y distal, a diferencia de la biopsia bronquial en que sólo se muestrea la vía aérea proximal, y en el asma grave es probable que exista una mayor inflamación distal, como sugiere Wenzel (273). Dente y cols. encontraron concentraciones más elevadas de IL-5 e IL-8 en el esputo de pacientes con asma grave que en el de los pacientes con asma leve (270). En nuestro trabajo no encontramos diferencias de concentración de las citoquinas según la gravedad del asma. Calderon y cols.(274) publicaron un trabajo en el que comparaban el número de células CD4+ y CD8+ productoras de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13 en niños asmáticos (n=16) con exacerbación, 6 semanas después y 6 meses después y con un grupo control (n=14). No encontraron diferencias para la IL-4 pero en cambio, la IL-13 estaba aumentada en la exacerbación, con un cociente IFN- $\gamma$ /IL-13 disminuido que indica un perfil Th2. En cuanto al IFN- $\gamma$ , las células CD4+ productoras de esta citoquina estaban aumentadas en los controles respecto a los asmáticos y las CD8+ productoras de IFN- $\gamma$  lo hacían en los asmáticos en la fase convaleciente. Concluyen que más que la IL-4, es la IL-13 que juega un papel proinflamatorio en la exacerbación asmática y que la respuesta IFN- $\gamma$  se asocia a la recuperación de la exacerbación. Sin embargo, tanto en nuestro estudio como en el de Truyen y cols.(108), no se detectó IFN- $\gamma$  en los controles. La diferencia con el estudio de Calderon y cols. podría radicar en que éstos miden la presencia de células CD4+ productoras de IFN- $\gamma$  y no la propia citoquina. Truyen y cols. encuentran mayor número de copias de mRNA de IFN- $\gamma$  en los asmáticos no atópicos que en los asmáticos atópicos, siendo a la

inversa en nuestro estudio, lo que sorprende por el perfil Th1 del IFN- $\gamma$ . No sabemos si puede tratarse de una diferencia en el fenotipo inflamatorio del asma entre adultos y niños o si debido al pequeño tamaño de la muestra de asmáticos no atópicos en nuestro estudio, no llegamos a encontrar el resultado que a priori parecería más lógico, que es el de mayor concentración de IFN- $\gamma$  en los asmáticos no atópicos.

#### **VI.7.5. Concentración de IL-1 $\beta$ en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles**

En los últimos años, la IL-1 $\beta$  ha ido adquiriendo importancia en la comprensión de la fisiopatología del asma. Sousa y cols. realizaron biopsias bronquiales a 18 pacientes asmáticos y 12 controles y encontraron que en los asmáticos existía un aumento de producción de IL-1 $\beta$  y del antagonista de su receptor IL-1ra, así como un aumento de macrófagos productores de IL-1 $\beta$  (275). Investigaciones recientes en ratones relacionan la IL-1 $\beta$  con el TNF- $\alpha$ . En presencia de IL-1 $\beta$ , en el epitelio bronquial aumenta la expresión de IL-1 RI y TNF RI (receptores de IL-1 $\beta$  y de TNF- $\alpha$ ) y en la musculatura lisa bronquial aumenta la expresión de TNF RI y se induce la de TNF RII (receptor de TNF- $\alpha$ ). Estos cambios tendrían implicaciones en el desarrollo de la hiperrespuesta bronquial en el asma (139). La IL-1 $\beta$  y la IL-6 son producidas por células TH17, implicadas en patología autoinmune y posiblemente en la alergia y el asma (276). En nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias en la concentración de IL-1 $\beta$  ni en la de IL-6 entre controles y asmáticos ni entre asmáticos atópicos y no atópicos. En un reciente estudio experimental, Baines y cols. comprueban que los neutrófilos de pacientes asmáticos liberan menor cantidad de IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  que los controles sanos (277). Neveu y cols. no encuentran diferencias en los niveles de IL-1 $\beta$  en esputo de los asmáticos respecto a controles sanos (271).

#### **VI.7.6. Concentración de IL-2 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles**

La IL-2, citoquina que induce tanto respuesta Th1 como Th2 y que juega un papel regulador junto a la IL-10, estuvo más elevada en nuestro trabajo en los asmáticos respecto a los controles y en los atópicos respecto a los no atópicos. Ceyhan y cols. no encontraron diferencias en los niveles de IL-2 en esputo (determinados mediante técnica ELISA) ni en suero entre los asmáticos (n=17) y los controles (n=5). Los niveles de IL-2 en asmáticos fueron de 35,3 (13,2) pg/ml y en sanos, de 35,3 (8,4) pg/ml, valores muy inferiores a los que encontramos, aunque respecto a nuestro trabajo difiere en la técnica (ELISA versus citometría de flujo) y en la población estudiada (adultos versus niños). Al igual que en nuestro estudio, no encontraron diferencias en las concentraciones de IL-2 según la clasificación de la gravedad del asma, aunque el tamaño muestral de cada grupo era pequeño (n entre 5 y 6 por grupo) o según si recibían o no corticoterapia. Los niveles de IL-2 en esputo se correlacionaron con el porcentaje de linfocitos en su estudio (131), hallazgo que no hemos podido comprobar en nuestro trabajo.

#### **VI.7.7. Concentración de IL-6 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles**

En nuestro trabajo, no hemos encontrado diferencias en los niveles de IL-6 entre asmáticos y controles ni entre asmáticos atópicos y no atópicos. Trabajos recientes han descrito diferencias en las concentraciones de IL-6 en asmáticos respecto a controles sanos y entre asmáticos según su gravedad. Así, Manise y cols. encontraron que los pacientes con asma moderada o refractaria presentaban niveles más altos de IL-6 en esputo respecto a los controles (278), al igual que Neveu y cols. que encuentran niveles de IL-6 en esputo más altos en asmáticos (asma leve a moderada) que en los controles. Estos últimos autores describen una correlación positiva entre IL-6 e IL-13 (citoquina que no hemos estudiado) y entre IL-6 y el empeoramiento de la función pulmonar, y

concluyen que la IL-6 es más que un marcador proinflamatorio y que tendría un rol en la fisiopatología del asma (271).

