




Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina

Identificación del fenotipo inflamatorio del asma mediante métodos no invasivos

Tesis Doctoral

Presentada por:

Astrid Crespo Lessmann

Director y Tutor:

Vicente Plaza Moral

Barcelona 2016



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Medicina

El Dr. Vicente Plaza Moral, Profesor titular del Departamento de Medicina de la Universidad Autònoma de Barcelona y Jefe del Servicio de Neumología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

CERTIFICA:

Que la Tesis doctoral titulada: **“Identificación del fenotipo inflamatorio del asma mediante métodos no invasivos”**, presentada por Astrid Crespo Lessmann para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección y tutela y considero que reúne los requisitos formales y científicos para poder proceder a su lectura y defensa pública.

Dr. Vicente Plaza Moral

Barcelona, 2016

Presentación

La siguiente tesis doctoral está estructurada siguiendo las normativas de la Universitat Autònoma de Barcelona para su presentación como compendio de publicaciones. Los artículos originales incluidos en la misma se detallan a continuación:

Artículos originales publicados:

- **Astrid Crespo**, Jordi Giner, Montserrat Torrejón, Alicia Belda, Eder Mateus, Carmen Granel, Alfons Torrego, David Ramos-Barbón and Vicente Plaza. **Clinical and Inflammatory Features of Asthma with Dissociation Between Fractional Exhaled Nitric Oxide and Eosinophils in Induced Sputum.** *J Asthma*. 2016 Jan 19:1-6. **Impact factor: 1.802. Q2 (Alergología, Inmunología y Neumología). Q1 (Medicina).**
- **Astrid Crespo**, Jordi Giner, Alfons Torrego, Carmen Granel, Montserrat Torrejón, Alicia Belda, Eder Mateus, Vicente Plaza. **Usefulness of the Exhaled Breath Temperature Plateau in Asthma Patients.** *Respiration*. 2015;90(2):111-7. **Impact factor: 2,593. Q3.**
- Vicente Plaza, **Astrid Crespo**, Jordi Giner, José Luis Merino, David Ramos-Barbón, Eder F. Mateus, Alfons Torrego, Borja G. Cosio, Alvar Agustí, and Oriol Sibila. **Inflammatory Asthma Phenotypes Discrimination by an Electronic Nose Breath Analyzer.** *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(6):431-7. **Impact factor: 2,642. Q2.**

“La medicina es una ciencia y un arte; arte porque debemos hacerle creer al paciente que lo que decimos es verdad y una ciencia porque nosotros debemos creer que lo que decimos es verdad”

Dr. Roberto Sánchez de León

“Nada hay más perjudicial para el médico que la convicción de su propia suficiencia. El que se cree en posesión de la verdad definitiva, descansa en el error tranquilo y seguro”

Gregorio Aráoz Alfaro

Índice

PRESENTACIÓN.....	3
ÍNDICE.....	5
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	9
AGRADECIMIENTOS.....	11
ABREVIATURAS.....	14
RESUMEN.....	17
1. JUSTIFICACIÓN.....	19
2. INTRODUCCIÓN.....	21
2.1. Métodos no invasivos para medir la inflamación bronquial.....	21
2.1.1. ESPUTO INDUCIDO.....	21
2.1.1.a. Método y procesado del esputo inducido.....	22
2.1.1.b. Valores de referencia.....	23
2.1.1.c. Interpretación celular específica del esputo inducido.....	24
2.1.1.d. Factores que modifican la interpretación del esputo inducido.....	25
2.1.1.e. Variabilidad de los fenotipos inflamatorios del esputo inducido.....	26
2.1.1.f. Utilidad del esputo inducido.....	26
2.1.2. FRACCIÓN EXHALADA DE ÓXIDO NÍTRICO.....	27
2.1.2.a. Método.....	27
2.1.2.b. Valores de normalidad y reproducibilidad.....	28
2.1.2.c. Interpretación.....	28
2.1.3. CONDENSADO DEL AIRE EXHALADO.....	29
2.1.4. TEMPERATURA DEL AIRE EXHALADO.....	30

2.1.4. a. Medición de la TAE.....	31
2.1.5. DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES MEDIANTE LA NARIZ ELECTRÓNICA.....	32
2.2. Fenotipos inflamatorios bronquiales del asma.....	33
2.3. Planteamiento de los proyectos de la tesis.....	33
3. HIPÓTESIS.....	35
4. OBJETIVOS.....	35
5. MÉTODOS Y RESULTADOS.....	36
5.1. Estudio I: Características clínicas e inflamatorias del asma con disociación entre la FeNO y la eosinofilia en el esputo inducido.....	36
5.1.1. Método del estudio I.....	36
5.1.1. a. Análisis estadístico.....	38
5.1.2. Resultados del estudio I.....	38
5.1.2.a. Características demográficas, clínicas y funcionales de la población.....	38
5.1.2.b. Disociación FeNO y eosinofilia en el esputo inducido (utilizando como valores de la FeNO >50ppb).....	39
5.1.2.c. Correlaciones.....	39
5.2. Estudio II: Utilidad de la temperatura del aire exhalado plateau en pacientes con asma.....	41
5.2.1. Método del estudio II.....	41
5.2.1. a. Análisis estadístico.....	42
5.2.2. Resultados del estudio II.....	42

5.2.2. a. Características demográficas, clínicas y funcionales de la población.....	42
5.2.2.b. Control del Asma.....	44
5.2.2.c. Gravedad del asma.....	44
5.2.2.d. Obstrucción bronquial.....	44
5.2.2.e. Inflamación bronquial.....	44
5.2.2.f. Variables confusoras.....	45
5.3. Estudio III: Discriminación de los fenotipos inflamatorios bronquiales de asma a través de la nariz electrónica.....	46
5.3.1. Método del estudio III.....	46
5.3.1.a. Mediciones.....	47
5.3.1.b. Análisis estadístico.....	48
5.3.2. Resultados del estudio III.....	49
5.3.2.a. Características demográficas, clínicas y funcionales de los pacientes.....	49
5.3.2.b. Análisis de la huellas olfativas.....	51
6. DISCUSIÓN.....	54
6.1. Estudio I: Características clínicas e inflamatorias del asma con disociación entre la FeNO y la eosinofilia en el esputo inducido.....	54
6.2. Estudio II: Utilidad de la temperatura del aire exhalado plateau en pacientes con asma.....	58
6.3. Estudio III: Discriminación de los fenotipos inflamatorios bronquiales de asma a través de la nariz electrónica.....	61
7. CONCLUSIONES.....	63

8. PUBLICACIONES.....	64
8.1. Estudio I: Clinical and Inflammatory Features of Asthma with Dissociation Between Fractional Exhaled Nitric Oxide and Eosinophils in Induced Sputum. <i>J Asthma</i>. 2016 Jan 19:1-6.....	64
8.2. Estudio II: Usefulness of the Exhaled Breath Temperature Plateau in Asthma Patients. <i>Respiration</i>. 2015; 90(2):111-7.....	65
8.3. Estudio III: Inflammatory Asthma Phenotypes Discrimination by an Electronic Nose Breath Analyzer. <i>J Investig Allergol Clin Immunol</i>. 2015; 25(6):431-7.....	66
9. BIBLIOGRAFÍA.....	74
10. ANEXOS.....	84
10.1. Otras publicaciones en relación con la temática de la tesis.....	84
10.2. Actividad científica generada en relación con la temática de la tesis.....	85
10.3. Becas concedidas en relación con la temática de la tesis.....	88

Índice de tablas y figuras

Índice de tablas

Tabla 1. Características demográficas, clínicas y funcionales según la disociación entre la FeNO y la eosinofilia en el esputo inducido (<i>estudio I</i>).....	40
Tabla 2. Características demográficas, clínicas y funcionales de los 69 asmáticos (<i>estudio II</i>).....	43
Tabla 3. Características demográficas, clínicas y funcionales de los participantes (<i>estudio III</i>).....	50
Tabla 4. Características del recuento de células inflamatorias del esputo inducido observadas en los tres grupos analizados (<i>estudio III</i>).....	51
Tabla 5. Análisis ROC entre las comparaciones de las huellas olfativas entre los tres fenotipos inflamatorios bronquiales de asma (<i>estudio III</i>).....	53
Tabla 6. Estudios que correlacionan la eosinofilia con la FeNO en pacientes con asma.....	56

Índice de figuras

Figura 1. X-Halo Breath Thermometer (<i>estudio II</i>).....	42
Figura 2. Correlación entre la TAE plateau y el porcentaje de eosinófilos en el esputo inducido de los pacientes asmáticos (<i>estudio II</i>).....	45
Figura 3. Comparación de los valores de la TAE plateau entre los diferentes subgrupos estudiados (<i>estudio II</i>).....	46
Figura 4. Nariz electrónica (Cyranose 320TM; Smith Detecciones, Pasadena, CA) (<i>estudio III</i>).....	48

Figura 5. Comparación de las huellas olfativas entre los diferentes fenotipos inflamatorios de asma según el recuento leucocitario diferencial del esputo inducido (*estudio III*).....52

Agradecimientos

- Debo de empezar esta Tesis Doctoral agradeciendo a las personas más importantes en mi formación, a mis padres, que con su dedicación, su siempre apoyo, su amor, me han dado cada segundo lo mejor de sus vidas. Para ti especialmente mamá quien con tu ejemplo educador, científico y de constancia fuiste un modelo a seguir.
- A mi hermana Lucibel, quien desde pequeña me guio y orientó en cada uno de mis pasos.
- A mi familia Crespo-Lessmann quien aun estando lejos, siempre han estado conmigo presentes.
- Al Dr. Roberto Sánchez de León quien fue la persona que desde segundo año de la carrera de medicina me estimuló a “querer” la investigación en el campo del aparato respiratorio. Así mismo durante muchos años me guio, confió en mí, me permitió “ver” el mundo de la investigación más allá de las fronteras.
- Gracias Liuska Pesce, Alejandro Comellas, Eliot Friedman, Héctor Marcano, Eva Novoa, María Alejandra Tortoledo, Alejandro Pezzulo, por ser “pupilos” de mi querido Roberto y por permitirme formar parte de este “hilo” que nos unirá siempre.
- Gracias a Iasha Sznajder, a Zaher Azzam y a todos los del equipo del laboratorio del Departamento de Medicina de la Northwestern University. Tarry Building. Chicago. Illinois, por acogerme en el año 1999, por mostrarme otra “cara de la investigación” y por estar allí siempre que los he necesitado.
- Gracias a mi querida Universidad Central de Venezuela, la “casa que vence las sombras”, a la Escuela de Medicina “Luis Razetti”, al Instituto de Medicina Experimental y al Laboratorio de Fisiología Respiratoria, quienes durante más de 6 años me acogieron y apoyaron en el campo de la investigación experimental.
- A mis amigos de la Facultad de Medicina y en especial a mi “hermana del alma” Ivette, quien siempre me ha apoyado y ha estado presente cuando más lo he necesitado.

- A mi querida Venezuela que durante veinticinco años me lo dio todo.
- A mis queridas España, Catalunya y Barcelona, quienes desde el 17 de Enero del 2003 supieron acogerme y me dieron la oportunidad de crecer y continuar mis sueños, dejándolo todo atrás...
- Al Servei de Pneumologia del Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, especialmente a Xavier Muñoz, Ferrán Morell y María Jesús Cruz, quienes me abrieron las puertas como investigadora en Neumología desde el primer momento que pisé Barcelona. Gracias por confiar en mí. Xavi, esta tesis va especialmente dirigida para ti. Gracias por apoyarme y orientarme siempre.
- A mi querido esposo, el más grande de todos, la persona más trabajadora, luchadora, noble, justa y sincera que conozco. Gracias amor mío, por ver “más allá de lo que otros pueden ver”, gracias por tu amor, por tu apoyo, por confiar en mí y entregarlo todo cada día.
- Gracias a mi querido Daniel, quien a pesar del poco tiempo que pasa conmigo, y de lo importante que es tener a su mami junto a él, me ha permitido y apoyado en “trabajar en el ordenador” y culminar este proyecto que comenzó muchos años atrás.
- Gracias al Servicio de Neumología y al Hospital de la Santa Creu i Sant Pau por formarme como neumóloga, por abrirme las puertas y hacerme sentir como en casa.
- Gracias Jordi, Montse, Eder, Alicia, Carmen, Lorena, David, Alfons, Oriol, sin su ayuda este proyecto no hubiese podido llevarse a cabo. Muchas gracias de corazón a todos.
- Gracias al equipo del Hospital de día de Neumología, Ingrid, Marina, Garbi, gracias por apoyarme durante muchas tardes en “sacar algún tiempo” para poder escribir esta tesis.
- Gracias por el apoyo científico y económico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica, de la Fundació Catalana de Pneumologia, del Plan Social y de investigación de la Muy Ilustre administración (MIA) de la Fundación Privada del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

- Gracias a Vicente, quien desde segundo año de Neumología confió en mí, quien día tras día me ha enseñado a ser mejor persona, no sólo desde el campo científico sino también en el campo profesional-personal, gracias por tu trabajo, por tu dedicación, por tus orientaciones, por tu cercanía, por tus esfuerzos, simplemente gracias.
- Por último quería agradecer a todos los que siempre han creído en mi vocación de investigadora, gracias a los que con su ejemplo han sabido estimularme, gracias a los que me han dado respuestas a mis preguntas y finalmente gracias a mis queridos pacientes, que sin ellos, esto no tendría sentido.

Abreviaturas

ACT: Asthma Control Test

ANOVA: Análisis de la Varianza

ATS: American Thoracic Society

AUC: Área Bajo la Curva

CA: California

CAE: Condensado del Aire Exhalado

CANO: Óxido Nítrico de Componente Alveolar

°C: Grados Centígrados

COV: Compuestos Orgánicos Volátiles

DE: Desviación Estándar

DTT: Ditiotreitól

DVR: Dentro de los valores de referencia

E.E.U.U: Estados Unidos

EI: Espujo Inducido

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERS: European Respiratory Society

FeNO: Fracción Exhalada de Óxido Nítrico

FEV₁: Forced Expiratory Volume in 1 s

FUCAP: Fundació Catalana de Pneumologia

FVC: Forced Vital Capacity

GEMA: Guía Española para el Manejo del Asma

GINA: Global Initiative for Asthma

h: Hora

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

ICS: Glucocorticoides Inhalados

ICS/LABA: Glucocorticoides Inhalados/B2 Adrenérgicos de Acción Larga

IgE: Inmunoglobulina E

IL: Interleuquinas

Ill: Illinois

IMC: Índice de Masa Corporal

iTAE: TAE Incremental

Kg/m²: Kilogramo / Metro Cuadrado

MATLAB: MATrix LABoratory

mL/s: Mililitros / Segundos

ml: Mililitro

µm: Micrometro

mm: Milímetro

MO: Missouri

N: Número

NO: Óxido Nítrico

NS: No Significativo

p: Diferencia Significativa

paq/años: Paquetes /Años

PCA: Análisis de Componentes Principales

pH: Grado de Acidez

Ppb: Partes por Billón

REEI: Recuento de Eosinófilos del Esputo Inducido

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROC: Característica Operativa del Receptor

SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica

SOCAP: Societat Catalana de Pneumologia

SPSS: Statistical Product and Service Solutions

TAE: Temperatura del Aire Exhalado

TSLP: Epithelial Cytokines thymic Stromal Lymphopoietin

UI/mL: Unidades Internacionales / Mililitros

Vs: versus

χ^2 : Chi cuadrado

RESUMEN

La tesis doctoral que presento es el resultado del trabajo realizado en el Servicio de Neumología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona y del Institut de Recerca Biomèdica de Sant Pau (IIB Sant Pau), siguiendo las normativas de la Universitat Autònoma de Barcelona para su presentación como compendio de publicaciones.

El estudio de la inflamación bronquial en el asma, se ha convertido en una herramienta valiosa para el diagnóstico, control y predicción de respuestas terapéuticas. En los últimos años ha aumentado el interés en los métodos que permitan evaluar de una forma no invasiva la inflamación de la vía aérea. Entre los métodos no invasivos descritos usados en la práctica clínica para evaluar la inflamación de la vía aérea figuran: el recuento de células inflamatorias en el esputo inducido y la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO). La temperatura del aire exhalado y la nariz electrónica se plantean como nuevas herramientas de medición de la inflamación bronquial y del control del asma.