#### **VI.7.8. Concentración de IL-12p70 en esputo inducido de los niños asmáticos y los controles**

En nuestro trabajo encontramos que la IL-12p70 (forma bioactiva de la IL-12) estaba más elevada en los asmáticos que en los controles y en los asmáticos atópicos respecto a los asmáticos no atópicos. Estos resultados son consistentes con los que publicaron Zeibecoglou y cols. en un estudio en el que hallaron en esputo valores más altos de células que expresaban mRNA de IL-12 en los asmáticos atópicos (n=8) que en los controles (6 atópicos y 7 no atópicos) y que en los asmáticos no atópicos (n=10) (136). Hemos encontrado correlación en los pacientes asmáticos entre IL-12p70 y las siguientes citoquinas: IL-4 ( $r=0,56$ ,  $p=0,001$ ); IFN- $\gamma$  ( $r=0,43$ ,  $p=0,005$ ); IL-10 ( $r=0,40$ ,  $p=0,03$ ). Estos hallazgos concuerdan con lo publicado en la literatura. En un trabajo de investigación básica, a partir de cultivos de células plasmáticas, Kalinski y cols. demostraron que la IL-4, más que el IFN- $\gamma$ , es un factor coestimulador en la inducción de la IL-12p70 y no un inhibidor como se postulaba previamente (152). No encontramos correlación entre IgE e IL-12p70, a pesar de que esta citoquina inhibe la síntesis de IgE.

## **VII. CONCLUSIONES**

## VII. CONCLUSIONES

1. La inducción de esputo en niños sanos y asmáticos en nuestro medio es una técnica segura y con un buen rendimiento.
2. El perfil inflamatorio determinado mediante recuento celular diferencial en esputo inducido en niños asmáticos es similar al que describen otros autores tanto en niños como en adultos.
3. Se han obtenido los valores de referencia de las concentraciones de citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-8, IL-6, IL-4, IL-5, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70 en esputo inducido de niños sanos y niños asmáticos en nuestro medio.
4. El perfil inflamatorio determinado mediante medición de la concentración de citoquinas en esputo inducido de niños asmáticos refleja un aumento de citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8 e IL-12p70) y disminución de IL-10 (citoquina antiinflamatoria) respecto a los niños sanos.
5. El perfil inflamatorio del asma atópica y no atópica en niños es diferente tanto en el recuento celular diferencial como en las concentraciones de citoquinas Th1 y Th2 en esputo inducido.
6. No hemos encontrado un aumento de citoquinas Th1 en esputo inducido de los asmáticos no atópicos respecto a los asmáticos atópicos, posiblemente por el pequeño tamaño muestral de los no atópicos.
7. Existen diferencias en el perfil inflamatorio del asma atópica y no atópica, determinado por la concentración de citoquinas Th1 y Th2 en esputo inducido, entre los niños y los adultos.



## **VIII.BIBLIOGRAFÍA**

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Gema 2009. Guía española para el manejo del asma. Madrid: Luzán 5,S.A.de Ediciones; 2009.
- (2) Castro-Rodríguez JA, García-Marcos L. Wheezing and asthma in childhood: an epidemiology approach. *Allergol et Immunopathol.* 2008;36:280-90.
- (3) ISAAC, Carvajal-Ureña I, García-Marcos L, Busquets-Monge R, Morales Sánchez-Varela M, García de Andoain N, et al. Variaciones geográficas de la prevalencia de síntomas de asma en los niños y adolescentes españoles. *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Fase III España.* *Arch Bronconeumol.* 2005;41:659-66.
- (4) Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CKW, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet.* 2006;368:733-43.
- (5) García-Marcos L, Castro-Rodríguez JA, Suarez-Varela MM, Garrido JB, Hernandez GG, Gimeno AM, et al. A different pattern of risk factors for atopic and non-atopic wheezing in 9-12-year-old children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16:471-7.
- (6) Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax.* 1999;54:268-72.
- (7) Castro-Rodríguez JA, Ramirez AM, Toche P, Pavon D, Perez MA, Girardi G, et al. Clinical, functional and epidemiological differences between atopic and nonatopic asthmatic children from a tertiary care hospital in a developing country. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007;98:239-44.
- (8) ISAAC Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J.* 1998;12:315-35.
- (9) von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149:358-64.
- (10) Flynn MG. Respiratory symptoms of rural Fijian and Indian children in Fiji. *Thorax.* 1994;49:1201-4.
- (11) García-Marcos L. Genes, medio ambiente y asma. *An Pediatr (Barc).* 2004;2:9-29.
- (12) Nieto García A. Fenotipos, genotipos y tratamiento del asma. *An Pediatr (Barc).* 2008;69:293-6.

- (13) Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, et al. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:434-57.
- (14) Lundgren R, Söderberg M, Hörstedt P, Stenling R. Morphological studies of bronchial mucosal biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroids. *Eur Respir J.* 1988;1(10):883-9.
- (15) Jeffery PK. Pathology of asthma. *Br Med Bull.* 1992;48:23-39.
- (16) Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben T, Karp C, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science.* 1998;282:2258-61.
- (17) Nomura N, Yoshikawa T, Kamoi H, Kanazawa H, Hirata K, Fujimoto S. Induced sputum analysis in asymptomatic young adults with bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *Respirology.* 2007;12:516-22.
- (18) Djukanovic R. Bronchoscopy as a research tool for the study of asthma pathogenesis and effects of antiasthma drugs. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98:S41-S45.
- (19) Bousquet J, Chanez P, Campbell A, Lacoste JY, Poston R, Enander I, et al. Inflammatory processes in asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;94:227-32.
- (20) Cokugras H, Akçakaya N, Seçkin, Camcioglu Y, Sarimurat N, Aksoy F. Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax.* 2001;56(1):25-9.
- (21) Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140(6):1745-53.
- (22) Möller G, Overbeek S, van Helden-Meeuwsen C, Hoogsteden H, Bogaard JM. Eosinophils in the bronchial mucosa in relation to methacholine dose-response curves in atopic asthma. *J Appl Physiol.* 1999;86(4):1352-6.
- (23) Karjalainen EM, Laitinen A, Sue-Chu M, Altraja A, Bjermer L, Laitinen LA. Evidence of airway inflammation and remodeling in ski athletes with and without bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(6):2086-91.
- (24) Shahana S, Björnsson E, Lúdvíksdóttir D, Janson C, Nettelbladt O, Venge P, et al. Ultrastructure of bronchial biopsies from patients with allergic and non-allergic asthma. *Respir Med.* 2005;99:429-43.
- (25) Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest.* 1999;104:1001-6.

- (26) Bousquet J, Jeffery PK, Busse WB, Johnson M, Vignola AM. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1720-45.
- (27) Woodruff P, Dolganov G, Ferrando R, Donnelly S, Hays S, Solberg O, et al. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:1001-6.
- (28) Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:975-81.
- (29) Pohunek P, Warner J, Turzíkóv J, Kudrmann J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16:43-51.
- (30) Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Tura M, et al. Airway inflammation in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:798-803.
- (31) Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodelling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:378-85.
- (32) Hoshino M, Nakamura Y, Sim JJ. Expression of growth factors and remodelling of the airway wall in bronchial asthma. *Thorax.* 1998;53:21-7.
- (33) Ward C, Pais M, Bish R, Reid D, Feltis B, Johns D, et al. Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Thorax.* 2002;309-16.
- (34) Editorial. A plea to abandon asthma as a disease concept. *Lancet.* 2006;368:705.
- (35) Bush A. Phenotype specific treatment of asthma in childhood. *Paediatr Resp Rev.* 2004;5:S93-S101.
- (36) Stein RT, Martinez FD. Asthma phenotypes in childhood: lessons from an epidemiological approach. *Paediatr Resp Rev.* 2004;5:155-61.
- (37) Real Academia Española. Diccionario de la lengua española. 21 ed. ed. Madrid: 1992.
- (38) Horner CC, Strunk RC. Age-related changes in the asthmatic phenotype in children. *Curr Opin Pediatr.* 2007;19:295-9.
- (39) Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet.* 2006;368:804-13.

- (40) Kiley J, Smith R, Noel P. Asthma phenotypes. 2007; 13. *Curr Opin Pulm Med*. 2007;13:19-23.
- (41) Green RH, Brightling CE, Bradding P. The reclassification of asthma based on subphenotypes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7:43-50.
- (42) Bush A, Menzies-Gow A. Phenotypic differences between pediatric and adult asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6:712-9.
- (43) Warner J O, Naspitz C K. Third International Pediatric Consensus Statement on the Management of Childhood Asthma. *Pediatric Pulmonology*. 1998;25:1-17.
- (44) Castillo Laita JA, Torregrosa Bertet MJ, Grupo de Vías Respiratorias. *Protocolo de Diagnóstico de Asma. El Pediatra de Atención Primaria y el diagnóstico de Asma*. Protocolo del GVR (publicación P-GVR-1) . [www.aepap.org/gvr/protocolos.htm](http://www.aepap.org/gvr/protocolos.htm) 2007 July 15 Available from: URL: [www.aepap.org/gvr/protocolos.htm](http://www.aepap.org/gvr/protocolos.htm)
- (45) Rackemann FM. A clinical classification of asthma. *Am J Med Sci*. 1921;12:802-3.
- (46) Kuehni CE, Swiss Paediatric Pulmonology Group. Phenotype specific treatment of obstructive airways disease in infancy and childhood: new recommendations of the Swiss Paediatric Pulmonology Group. *Swiss Med Wkly*. 2005;135:95-100.
- (47) Busquets Monge RM, Escribano Montaner A, Fernández Benítez M, García-Marcos L, Garde Garde J, Ibero Iborra M, et al. Consenso sobre tratamiento del asma en Pediatría. *An Pediatr (Barc)*. 2006;64:365-78.
- (48) Castro-Rodríguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A Clinical Index to Define Risk of Asthma in Young Children with Recurrent Wheezing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1403-6.
- (49) Guilbert T W, Morgan WJ, Zeiger R S, Bacharier L B, Boehmer S J, Krawiec M, et al. Atopic characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1282-7.
- (50) Castro-Rodriguez JA. Assessing the risk of asthma in infants and pre-school children. *Arch Bronconeumol*. 2006;42:453-6.
- (51) Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life: relation with lung function, total serum IgE levels and skin test reactivity to allergens. *N Engl J Med*. 1995;332(133):138.

- (52) Taussig LM, Wright AL, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Martinez FD. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:661-75.
- (53) Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL, Guerra S, Holberg CJ, Guilbert TW, et al. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:1253-8.
- (54) Martinez FD. Heterogeneity of the association between lower respiratory illness in infancy and subsequent asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2:157-61.
- (55) Pérez-Yarza EG, Moreno A, Lázaro P, Mejías A, Ramilo O. The association between respiratory syncytial virus infection and the development of childhood asthma: a systematic review of the literature. *Pediatr Infect Dis.* 2007;26:733-9.
- (56) Piedimonte G. Neural mechanisms of respiratory syncytial virus-induced inflammation and prevention of respiratory syncytial virus sequelae. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:S18-S21.
- (57) García-Marcos Álvarez L, Sánchez-Solís de Querol M, Bosch Giménez V. Epidemiología e historia natural de las sibilancias en el lactante. In: Villa Asensi JR, editor. *Sibilancias en el lactante 2009*. Madrid: Ediciones Luzán 5, 2009. p. 11-26.
- (58) Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:101-8.
- (59) Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Martinez FD. Increased incidence of asthmalike symptoms in girls who become overweight or obese during the school years. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1344-9.
- (60) Varraso R, Siroux V, Maccario J, Pin I, Kauffmann F. Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma. Asthma severity is associated with body mass index and early menarche in women. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:334-9.
- (61) De Mir Messa I. Estudio de la hiperrespuesta bronquial a la metacolina y de la inflamación bronquial valorada mediante el óxido nítrico exhalado, en niños menores de cuatro años con bronquitis sibilantes de repetición. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona; 2005.
- (62) De Mir Messa I, Moreno Galdó A, Liñán Cortés S, Morera G, Gartner S, Cobos Barroso N. La hiperrespuesta bronquial no predice la evolución de los lactantes y niños pequeños con bronquitis sibilantes. *An Pediatr (Barc).* 2007;66(Supl 2):89.

- (63) Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathological phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119:1043-52.
- (64) Bentley AM, Hamid Q, Robinson DS, Schotman E, Meng Q, Assoufi B, et al. Prednisolone treatment in asthma: reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon-gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:551-6.
- (65) Gemou-Engesaeth V, Kay AB, Bush A, Corrigan CJ. Activated peripheral blood CD4 and CD8 T-lymphocytes in child asthma: correlation with eosinophilia and disease severity. *Pediatr Allergy Immunol.* 1994;5:170-7.
- (66) Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax.* 2002;57:643-8.
- (67) Vizmanos G, Cruz MJ, Moreno A, Liñán S, Gómez S, Muñoz X, et al. Estudio del fenotipo inflamatorio en niños asmáticos mediante determinación de celularidad y leucotrieno B4 (LTB4) en esputo inducido. *An Pediatr (Barc).* 2007;66 (Supl 2):75.
- (68) Payne DNR, Adcock IM, Wilson NM, Oates T, Scallan M, Bush A. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1376-81.
- (69) Krawiec M, Westcott J, Chua HL. Persistent wheezing in very young children is associated with lower respiratory inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:290-1.
- (70) Marguet C, Dean T, Warner J. Broncoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:1533-40.
- (71) Le Bourgeois M, Goncalves M, Le Clainche. Broncoalveolar cells in children < 3 years old with severe recurrent wheezing. *Chest.* 2002;122:761-3.
- (72) Stevenson E, Turner G, Heaney L. Broncoalveolar lavage findings suggest two different forms of childhood asthma. *Clin Exp Allergy.* 2004;27:1027-35.
- (73) Saglani S, Nicholson AG, Scallan M, Balfour-Lynn I, Rosenthal M, Payne DN, et al. Investigation of young children with severe recurrent wheeze: any clinical benefit? *Eur Respir J.* 2006;27:29-35.
- (74) Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med.* 2002;346:1699-705.