La línea de investigación desarrollada tuvo como objetivo fundamental mejorar los conocimientos sobre los fenotipos inflamatorios del asma a través de métodos no invasivos. Está basada en tres proyectos. **El primero**, es un *proyecto clínico* cuyos resultados muestran que existen un alto porcentaje de pacientes con disociación entre los resultados de la FeNO y de los eosinófilos en el esputo inducido y que cursan con características clínicas e inflamatorias diferenciales. **Los otros dos** proyectos permiten conocer la utilidad en el asma de dos nuevos métodos no invasivos como lo son, la temperatura del aire exhalado (TAE) y el reconocimiento de patrones de compuestos orgánicos volátiles mediante la “nariz electrónica”. Estos trabajos aportaron como resultados principales que en el caso de la TAE, no parece que éste sea un método que proporcione una información clínica útil puesto que no se encontró ninguna correlación entre este método y el grado de control del asma, la gravedad de la enfermedad, la obstrucción bronquial, o la inflamación bronquial. Por otro lado, los resultados del tercer estudio sí que fueron alentadores, puesto que de manera significativa, el uso de la nariz electrónica en un entorno clínico habitual permitió discriminar con fiabilidad los diferentes fenotipos inflamatorios bronquiales en

pacientes con asma. Así pues, los resultados de esta tesis sirven como fundamento del estudio y aplicabilidad de diversos métodos no invasivos en el asma.

SUMMARY

This doctoral thesis is the result of the work done in the Service of Respiratory Medicine of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona and the Institute of Biomedical Research of Sant Pau (IIB Sant Pau), following the regulations of the Universitat Autònoma de Barcelona.

The study of bronchial inflammation in asthma has become a valuable tool for its diagnosis, monitoring and prediction of therapeutic responses. In recent years, there has been an increased interest in methods of noninvasive evaluation of the airway inflammation. The described non-invasive methods used in the clinical practice to assess airway inflammation include the inflammatory cell counts in induced sputum and the fractional exhaled nitric oxide (FeNO). The exhaled breath temperature and the electronic nose device are considered to be new tools for measuring airway inflammation and control of asthma.

The line of the developed research had as a main goal to improve the knowledge of inflammatory phenotypes of asthma through non-invasive methods. It is based on three projects. The first (1) is a clinical project that shows a high percentage of patients with dissociation between the results of the FeNO and eosinophils in induced sputum, presenting clinical and inflammatory differential characteristics. The other two projects provide an insight into the utility of two non-invasive diagnostic methods: 2) the exhaled breath temperature (EBT) and 3) the recognition of the patterns formed by organic volatile compounds using the electronic nose device. The second study does not support the usefulness of the EBT plateau, because no correlation was found between EBT and control of asthma, severity of disease, bronchial obstruction or bronchial inflammation. Furthermore, the results of the third study were encouraging since the using of an e-nose device in a regular clinical setting can reliably discriminate different inflammatory asthma phenotypes among patients with persistent asthma. Thus, the results of this thesis disclosed the applicability of various non-invasive methods performed in routine clinical practice.

1. Justificación

La tesis doctoral que presento es el resultado del trabajo realizado en el Servicio de Neumología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y del Institut de Recerca Biomèdica de Sant Pau (IIB Sant Pau), en el programa de doctorado del Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona y bajo la dirección del profesor Vicente Plaza Moral.

El estudio de la inflamación bronquial en el asma, se ha convertido en una herramienta valiosa para el diagnóstico, control y predicción de respuestas terapéuticas. En los últimos años ha aumentado el interés en los métodos que permitan evaluar de una forma no invasiva la inflamación de la vía aérea así como el control del asma. Muchos de estos métodos han sido evaluados en la práctica clínica diaria y han aportado un mejor manejo en el uso de tratamientos para el asma.

Cerca de un 10% de los asmáticos sufre una enfermedad grave o refractaria a los tratamientos disponibles, el desarrollo de nuevos métodos de medición de la inflamación aportaría herramientas que permitiría a estos pacientes proponer una terapia específica e individualizada.

Entre los métodos no invasivos descritos para evaluar la inflamación de la vía aérea, figuran: el recuento de células inflamatorias en el esputo inducido, la fracción exhalada de óxido nítrico, el condensado del aire exhalado, la temperatura del aire exhalado y más recientemente, la determinación de patrones de compuestos orgánicos volátiles mediante la nariz electrónica, siendo estos tres últimos actualmente utilizados sólo a nivel experimental. La temperatura del aire exhalado y la nariz electrónica se plantean como nuevas herramientas de medición de la inflamación bronquial y del control del asma.

La línea de investigación desarrollada tuvo como objetivo fundamental mejorar los conocimientos sobre los fenotipos inflamatorios de asma, mediante diferentes métodos no invasivos (el recuento de células inflamatorias del esputo inducido, la temperatura del aire exhalado y la detección de compuestos orgánicos volátiles mediante la nariz electrónica). Esta línea de investigación se basó en tres proyectos de

investigación publicados como artículos originales. **El primero**, es un *proyecto clínico* cuyos resultados muestran que existen un alto porcentaje de pacientes con disociación entre los resultados de la FeNO y de los eosinófilos en el esputo inducido y que cursan con características clínicas e inflamatorias diferenciales. **Los otros dos** proyectos permiten conocer la utilidad en el asma de dos métodos no invasivos innovadores como son, la temperatura del aire exhalado y el reconocimiento de compuestos orgánicos volátiles mediante la “nariz electrónica”.

A través de estos tres proyectos, analizamos diferentes fenotipos inflamatorios de asma con cuatro de los cinco métodos no invasivos utilizados en la actualidad, como son: el esputo inducido, la fracción exhalada de óxido nítrico, la temperatura del aire exhalado y la nariz electrónica.

2. Introducción

La determinación de la inflamación bronquial en el asma constituye una herramienta complementaria útil en el diagnóstico, seguimiento clínico y terapéutico de la enfermedad. Su uso está recomendado, por las principales guías de práctica clínica en asma, nacionales e internacionales ⁽¹⁻³⁾, específicamente en los pacientes con asma grave no controlada.

En los últimos años ha aumentado el interés en el descubrimiento de nuevos métodos que permitan evaluar de una forma no invasiva la inflamación de la vía aérea. Algunos han sido evaluados en la práctica clínica diaria y han aportado un mejor manejo en el uso de tratamientos para el asma ⁽⁴⁻⁵⁾.

Dentro de los métodos no invasivos que disponemos para evaluar la inflamación de la vía aérea tenemos: el esputo inducido, la fracción exhalada de óxido nítrico, el condensado del aire exhalado, la temperatura del aire exhalado y más recientemente la nariz electrónica.

2.1. Métodos no invasivos para medir la inflamación bronquial

2.1.1. ESPUTO INDUCIDO

En la actualidad el recuento de células inflamatorias en el esputo inducido (EI), sigue siendo la exploración no invasiva más eficaz para valorar la inflamación bronquial y la herramienta más valiosa para predecir respuestas terapéuticas. El EI tiene diversas aplicaciones; permite en el campo de la investigación, determinar marcadores de inflamación, marcadores biológicos y desde un punto de vista práctico permite identificar agentes infecciosos, orientar el diagnóstico de asma ocupacional, ayudar al diagnóstico del síndrome de solapamiento asma-EPOC y se ha revelado como una técnica que permite clasificar el asma grave no controlada en función de su celularidad, en diversos fenotipos inflamatorios (eosinofílico, neutrofílico, paucigranulocítico o mixto) siendo esto de gran interés para predecir el comportamiento de la enfermedad y valorar diversas respuestas terapéuticas.

2.1.1.a. Método y procesado del esputo inducido

El método y el procesado del esputo inducido fue revisado por la *European Respiratory Society* en el año 2002 ⁽⁶⁾. Dentro de las *contraindicaciones* relativas está tener una baja función pulmonar (FEV1<1L), así mismo se recomienda que todos los pacientes tienen que ser pre-tratados con un agonista B2 adrenérgico de acción corta por el posible riesgo de inducir una broncoconstricción.

Los protocolos de inducción del esputo inducido difieren según el tipo de nebulizador ultrasónico utilizado y según el tipo de procesado de la muestra. Usualmente se emplea para la inducción del EI suero salino hipertónico (a dosis incrementales) y suele ser procesado con la ayuda del ditiotreitól (agente reductor, que disocia los puentes de disulfuro en las proteínas de las mucinas). No hay evidencias que indiquen importantes diferencias en el recuento celular diferencial según los diversos métodos utilizados ⁽⁶⁻⁷⁾.

Cuando se procesa el EI se obtienen dos partes analizables: el sobrenadante y el sedimento celular. El *sobrenadante* puede ser utilizado como muestra biológica para investigar marcadores solubles de inflamación (interleuquinas, triptasa, mieloperoxidasas, proteína catiónica eosinofílica, marcadores por: inmunohistoquímica, hibridación *in situ* o citometría de flujo) y el *sedimento celular* es el que actualmente se ha consolidado como aplicación clínica y es el que permite clasificar al asma en fenotipos inflamatorios según la celular obtenida. Del sedimento celular se pueden realizar tres mediciones: el recuento celular total, el recuento diferencial celular y la viabilidad celular.

Del *recuento celular total* se obtiene la concentración celular total por gramo de esputo procesado, el porcentaje de células epiteliales (que determinan la contaminación de la muestra) y la viabilidad celular (que expresa el porcentaje de células vivas por muestra analizada) estos deben de ser reportados para poder así interpretar de una forma correcta los resultados ⁽⁷⁾. El *recuento diferencial* es el que permite cuantificar la proporción de eosinófilos, neutrófilos, basófilos, macrófagos, linfocitos y células epiteliales bronquiales que se utilizarán para la interpretación del EI.

2.1.1.b. Valores de referencia

Estudios realizados en voluntarios sanos han establecido los valores de referencia para el recuento celular total y diferencial del EI ⁽⁸⁻¹⁰⁾. Estos valores de referencia se establecieron en los años noventa (del pasado siglo) tras la detección de diferencias en el recuento celular de personas sanas y asmáticas ⁽¹¹⁾, valorando en otro estudio su reproducibilidad y validez ⁽⁵⁾. Posteriormente aumentó el número de trabajos que utilizaban el EI para el estudio de diferentes aspectos de la inflamación de la vía aérea, enfocados inicialmente en el asma y extendiéndose posteriormente a la EPOC. Ello incrementó las diferencias en las observaciones entre los diversos grupos de trabajo y promovió la necesidad de validar y estandarizar el método de obtención y procesado del EI por un consenso de expertos. El primer intento de validación fue en un “workshop” que tuvo lugar en Estocolmo, Suecia en 1996, que posteriormente se fue consolidando a través de diferentes reuniones realizadas en la “European Respiratory Society” (ERS) llevadas a cabo en Berlín, Alemania (1997), en Ginebra, Suiza (1998) hasta que se decidió realizar un “Task Force” dirigido por la ERS en Septiembre de 1999 con diferentes reuniones en la “American Thoracic Society” en Toronto, Canadá; en la ERS de Madrid, España y finalmente en Florencia, Italia en el año 2000 en donde se presentó el documento final realizado por los diferentes grupos de trabajo ⁽⁶⁾. Este documento final fue publicado en un suplemento especial del “European Respiratory Journal” en el año 2002 y constituye las recomendaciones formales del esputo inducido a nivel europeo. Este suplemento se compone de diversos informes de los grupos de trabajo que incluyen: la obtención de la muestra y su seguridad ⁽¹²⁾, el método del procesado del recuento celular e inmunohistoquímica ⁽¹³⁾, el análisis de los mediadores de las fracciones líquida y celular del EI ⁽¹⁴⁾, las aplicaciones clínicas del EI ⁽¹⁵⁾, el empleo del EI en el ámbito pediátrico ⁽¹⁶⁾, el uso del EI en los ensayos clínicos multicéntricos ⁽¹⁷⁾, y las futuras direcciones del EI ⁽¹⁸⁾.

Estas recomendaciones proponen algunos valores de referencia, interpretación y manejo del esputo inducido, particularmente en asmáticos, diferentes a los que previamente se habían venido utilizando. Estos puntos de corte propuestos para la celularidad del esputo, modifican la sensibilidad y la especificidad de la muestra obtenida a la hora de interpretar los resultados. Por dicha razón, no resulta extraño

constatar que diversos trabajos empleen diferentes valores de referencia, en particular en lo que se refiere al recuento de los eosinófilos. Dicho esto, se considera que los valores de referencia del porcentaje de estas células en el EI deben ser inferiores al 1% ⁽²⁾, otras publicaciones establecen eosinofilia en el esputo cuando son superiores al 3% ^(8-11,15,19-22). Muchas de estas diferencias se deben a diversos estudios que compararon algoritmos para ajustar el tratamiento del asma según el número de eosinófilos del esputo. En la práctica clínica habitual los estudios descriptivos señalan que cuando el recuento de eosinófilos es igual o superior al 2% se debe aumentar la dosis de glucocorticoides y si este valor está entre el 1 y el 2%, no se debería modificar ⁽¹⁷⁾. En el caso de los neutrófilos, se considera neutrofilia en el EI cuando el recuento de dichas células es superior al 61-64,4% ⁽⁸⁻¹²⁾.

2.1.1.c. Interpretación celular específica del esputo inducido

- Eosinófilos. La presencia de eosinófilos elevados puede indicar la necesidad de incrementar el tratamiento glucocorticoideo en pacientes con asma, puede ayudar en el diagnóstico de bronquitis eosinofílica, puede indicar la exposición a aeroalérgenos o exacerbaciones asmáticas.
- Neutrófilos. Una elevación de los neutrófilos en el esputo inducido puede estar presente en el asma neutrofílica, infección respiratoria, tabaquismo, exposición laboral a proteínas de bajo peso molecular, fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática. La combinación de neutrofilia más eosinofilia persistente puede sugerir un fenotipo mixto de asma y una sensibilización alérgica a hongos, debiéndose descartar en este último caso una aspergilosis broncopulmonar alérgica.
- Macrófagos. Su presencia es indicativa de muestra del tracto respiratorio inferior. El valor del recuento simple de estas células actualmente no tiene un uso clínico establecido. Sin embargo en el estudio de la enfermedad intersticial y de la tuberculosis, el estudio de su inmunofenotipo a través de la citometría de flujo puede ser de utilidad.
- Linfocitos. Su recuento por encima de los valores de referencia obliga a descartar sarcoidosis y otras granulomatosis, enfermedad de Crohn, infección por

Chlamydia pneumoniae o Síndrome de Sjogren primario. Valores de linfocitos elevados, con un moderado incremento del recuento celular total y de neutrófilos, es muy sugestivo de infección vírica.

- Lipófagos. Cuando son superiores al 15% permiten sospechar microaspiraciones o reflujo gastroesofágico asociado.
- Hemosiderófagos. Un 30% de dichas células se asocia a insuficiencia cardíaca izquierda.
- Contenido antracótico. Su presencia sugiere exposición al tabaco o a contaminación por humo ⁽²³⁾.

2.1.1.d. Factores que modifican la interpretación del esputo inducido

Existen diversos factores que pueden modificar la interpretación de la muestra, tales como la concentración celular, la viabilidad celular, el grado de contaminación de la muestra obtenida, la edad, las infecciones, el tabaquismo, el tratamiento con antibióticos en el momento de la recogida de la muestra, el uso de antiácidos o de inhibidores de la bomba de protones, el uso de tiotropio, el tipo de nebulizador utilizado para su inducción, el tiempo que transcurre entre la obtención de la muestra y su procesado, la forma como éste se realiza, el personal que interviene en todo el proceso, la variabilidad interobservador, entre otras.

Muchos profesionales e incluso investigadores desconocen que la calidad de la muestra en el esputo inducido es uno de los puntos que se debe de tomar también en cuenta a la hora de interpretar los resultados clínicos. Cada laboratorio debería establecer su propio programa de control de calidad, como parte integral de los protocolos del procedimiento de obtención y procesado de la muestra del esputo. Siguiendo dicha recomendación, en nuestra Unidad hemos establecido tres niveles de calidad en base a la evidencia científica y a nuestra experiencia en el procesado de esputos inducidos (más de 20 años). Concretamente, establecemos calidad:

- **Alta:** si existe una viabilidad superior al 40% y un porcentaje de células epiteliales inferior al 20%.

- **Media:** si existe una viabilidad inferior al 40% **o** un porcentaje de células epiteliales superior al 20%.
- **Baja:** si existe una viabilidad inferior al 40% **y** un porcentaje de células epiteliales superior al 20% **o** un recuento celular inferior a 1.000.000 cel./g.

Concordando con algunas publicaciones, en cuanto se refiere al procesado del esputo inducido ^(8,24), nuestra Unidad considera que para obtener una buena calidad de la muestra, el factor más importante es que el número mínimo de células a procesar sea de 1.000.000 cel./g de esputo procesado, de allí a que sólo la disminución por debajo de ese valor, nos indique una baja calidad de la muestra.

2.1.1.e. Variabilidad de los fenotipos inflamatorios del esputo inducido

Estudios realizados recientemente han observado una variabilidad del fenotipo inflamatorio del esputo inducido a lo largo del tiempo. Se ha observado que dicha variabilidad puede aparecer a lo largo del día ⁽²⁵⁾, por efecto del tratamiento con glucocorticoides inhalados (ICS) ^(16,26), o a lo largo del curso evolutivo de la enfermedad, tanto en adultos ⁽²⁷⁾ como en niños ⁽²⁸⁾. En todo caso, esta variabilidad en la expresión del fenotipo inflamatorio debe cotejarse con la situación clínica de cada paciente, en el momento de obtenerse la muestra, porque factores como las infecciones intercurrentes pueden por ejemplo influir en dichos cambios (Ver anexo 10.1.1.).

2.1.1.f. Utilidad del esputo inducido

Las principales guías de práctica clínica en asma, nacionales e internacionales ⁽¹⁻³⁾, recomiendan el uso del EI específicamente en los pacientes con asma grave no controlada.

Dentro de los supuestos prácticos en los que EI puede ser útil en la práctica clínica habitual tenemos: en el diagnóstico diferencial del asma, mala evolución del asma a pesar del tratamiento glucocorticoideo, prevención de exacerbaciones eosinofílicas asmáticas, asma ocupacional, manejo de la tos crónica, sospecha de microaspiraciones, asma con disociación clínica-FeNO, en el asma grave mal controlada, entre otros (Ver anexo 10.1.2.).

2.1.2. FRACCIÓN EXHALADA DE ÓXIDO NÍTRICO

La relación exacta entre la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO) y la fisiopatología del asma sigue siendo aún un tema desconocido ⁽²⁹⁾. La utilidad de la medición de la FeNO se desprende de su capacidad para reflejar inflamación bronquial, específicamente la eosinofílica. La relación con la eosinofilia ayuda al seguimiento de algunos tipos de asma, pero representa un problema en el caso de tipos de asma grave en donde la inflamación neutrofílica puede jugar un papel importante. El uso de la FeNO como posible marcador de eosinofilia se basa en diversos trabajos que correlacionan las mediciones de la FeNO con eosinofilia en la vía aérea ⁽³⁰⁻³²⁾. Algunos estudios han valorado que existe una sensibilidad del 71% y una especificidad del 72% para identificar un recuento de eosinófilos >3% a través de la FeNO ⁽³³⁾.

2.1.2.a. Método

Actualmente la determinación de la FeNO está estandarizada según las recomendaciones que la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS) consensuadas en el año 2005 ⁽³⁴⁾, y por las recomendaciones del Manual de Procedimientos SEPAR nº 11 ⁽³⁵⁾ publicado en el año 2007. La medición de la FeNO se suele realizar a través de dos sensores: de quimioluminiscencia o electroquímico, este último es el más utilizado puesto que es más barato, más manejable y más sencillo de calibrar y utilizar. El procedimiento más habitualmente utilizado es el de la respiración única en el que tras el sujeto inhalar el NO hasta la capacidad pulmonar total espira a un flujo de 50mL/s durante unos 6s aproximadamente. El registro de los valores se realiza a través de una gráfica en la que el trazador desestima el pico inicial de espiración y mide la *plateau* (meseta ≥ 3 s y gradiente de variabilidad $\leq 10\%$). Se realizan 3 mediciones y posteriormente se promedian según las recomendaciones internacionales ⁽³⁴⁻³⁵⁾. Normalmente los equipos tienen una precisión del $\pm 1\%$ y un margen de lectura entre 0 y 500 ppb. El análisis de los resultados se hace automático y la concentración de la FeNO se expresa en partes por billón (ppb).

Para diferenciar anatómicamente en qué lugar reside la inflamación eosinofílica diversos autores han descrito un modelo matemático que permite diferenciar la contribución de las vías aéreas distales en la producción de NO, en un modelo que se denomina “bicompartimental” ⁽³⁶⁾. Este modelo permite conocer el cálculo del

componente alveolar (CANO, ppb) y separarlo del componente bronquial, pero para ello se requiere la determinación de la FeNO a diferentes flujos espiratorios. Se especula que los niveles de CANO elevados en pacientes tratados con glucocorticoides inhalados podrían reflejar la incapacidad de estos para llegar a las zonas más distales de las vías aéreas.

2.1.2.b. Valores de normalidad y reproducibilidad

Los valores de referencia de la FeNO pueden variar si se toma en cuenta el sexo, el hábito tabáquico, la atopia o el dispositivo de medición. Los rangos de normalidad estimados para adultos sanos suelen ser <35ppb, este se reduce a <25ppb o <20ppb si se toman en cuenta los factores de variabilidad y se eliminan los valores extremos atípicos. Existe mucha discordancia sobre qué valores límites se deben de escoger para el diagnóstico de asma. La GEMA ⁽¹⁾ y la ATS sugieren >50 ppb en adultos y >35ppb en niños para presumir una inflamación eosinofílica y de respuesta a glucocorticoides ⁽³⁷⁾. Bajos valores de la FeNO (<25ppb en adultos y <20ppb en niños) pueden ser particularmente útiles para reducir la dosis de glucocorticoides o alternativas para discriminar síntomas de inflamación de la vía aérea en la inflamación eosinofílica.

2.1.2.c. Interpretación

Existen diversas variables que pueden modificar los valores de la FeNO. Por ejemplo, puede estar elevada en pacientes con asma atópica tras una respuesta tardía a alérgenos ⁽³⁸⁾ y suele estar reducida en pacientes que responden a glucocorticoides. Es controvertido la dosis necesaria de glucocorticoides que se requiere para reducir la FeNO, así como el tiempo necesario para medir este efecto (que puede variar entre 3 días y 8 semanas) ⁽³⁹⁻⁴⁰⁾. Entre otras variables que pueden modificar los valores de la FeNO tenemos: la técnica de medición, el flujo espiratorio utilizado, el dispositivo utilizado, el tabaco (puede generar valores bajos de FeNO) ⁽⁴¹⁾, la edad ⁽⁴²⁾, el sexo ⁽⁴³⁻⁴⁴⁾, el ciclo menstrual, la altura, las infecciones respiratorias, el índice de masa corporal, las bronquiectasias, la EPOC, la alveolitis fibrosante, la sarcoidosis, la tuberculosis, el síndrome de Sjogren, la insuficiencia renal crónica, la cirrosis hepática, entre otras.

La ATS establece una serie de recomendaciones sobre la utilidad clínica de la medición de la FeNO ⁽⁴⁵⁾. Entre ellas tenemos: diagnóstico de la inflamación eosinofílica

de las vías respiratorias, para valorar respuesta a los glucocorticoides en pacientes con síntomas respiratorios y enfermedades crónicas, para apoyar el diagnóstico de asma en situaciones en las que se necesita una evidencia objetiva, como método de monitorización de inflamación en pacientes con asma. Valores altos persistentes pueden estar relacionados con una exposición persistente a alérgenos.

2.1.3. CONDENSADO DEL AIRE EXHALADO

El condensado de aire exhalado (CAE), es un método no invasivo que nos permite recoger moléculas volátiles procedentes de las vías respiratorias. Este es el resultado de la condensación del vapor de agua que se produce por la inhalación a través de un sistema de enfriamiento o congelación. Este condensado contiene una mezcla de compuestos volátiles y no volátiles, que provienen del fluido del revestimiento epitelial de las vías respiratorias. La mayoría de los equipos funcionan haciendo pasar a través de una cámara refrigerada el aire exhalado, esta cámara está conectada a un vial que recoge el aire condensado y tarda respirando a volumen corriente unos 10-15 minutos en recolectar una muestra de 1 a 3 ml. El tiempo requerido para su obtención y procesado, además de la falta de estandarización, lo hacen que sea un método utilizado principalmente en la investigación ⁽⁴⁶⁾.

Los aspectos metodológicos para la obtención del CAE han sido revisados por la ERS ⁽⁴⁶⁾. Entre los factores que pueden influir en la recogida del CAE están: la edad, el sexo, la contaminación con saliva, el patrón ventilatorio, el tabaco, el aire ambiente que el paciente respira en el momento de su recogida, y el consumo de alimentos previos a la obtención de la muestra. Los métodos de colección de la CAE variarán según el tipo de condensador, así mismo las propiedades físicas de cada condensador pueden influir en el condensado recolectado e inducir a variaciones en las partículas recogidas. Dentro de los marcadores de inflamación que se pueden medir con el CAE tenemos: el pH, marcadores de estrés oxidativo (el 8-isoprostano, el H₂O₂, aldehidos) NO, prostaglandinas y leucotrienos. El análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es el método más utilizado para medir los distintos biomarcadores del CAE. Sin embargo, puede existir variabilidad según el kit empleado. Entre otras técnicas de medición, más caras y que consumen más tiempo tenemos: la citometría de flujo, la cromatografía en fase líquida o gaseosa y más recientemente la detección de “huellas

digitales metabólicas” mediante resonancia magnética nuclear (RMN) o espectrofotometría de masa ⁽⁴⁷⁾.

En la actualidad el uso del CAE está limitado al ámbito de la investigación clínica o epidemiológica. Se emplea fundamentalmente para la evolución de biomarcadores representativos del proceso inflamatorio o del estrés oxidativo de las vías aéreas respiratorias. Dentro de las enfermedades más comunes en las que puede ser útil la medición del CAE están: el asma, la EPOC, la fibrosis quística, las bronquiectasias, el reflujo gastroesofágico, la tos crónica, la fibrosis pulmonar idiopática, la rinitis alérgica y la hipertensión pulmonar. Actualmente la utilidad del CAE en el asma, se limita al diagnóstico de asma relacionada con el trabajo (que incluye el asma ocupacional y el asma exacerbada por el trabajo), y como posible marcador de respuesta al tratamiento de agudizaciones asmáticas. De momento se desconoce el efecto que pudiese tener las enfermedades bucodentales (periodontitis, gingivitis, candidiasis) u orofaríngeas (SAHS, roncopatías) sobre los constituyentes del CAE.

2.1.4. TEMPERATURA DEL AIRE EXHALADO

La temperatura del aire exhalado (TAE) se plantea como otro nuevo método no invasivo de la inflamación bronquial del asma ⁽⁴⁸⁾. Su fundamento se basa en que la inflamación de la mucosa bronquial en los pacientes asmáticos ocasiona una vascularización de la misma, que a su vez provoca un aumento del flujo sanguíneo y que se traduce en cambios en la temperatura de las vías aéreas. Este aumento del flujo sanguíneo de la mucosa bronquial se debe a que en la inflamación intervienen una serie de mediadores como son la histamina, la bradiquinina, los leucotrienos, factor activador de plaquetas (PAF), la prostaglandina E2, la adenosina y el óxido nítrico (NO) y esta inflamación es la que se traduciría como un “calor local bronquial” detectable a través de este nuevo equipo.

Estudios en pacientes asmáticos han descrito un incremento de la temperatura bronquial susceptible de poder ser medida mediante la determinación de la TAE ⁽⁴⁹⁾. Así pues la medición de la TAE podría ser un marcador sencillo, rápido y barato para la medición indirecta de la inflamación bronquial.

2.1.4.a. Medición de la TAE

Existen varios métodos para medir la TAE. El incremento de la temperatura del aire exhalado (iTAE) fue propuesta por Paredi y cols. ⁽⁴⁸⁾ a través de una maniobra espiratoria lenta y controlada, a un flujo de entre 10 y 11 L/min (maniobra parecida a la utilizada para la medición de la FeNO).

La temperatura máxima observada del aire exhalado (TAE pico) y la temperatura meseta en la finalización de una maniobra de exhalación (TAE plateau) fue propuesta por Piacentini y cols. ⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾ a través de una maniobra lenta con un flujo no controlado, similar a la de una capacidad vital no forzada. De estas dos mediciones, y en estudios posteriores, los autores utilizan habitualmente la TAE meseta.

El grupo de Popov y cols. ⁽⁵¹⁾ recientemente diseñaron un equipo para la medición de la temperatura meseta del aire exhalado medida tras respirar a volumen circulante. Este equipo ha sido comercializado por Delmedica (Singapore) con el nombre de X-Halo y es el equipo que en las últimas publicaciones se utiliza para medir la TAE. Para obtener esta TAE meseta se requiere una respiración a volumen circulante, inspiración nasal del ambiente y espiración en el interior del equipo.

A pesar de los diferentes métodos de medición, todos han evidenciado diferencias estadísticamente significativas en las mediciones de la TAE entre asmáticos y controles sanos, lo cual habilita la medición de la TAE como un potencial marcador de la inflamación bronquial.

Dentro de las limitaciones que deben tenerse en cuenta en la TAE es que ninguna de las formas de medición de la TAE (la iTAE, la TAE pico, la TAE plateau) está estandarizada, lo que limita su aplicación en la clínica diaria, así como la comparación de algunos de los resultados obtenidos, debido a las diferencias metodológicas utilizadas. Para las tres primeras modalidades, además, no existe un equipo comercializado que facilite tanto su realización como sobre todo el cálculo posterior, por lo que requieren de un desarrollo técnico que las simplifique y las pueda acercar a la práctica diaria.

Actualmente existen estudios que correlacionan la TAE con otros marcadores de la inflamación habituales en la práctica diaria como son la FeNO, la eosinofilia en esputo y sangre, el FEV₁ o las pruebas de provocación bronquial.

2.1.5. DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES MEDIANTE LA NARIZ ELECTRÓNICA

La nariz electrónica es una técnica novedosa que se basa en la detección de compuestos orgánicos volátiles (COVs) presentes en la fase gaseosa de la respiración humana, que pueden ser detectados por sensores de cromatografía y espectrometría de masas. La nariz electrónica se compone de un dispositivo formado por varios sensores, que al ser expuestos a partículas volátiles experimentan cambios específicos en su resistencia eléctrica y que se traducen en un patrón o perfil de COVs mediante regresiones logarítmicas. Estos patrones de COVs son sustancias químicas compuestas de carbono y que tienen la capacidad de convertirse en vapor y contactar con la atmósfera. Se han descrito muchas sustancias químicas, entre ellas destacan: el isopreno, el benceno, el tolueno y el formaldehído. Los COVs pueden ser usados como biomarcadores no invasivos de “huellas olfativas” capaces de distinguir enfermedades.

Hasta la fecha no existe una estandarización del método, es por ello que al hablar de nariz electrónica hay que tener en cuenta varios puntos: el tipo de nariz utilizada (por espectrometría de masa, por cromatografía de gases, Cyranose 320), el tipo de análisis de los resultados (cross-validated accuracy, M-distance, neural network) y la validación y reproducibilidad de los resultados en cada una de las narices utilizadas. Las narices electrónicas que existen en el mercado están hechas con fines militares (detectar bombas, narcóticos), en la industria alimentaria, para monitorizar parámetros medioambientales, en el desarrollo de fragancias y cosméticos o con fines enológicos. La nariz electrónica actualmente en el área de neumología sólo se utiliza en la investigación, diversas enfermedades como el asma, la EPOC, el reflujo gastroesofágico, el cáncer de pulmón son los temas más estudiados.

Existen estudios que han demostrado que la nariz electrónica es capaz de discriminar: asmáticos de controles sanos (distinguiendo en menor grado las diversas

gravidades asmáticas)⁽⁵²⁾, el grado de control del asma⁽⁵³⁾, fumadores de no fumadores, EPOC vs asma⁽⁵⁴⁾. Se ha observado que el rendimiento diagnóstico del asma está aumentado cuando se combina con la FeNO⁽⁵⁵⁾. Así mismo, se ha descrito su utilidad en el diagnóstico del reflujo gastroesofágico⁽⁵⁶⁾, del mesotelioma pleural maligno⁽⁵⁷⁾, cáncer de pulmón de célula no pequeña⁽⁵⁸⁾. Y se ha evidenciado que una disminución del calibre de la vía aérea *per se*, no está asociada con una alteración de las “huellas olfativas” en asma, medidas por la nariz electrónica y que las mismas no muestran cambios significativos en diferentes días en asmáticos estables⁽⁵⁹⁾.

2.2. Fenotipos inflamatorios bronquiales del asma

Existe un aumento en la evidencia que sugiere que al establecer el fenotipo de la enfermedad asmática según la inflamación de la vía aérea, se pueden identificar subgrupos de pacientes que más fácilmente responden a tratamientos anti-inflamatorios como los glucocorticoides inhalados⁽⁶⁰⁻⁶¹⁾ y anti-IL5. Así mismo se ha demostrado que aquellos con un fenotipo neutrofílico responden menos al tratamiento con glucocorticoides y podrían responder favorablemente a tratamientos prolongados con macrólidos⁽⁶²⁾, y posiblemente a tiotropio⁽⁶³⁾.

El esputo inducido es la técnica que actualmente se utiliza para clasificar los fenotipos inflamatorios bronquiales en pacientes con asma. Según la celularidad del esputo, este se puede clasificar en 4 fenotipos: aquellos que tengan un recuento de neutrófilos superior a 61% se clasifican como neutrofílicos, aquellos con eosinófilos superior al 3% se clasifican como eosinofílicos, aquellos con recuento de neutrófilos menor del 61% y menor del 3% de eosinófilos se clasifican como paucigranulocíticos y aquellos con recuento de neutrófilos mayor del 61% y mayor del 3% de eosinófilos se clasifican como mixtos^(5,8,64).