- (75) Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:651-63.
- (76) Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;95:843-52.
- (77) Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:789-815.
- (78) Peters-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31:3-7.
- (79) Politio AJ, Proud D. Epithelia cells as regulators of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102:714-8.
- (80) Groneberg DA, Quarcoo D, Frossard N, Fischer A. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy.* 2004;59:1139-52.
- (81) Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. State of the Art. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1720-45.
- (82) Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, et al. Interleukin-4,-5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;(10):471-80.
- (83) Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts.J.A., Britten K, et al. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med.* 1992;176:1381-6.
- (84) Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:1277-84.
- (85) Ruoss S, Hartmann T, Caughey GH. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest.* 1991;88:493-9.
- (86) Thompson H, Burbelo P, Gabriel G, Yamada Y, Metcalfe DD. Murine mast cells synthesize basement membrane components: a potential role in early fibrosis. *J Clin Invest.* 1991;87:619-23.
- (87) Robinson DS. The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle? *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:58-65.
- (88) El-Shazly A, Berger P, Girodet PO, Ousova O, Fayon M, Vernejoux JM, et al. Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol.* 2006;176:1860-8.



- (89) Bousquet J, Chanez P, Lacoste J, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 1990;323:1033-9.
- (90) Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med*. 1991;324:1110-8.
- (91) Rabe K, Munoz N, Vita A, Morton B, Magnussen H, Leff A. Contraction of human bronchial smooth muscle caused by activated human eosinophils. *Am J Physiol*. 1994;267:L326-34.
- (92) Lungarella G, Menegazzi R, Gardi C, Spessotto P, de Santi M, Bertoncin P, et al. Identification of elastase in human eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization. *Arch Biochem Biophys*. 1992;292:128-35.
- (93) Pincus S, Ramesh K, Wyler DJ. Eosinophils stimulate fibroblast DNA synthesis. *Blood*. 1987;70:572-4.
- (94) Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1001-8.
- (95) Berry M, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green R, Brightling C, et al. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax*. 2007;62:1043-9.
- (96) Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:199-204.
- (97) Koh YY, Dupuis R, Pollice M, Albertine KH, Fish JE, Peters SP. Neutrophils recruited to the lungs of human by segmental antigen challenge display a reduced chemotactic response to leukotriene B4. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;8:493-9.
- (98) Carroll N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur Respir J*. 1996;9:709-15.
- (99) Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, et al. Sudden onset fatal asthma: a distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:713-9.
- (100) Maneechotesuwan K, Essilfie-Quaye S, Kharitonov SA, Adcock IM, Barnes PJ. Loss of control of asthma following inhaled corticosteroid withdrawal is associated with increased sputum interleukin-8 and neutrophils. *Chest*. 2007;132:98-105.

- (101) in't Venn JC, Smits HH, Hiemstra PS, Zwinderman AE, Sterk PJ, Bel EH. Lung function and sputum characteristics of patients with severe asthma during an induced exacerbation by double-blind steroid withdrawal. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:93-9.
- (102) Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):64-72.
- (103) Kittipong M, Essilfie-Quaye S, Kharitonov SA, Adcock IM, Barnes PJ. Loss of control of asthma following inhaled corticosteroid withdrawal is associated with increased sputum interleukin-8 and neutrophils. *Chest*. 2007;132:98-105.
- (104) Shaw DE, Berry MA, Hargadon B, McKenna S, Shelley MJ, Green RH, et al. Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma. *Chest*. 2007;132:1871-5.
- (105) Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma. Insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6:256-9.
- (106) Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay A, Durham SR. Activation of CD4<sup>+</sup> T cells, increased Th<sub>2</sub>-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92:313-24.
- (107) Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy*. 2006;91:59-75.
- (108) Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Overbergh L, Dupont L, Ceuppens J, et al. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax*. 2006;61:202-8.
- (109) Bullens DMA, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respiratory Research*. 2006;7:135.
- (110) Kelly C, Ward C, Stenton C, Bird G, Hendrick D, Walters EH. Number and activity of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid in asthma and their relation to airway responsiveness. *Thorax*. 1988;43:684-92.
- (111) Bentley AM, Menz G, Storz C, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, et al. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma: relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146:500-6.
- (112) Chanez P, Vignola AM, Paul-Eugene N, Dugas B, Godard P, Michel FB, et al. Modulation by interleukin-4 of cytokine release from

- mononuclear phagocytes in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;94:997-1005.
- (113) Zhang S, Howarth P, Roche WR. Cytokine production by cell cultures from bronchial subepithelial myofibroblasts. *J Pathol.* 1996;180:95-101.
- (114) Kelly M, Chakir J, Vethanayagam D, Boulet L, Laviolette M, Gauldie J, et al. Montelukast treatment attenuates the increase in myofibroblasts following low-dose allergen challenge. *Chest.* 2006;130(3):741-53.
- (115) Clutterbuck EJ, Hirst EM, Sanderson CJ. Human interleukin-5 regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures : comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood.* 1989;73:1504-12.
- (116) Barnes PJ, Chung KF. Cytokines in asthma. *Thorax.* 1999;54:825-57.
- (117) Ramos-Barbón D. Asma. *Arch Bronconeumol.* 2007;43:3-14.
- (118) Steinke J, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res.* 2001;2:66-70.
- (119) Del Prete G, DeCarli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol.* 1993;150:353-60.
- (120) Hauber HP, Bergeron C, Hamid Q. IL-9 in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;134(1):79-87.
- (121) Zhou Y, McLane M, Levitt RC. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-9 as a therapeutic target for asthma. *Respir Res.* 2001;2:80-4.
- (122) Holz L, Jakobsen K, Van Snick J, Cormont F, Sewell WA. Dexamethasone inhibits IL-9 production by human T cells. *J Inflamm (Lond).* 2005;2(1):3.
- (123) Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(6):1484-90.
- (124) Smithgall M, Comeau M, Yoon B, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol.* 2008;20(8):1019-30.
- (125) Wang J, Homer R, Chen Q, Elias JA. Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J Immunol.* 2000;165:4051-61.