2.3. Planteamiento de los proyectos de la tesis

La utilidad de la medición de la FeNO radica en su capacidad para identificar la inflamación bronquial eosinofílica determinada a través del EI. Si bien parece lógico presuponer que en el asma eosinofílica existe una buena correlación entre los resultados obtenidos con ambos métodos (FeNO y recuento de eosinófilos en el esputo inducido (REEI)) en la práctica clínica, en ocasiones existe una disparidad entre

dichos resultados. Así, algunos pacientes presentan una FeNO alta, pero un REEI dentro de los valores de referencia (DVR), y al contrario, otros con un REEI alto presentan una FeNO DVR, independientemente del grado de control y del tratamiento del asma. En base a estas discrepancias se diseñó el primer estudio con el objetivo principal de conocer la proporción de pacientes en los cuales existía una disociación entre los valores de la FeNO y del REEI y definir si estos tenían características clínico-inflamatorias diferenciales.

Posteriormente se diseñaron los siguientes dos estudios, con la finalidad de conocer la utilidad de la TAE y la nariz electrónica como nuevos métodos no invasivos para determinar la inflamación bronquial en el asma.

3. Hipótesis

- Existe un grupo de pacientes en la práctica clínica que cursan con disociación entre los valores de la FeNO y de los eosinófilos en el esputo inducido, estos pacientes tienen características diferenciadoras que permiten explicar tales discrepancias.
- La temperatura del aire exhalado y la nariz electrónica se plantean como nuevos métodos capaces de discriminar los diferentes fenotipos inflamatorios de asma.
- La temperatura del aire exhalado permite determinar el control y la gravedad del asma.

4. Objetivos

- 1) Conocer la proporción de pacientes con asma que cursan con disociación entre los valores de la FeNO y el recuento de eosinófilos en el esputo inducido y describir sus posibles características clínicas e inflamatorias diferenciales.
- 2) Determinar si la temperatura del aire exhalado está relacionada con el control del asma, la gravedad de la enfermedad, la obstrucción bronquial y la inflamación bronquial.
- 3) Establecer la capacidad que tiene la nariz electrónica para discriminar los diferentes fenotipos inflamatorios de asma determinados mediante el esputo inducido.

5. Métodos y Resultados

5.1. Estudio I: Características clínicas e inflamatorias del asma con disociación entre la FeNO y la eosinofilia en el esputo inducido

5.1.1. Método del estudio I

Estudio transversal, descriptivo, realizado entre los meses de noviembre del 2011 y noviembre del 2013, diseñado para determinar la correlación entre el recuento de eosinófilos del esputo inducido (REEI) y la FeNO en 110 pacientes con asma en tratamiento de mantenimiento y que acudían para la realización de un esputo inducido para su valoración clínica. Todos los pacientes procedían de una consulta temática de asma. Los asmáticos fueron definidos según los criterios de la GEMA y GINA 2009⁽¹⁻²⁾ y clasificados según la presencia de disociación o no entre el REEI y la FeNO. *Criterios de exclusión:* haber padecido infección respiratoria y/o haber requerido el uso de glucocorticoides orales en el último mes, tener baja adherencia terapéutica, tener alguna enfermedad potencial que alterase los niveles de la FeNO (sarcoidosis, cáncer de pulmón, tuberculosis, bronquiectasias, nefropatía, enfermedad reumática o hepática), cualquier comorbilidad que pudiese afectar la comprensión y/o colaboración en el estudio.

De todos estos pacientes se recogieron datos demográficos y clínicos de su enfermedad. Se realizaron las siguientes determinaciones o exploraciones en el mismo día: FeNO, espirometría forzada, recuento de células inflamatorias en el esputo inducido, número de eosinófilos en sangre periférica y de IgE total en sangre, prick-test cutáneo para aeroalérgenos. Se les pidió a los pacientes que cumplimentaran el cuestionario de control del asma (ACT) (Asthma Control Test).

La medición de la FeNO se realizó con un equipo electroquímico (NO Vario Alalyzer. FILT Lungen and Thorax diagnostic GmbH, Berlín, Alemania) a un flujo de 50 ml/s, siguiendo las recomendaciones de la ATS/ERS 2005⁽³⁴⁾, se consideró una elevación significativa de la FeNO cuando los valores resultaron igual o superiores a 50 ppb⁽⁴⁵⁾. Las mediciones espirométricas se realizaron con un equipo Datospir-600

(Sibelmed SA, Barcelona, España) por un técnico experimentado y siguiendo las recomendaciones de la SEPAR 2013⁽⁶⁵⁾; se consideró un FEV₁ en el rango de referencia cuando fue superior o igual al 80% del valor teórico⁽⁶⁶⁾. La inducción y el procesado de la muestra de esputo se realizaron según el procedimiento estandarizado⁽¹¹⁾. Brevemente, los tapones de moco se seleccionaron manualmente y se pesaron, se incubaron (15 min a temperatura ambiente) y diluyeron cuatro veces el peso (en ml) con PBS de Dulbecco. Para romper los tapones de moco se sometió la muestra a un agente reductor “ditiotreitól” (DTT) Sputolysin®. Posteriormente se filtró por gravedad a través de un filtro de red de nylon 41µm de poro (Millipore). Después de la homogeneización, cada muestra se dividió en alícuotas en dos partes de igual volumen. El recuento de células totales se realizó usando un hemocitómetro de Neubauer. Las muestras con un número de células de esputo (<1000 × 10⁶ células / g) fueron excluidas. La viabilidad celular se determinó a través de un microscopio de luz usando tinción con azul de tripano. Después de centrifugar la preparación de células, se obtuvo el sedimento celular y el sobrenadante. El sedimento de células se utilizó para el recuento diferencial celular (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y células epiteliales bronquiales) utilizando la tinción de Wright-Giemsa. El análisis diferencial de leucocitos se realizó en un mínimo de 400 células. Para clasificar los fenotipos inflamatorios bronquiales de asma, aquellos pacientes que tenían un recuento de neutrófilos >61% fueron clasificados como *asma neutrofílica*; aquellos con eosinófilos en el esputo >3%, como *asma eosinofílica*; aquellos con neutrófilos < 61% y < 3% de eosinófilos en el esputo como *asma paucigranulocítica* y aquellos con neutrófilos >61% y >3% de eosinófilos en el esputo como *asma mixta*⁽⁶⁴⁾. La determinación de la IgE total en sangre se realizó mediante ImmunoCAP (Phadia 250), se consideró aumentada cuando mostró unas cifras superiores a 160 UI/mL. El prick-test se realizó según el procedimiento estándar⁽⁶⁷⁾, se consideró positivo cuando el diámetro de la pápula fue superior a 3 mm. Se utilizó el Asthma Control Test (ACT), cuestionario de auto-evaluación validado al español⁽⁶⁸⁾ diseñado para valorar el control del asma. Se consideró un buen control cuando el resultado fue superior a 20 puntos. Se consideraron dosis altas de glucocorticoides inhalados a las de dipropionato de Beclometasona (o equivalente) ≥ 1000 µg/día⁽¹⁾. Se definió a los pacientes con

asma alérgica cuando cursaban con síntomas de asma ante uno o más alérgenos y prick test positivo para estos.

Los pacientes que presentaron disociación entre ambos métodos, fueron divididos en dos grupos. El Grupo 1 fueron aquellos pacientes que tenían una FeNO < 50ppb y un REEI alto (>3%) y el Grupo 2 eran aquellos que tenían una FeNO > 50 ppb y un REEI dentro de los valores de referencia.

5.1.1.a. Análisis estadístico

Las variables categóricas se expresaron como frecuencias absolutas y relativas y las variables cuantitativas como media y desviación estándar. Las comparaciones entre los dos grupos de pacientes asmáticos se realizaron mediante el análisis "*t*"-student para las variables cuantitativas. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado o de McNemar para las variables categóricas. Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre la FeNO, el REEI y la eosinofilia en sangre periférica. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa un valor de *p* inferior a 0,05. El análisis se realizó con el programa SPSS versión 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU).

5.1.2. Resultados del estudio I

5.1.2.a. Características demográficas, clínicas y funcionales de la población

De los 110 pacientes asmáticos, 55 (50%) eran mujeres, con una media de edad de 49 (15) años. Respecto al tabaquismo: 49 pacientes (45,5%) no habían fumado nunca, 15 (13,6%) eran exfumadores y 10 (9,1%) eran fumadores activos. 104 pacientes (94,5%) tenían un FEV₁ en el rango de referencia, la FeNO >50ppb estaba elevada en 80 pacientes (72,7%), y la IgE total en sangre estaba elevada en 33 pacientes (30%) con una media de 680,8 UI/mL. El ACT mostró un buen control del asma en 92 pacientes (86,6%); 52 pacientes (47,3%) tenían eosinofilia en el esputo; 68 pacientes (61,8%) presentaban rinitis asociada. El prick-test resultó positivo en 85 casos (77,2%). Con respecto a las dosis de glucocorticoides inhalados recibidos: el 3,6% no recibía, el 42,8% recibía bajas dosis, el 21,4% recibía dosis medias, el 32,2% recibía dosis altas.

5.1.2.b. Disociación FeNO y eosinofilia en el esputo inducido (utilizando como valores de la FeNO >50ppb)

Del total de 110 asmáticos, 46 (41,8%) presentaron una disociación entre los valores de la FeNO y de la eosinofilia en el esputo inducido. De estos, 34 (73,9%) fueron asignados al grupo 1 y 12 (26,1%) al grupo 2. Las características de estos pacientes se detallan en la tabla 1. Los pacientes del grupo 1 con respecto al grupo 2 presentaron un mayor número de visitas a urgencias en los últimos 12 meses, 1,4 visitas (2,9) vs 0 visitas, $p=0,037$; un fenotipo inflamatorio eosinofílico (94,1%) y mixto (5,9%) vs un fenotipo inflamatorio paucigranulocítico (91,7%) y mixto (8,30%), $p=0,000$ y un menor porcentaje de prick test positivo 70,6% vs 91,7%, $p=0,037$.

5.1.2.c. Correlaciones

Tras analizar a los 110 pacientes asmáticos, se observó una correlación positiva entre los eosinófilos en sangre periférica (valores absolutos) y el REEI ($r=0,48$; $p=0,000$). Así mismo se observó una correlación positiva débil entre la FENO y el REEI ($r=0,20$; $p=0,036$). De estos 110 pacientes un 16,21% mostró una concordancia entre los valores de la FeNO y el REEI.

Tabla 1: Características demográficas, clínicas y funcionales según la disociación entre la FeNO y la eosinofilia en el esputo inducido

Variables	Grupo 1 FeNO < 50ppb / REEI alto (n = 34)	Grupo 2 FeNO ≥50ppb / REEI dentro de los valores de referencia (n = 12)	P
Mujeres, n (%)	21 (61,8)	5 (41,7)	0,227
Edad en años, media (DE)	53,09 (16)	43,08 (13,5)	0,150
Índice de masa corporal, (kg/m ²), media (DE)	27,04 (3,9)	24,23 (2,2)	0,107
Fumadores o ex-fumadores, n (%)	10 (29,4)	6 (50)	0,399
Asma bien controlada (ACT ≥ 20), n (%)	12 (35,3)	8 (66,7)	0,455
Asma persistente grave, n (%)	15 (44,1)	2 (16,7)	0,517
Visitas a urgencias en los últimos 12 meses, media (DE)	1,4 (2,9)	0	0,037
FEV ₁ (%), media (DE)	80,6 (23)	88,3 (16,3)	0,422
Rinitis, n (%)	25 (73,5)	9 (75)	0,924
Poliposis nasal, n (%)	12 (35,3)	2 (16,7)	0,350
Glucocorticoides inhalados (% pacientes tratados)			
Dosis altas	31,8	33,3	0,930
Dosis medias	22,7	16,6	
Valores de FeNO (ppb), media (DE)	25,35 (10,9)	85,25 (29,7)	0,001
Fenotipo inflamatorio predominante, n (%)			
Eosinofílico	32 (94,1)	0	0,001
Paucigranulocítico	0	11 (91,7)	
Recuento de eosinófilos en el esputo inducido, %, media (DE)	11,7 (8,9)	1,03 (0,9)	0,001
Recuento de neutrófilos en el esputo inducido, %, media (DE)	39,5 (20,7)	47,4 (21,4)	0,418
Prick test positivo, n (%)	24 (70,6)	11 (91,7)	0,037
Total IgE en suero, IU/mL, media (DE)	321,4 (721,3)	572,7 (337,7)	0,734
Recuento de eosinófilos en sangre periférica (x 10 ⁹ /L)	0,43 (0,3)	0,32 (0,1)	0,456
Eosinófilos en sangre periférica, %, media (DE)	5,7 (3,5)	4,5 (2,9)	0,459

5.2. Estudio II: Utilidad de la temperatura del aire exhalado plateau en pacientes con asma

5.2.1. Método del estudio II

Estudio observacional, transversal, de los datos recogidos desde enero 2012 hasta julio 2013 de 69 pacientes en tratamiento de mantenimiento para el asma con una edad mayor de 18 años y que provenían de las consultas externas de asma de nuestro Centro. Se definió a los paciente con asma y las dosis altas de glucocorticoides inhalados según los criterios de la GINA ⁽²⁾. Los criterios de exclusión fueron: la presencia de infección del tracto respiratorio o exacerbación del asma en los 30 días anteriores a la inclusión, el uso de tratamiento con glucocorticoides orales o fármacos inmunomoduladores, pacientes con hospitalización programada durante el estudio, trastornos cognitivos que afectasen la comprensión del estudio.

Todos los pacientes respondieron al cuestionario ACT y posteriormente se les realizó en el mismo día, los siguientes exámenes: FeNO, espirometría forzada, recuento de células inflamatorias en el esputo inducido, IgE total en sangre, prick-test cutáneo para aeroalérgenos. El esputo inducido se analizó dentro de las 2 h posteriores y se registró también el índice de masa corporal (IMC). Todas las mediciones, procedimientos y valores de referencia que se utilizaron en este apartado, siguieron el mismo método empleado en el estudio I.

La TAE plateau se midió utilizando un termómetro X-halo Breath (Delmedica, Singapur) (ver figura 1), según el método validado por Popov et al. ⁽⁵¹⁾. Los pacientes fueron instruidos para respirar a volumen circulante, inhalando libremente a través de la nariz y exhalando en el dispositivo. La maniobra se continuó hasta que el software del instrumento indicara que el valor medido se mantuviera estable. La TAE plateau se definió como aquella temperatura que se mantuviese durante 20 s con cambios $<0,01^{\circ}\text{C}$. A todos los pacientes, la TAE plateau se midió por la mañana (9:00-10:00 h) después de un mínimo de 2 h de ayuno. La temperatura del medio ambiente se controló para mantener una condición estable de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de 40 a 50% ⁽⁶⁹⁾.

Figura 1: X-Halo Breath Thermometer

5.2.1.a. Análisis estadístico

Para la estadística descriptiva, los valores basales de los datos cualitativos se presentaron como porcentajes y frecuencias, y para los datos cuantitativos, como medias y desviación estándar (DS). El análisis de comparación entre dos grupos se realizó por análisis *"t"-student* para las variables cuantitativas. La comparación entre los grupos de acuerdo con los fenotipos inflamatorios del esputo inducido se llevó a cabo mediante el análisis de varianza. Los resultados se presentaron como valores medios y DS. Las variables categóricas se compararon mediante tablas de contingencia utilizando la prueba de χ^2 . Los resultados se expresaron en número de casos y porcentajes. El análisis de correlación se realizó mediante la "r" de Pearson. En todos los casos, el nivel de significación estadística fue del 5% ($\alpha = 0,05$). El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (versión 18.0) para Windows (SPSS Inc., Chicago, Ill., EE.UU.).