- (126) Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol.* 2002;39:531-6.
- (127) Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur Respir J.* 2005;26:1119-37.
- (128) Brusselle GG, Kips JC, Peleman RA, Joos GF, Devos RR, Tavernier JH, et al. Role of IFN- $\gamma$  in the inhibition of the allergic airway inflammation caused by IL-12. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17:767-71.
- (129) Doshi U, Salat P, Parikh V. Cytokine modulators in asthma: clinical perspectives. *Indian Journal of Pharmacology.* 2002;34:16-25.
- (130) Upham JW, McMenemy C, Schon-Hegrad MA, Robinson BWS, Holt PG. Functional analysis of human bronchial mucosa T cells extracted with interleukin-2. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149:1608-13.
- (131) Ceyhan BB, Enc FY, Sahin S. IL-2 and IL-10 levels in induced sputum and serum samples of asthmatics. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2004;14:80-5.
- (132) Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, et al. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol.* 1995;155:1428-33.
- (133) Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, von Tscherner V, Walz A, Moser B, et al. Activation of human basophils through the IL-8 receptor. *J Immunol.* 1992;149:2662-7.
- (134) Hilger RA, Köller M, König W. Inhibition of leukotriene formation and IL-8 release by the PAF-receptor antagonist SM-12502. *Inflammation.* 1996;20:57-70.
- (135) Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 1993;177:1199-204.
- (136) Zeibecoglou K, Ying S, Meng Q, Poulter LW, Robinson DS, Kay AB. Macrophage subpopulations and macrophage-derived cytokines in sputum of atopic and nonatopic asthmatic subjects and atopic and normal control subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:697-704.
- (137) Yates DH, Barnes PJ, Thomas PS. Tumor necrosis factor  $\alpha$  alters human bronchial reactivity and induces inflammatory cell influx. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:A1011.
- (138) Choi IW, Sun-Kim, Kim YS, Ko HM, Im SY, Kim JH, et al. TNF-alpha induces the late-phase airway hyperresponsiveness and airway inflammation through cytosolic phospholipase A(2) activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:537-43.

- (139) Cardell LO, Uddman R, Zhang Y, Adner M. Interleukin-1 beta up-regulates tumor necrosis factor receptors in the mouse airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;21:675-81.
- (140) Yang Y, Bin W, Aksoy MO, Kelsen SG. Regulation of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 $\beta$  inhibitor release by human airway epithelial cells. *Eur Respir J.* 2004;24:360-6.
- (141) Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Pagé N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:430-8.
- (142) Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.* 2005;5:161-6.
- (143) MacGlashan DJr, White J, Huang S, Ono S, Schroeder J, Lichtenstein LM. Secretion of IL-4 from human basophils: the relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J Immunol.* 1994;152:3006-16.
- (144) Carrillo T. Anticitocinas: expectativas en el tratamiento del asma. 2003.  
Ref Type: Personal Communication.
- (145) Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, et al. A comprehensive evaluation of *IL4* variants in ethnically diverse populations: Association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:80-7.
- (146) Hawrylowicz C, Richards D, Loke TK, Corrigan C, Lee T. A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109:369-70.
- (147) Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:676-80.
- (148) Huang C, Tliba O, Panettieri RJ, Amrani Y. Bradykinin induces interleukin-6 production in human airway smooth muscle cells: modulation by Th2 cytokines and dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(3):330-8.
- (149) Schmitz N, Kurrer M, Kopf M. The IL-1 receptor is critical for Th2 cell type airway immune responses in amild but not in a more severe asthma model. *Eur J Immunol.* 2003;33:991-1000.
- (150) White SR, Fischer BM, Marroquin BA, Stern R. Interleukin-1beta mediates human airway epithelial cell migration via NF-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295:1018-27.

- (151) Zeyrek D, Demir E, Alpman A, Ozkinay F, Gulen F, Tanac R. Association of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Turkish children with atopic asthma. *Allergy Asthma Proc.* 2008;29:468-74.
- (152) Kalinski P, Smiths HH, Schuitemaker JH, Vieira PL, van Eijk M, de Jong EC, et al. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J Immunol.* 2000;165:1877-81.
- (153) Norzila M, Fakes K, Henry R, Simpson J, Gibson PG. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:769-74.
- (154) Fujimura M, Xiu Q, Tsujiura M, Tachibana H, Myou S, Matsuda T, et al. Role of leukotriene B<sub>4</sub> in bronchial hyperresponsiveness induced by interleukin-8. *Eur Respir J.* 1998;11:306-11.
- (155) Shannon J, Ernst P, Yamauchi Y, Olivenstein R, Lemiere C, Foley S, et al. Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest.* 2008;133(2):420-6.
- (156) Park H, Li Z, O Yang X, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6:1133-41.
- (157) Takeda N, Sumi Y, Préfontaine D, Al Abri J, Al Heialy N, Al-Ramli W, et al. Epithelium-derived chemokines induce airway smooth muscle cell migration. *Clin Exp Allergy.* 2009;39:1018-26.
- (158) Devillier P, Baccard N, Advenier C. Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part I: synthesis, receptors and role of leukotrienes in asthma. *Pharmacol Res.* 1999;40(1):3-13.
- (159) Toda A, Yokomizo T, Shimizu T. Leukotriene B<sub>4</sub> receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:575-85.
- (160) Peters-Golden M. Expanding roles for leukotrienes in airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2008;8(4):367-73.
- (161) Miyahara N, Ohnishi H, Miyahara S, Takeda K, Matsubara S, Matsuda H, et al. Leukotriene B<sub>4</sub> release from mast cells in IgE-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(6):672-82.
- (162) Holgate S, Peters-Golden M, Panettieri R, Henderson WJ. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(1 Suppl):S18-S34.

- (163) Hamid Q, Springall D, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, et al. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet*. 1993;342:1510-3.
- (164) Gustaffson L, Leone A, Persson M, Wiklund N, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;181:852-7.
- (165) Kharitonov S, Yates D, Robbins R, Logan-Sinclair R, Shinebourne E, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*. 1994;343:133-5.
- (166) Yates D, Kharitonov S, Robbins R, Thomas P, Barnes P. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:892-6.
- (167) Byrnes C, Dinarevic S, Shinebourne E, Barnes P, Bush A. Exhaled nitric oxide measurements in normal and asthmatic children. *Pediatr Pulmonol*. 1997;24:312-8.
- (168) Redington A, Meng Q, Springall D, Evans T, Creminon C, Maclouf J, et al. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment. *Thorax*. 2001;56:351-7.
- (169) Franklin P, Stick SM. The value of FeNO measurement in asthma management: the motion against FeNO to help manage childhood asthma--reality bites. *Paediatr Respir Rev*. 2008;9(2):122-6.
- (170) Bush A, Eber E. The value of FeNO measurement in asthma management: the motion for Yes, it's NO--or, the wrong end of the Stick! *Paediatr Respir Rev*. 2008;9(2):127-31.
- (171) Cobos Barroso N, Pérez-Yarza EG, Sardón Prado O, Reverté Bover C, Gartner S, Korta Murua J. Óxido nítrico exhalado en niños: un indicador no invasivo de la inflamación de las vías aéreas. *Arch Bronconeumol*. 2008;44(1):41-51.
- (172) Sivan Y, Gadish T, Fireman E, Soferman R. The use of exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma in school children. *J Pediatr*. 2009;155:211-6.
- (173) Buke W, Fesinmeyer M, Reed K, Hampson L, Caristen C. Family history as a predictor of asthma risk. *Am J Prev Med*. 2009;24:160-9.
- (174) Pérez-Yarza EG, Villa JR, Cobos N, Navarro M, Salcedo A, Martín C, et al. Espirometría forzada en preescolares sanos bajo las recomendaciones de la ATS/ERS: estudio CANDELA. *An Pediatr (Barc)*. 2009;70:3-11.
- (175) Beydon N, Davis SD, Lombardi E, Allen JL, Arets H, Aurora P, et al. On behalf of the American Thoracic Society/European Respiratory Society