5.2.2. Resultados del estudio II

5.2.2.a. Características demográficas, clínicas y funcionales de la población

Las características demográficas, clínicas y funcionales de los 69 asmáticos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Características demográficas, clínicas y funcionales de los 69 asmáticos

Variables	N=69
Sexo (% mujeres)	62,3%; p=0,113*
Edad (años); mediana (valores min - max)	49,7 (15,6); 47 (22-80); p=0,752*
IMC (kg/m ²); mediana (valores min - max)	26,9 (4,9); 26,8 (16,6-45,3); p=0,838*
Duración de la enfermedad (años); mediana (valores min - max)	11,7 (9,45); 9 (1-35); p=0,604*
Ex-fumadores (%) e índice de (paq/años)	31% (8,5 paq/años); p=0,108*
Rinitis (%)	69,6%; p=0,628*
Poliposis nasal (%)	21,7%; p=0,424*
Prick test positivo (%)	68,1% (60% para ácaros del polvo doméstico , 13% para pólenes y 27% para otros alérgenos); p=0,082*
Asma controlada (%) (ACT ≥ 20)	62,3%; p=0,521*
Mediana ACT (valores Min-Max)	22 (9-25)
Pacientes con budesonida (o equivalente ICS) ≥ 800 µg/día (%)	33,3%; p=0,371*
Pacientes con combinaciones de ICS/LABA (%)	55,1%; p=0,565*
Pacientes con prueba broncodilatadora positiva (%)	25,6%; p=0,425*
Asma leve (Step 1-2)	34,8%
Asma moderada (Step 3)	18,8%
Asma grave (Step 4-5)	46,4%; p=0,749*
FEV ₁ (%); mediana (valores min - max)	82,7 (19,3); 88 (36-117); p=0,255*
FEV ₁ /FVC; mediana (valores min - max)	67,5 (13,6); 70 (32,2-94,4); p=0,734*
Total IgE UI/mL; mediana (valores min - max)	361,9 (633,1); 124 (2-3500); p=0,881*
REII (%); mediana (valores min - max)	7,2 (11,2); 3,1 (0-65,8); p=0,328*
Recuento de neutrófilos en el EI (%); mediana (valores min - max)	42,9 (23,2); 40,2 (4,9-85,7); p=0,190*
Fenotipos inflamatorios de asma (%)	Paucigranulocítico: 33,33 % Eosinofílico: 50,72% Neutrofílico: 15,95%; p=0,364*
FeNO (ppb); mediana (valores min - max)	38,4 (32,7); 27 (3-174); p=0,589*
TAE plateau (°C); mediana (valores min - max)	34,19 (0,66); 34,33 (32,09-36,2); p=0,038*

* Comparación entre sexos

5.2.2.b. Control del Asma

Los pacientes se clasificaron en dos grupos según el nivel de control del asma. Cuarenta y tres pacientes tenían un asma bien controlada (62,31%; $ACT \geq 20$) y 26 tenían un asma mal controlada (37,69%). Los niveles de la TAE plateau no mostraron diferencias significativas entre los grupos: $34,29^{\circ}\text{C}$ (0,61) en los asmáticos con buen control vs $34,02^{\circ}\text{C}$ (0,72) en el grupo de los asmáticos con un mal control ($p = 0,104$). No se observó una correlación significativa entre los niveles de la TAE plateau y el ACT ($r = 0,179$, $p = 0,142$).

5.2.2.c. Gravedad del asma

Según la gravedad de la enfermedad, los pacientes fueron clasificados en dos grupos: 24 (34,78%) tenían asma intermitente o persistente leve y 45 (65,22%) asma moderada o grave. La TAE plateau fue de $34,33^{\circ}\text{C}$ (0,28) en los asmáticos intermitentes y leves y $34,11^{\circ}\text{C}$ (0,78) en el grupo de asma moderada-grave. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,200$).

5.2.2.d. Obstrucción bronquial

Según los valores de la FEV1%, se consideró que tenían una obstrucción bronquial aquellos pacientes que tenían un FEV1% $<80\%$ del valor teórico normal. Así, 28 pacientes (40,58%) tenían una obstrucción bronquial y 41 (59,42%) no. La TAE plateau fue de $34,30^{\circ}\text{C}$ (0,43) en el primer grupo y $34,02^{\circ}\text{C}$ (0,88) en el segundo grupo. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,128$). No se encontró una correlación significativa entre las mediciones de la TAE plateau y la FEV1% ($r = 0,165$, $p = 0,176$) en ninguna de las muestras analizadas.

5.2.2.e. Inflamación bronquial

Fracción de óxido nítrico exhalado

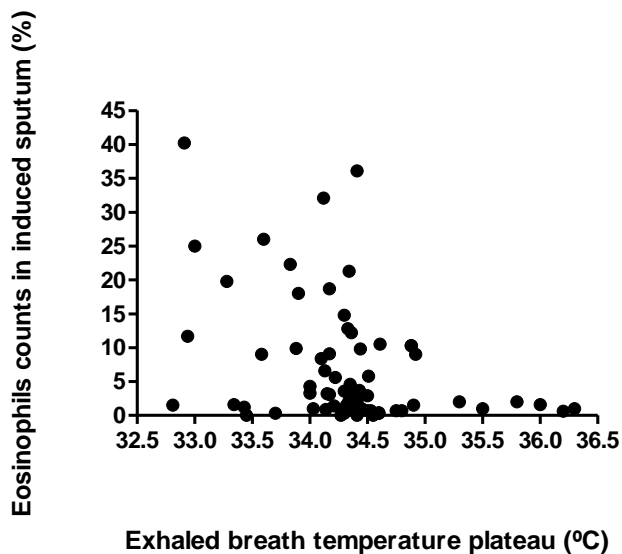
Dieciocho pacientes (26,08%) tenían una FeNO alta (≥ 50 ppb), y 51 (73,92%) tuvieron valores normales de la FeNO (<50 ppb). La TAE plateau fue de $34,26^{\circ}\text{C}$ (0,57) en el primer grupo y de $34,17^{\circ}\text{C}$ (0,69) en el segundo grupo. La diferencia no fue significativa entre ambos grupos ($p = 0,604$), tampoco se encontró una correlación significativa entre las mediciones de la TAE plateau y los valores de la FeNO ($r = -0,07$, $p = 0,568$).

Fenotipos inflamatorios bronquiales del asma

Veintitrés pacientes (33,33%) tenían un fenotipo paucigranulocítico, 35 (50,72%) tenían un fenotipo eosinofílico, y 11 (15,95%) tenían un fenotipo neutrofílico. La TAE plateau observada por grupo fue de 34,22°C (0,78) para los pacientes con asma paucigranulocítica, 34,12°C (0,53) para los pacientes con asma eosinofílica, y 34,34°C (0,78) para los pacientes con asma neutrofílica. No se encontraron diferencias significativas en las mediciones de la TAE plateau entre los diferentes fenotipos inflamatorios de asma ($p = 0,607$). Sin embargo, se demostró una correlación negativa significativa débil entre el número de eosinófilos en el esputo inducido y la TAE plateau ($r = -0,348$, $p = 0,003$) (Fig. 2).

Figura 2: Correlación entre la TAE plateau y el porcentaje de eosinófilos en el esputo inducido de los pacientes asmáticos

$r: -0,348; p=0,003$

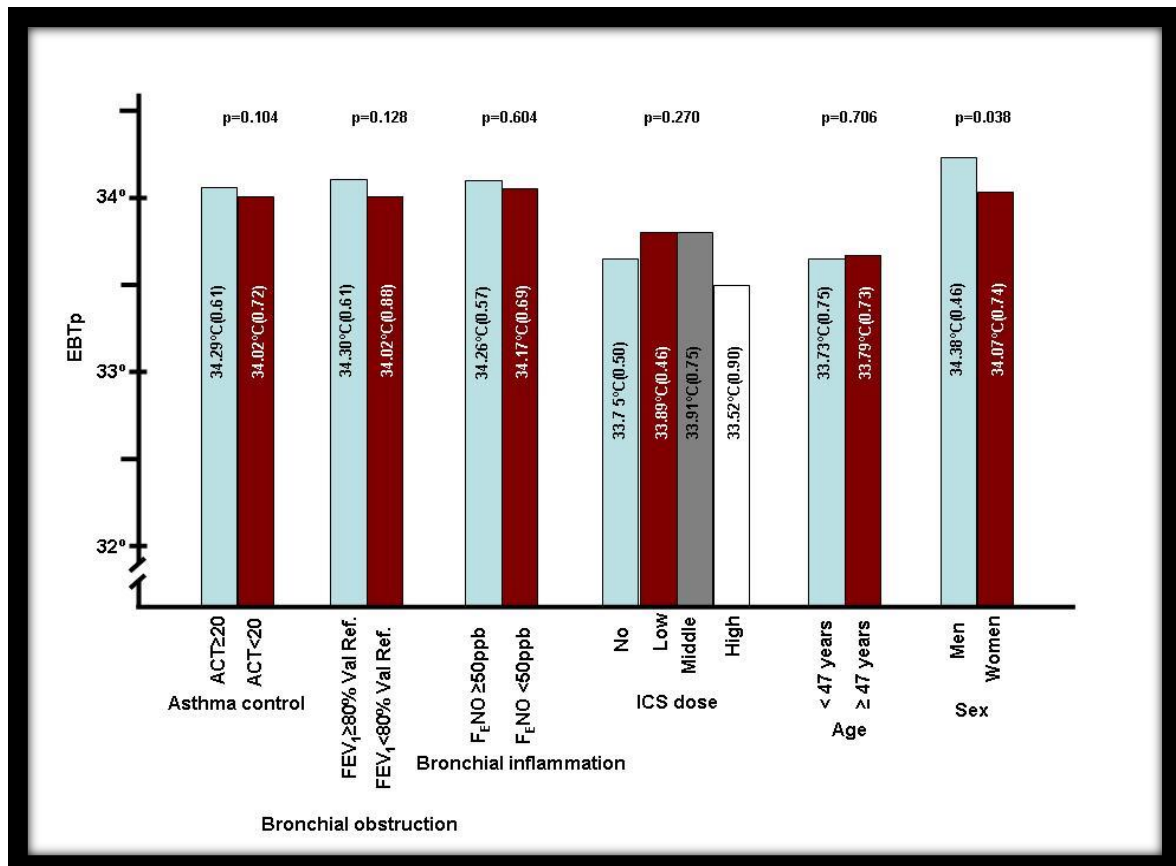


5.2.2.f. Variables confusoras

No hubo correlación significativa entre la TAE plateau y: la edad ($r = -0,052$, $p = 0,670$), el índice de masa corporal ($r = 0,091$, $p = 0,459$), la temperatura del aire ambiente ($r = -0,075$, $p = 0,586$), la temperatura corporal ($r = 0,156$, $p = 0,262$). Hubo una diferencia significativa en la TAE plateau según el sexo: en la mujeres fue de 34,07°C (0,74) y en los hombres fue de 34,38°C (0,46) ($p = 0,038$). La Figura 3 compara los valores de la

TAE plateau entre los diferentes subgrupos estudiados: ACT <20 vs. ≥ 20 ; FEV₁ ≥ 80 vs. FEV₁ <80 ; FeNO ≥ 50 vs. <50 ppb; dosis de ICS altas vs. dosis medias/ bajas; edad <47 años vs. ≥ 47 años (encima del valor medio), y los hombres vs. las mujeres.

Figura 3: Comparación de los valores de la TAE plateau entre los diferentes subgrupos estudiados



5.3. Estudio III: Discriminación de los fenotipos inflamatorios bronquiales de asma a través de la nariz electrónica

5.3.1. Método del estudio III

Estudio transversal diseñado para analizar la concordancia entre los fenotipos inflamatorios del esputo inducido de pacientes asmáticos con los compuestos orgánicos volátiles (COV) (huellas olfativas) a través de la nariz electrónica.

Cincuenta y dos adultos con asma persistente, siguiendo los criterios de la GINA⁽²⁾, provenientes de las consultas externas de la unidad de asma de nuestro centro

fueron reclutados para participar en el estudio desde enero a diciembre de 2013. Los criterios de exclusión fueron: infección de las vías respiratorias o una exacerbación de asma los 30 días anteriores a la inclusión, tratamiento con glucocorticoides orales o inmunosupresores. Pacientes fumadores y ex fumadores se incluyeron en el estudio. Se consideró un paciente ex-fumador cuando estos habían dejado de fumar desde los 12 meses antes del inicio del estudio. Sólo se seleccionaron pacientes que tenían esputo inducido con buena calidad.

5.3.1.a. Mediciones

Para realizar las mediciones del estudio, los pacientes dejaron de tomar los medicamentos inhalados diez horas antes y dejaron de fumar, de ingerir alimentos y bebidas tres horas antes de las determinaciones. En una sola visita se les realizó las siguientes pruebas: medición del control del asma a través del cuestionario ACT ⁽⁶⁸⁾, prick test a los aeroalérgenos locales habituales ⁽⁶⁷⁾, FeNO por quimioluminiscencia (NO Vario Analyser, FILT GMBH, Berlín, Alemania), siguiendo las recomendaciones de la ATS / ERS ⁽³⁴⁾. Se recogió el gas exhalado a través de la nariz electrónica de la siguiente forma: los pacientes respiraban a través de una boquilla que estaba conectada a una válvula de re-inhalación de 2 vías (Hans Rudolph 2700, Hans Rudolph, Kansas City, MO) con un filtro de COV inspiratorio (Compact Air Plus Norte, Middelburg, Países Bajos) y un depósito de sílice espiratorio, que se cambió en cada paciente, para secar el aire espirado. Se recogió dentro de 10 minutos, el aire espiratorio en una bolsa Tedlar 10-L, que se lavó con aire ambiente entre los pacientes (tiempo necesario para verificar que todos los sensores estaban dentro del rango de referencia especificado por el fabricante de la bolsa), posteriormente se conectó durante 5 minutos a la nariz electrónica (CyranoSE 320TM; Smith Detecciones, Pasadena, CA. Ver figura 4) provisto de una serie de nano-sensores compuestos por 32 polímeros orgánicos. Los cambios en la resistencia eléctrica nano-sensor generaban un perfil respiración - print COV (huella olfativa). La medición se basó en una variación de la resistencia en cada sensor cuando se exponía a una mezcla de COV. Estos cambios en la resistencia se presentaron como patrones y se analizaron mediante algoritmos de reconocimiento de patrones ⁽⁷⁰⁾. Todas las muestras se recogieron en la misma habitación. La inducción y

el procesado del esputo inducido se realizaron según el método descrito en el estudio I.

Los fenotipos inflamatorios de asma bronquial se clasificaron según el porcentaje de células en el esputo inducido (igual que en el método del estudio I). Así el fenotipo neutrofílico era el que tenía >61% de neutrófilos, el eosinofílico >3% de eosinófilos y el paucigranulocítico <61% de neutrófilos y eosinófilos <3%. Se excluyó el fenotipo mixto dado el poco porcentaje de pacientes que tenían este fenotipo. A todos los pacientes se les realizó también una punción venosa para analizar la IgE sérica total y una espirometría forzada siguiendo las directrices de la SEPAR⁽⁶⁵⁾ y los valores de referencia de la población mediterránea⁽⁶⁶⁾.

Figura 4: Nariz electrónica (Cyranoze 320TM; Smith Detecciones, Pasadena, CA)



5.3.1.b. Análisis estadístico

Las variables categóricas se expresaron como frecuencias absolutas y relativas y las cuantitativas como media y desviación estándar. Los grupos se compararon mediante ANOVA, Chi-cuadrado o la prueba de Fisher, según correspondía. Un valor de p menor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. El análisis de los datos de la impresión del aire exhalado recogido se analizó utilizando una aplicación de reconocimiento de patrones del software MATLAB (v.R2012a), y fueron representados por regresión logarítmica como gráficos mono o bidimensionales según los algoritmos publicados anteriormente^(52,54). Los datos brutos se redujeron mediante el análisis de componentes principales (PCA) a tres factores principales. Estos factores PCA fueron

analizados en un ANOVA univariante con pruebas post-hoc. Un análisis discriminante lineal canónico se realizó utilizando los factores de PCA, que luego fue empleado para clasificar a los pacientes en categorías. Sobre la base de los factores diferenciadores de la PCA, se calculó la función discriminante que mejor distinguía a los diferentes fenotipos inflamatorios. La precisión del modelo se definió como el porcentaje de pacientes clasificados correctamente utilizando los resultados del esputo inducido como referencia. Para el análisis discriminante, se utilizó el método de "leave-one-out" (dejar uno fuera) ⁽⁵²⁾. La función discriminante fue entrenada utilizando todos los sujetos menos uno, utilizando cuatro muestras (PCA), si tres de las muestras eran correctas la función discriminante era válida. El proceso se repitió para todos los sujetos y los resultados se utilizaron para calcular el valor del porcentaje de precisión de validación cruzada. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron calculados para los tres fenotipos inflamatorios. El funcionamiento del receptor se generó utilizando los resultados de la función discriminante y la combinación de todas las muestras de un sujeto. Si una materia evaluada (verdadera "clase 1") tenía tres muestras dirigida a la "clase 1" por el identificador y uno de "Clase 0", la verdadera tasa positiva se consideró como 0,75. El área bajo la curva ROC se calculó utilizando los pares de valores de X, Y y una aproximación trapezoidal para el espacio entre los puntos. Estos análisis fueron realizados por un ingeniero experto en el tema.