Working Group on Infant and Young Children Pulmonary Function Testing. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Pulmonary Function Testing in Preschool Children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:1304-45.

- (176) Polosa R, Rorke S, Holgate ST. Evolving concepts on the value of adenosine hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2002;57:649-54.
- (177) Avital A, Springer C, Bar-Yishay E, Godfrey S. Adenosine, methacholine, and exercise challenges in children with asthma or paediatric chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1995;50:511-6.
- (178) Asensio de la Cruz O, Cordón Martínez A, Elorz Lambarri J, Moreno Galdó A, Villa Asensi JR, y Grupo de Técnicas de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica. Estudio de la función pulmonar en el paciente colaborador. Parte II. *An Pediatr (Barc).* 2007;66:518-30.
- (179) Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest.* 2006;130:1541-6.
- (180) American Thoracic Society, European Respiratory Journal. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(8):912-30.
- (181) Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. *Thorax.* 2006;61:817-27.
- (182) Warke TJ, Fitch PS, Brown V, Taylor R, Lyons JDM, Ennis M, et al. Exhaled nitric oxide correlate with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax.* 2002;57:383-7.
- (183) Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest.* 2003;123:751-6.
- (184) Smith AD, Cowan JO, Filsell S, Mc Lachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, et al. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:473-8.
- (185) Malmberg LP, Pelkonen AS, Haahtela T, Turpeinen M. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. *Thorax.* 2003;58:494-9.
- (186) Sardón Prado O, Aldasoro Ruiz A, Korta Murua J, Mintegui Aranburu J, Emparanza Knörr JI, Pérez-Yarza EG. Concordancia entre dos dispositivos de medida de óxido nítrico exhalado. 2007;67:572-7. *An Pediatr (Barc).* 2007;67:572-7.



- (187) Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, De Jongste JC. Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:831-6.
- (188) Moeller A, Franklin P, Hall GL, Turner S, Straub D, Wildhaber JH, et al. Inhaled fluticasone dipropionate decreases levels of nitric oxide in recurrently wheezy infants. *Pediatr Pulmonol*. 2004;38:250-5.
- (189) Straub DA, Moeller A, Minocchieri S, Hamacher J, Sennhauser FH, Hall GL, et al. The effect of montelukast on lung function and exhaled nitric oxide in infants with early childhood asthma. *Eur Respir J*. 2005;25:289-94.
- (190) Straub DA, Minocchieri S, Moeller A, Hamacher J, Wildhaber JH. The effect of montelukast on exhaled nitric oxide and lung function in asthmatic children 2 to 5 years old. *Chest*. 2005;127:509-14.
- (191) Gabriele C, Nieuwhof EM, Van der Wiel EC, Hofhuis W, Moll HA, Merkus PJFM, et al. Exhaled Nitric Oxide Differentiates Airway Diseases in the First Two Years of Life. *Pediatr Res*. 2006;60:461-5.
- (192) De Mir Messa I, Moreno Galdó A, Cobos Barroso N, Gartner S, Martín de Vicente C, Liñán Cortés S. Óxido nítrico exhalado en niños menores de 4 años con bronquitis de repetición. *Arch Bronconeumol*. 2009;45:442-8.
- (193) Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M, Castillo D, Foss B, Dunning M, et al. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit care Med*. 2002;165:663-9.
- (194) Rosias PP, Dompeling E, Hendriks HJ, Heijmans JW, Donckerwolcke RA, Jöbsis Q. Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatr Allergy Immunol*. 2004;15:4-19.
- (195) Robroeks CM, Rijkers GT, Jöbsis Q, Hendriks HJ, Damoiseaux JG, Zimmermann LJ, et al. Increased cytokines, chemokines and soluble adhesion molecules in exhaled breath condensate of asthmatic children. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:77-84.
- (196) Andrés Piquer. *Las obras de Hipócrates mas selectas*. Segunda Edición ed. Madrid: Joachim de Ibarra; 1769. p. 175-7.
- (197) Bickerman HA, Sproul DE, Barach AL. An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technic for the detection of lung cancer. *Dis Chest*. 1958;33:347-62.
- (198) Barach AL, Bickerman HA, Beck GJ, Nanda KGS, Pons ERJr. Induced sputum as a diagnostic technique for cancer of the lungs and for mobilization of retained secretions. *Arch Int Med*. 1960;106:230-6.

- (199) Khajotia RR, Mohn A, Pokieser L, Schalleschak J, Vetter N. Induced sputum and cytological diagnosis of lung cancer. *Lancet*. 1991;338:976-7.
- (200) Yue WY, Cohen SS. Sputum induction by newer inhalations methods in patients with pulmonary tuberculosis. *Dis Chest*. 1967;51:614-20.
- (201) Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, Swinger G, Hussey G. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. *Lancet*. 2005;365:130-4.
- (202) Oliveira GM, Cordeiro AM, Marsico GA, Rentería JM, Guimaraes CA. Induced sputum in HIV-infected patients: diagnosis of acute pulmonary diseases. *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55:617-20.
- (203) Lahti E, Peltola V, Waris M, Virkki R, Rantakokko-Jalava K, Jalava J, et al. Induced sputum in the diagnosis of childhood community-acquired pneumonia. *Thorax*. 2009;64:252-7.
- (204) Irwin RS. Chronic cough due to gastroesophageal reflux disease. *Chest*. 2006;129:80S-94S.
- (205) Parameswaran K, Anvari M, Efthimiadis A, Kamada D, Hargreave FE, Allen CJ. Lipid-laden macrophages in induced sputum are a marker of oropharyngeal reflux and possible gastric aspiration. *Eur Respir J*. 2000;16:1119-22.
- (206) Pérez Tarazona S. Enfermedad respiratoria por reflujo gastroesofágico en niños: Valor diagnóstico del índice de macrófagos cargados de lípidos en una población seleccionada. Tesis doctoral. Universidad de Valencia; 2005.
- (207) Rosen R, Fritz J, Nurko A, Simon D, Nurko S. Lipid-laden macrophage index is not an indicator of gastroesophageal reflux-related respiratory disease in children. *Pediatrics*. 2008;121:e879-e884.
- (208) Gartner S, Cobos N. Cribado neonatal para la fibrosis quística. *An Pediatr (Barc)*. 2009;71:481-2.
- (209) Barrio Gómez de Agüero MI, García Hernández G, Gartner S, Prats M. Protocolo de diagnóstico y seguimiento de los pacientes con fibrosis quística. *An Pediatr (Barc)*. 2009;71:250-64.
- (210) Sagel SD, Kapsner R, Osberg I, Sontag MK, Accurso FJ. Airway inflammation in children with cystic fibrosis and healthy children assessed by sputum induction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1425-31.
- (211) De Boeck K, Alifrier M, Vandeputte S. Sputum induction in young cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*. 2000;16:91-4.

- (212) Suri R, Marshall LJ, Wallis C, Metcalfe C, Shute JK, Bush A. Safety and use of sputum induction in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2003;35:309-13.
- (213) Shute J. Induced sputum studies in cystic fibrosis. In: Djukanovic R, Sterk PJ, editors. *An atlas of induced sputum. An aid for research and diagnosis.*New York: *The Parthenon Publishing Group*; 2004. p. 89-97.
- (214) Colombo C, Costantini D, Rocchi A, Cariani L, Garlaschi ML, Tirelli S, et al. Cytokine levels in sputum of cystic fibrosis patients before and after antibiotic therapy. *Pediatr Pulmonol.* 2005;40:15-21.
- (215) Maestrelli P, Mapp CE. Induced sputum studies in chronic obstructive pulmonary disease in interstitial and occupational lung diseases . In: Djukanovic R, Sterk PJ, editors. *An atlas of induced sputum. An aid for research and diagnosis.*New York: *The Parthenon Publishing Group*; 2009. p. 71-9.
- (216) Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:530-4.
- (217) Rutgers SR, Timens W, Tzanakis N, Kauffman HF, van der Mark TW, Koëter GH, et al. Airway inflammation and hyperresponsiveness to adenosine 5'-monophosphate in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy.* 2000;30:657-62.
- (218) Culpitt SV, de Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of theophylline on induced sputum inflammatory indices and neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;15:1371-6.
- (219) Fireman E, Costabel U. Induced sputum in interstitial and occupational lung diseases . In: Djukanovic R, Sterk PJ, editors. *An atlas of induced sputum. An aid for research and diagnosis.*New York: *The Parthenon Publishing Group*; 2004. p. 121-7.
- (220) Djukanovic R, Sterk PJ. Introduction. In: Djukanovic R SPe, editor. *An atlas of induced sputum. An aid for research and diagnosis.* New York: *The Parthenon Publishing Group*; 2004. p. 9-10.
- (221) Pin I, Gibson P, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg J, Hargreave F, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax.* 1992;47:25-9.
- (222) Quaedvlieg V, Henket M, Sele J, Louis R. Cytokine production from sputum cells in eosinophilic versus non-eosinophilic asthmatics. *Clinical and Experimental Immunology.* 2006;143:161-6.

- (223) Bettiol J, Sele J, Henket M, Louis E, Malaise M, Bartsch P, et al. Cytokine production from sputum cells after allergenic challenge in IgE-mediated asthma. *Allergy*. 2002;57(12):1145-50.
- (224) Bodini A, Peroni D, Vicentini L, Loiacono A, Baraldi E, Ghiso L, et al. Exhaled breath condensate eicosanoids and sputum eosinophils in asthmatic children: a pilot study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2004;15:26-31.
- (225) Wilson N, Bridge P, Spanevello A, Silverman M. Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax*. 2000;55:768-74.
- (226) Jones PD, Hankin R, Simpson J, Gibson PG, Henry RL. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1146-9.
- (227) Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry R.L. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax*. 2003;58:116-21.
- (228) Cai Y, Carty K, Henry R.L., Gibson PG. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J*. 1998;11:848-53.
- (229) Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, Gleeson M, Henry RL, Cripps AW, et al. Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:36-41.
- (230) Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon BPDBPWAJPID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:1715-21.
- (231) Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J*. 2000;16(1):150-8.
- (232) Simpson JL, Scott R, Boyle M, Gibson P. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology*. 2006;11:54-61.
- (233) Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, Boulet LP, Lemiere C, Pizzichini E, et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J*. 2006;27(483):494.
- (234) Simpson JL, McElduff P, Gibson PG. Assessment and reproducibility of non-eosinophilic asthma using induced sputum. *Respiration*. 2010;79:147-51.

- (235) Covar RA, Spahn JD, Martin RJ, Silkoff PE, Sundstrom DA, Murphy J, et al. Safety and application of induced sputum analysis in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:575-82.
- (236) Park S, Jangm H, An M, Min J, Jang A, Lee J, et al. Interleukin-13 and interleukin-5 in induced sputum of eosinophilic bronchitis: comparison with asthma. *Chest.* 2005;128(4):1921-7.
- (237) Pizzichini E, Pizzichini M, Leigh R, Djukanovic R, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *Eur Respir J (Suppl).* 2002;37:9s-18s.
- (238) Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J (Suppl).* 2002;37:1s-2s.
- (239) Paggiaro P, Spanevello A, Bacci E. Sputum induction: methods and safety. In: Djukanovic R SP, editor. *An atlas of induced sputum. An aid for research and diagnosis.* New York: The Parthenon Publishing Group; 2004. p. 11-9.
- (240) Pizzichini E, Pizzichini M, Efthimiadis A, Evans S, Morris M, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit care Med.* 1996;154:308-17.
- (241) Bacci E, Cianchetti S, Paggiaro PL, Carnevali S, Bancalari L, Dente FL, et al. Comparison between hypertonic and isotonic saline-induced sputum in the evaluation of airway inflammation in subjects with moderate asthma. *Clin Exp Allergy.* 1996;26:1395-400.
- (242) Cataldo D, Foidart JM, Lau L, Bartsch P, Djukanovic R, Louis R. Induced sputum: comparison between isotonic and hypertonic saline solution inhalation in patients with asthma. *Chest.* 2001;120:1815-21.
- (243) Popov T, Pizzichini M, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J.* 1995;8(4):559-65.
- (244) Gershmann NH, Liu H, Wong HH, Liu JT, Fahy JV. Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different time points. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:322-8.
- (245) Belda J, Hussack P, Dolovich M, Efthimiadis A, Hargreave FE. Sputum induction: effect of nebulizer output and inhalation time on cell counts and fluid-phase measures. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(11):1740-4.
- (246) Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridization. *Eur Respir J.* 2002;37 (suppl.):19s-23s.