5.3.2. Resultados del estudio III

5.3.2.a. Características demográficas, clínicas y funcionales de los pacientes

La tabla 3 muestra las características demográficas, clínicas y funcionales de los participantes. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 3: Características demográficas, clínicas y funcionales de los participantes

	Fenotipo eosinofílico (n=24)	Fenotipo neutrofilico (n=10)	Fenotipo paucigranulocítico (n=18)	P
Edad (años) media (DE)	47,8 (16,4)	54,8 (18,0)	42,9 (10,6)	ns
Sexo (% mujeres)	67	40	61	ns
IMC (Kg/m ²) media (DE)	26,1 (4,3)	25,7 (4,0)	27,2 (6,8)	ns
Fumadores activos (%)	12	10	5	ns
Ex-fumadores(%)	30	30	23	ns
IgE (UI/ml) media (DE)	148 (404,6)	45,25 (100,7)	238,5 (565,58)	ns
Prick test positivo (%)	71	60	83	ns
Pacientes con ACT ≥ 20 (%)	58	60	78	ns
ACT media (DE)	19,8 (4,4)	20,9 (5,9)	20,9 (4,5)	ns
FEV ₁ (%) media (DE)	86,9 (19,2)	78,8 (17,9)	89,9 (14,9)	ns
FEV ₁ /FVC media (DE)	69,4 (15,2)	65,5 (13,1)	71,5 (10,6)	ns
FeNO (ppb) media (DE)	32 (38,75)	25 (26)	21,5 (37,25)	ns
Pacientes con beclometasona (o ICS equivalente) ≥ 800 µg/día (%)	29	30	33	ns

La tabla 4 muestra las características del esputo inducido de los participantes, según los resultados, 24 pacientes (46%) tenían un fenotipo eosinofílico, 10 pacientes (19%) neutrofilico y 18 pacientes (35%) paucigranulocítico.

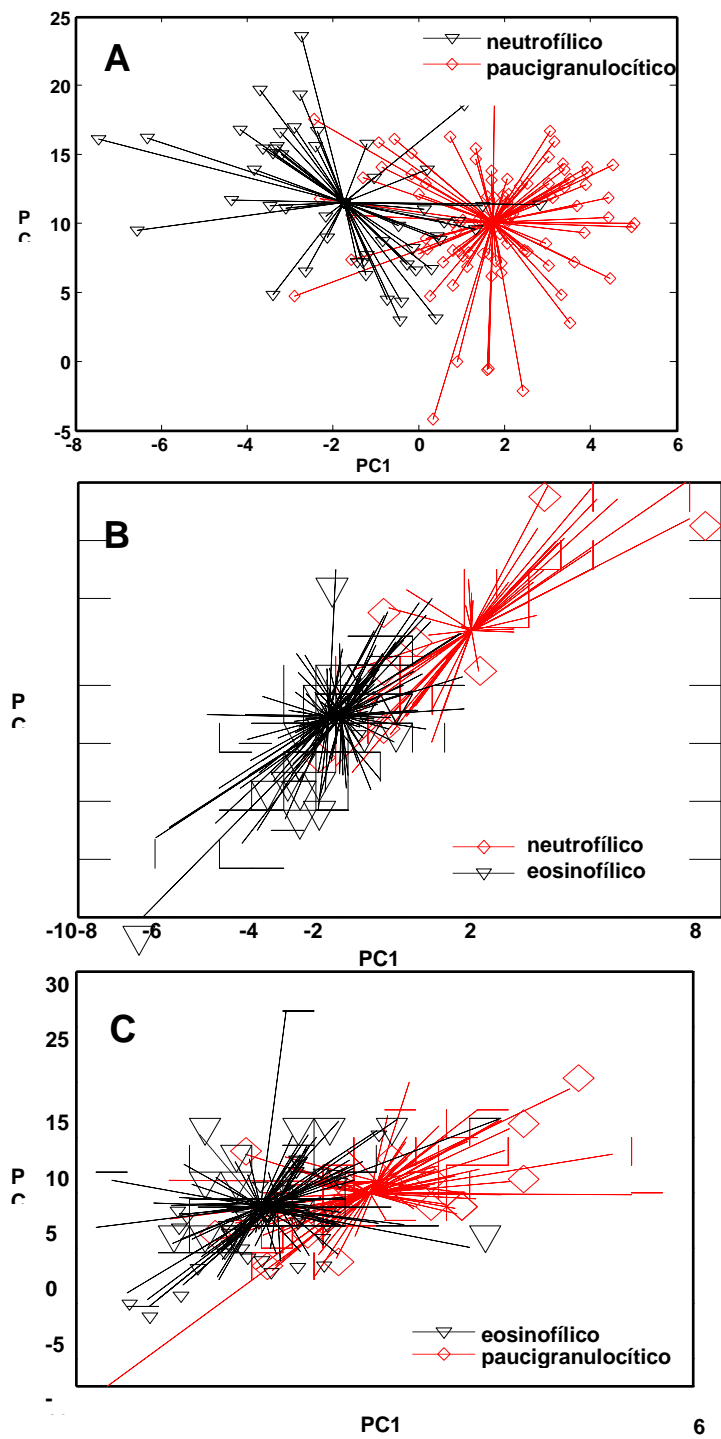
Tabla 4: Características del recuento de células inflamatorias del esputo inducido observadas en los tres grupos analizados

	Fenotipo eosinofílico (n=24)	Fenotipo neutrofilico (n=10)	Fenotipo paucigranulocítico (n=18)	P
Linfocitos (%)	0,8 (0,6)	0,9 (0,5)	1,0 (0,6)	0,516
Macrófagos (%)	56,4 (17,8)	19,2 (9,3)	61,1 (20,0)	<0,001
Eosinófilos (%)	13,2 (14,0)	1,3 (0,9)	0,9 (0,6)	<0,001
Neutrófilos (%)	29,4 (16,4)	77,3 (8,1)	36,5 (20,4)	<0,001
Células escamosas (mediana %)	7,21 (5,87)	3,17 (2,38)	4,53 (3,78)	0,064
Concentración celular ($\times 10^6$ cél./g)	3,26 (2,16)	3,96 (1,72)	3,5 (1,74)	0,682

5.3.2.b. Análisis de la huellas olfativas

El análisis de los componentes principales (PCA) mostró que las huellas olfativas de los tres fenotipos inflamatorios de asma eran diferentes. La figura 5 muestra las huellas olfativas de los fenotipos neutrofilicos vs. los fenotipos paucigranulocíticos, claramente distintas en la evaluación visual (panel A) y el análisis discriminante mostró una precisión de validación cruzada de 89% ($p = 0,001$). Del mismo modo, las huellas olfativas del fenotipo eosinofílico vs. el fenotipo neutrofilico (panel B), y eosinofílico vs. paucigranulocítico (grupo C), son bastante distinguibles, con un 73% ($p = 0,008$) y 74% ($p = 0,004$) de precisión, respectivamente. Finalmente, una comparación entre los fenotipos eosinofílicos vs. no eosinofílicos (es decir, neutrofilicos más paucigranulocíticos) mostró una precisión de validación cruzada reducida, pero aún significativa (61%, $p = 0,008$).

Figura 5: Comparación de las huellas olfativas entre los diferentes fenotipos inflamatorios de asma según el recuento leucocitario diferencial del esputo inducido



La Tabla 5 muestra los resultados del análisis ROC, así como la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos y el área bajo la curva para las huellas olfativas comparadas en los tres fenotipos inflamatorios de asma estudiados.

Tabla 5: Análisis ROC entre las comparaciones de las huellas olfativas entre los tres fenotipos inflamatorios bronquiales de asma

	Fenotipo neutrofílico vs. paucigranulocítico	Fenotipo neutrofílico vs. eosinofílico	Fenotipo eosinofílico vs. paucigranulocítico
Cross-validation accuracy (%)	89 (p=0,001)	73 (p=0,008)	74 (p=0,004)
Sensibilidad	0,94	0,6	0,55
Especificidad	0,80	0,79	0,87
Valor predictivo positivo	0,89	0,54	0,61
Valor predictive negativo	0,72	0,83	0,68
ROC	0,88	0,92	0,79

6. Discusión

El manejo actual del asma trae consigo, la necesidad de investigar en los pacientes con finalidades científicas y clínicas la inflamación crónica de las vías respiratorias. Así el recuento leucocitario diferencial del esputo inducido, la fracción exhalada de óxido nítrico se han consagrado ya como instrumentos de relevancia clínica para la evaluación de esta inflamación, pero nuevos métodos como la temperatura del aire exhalado y la nariz electrónica cada vez tienen más protagonismo en el campo de la neumología.

El estudio de fenotipos inflamatorios bronquiales de asma viene definido por el recuento leucocitario diferencial del esputo inducido, sin embargo, al ser esta una técnica que no es accesible a todos los profesionales, dado que requiere de un equipo entrenado y de un mínimo de 2-3 horas para su procesamiento, cada vez se tiende más a buscar métodos que de una forma no invasiva y rápida permitan valorar esta inflamación. El manejo del asma a través de fenotipos, permite ajustar y pronosticar respuestas a tratamientos, hecho de relevante interés debido a las diferentes respuestas a los tratamientos antiinflamatorios que cada uno posee.

Los tres trabajos presentados en esta tesis permiten responder diferentes interrogantes sobre la utilidad que tienen diferentes métodos no invasivos para identificar fenotipos inflamatorios de asma y en el caso del primer estudio valorar el porcentaje de pacientes con asma que cursan con disociación entre los dos métodos más utilizados en la práctica clínica habitual (REEI y FeNO) y conocer si estos grupos cursaban con características clínicas e inflamatorias diferenciales.

6.1. Estudio I: Características clínicas e inflamatorias del asma con disociación entre la FeNO y la eosinofilia en el esputo inducido

Este estudio realizado en 110 pacientes con asma en tratamiento de mantenimiento mostró una disociación entre los valores de la FeNO y de la eosinofilia en el esputo inducido en el 42% de los casos. Asimismo estos pacientes mostraron características clínicas e inflamatorias diferenciales. Los pacientes con valores de la FeNO <50 ppb y un alto REEI, presentaban un asma no alérgica eosinofílica, mientras que aquellos

pacientes que cursaban con valores de la FeNO ≥ 50 ppb y un REEI dentro de los valores de referencia, se caracterizaban por ser asmáticos con un fenotipo paucigranulocítico y atópicos.

Diferentes estudios realizados tanto en niños como en adultos han evaluado la correlación entre la FeNO y la eosinofilia en el esputo inducido, en el lavado broncoalveolar o en la sangre periférica. Como se muestra en la Tabla 6, los resultados obtenidos son controvertidos, encontrando correlaciones positivas en algunos estudios ^(71-76,37) negativas en otros ^(77,78) e incluso discordantes en el mismo estudio ⁽⁷¹⁻⁷⁹⁾. Nuestro trabajo fue realizado con un número de pacientes elevado con asma y los resultados mostraron una correlación positiva débil entre los valores de la FeNO y el REEI ($r=0,20$; $p=0,036$), siendo más fuerte la correlación entre la eosinofilia en el esputo y la eosinofilia en la sangre periférica (valores absolutos) ($r=0,48$; $p=0,000$). Las mediciones de la FeNO pueden servir de guía clínica fiable, en especial cuando los valores son bajos. Tales valores están asociados con altos valores negativos de predicción ($> 90\%$). Los niveles elevados de la FeNO se asocian con mucho más modestos valores predictivos positivos (75%-85%) y estos son menos fiables para determinar la inflamación eosinofílica en las vías respiratorias ⁽⁸⁰⁾.

Tabla 6: Estudios que correlacionan la eosinofilia con la FeNO en pacientes con asma

Primer autor (referencia)	Tipo de muestra	Correlación	Observaciones
Strunk ⁽⁷¹⁾	Sangre periférica	$r = 0,51; P < 0,001$	144 niños (6-17 años) con asma persistente leve y moderada. Una correlación entre la FeNO, eosinofilia en sangre periférica y los niveles de IgE fueron encontrados.
Jatakanon ⁽⁷²⁾	Espuito inducido	$r = 0,48; P = 0,003$	35 pacientes con asma estable. Correlación entre la eosinofilia en el esputo, la FeNO y el PC ₂₀ (metacolina).
Mattes ⁽⁷³⁾	Espuito inducido	$r = 0,35; P = 0,09$	25 niños con asma estable y 9 controles sanos.
Jones ⁽³⁷⁾	Espuito inducido	$r = 0,62; P < 0,001$	78 pacientes con asma persistente leve y moderada. Correlación entre la FeNO y el control del asma.
Payne ⁽⁷⁴⁾	Biopsia bronquial	$r = 0,54; P = 0,03$	31 niños con asma de difícil control. Evaluación de la respuesta al tratamiento con prednisona oral.
Obata ⁽⁷⁸⁾	Espuito inducido	No correlación	17 adultos con asma ocupacional.
Piacentini ⁽⁷⁵⁾	Espuito inducido	$r = 0,438;$ $P = 0,032$	25 niños con asma persistente moderada.
Warke ⁽⁷⁶⁾	Lavado broncoalveolar	$r = 0,78; P < 0,001$	71 niños (29 con asma atópica, 15 controles sanos atópicos, 27 controles sanos no atópicos).
Berry ⁽⁷⁷⁾	Lavado broncoalveolar	$r = 0,59; P < 0,001$	13 controles sanos.
	Espuito inducido	No correlación	25 pacientes con asma persistente leve-moderada.
			27 pacientes con asma refractaria. El óxido nítrico alveolar fue medido.
Malerba ⁽⁷⁹⁾	Espuito inducido	No correlación	14 pacientes con asma persistente leve y moderada tratadas con ICS, evaluaciones a los 3, 6 y 12 meses.
	Espuito inducido (a los 6 meses)	$r = 0,42; P < 0,01$	
Lim ⁽³¹⁾	Biopsia bronquial	$r = 0,14$	32 pacientes. No correlación entre la FeNO, eosinofilia en la mucosa bronquial y otros marcadores de inflamación.

En la práctica clínica, hay tendencia a generalizar y correlacionar los resultados de la FeNO con los del REEI. Sin embargo, a pesar de que ambos métodos son útiles para evaluar el grado de inflamación eosinofílica de las vías respiratorias^(30,32-33), el recuento de células bronquiales en el esputo inducido proporciona una aproximación más exacta de la inflamación de las vías en pacientes asmáticos que la FeNO. Además, la FeNO tiene un valor limitado en la evaluación de la inflamación neutrofílica de las vías respiratorias y diversos factores de confusión pueden afectar sus valores⁽⁴⁵⁾. Es por ello, que los valores de la FeNO deben de interpretarse con cautela en relación con el contexto clínico del paciente.

Utilizando en este estudio como punto de corte de la FeNO ≥ 50 ppb (como valor elevado), el 42% de los pacientes mostró disociación entre los valores de la FeNO y la eosinofilia en el esputo inducido, observado diferencias significativas entre ambos grupos. Así los pacientes del grupo 1 (FeNO <50 ppb y REEI elevado) se caracterizaron por tener un menor porcentaje de atopia (70,6%), pero con un fenotipo inflamatorio eosinofílico predominante en el esputo inducido y un mal control de la enfermedad. Estos resultados apoyan la discusión de Brusselle et al.⁽⁸¹⁾ y Wenzel⁽⁸²⁾ quienes hicieron hincapié en que el asma eosinofílica puede ocurrir tanto en pacientes alérgicos como no alérgicos, pero mientras que el origen de la eosinofilia en el asma alérgica se entiende en gran medida, los factores desencadenantes de la eosinofilia en la eosinofilia no alérgica aún no se han dilucidado. De acuerdo con estos autores, dos vías diferentes conducen a la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias en el asma. *En el asma alérgica*, las células dendríticas presentan alérgenos a las células T CD4+, induciendo linfocitos T de tipo 2 helper (Th2), que producen citoquinas, como la interleuquina-4 (IL-4), IL-5 e IL-13, y que conducen a una liberación de IgE a través del estímulo de las células B, eosinofilia de las vías respiratorias e hipersecreción mucosa bronquial. En cambio, en el asma eosinofílica no alérgica, los contaminantes del aire, los microbios y glicolípidos inducirían la liberación de citoquinas derivadas del epitelio, incluyendo IL-33, IL-25 y TSLP (epithelial cytokines thymic stromal lymphopoietin), que activan a células linfoides innatas tipo 2 (ILC2s) de una manera independiente de antígeno a través de sus respectivos receptores (IL-17RB, ST2 y TSLPR). Estas células linfoides (ILC2s) activadas producirían grandes cantidades de IL-5 e IL-13, lo que

conllevaría a la eosinofilia, hipersecreción mucosa y la hiperreactividad de las vías respiratorias.

De los 110 pacientes estudiados, un 11% correspondían al grupo 2 (FeNO \geq 50 ppb y REEI en el rango de referencia) estos pacientes se caracterizaron por tener un predominio de atopia, un fenotipo paucigranulocítico en el esputo inducido, un mejor FEV1 y ser más jóvenes. Estos resultados son consistentes con varios estudios que muestran que los aumentos de la FeNO están relacionados principalmente con estados de atopia ⁽⁸³⁻⁸⁴⁾.

Dentro de las limitaciones del estudio figura el hecho de que variables confusoras (falsos positivos y negativos) pudo influir en los valores de la FeNO. Así factores como el tabaco pudieron afectar los resultados de la FeNO (disminución de los niveles). Sin embargo, tras comparar los grupos 1 y 2, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fumadores activos o ex fumadores entre ambos grupos, aunque la proporción de fumadores y ex fumadores fue mayor entre los pacientes en el grupo 2. Por otro lado, hay que resaltar que los resultados del estudio deben ser interpretados con precaución debido a que la mayoría de los sujetos incluidos tenían un buen control del asma.