- (247) Efthimiadis A, Hamid Q. Analysis of sputum cells: cytology, immunocytochemistry and in situ hybridization. In: Djukanovic R SP, editor. *An atlas of induced sputum. An aid for research and diagnosis.* New York: The Parthenon Publishing Group; 2004. p. 21-34.
- (248) GEMA 2003. Guía española para el manejo del asma. Barcelona: Ediciones Mayo S.A.; 2003.
- (249) Pizzichini E, Pizzichini M, Efthimiadis A, Hargreave F, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J.* 1996;9:1174-80.
- (250) Técnicas de contaje celular. 2009.  
Ref Type: Internet Communication.
- (251) Belda J, Brufal M, Casan P, Giner J, Granel C, Margarit G, et al. Procesado de las muestras de esputo inducido. In: Belda J, Casan P, Sanchis J, editors. *El esputo inducido en el asma. Procedimientos de laboratorio.* Barcelona: Preimpresión Directa, s.l.; 2001. p. 27-40.
- (252) Vizmanos Lamotte G, Moreno Galdó A, Cruz Carmona MJ, Muñoz Gall X, Gómez Olles S, De Mir Messa I, et al. Inducción de esputo en niños: desarrollo técnico. *An Pediatr (Barc).* 2010;72:199-204.
- (253) Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, Siverman M. Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax.* 2000;55:768-74.
- (254) Grootendorst DC, van den Bos J-W, Romeijn JJ, Veselic-Charvat M, Duiverman EJ, Vrijlandt EJLE, et al. Induced sputum in adolescents with severe stable asthma. *Eur Respir J.* 1999;13:647-53.
- (255) Palomino AL, Bussamra MH, Saraiva-Romanholo BM, Martins MA, Nunes Mdo P, Rodrigues JC. Induced sputum in children and adolescents with asthma: safety, clinical applicability and inflammatory cells aspects in stable patients and during exacerbation. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81:216-24.
- (256) Li AM, Tsang TW, Chan DF, Lam HS, So HK, Sung RY, et al. Sputum induction in children with asthma: a tertiary-center experience. *Pediatr Pulmonol.* 2006;41:720-5.
- (257) Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, Li AM, Wilson NM, Hansel TT, et al. Sputum induction in children with difficult asthma: safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol.* 2005;39:318-24.
- (258) Reining U, Mattes J, Storm-van's Gravesande K, Ihorst G, Kühn J. Reproducibility in induced sputum in children with asthma. *Pneumologie.* 2000;54:185-90.

- (259) Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O' Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:475-8.
- (260) Mattes J, Storm-van's Gravesande K, Reining U, Alving K, Ihorst G, Henschen M, et al. NO in exhaled air is correlated with markers of eosinophilic airway inflammation in corticosteroid-dependent childhood asthma. *Eur Respir J.* 1999;13:1391-5.
- (261) Oh JW, Lee HB, Kim CR, Yum MK, Koh YJ, Moon SJ, et al. Analysis of induced sputum to examine the effects of inhaled corticosteroid on airway inflammation in children with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999;82:491-6.
- (262) Ryttilä P, Pelkonen AS, Metso T, Nikander K, Haahtela T, Turpeinen M. Induced sputum in children with newly diagnosed mild asthma: the effect of 6 months of treatment with budesonide or disodium cromoglycate. *Allergy.* 2004;59:839-44.
- (263) Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T, Hagiwara K, Sakamoto Y, Kanazawa M, et al. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34:760-5.
- (264) Basyigit I, Yildiz F, Ozkara SK, Boyaci H, Ilgazli A. Inhaled corticosteroid effects both eosinophilic and non-eosinophilic inflammation in asthmatic patients. *Mediators Inflamm.* 2004;13:285-91.
- (265) Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K, et al. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J.* 1999;14:309-14.
- (266) Shirai T, Inui N, Suda T, Chida K. Correlation between peripheral blood T-cell profiles and airway inflammation in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:622-6.
- (267) Kim CK, Kita H, Callaway Z, Kim HB, Choi J, Fujisawa T, et al. The roles of a Th2 cytokine and CC chemokine in children with stable asthma: potential implication in eosinophil degranulation. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21:697-704.
- (268) Paro-Heitor ML, Bussamra MH, Saraiva-Romanholo BM, Martins MA, Okay TS, Rodrigues JC. Exhaled nitric oxide for monitoring childhood asthma inflammation compared to sputum analysis, serum interleukins and pulmonary function. *Pediatr Pulmonol.* 2008;43:134-41.
- (269) Gayoso OD, Jumbo PP, Aguilar JL, Loza C, Gotuzzo E, Celedonio JE, et al. Nivel sérico de citoquinas en pacientes asmáticos crónicos estables. *Revista de la Sociedad Peruana de Neumología.* 2004;48(2):117-22.

- (270) Dente FL, Carnevali S, Bartoli ML, Cianchetti S, Bacci E, Di Franco A, et al. Profiles of proinflammatory cytokines in sputum from different groups of severe asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006;97:312-20.
- (271) Neveu WA, Allard JL, Raymond DM, Bourassa LM, Burns SM, Bunn JY, et al. Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function. *Respiratory Research.* 2010;11:28.
- (272) Kulkarni N, Cooke MS, Grigg J. Neutrophils in induced sputum from healthy children: role of interleukin-8 and oxidative stress. *Respir Med.* 2007;101:2108-12.
- (273) Wenzel SE. Severe asthma in adults. *Exp Lung Res.* 2005;31(suppl 1):22.
- (274) Calderon C, Rivera L, Hutchinson P, Dagher H, Villanueva E, Ghildyal R, et al. T-cell cytokine profiles are altered in childhood asthma exacerbation. *Respirology.* 2009;14:264-9.
- (275) Sousa AR, Lane SJ, Nakhosteen JA, Lee TH, Poston RN. Expression of interleukin-1 beta (IL-1beta) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on asthmatic bronchial epithelium. *Am J Respir Crit care Med.* 1996;154:1061-6.
- (276) Burgler S, Ouaked N, Bassin C, Basinski TM, Mantel PY, Siegmund K, et al. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:588-95.
- (277) Baines KJ, Simpson JL, Scott RJ, Gibson PG. Immune responses of airway neutrophils are impaired in asthma. *Exp Lung Res.* 2009;35:554-69.
- (278) Manise M, Schleich F, Gusbin N, Godinas L, Henket M, Antoine N, et al. Cytokine production from sputum cells and blood leukocytes in asthmatics according to disease severity. *Allergy.* 2010;65:889-96.