En este estudio se tomaron en cuenta otras variables de confusión identificados en la literatura tales como la técnica de medición, el flujo de aire exhalado, el dispositivo utilizado y el índice de masa corporal. Así, todas las maniobras fueron realizadas por el mismo técnico y no se observaron diferencias significativas en el IMC entre ambos grupos.

6.2. Estudio II: Utilidad de la temperatura del aire exhalado plateau en pacientes con asma

Este estudio realizado en asmáticos adultos, no encontró ninguna relación entre la TAE plateau y el control del asma, la gravedad de la enfermedad, la obstrucción de las vías respiratorias y la inflamación bronquial. Por lo que de acuerdo con nuestros resultados, la TAE plateau no parece proporcionar información clínica útil en una medición puntual.

La TAE se plantea como un nuevo biomarcador de la inflamación de las vías aéreas de una forma simple y no invasiva. Este método se basa en que el aumento de la vascularización producido por la inflamación, puede conducir a una mayor pérdida de calor en el aire exhalado ⁽⁴⁸⁾. Las mediciones de la TAE se han realizado en diversos estudios utilizando diferentes métodos no estandarizados, pero su utilidad clínica es todavía incierta. Dentro de los estudios publicados que compararon a un grupo de pacientes con asma (n = 18) vs voluntarios sanos (n = 16), Paredi et al ⁽⁴⁸⁾ encontraron un mayor aumento de la TAE incremental (iTAE) en pacientes con asma con respecto a los sanos, pero no encontraron diferencias en la TAE plateau en los mismos pacientes. También fracasaron en encontrar una correlación entre la TAE plateau y la FeNO, resultados que concuerdan con los nuestros.

Los resultados de varios estudios realizados en asmáticos que miden la TAE plateau con el mismo termómetro que utilizamos en nuestro estudio (X-Halo) varían entre ellos. Así, Popov T et al ⁽⁵¹⁾ encontraron que la TAE plateau se incrementó en 14 pacientes con asma mal controlada y que estos valores disminuían después de que se iniciaba un tratamiento anti-inflamatorio. En otro estudio de grupo de García et al ⁽⁸⁵⁾, observaron en 100 pacientes, niveles más altos de TAE plateau en pacientes con un asma mal controlada en comparación con asmáticos bien controlados y sujetos sanos. En nuestro estudio, utilizando el mismo equipo, no confirmamos estos hallazgos y no observamos ninguna correlación entre la TAE plateau y los niveles de control del asma. Una explicación de las discrepancias de nuestros resultados con respecto a los otros dos estudios sería, la menor proporción de pacientes con asma mal controlada en nuestro estudio (37,69%), no siendo equitativo entre ambos grupos comparativos.

En nuestro estudio, tampoco hemos encontrado ninguna asociación entre los niveles de la TAE plateau y la gravedad de la obstrucción al flujo aéreo. Otros estudios han demostrado resultados discrepantes en esta asociación. Así, Peroni et al ⁽⁸⁶⁾ no encontraron ninguna correlación entre la TAE plateau de 50 niños con asma tratados con ICS después de la broncoconstricción inducida por el ejercicio, mientras que en los niños asmáticos no tratados con ICS encontraron un aumento en la TAE plateau tras disminuir el FEV1 después del mismo ejercicio. Svensson et al ⁽⁸⁷⁾ no encontraron cambios en la TAE plateau en pacientes con asma antes ni después de realizarle dos

pruebas de broncoconstricción (hiperventilación voluntaria eucápnica y de metacolina). Estas diferencias entre los estudios podrían explicarse por el efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides inhalados sobre la TAE. La mayoría de los pacientes incluidos en nuestro estudio estaban bajo dicho tratamiento.

La TAE se ha relacionado con la inflamación de las vías respiratorias y el flujo sanguíneo bronquial^(51,88). Sin embargo, en una muestra ampliamente caracterizada de pacientes con asma, nuestro estudio no pudo demostrar una correlación entre la TAE plateau y otros marcadores de inflamación bronquial. Esta discrepancia se ha observado en otros estudios. Así Paredi et al⁽⁸⁸⁾ en un grupo de 19 pacientes asmáticos, no encontró ninguna correlación entre los niveles de la FeNO y la iTAE. Tampoco Svensson et al⁽⁸⁷⁾ observaron ninguna asociación entre la FeNO y la TAE plateau en un grupo de 20 pacientes con asma leve. Sin embargo, a diferencia de Paredi et al⁽⁸⁸⁾, Piacentini et al⁽⁸⁹⁾ encontró que la TAE plateau se asoció con la FeNO (en 41 niños con asma alérgica) y con el porcentaje de eosinófilos en el esputo inducido (16 niños). Sin embargo, esta asociación se perdió cuando se utilizó el método de la TAE incremental (iTAE). En el esputo inducido de los 69 casos de nuestro estudio, se observó una correlación negativa entre la TAE plateau y el porcentaje de eosinófilos en el esputo. Una explicación para esta discrepancia podría ser que en nuestro estudio, se estudiaron tres fenotipos inflamatorios (paucigranulocítico, eosinofílico y neutrofílico) mientras que los otros autores estudiaron sólo fenotipos eosinofílicos. Asimismo dentro de los razonamientos que pudiesen explicar los diferentes resultados entre los estudios podrían ser, la variabilidad entre los métodos utilizados para medir la TAE, la falta de estandarización de estos métodos, las diferencias en las poblaciones de asma, el efecto de los tratamientos y la posibilidad de que los marcadores indirectos reflejen diferentes partes de la cascada inflamatoria.

Dentro de los posibles factores de confusión, valores más altos de la TAE han sido reportados en el sexo masculino, la edad más joven, la actividad física, el IMC y la más alta temperatura del aire ambiente^(69,90-91). En nuestro estudio, no se encontró correlación entre la TAE plateau y: la edad, el índice de masa corporal, la temperatura del aire ambiente, o la humedad, pero los hombres sí que mostraron valores de TAE plateau más altos que las mujeres. La falta de correlación entre la TAE plateau, la edad

y el IMC probablemente haya sido por la homogeneidad del grupo. La falta de correlación entre la TAE plateau y la temperatura del aire ambiente y la humedad probablemente haya sido a que estas variables fueron siempre estables y controladas en nuestro laboratorio (24 ± 1 °C, humedad relativa 40-50%).

Dentro de las limitaciones en nuestro estudio están: en primer lugar, no empleamos otros métodos de medición de la TAE como la iTAE o la TAE pico. En segundo lugar, a diferencia de algunos estudios, no se incluyeron niños con asma. A pesar de estas limitaciones, nuestro estudio tuvo varios puntos robustos, integra en una muestra de gran tamaño diferentes técnicas para evaluar distintos aspectos de la enfermedad, mientras que los otros estudios practicados se centran en aspectos más específicos o parciales. Además, todas las mediciones clínicas, funcionales e inflamatorias fueron realizadas el mismo día en todos los pacientes.

6.3 Estudio III: Discriminación de los fenotipos inflamatorios bronquiales de asma a través de la nariz electrónica

Los resultados de este estudio muestran que los diferentes fenotipos inflamatorios bronquiales de asma analizados según el esputo inducido, pueden ser fácilmente reconocidos por las huellas olfativas de una nariz electrónica.

Estudios anteriores sugieren que el análisis de los compuestos orgánicos volátiles (COV) de la nariz electrónica es prometedor como procedimiento preciso y no invasivo para el diagnóstico de diferentes enfermedades respiratorias. Así este dispositivo puede ayudar a discriminar asmáticos de controles sanos (100% de exactitud)⁽⁵²⁾, asma de EPOC (96% de precisión)⁽⁵⁴⁾, aumentar la eficacia para diagnosticar el asma a través de la determinación de la FeNO (95,8% de precisión)⁽⁹²⁾.

Nuestros resultados indican que el análisis de los COV a través de la nariz electrónica puede discriminar de forma razonable y no invasiva los fenotipos inflamatorios de las vías respiratorias en pacientes con asma. Estos resultados coinciden con algunos estudios. Por ejemplo, Ibrahim et al⁽⁵³⁾ a través de un espectrofotómetro de masas demostraron en un número más pequeño de sujetos (n = 18) la capacidad de distinguir un fenotipo de asma eosinofílica vs no eosinofílica con una precisión del 83% y para distinguir un fenotipo de asma neutrofílica de uno no

neutrofílica del 72% (no incluyeron pacientes con fenotipo paucigranulocítico). Más recientemente, Wagener et al ⁽⁹³⁾ utilizaron la nariz electrónica para discriminar en 27 pacientes, las huellas olfativas de asmáticos con fenotipo eosinofílico vs. no eosinofílico y obtuvieron una precisión del 85%, y una área ROC bajo la curva del 99% (IC del 95%: ,9752-1). Por último, van der Schee et al ⁽⁹⁴⁾ encontraron que los patrones de la nariz electrónica predecían la respuesta a los glucocorticoides en 25 pacientes de asma con mayor precisión (AUC = 0,883 ± 0,16, p = 0,008) que los recuentos de eosinófilos en el esputo inducido (0,610 ± 0,29, p = 0,441) y la determinación de la FeNO (0,545 ± 0,28, p = 0,751). Así estos resultados y los nuestros indican que el uso de la nariz electrónica es una técnica fácil de utilizar y que permite identificar de forma no invasiva fenotipos inflamatorios de asma en el ámbito clínico ⁽⁹⁵⁻⁹⁶⁾.

En capítulos anteriores se ha comentado la utilidad que tiene el esputo inducido en la práctica clínica, sin embargo al ser una técnica compleja, que consume tiempo, que requiere de un personal capacitado, los resultados de nuestro estudio apoyan que la nariz electrónica puede ser una alternativa sencilla para identificar fenotipos inflamatorios de las vías respiratorias en la práctica clínica habitual. Sin embargo hay que tener en cuenta algunas limitaciones de nuestro estudio. En primer lugar, fue un estudio en donde se analizó un número relativamente pequeño de pacientes en un solo centro, se deberían efectuar estudios multicéntricos de cohortes de asma más grandes. En segundo lugar, no se investigó la reproducibilidad de los resultados. Sin embargo, en los estudios anteriores y utilizando el mismo método y el mismo dispositivo han observado una buena reproducibilidad de los resultados ⁽⁵⁴⁾. En tercer lugar, el tabaquismo y el tratamiento con ICS pueden alterar los patrones de COV. No obstante, en nuestro estudio no hubo diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la proporción de fumadores o en cuanto a los pacientes que recibían altas dosis de ICS. Y en cuarto lugar, el análisis de nuestros datos se limitó a un enfoque discriminante que no investigó los compuestos específicos que forman el patrón de COV de la nariz electrónica, recientemente realizado por otro estudio ⁽⁵³⁾. Aun así los resultados de nuestro trabajo son prometedores y apoyarían el futuro uso de la nariz electrónica en un entorno clínico habitual como método no invasivo capaz de discriminar con fiabilidad los diferentes fenotipos inflamatorios de asma.

7. Conclusiones generales de los tres estudios

7.1. Existe un alto porcentaje de pacientes con asma que cursan con disociación entre los resultados de las mediciones de la FeNO y el recuento de eosinófilos en el esputo inducido. Estos grupos discordantes mostraron características clínicas e inflamatorias diferenciales.

7.2. No existe una correlación entre la temperatura del aire exhalado plateau y el grado de control y gravedad de la enfermedad y la obstrucción o inflamación bronquial. La TAE plateau no parece proporcionar una información clínica útil puntual para este tipo de pacientes.

7.3. El uso de la nariz electrónica en unas situaciones de práctica clínica habitual puede discriminar con fiabilidad los diferentes fenotipos inflamatorios bronquiales en pacientes con asma persistente.

8. Publicaciones

Compendio de publicaciones:

8.1 Estudio I: Astrid Crespo, Jordi Giner, Montserrat Torrejón, Alicia Belda, Eder Mateus, Carmen Granel, Alfons Torrego, David Ramos-Barbón and Vicente Plaza. **Clinical and Inflammatory Features of Asthma with Dissociation Between Fractional Exhaled Nitric Oxide and Eosinophils in Induced Sputum.** *J Asthma*. 2016 Jan 19:1-6. **Impact factor: 1.802. Q2 (Alergología, Inmunología y Neumología). Q1 (Medicina).**

Artículo con Copyright

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26785727>

8.2 Estudio II: Astrid Crespo, Jordi Giner, Alfons Torrego, Carmen Granel, Montserrat Torrejón, Alicia Belda, Eder Mateus, Vicente Plaza. **Usefulness of the Exhaled Breath Temperature Plateau in Asthma Patients.** *Respiration*. 2015;90(2):111-7. **Impact factor: 2,593. Q3.**

Artículo con Copyright

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26113222>

8.3 Estudio III: Vicente Plaza, **Astrid Crespo**, Jordi Giner, José Luis Merino, David Ramos-Barbón, Eder F. Mateus, Alfons Torrego, Borja G. Cosio, Alvar Agustí, and Oriol Sibila. **Inflammatory Asthma Phenotypes Discrimination by an Electronic Nose Breath Analyzer.** J Investig Allergol Clin Immunol. 2015;25(6):431-7. **Impact factor: 2,642. Q2.**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26817140>

ORIGINAL ARTICLE

Inflammatory Asthma Phenotype Discrimination Using an Electronic Nose Breath Analyzer

Plaza V¹, Crespo A^{1*}, Giner J¹, Merino JL², Ramos-Barbón D¹, Mateus EF¹, Torrego A¹, Cosio BG³, Agustí A⁴, Sibila O¹

¹Department of Respiratory Medicine, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau); Universitat Autònoma de Barcelona, Department of Medicine; Barcelona Respiratory Network (BRN), Barcelona, Spain

²Rflic group, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland

³Department of Respiratory Medicine, Hospital Son Espases, Palma de Mallorca; CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Spain

⁴Thorax Institute, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona; FISIB, CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES); Barcelona Respiratory Network (BRN), Barcelona, Spain

*This paper is part of the doctoral thesis of AC.

■ Abstract

Background and Objective: Patients with persistent asthma have different inflammatory phenotypes. The electronic nose is a new technology capable of distinguishing volatile organic compound (VOC) breath-prints in exhaled breath. The aim of the study was to investigate the capacity of electronic nose breath-print analysis to discriminate between different inflammatory asthma phenotypes (eosinophilic, neutrophilic, paucigranulocytic) determined by induced sputum in patients with persistent asthma.

Methods: Fifty-two patients with persistent asthma were consecutively included in a cross-sectional proof-of-concept study. Inflammatory asthma phenotypes (eosinophilic, neutrophilic and paucigranulocytic) were recognized by inflammatory cell counts in induced sputum. VOC breath-prints were analyzed using the electronic nose Cyranose 320 and assessed by discriminant analysis on principal component reduction, resulting in cross-validated accuracy values. Receiver operating characteristic curves (ROC) were calculated.

Results: VOC breath-prints were different in eosinophilic asthmatics compared with both neutrophilic asthmatics (accuracy 73%; $P= .008$; area under ROC, 0.92) and paucigranulocytic asthmatics (accuracy 74%; $P=.004$; area under ROC, 0.79). Likewise, neutrophilic and paucigranulocytic breath-prints were also different (accuracy 89%; $P=.001$; area under ROC, 0.88).

Conclusions: An electronic nose can discriminate inflammatory phenotypes in patients with persistent asthma in a regular clinical setting. ClinicalTrials.gov identifier: NCT02026336.

Key words: Asthma. Electronic nose. Inflammation. Volatile organic compounds.

■ Resumen

Antecedentes: Pacientes con asma persistente tienen diferentes fenotipos inflamatorios bronquiales. La nariz electrónica es una nueva tecnología capaz de distinguir compuestos orgánicos volátiles (VOCs), huellas olfatorias del aire exhalado. El objetivo de este estudio fue investigar la capacidad que tiene la nariz electrónica de discriminar las huellas olfatorias en los diferentes fenotipos bronquiales de asma determinados por el esputo inducido (eosinofílicos, neutrofilílicos, paucigranulocíticos) en pacientes con asma persistente.

Método: Cincuenta y dos pacientes con asma persistente fueron incluidos en un estudio transversal. Los fenotipos inflamatorios asmáticos fueron determinados a través de recuento de células inflamatorias del esputo inducido. Los VOCs fueron analizados a través de una nariz electrónica Cyranose 320TM y evaluados por un análisis de discriminación de componentes principales, resultando en valores de precisión con validación cruzada. Se calcularon las características operativas del receptor (ROC).

Resultados: Los VOCs de los asmáticos eosinofílicos fueron diferentes a los neutrofilílicos (precisión 73%; $p= 0.008$; área bajo ROC 0.92) y de los pacientes paucigranulocíticos (precisión 74%; $p= 0.004$; área bajo ROC 0.79). Del mismo modo, las huellas olfatorias entre los neutrofilílicos y paucigranulocíticos eran diferentes (precisión 89%; $p= 0.001$; área bajo ROC 0.88).

Conclusiones: La nariz electrónica puede discriminar los fenotipos inflamatorios bronquiales en los pacientes con asma persistente en un entorno clínico regular. ClinicalTrials.gov: NCT02026336.

Palabras clave: Asma. Nariz electrónica. Inflamación. Compuestos orgánicos volátiles.

Introduction

Chronic airway inflammation is a key pathogenic mechanism in asthma. Yet, there is significant variability in the inflammatory phenotype across individuals. In fact, several guidelines already recommend tailored management approaches for patients with different inflammatory phenotypes, especially those with severe, refractory asthma [1-2]. This is particularly relevant with the emergence of a variety of biological anti-inflammatory therapies targeting both eosinophilic [3-4] and noneosinophilic asthma phenotypes.

Two noninvasive methods are commonly used in clinical practice to assess airway inflammation in asthma: quantification of exhaled nitric oxide (FeNO) and analysis of induced sputum. Measuring FeNO is an inexpensive, simple technique that provides readily available readouts, but it is not informative of the specific inflammatory profile present. Induced sputum analysis can certainly assess the specific airway inflammatory phenotype present [5-6], but it is time-consuming, costly, and requires technical expertise. Furthermore, 10% of patients fail to provide adequate samples. Therefore, there is a lack of methods able to classify asthmatic individuals according to their airway inflammatory profile in an easy, cost-effective fashion suitable for generalized use in regular clinical practice.

The electronic nose (e-nose) is an emerging technology that detects volatile organic compounds (VOCs) in exhaled gas. It uses an array of sensors that react with different VOCs and generate a specific "breath-print" for each individual [7]. The exhaled gas contains a complex mix of VOCs derived from various metabolic and inflammatory pathways in the lung. Previous studies have shown that some respiratory diseases, including lung cancer, malignant mesothelioma, pulmonary arterial hypertension, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and asthma, are associated with specific breath-prints that can be detected by an e-nose [8-12]. Here we hypothesized that the breath-print of asthmatic individuals may reflect their airway inflammatory profile, and that the e-nose may therefore qualify as a novel tool of potential clinical value for the inflammatory phenotyping of asthma. Accordingly, this proof-of-concept study sought to use an e-nose to compare VOC profiles generated from different asthma inflammatory phenotypes.

Methods

Study Design and Participants

This was a cross-sectional study designed to analyze the concordance of sputum inflammatory phenotypes with e-nose

VOC profiles. Fifty-two adults with persistent asthma, as per the Global INitiative for Asthma (GINA) criteria [13], were consecutively enrolled from the outpatient clinic at the asthma unit of our institution, a tertiary referral university hospital, between January and December 2013. All the patients had a positive bronchodilator test or a daily peak expiratory flow variability greater than 20%, or a positive methacholine challenge test documented in their case history. Patients were excluded if they had a respiratory tract infection or asthma exacerbation within 30 days prior to inclusion or if they were receiving oral corticosteroids or immunosuppressive treatments. Smoker and ex-smokers were included. Patients who had stopped smoking more than 12 months earlier were considered ex-smokers. Only patients with good-quality sputum were selected.

Measurements

The tests were all performed during a single visit in the morning. Patients stopped their medications 10 hours before the visit. In the 3 hours before the visit, they rested, and did not smoke, eat, or drink. The following tests were performed in the order shown: 1) the asthma control test using the validated Spanish version [14], 2) allergy skin prick tests to usual local allergens [15], 3) FeNO testing, 4) e-nose VOC profiles, 5) sputum induction and processing, 6) forced spirometry, and 7) venipuncture for total serum IgE. FeNO levels were measured using a chemiluminescence analyzer (NO Vario Analyser, FILT GMBH) at a flow rate of 50 mL/s, and, following the recommendations of the American Thoracic Society and the European Respiratory Society [16], we used the mean of 3 measurements. For the e-nose VOC profiles, exhaled gas was collected as described before [8,10,17-18]. Briefly, patients breathed through a mouthpiece into a 2-way nonbreathing valve (Hans Rudolph 2700, Hans Rudolph) with an inspiratory VOC filter (Compact Air Plus, North) and an expiratory silica reservoir (replaced after each patient) to dry the expired air. Expiratory air was collected in a 10-L Tedlar bag that was flushed with ambient air after each use by filling and emptying the bag twice. After 10 minutes, which is the time needed to verify that all the sensors were within the reference range specified by the manufacturer, the bag was connected to the e-nose device (Cyranose 320, Smith Detections) and fitted with a 32-organic polymeric nano-composite sensor array for 5 minutes. Changes in the nano-sensor electrical resistance generated a breath-print VOC profile. The measurement is based on a resistance variation in each sensor when exposed to a VOC mixture. The differential responses across the array (resistance shifts) are presented as patterns and analyzed by pattern recognition algorithms [18]. All breath samples were collected in the same room. Sputum induction and processing

was performed as previously described [19-20]. Briefly, mucus plugs were manually selected and weighed, incubated (for 15 minutes at room temperature) in 4 times the weight (in mL) of the selected plug (in mg) in 0.1% dithiothreitol (DTT) (Calbiochem), washed with 4 times the plug weight (in mL) in Dulbecco's PBS, and gravity-filtered through a 41 μm -pore nylon net filter (Millipore). After DTT homogenization, each specimen was aliquoted into 2 parts of equal volume. Total cell counts were performed using a Neubauer hemocytometer. Visually identifiable squamous epithelial cells were not counted or included in the total cell count. Samples that did not produce adequate sputum cell numbers ($<1000 \times 10^6$ cell/g) were excluded. Cell viability was determined by light microscopic assessment using trypan blue exclusion staining. After centrifuging the cell preparation, we obtained cell pellet and supernatant. The cell pellet was used for the differential cell count (macrophages, eosinophils, neutrophils, lymphocytes, and bronchial epithelial cells) with Wright-Giemsa staining. Differential leukocyte analysis of nonsquamous cells (Diff-Quik stained) was performed on a minimum of 400 cells. Differential cell counts were expressed as a percentage of total non-squamous nucleated cells [19]. The inflammatory asthma phenotypes were classified as neutrophilic ($>61\%$ neutrophils), eosinophilic ($>3\%$ eosinophils), or paucigranulocytic ($<61\%$ neutrophils and $<3\%$ eosinophils) according to previous studies [21]. Forced spirometry (Datospir-500, Sibelmed SA) was performed according to the guidelines of the Spanish Respiratory Society (SEPAR) [22], using reference values from a Mediterranean population [23].

Data Analysis

Categorical variables are expressed as absolute and relative frequencies and quantitative variables as mean and

SD. Groups were compared using analysis of variance and the χ^2 or Fisher exact test as appropriate. A P value of less than .05 was considered statistically significant. Breath-print data were analyzed using a pattern-recognition application of the MATLAB software (v.R2012a), and were represented by logarithmic regression as single- or 2-dimensional graphs following previously published algorithms [10,17]. Raw data were first reduced by principal component analysis (PCA) to 3 principal factors. These PCA factors entered a univariate ANOVA followed by a post-hoc least significant difference test. Linear canonical discriminant analysis, using the PCA factors, was then performed to classify patients into categories. Based on the differentiating PCA factors, a discriminating function was calculated that best distinguished the different inflammatory phenotypes. The accuracy of the model is defined as the percentage of correctly classified patients using induced sputum results as the reference. It was obtained using the leave-one-out method [17]. In this method, the discriminant function is trained using all subjects minus one, and then the function is tested with the 4 samples (the PCA factors) from the "left-out" individual. If 3 of the samples are correctly allocated, the discriminant function is considered to be valid for this individual. The process is repeated for all individuals and results are used to calculate the cross-validated accuracy percentage value. Sensitivity, specificity, and positive predictive and negative predictive values were calculated for the 3 inflammatory phenotypes. A receiver operating characteristics (ROC) curve was generated using the results of the discriminant function and combining all the samples of 1 individual. If one tested individual (true 'class 1') has 3 samples allocated to 'class 1' by the identifier and 1 sample allocated to 'class 0', the true positive rate is considered to be 0.75. The area under the ROC curve (AUC) was calculated

Table 1. Demographic Characteristics of Patients Who Completed 3 Years of Follow-up

	Eosinophilic Phenotype (n=24)	Neutrophilic Phenotype (n=10)	Paucigranulocytic Phenotype (n=18)	P Value
Age, mean (SD), y	47.8 (16.4)	54.8 (18.0)	42.9 (10.6)	NS
Sex, % female	67	40	61	NS
BMI, mean (SD), kg/m ²	26.1 (4.3)	25.7 (4.0)	27.2 (6.8)	NS
Active smokers, %	12	10	5	NS
Ex-smokers, %	30	30	23	NS
IgE, mean (IQR), IU/mL	148 (404.6)	45.25 (100.7)	238.5 (565.58)	NS
Patients with positive skin prick test, %	71	60	83	NS
Patients with ACT ≥ 20 , %	58	60	78	NS
ACT score, mean (SD)	19.8 (4.4)	20.9 (5.9)	20.9 (4.5)	NS
FEV ₁ , mean (SD), % of reference values	86.9 (19.2)	78.8 (17.9)	89.9 (14.9)	NS
FEV ₁ /FVC, mean (SD)	69.4 (15.2)	65.5 (13.1)	71.5 (10.6)	NS
FeNO, median (IQR), ppb	32 (38.75)	25 (26)	21.5 (37.25)	NS
Patients with beclomethasone (or equivalent ICS) ≥ 800 $\mu\text{g}/\text{day}$, %	29	30	33	NS

Abbreviations: ACT, asthma control test; BMI, body mass index; FeNO, fractional exhaled nitric oxide; FEV₁, forced expiratory volume in the first second; FVC, forced vital capacity; ICS, inhaled corticosteroids; IQR, interquartile range; NS, nonsignificant.

using the pairs of X, Y values and a trapezoidal approximation for the space between points.

Ethics Statement

The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (18th World Medical Assembly, 1964) and was approved by the clinical research ethics committee at our institution (approval number, IIBSP/10/122/1161). The participants signed an informed consent form to participate in this study and all personal identification data were anonymized. ClinicalTrials.gov identifier: NCT02026336.

Results

Characterization of Participants

Table 1 presents the main demographic, clinical, and functional characteristics of the participants. According to the induced sputum results (Table 2), 24 patients (46%) had an eosinophilic phenotype, 10 (19%) a neutrophilic phenotype, and 18 (35%) a paucigranulocytic phenotype. Age, sex, body mass index (BMI), smoking status, serum IgE concentration, proportion of individuals positive to the standard skin prick test series, response to the asthma control test questionnaire, spirometry values, and FeNO or inhaled corticosteroid usage was similar in the 3 groups (Table 1).

Table 2. Inflammatory Cell Counts Observed in the 3 Inflammatory Groups

	Eosinophilic Phenotype (n=24)	Neutrophilic Phenotype (n=10)	Paucigranulocytic Phenotype (n=18)	P Value
Lymphocytes, mean (SD), %	0.8 (0.6)	0.9 (0.5)	1.0 (0.6)	0.516
Macrophages, mean (SD), %	56.4 (17.8)	19.2 (9.3)	61.1 (20.0)	<0.001
Eosinophils, mean (SD), %	13.2 (14.0)	1.3 (0.9)	0.9 (0.6)	<0.001
Neutrophils, mean (SD), %	29.4 (16.4)	77.3 (8.1)	36.5 (20.4)	<0.001
Squamous cell, median (IQR), %	7.21 (5.87)	3.17 (2.38)	4.53 (3.78)	0.064
Cell concentration, mean (SD), $\times 10^6$ cell/g	3.26 (2.16)	3.96 (1.72)	3.5 (1.74)	0.682

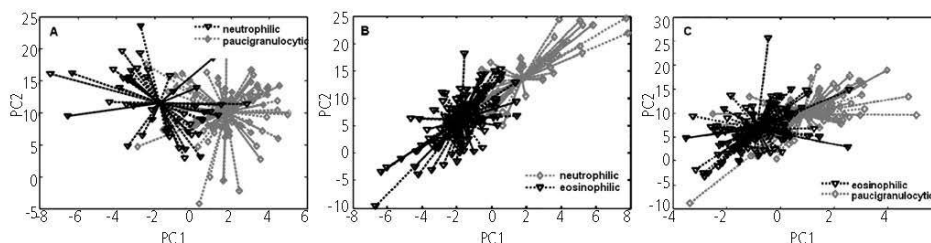


Figure. Comparison of e-nose breath-prints between asthma inflammatory phenotypes defined by differential leukocyte counts in induced sputum. The graphs depict 2-dimensional principal component analysis plots showing breath-print discrimination between patients with A) neutrophilic versus paucigranulocytic phenotypes (accuracy 89%; $P= .001$; AUROC, 0.88); B) neutrophilic versus eosinophilic phenotypes (accuracy, 73%; $P= .008$; AUROC, 0.92), and C) eosinophilic versus paucigranulocytic phenotypes (accuracy 74%; $P= .004$; AUROC, 0.79). Axes represent discriminative composite principal factors. Symbol legends indicate phenotype representation in each plot. There are 4 samples represented for each patient. AUROC indicates area under the receiver operator characteristics curve.

Breath-Print Analysis

PCA of the e-nose data showed that the breath-prints of the 3 inflammatory asthma phenotypes were different. As shown in Figure 1, plotted breath-prints from neutrophilic versus paucigranulocytic phenotypes were clearly distinct on visual assessment (panel A) and canonical discriminant analysis showed a cross-validated accuracy of 89% ($P= .001$). Likewise, the breath-prints of eosinophilic versus neutrophilic phenotypes (panel B), and eosinophilic versus paucigranulocytic (panel C), were also fairly distinguishable, with accuracy values of 73% ($P= .008$) and 74% ($P= .004$), respectively. Finally, a comparison of eosinophilic versus noneosinophilic asthmatics (i.e., neutrophilic plus paucigranulocytic phenotypes) showed a reduced but still significant cross-validated accuracy (61%, $P= .008$).

Table 3 presents the results of the ROC analysis, as well as the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values, and the AUC for the 3 breath-print comparisons of the 3 inflammatory asthma phenotypes studied.

Discussion

The results of the proof-of-concept study presented here show that different inflammatory asthma phenotypes based on induced sputum analysis can be readily recognized by their breath-prints using an e-nose device.

Table 3. Receiver Operating Characteristics Analyses for the Comparisons Between Breath-Prints of the 3 Asthma Inflammatory Phenotypes Studied

	Neutrophilic vs Paucigranulocytic Phenotype	Neutrophilic vs Eosinophilic Phenotype	Eosinophilic vs Paucigranulocytic Phenotype
Cross-validation accuracy, %	89 ($P=.001$)	73 ($P=.008$)	74 ($P=.004$)
Sensitivity	0.94	0.6	0.55
Specificity	0.80	0.79	0.87
Positive predictive value	0.89	0.54	0.61
Negative predictive value	0.72	0.83	0.68
Area under the receiver operating characteristic curve	0.88	0.92	0.79

Prior studies provided evidence supporting the use of the e-nose to aid in the diagnosis of asthma by discriminating asthmatics from healthy controls (100% accuracy) [17], asthma from COPD (96% accuracy) [10], and asthma with fixed airflow obstruction from COPD (88% accuracy) [24]. It has also been seen to be more accurate than FeNO measurements in this diagnostic setting, with an accuracy of 95.8% [25]. Overall, these previous reports suggest that e-nose VOC analysis holds promise as an accurate, noninvasive procedure for the diagnosis of different respiratory diseases, and may potentially serve to discriminate between different airway inflammatory phenotypes [26].

Our results indicate that e-nose VOC analysis can reliably discriminate airway inflammatory phenotypes in asthma patients with similar clinical manifestations. This observation is in line with some previous reports. For instance, Ibrahim et al [27] used gas chromatography-mass spectrometry in a smaller number of patients ($n=18$) and reported an accuracy of 83% for distinguishing eosinophilic from noneosinophilic asthma phenotypes and of 72% for separating neutrophilic from non-neutrophilic phenotypes; it should be noted, however, that paucigranulocytic patients were not included. More recently, Wagener et al [28] used the e-nose to discriminate breath-prints from 27 patients with eosinophilic versus noneosinophilic asthma with an accuracy of 85% and an AUC of 99% (95% CI, 0.9752-1). Finally, van der Schee et al [29] found that e-nose patterns predicted response to corticosteroids in 25 asthma patients with greater accuracy (mean [SD] AUC, 0.883 [0.16]; $P=.008$) than sputum eosinophil counts (0.610 [0.29]; $P=.441$) or FeNO measurements (0.545 [0.28]; $P=.751$). All in all, these and our results indicate that the e-nose is a simple, easy-to-use technology that can identify inflammatory asthma phenotypes in the clinical setting, as has already been suggested for COPD [30-31].

The identification of specific immunological pathways [1], now termed endotypes [32], is particularly relevant in the management of patients with difficult-to-treat asthma [6] because it can guide personalized treatment [33]. For instance, several recent studies [7] and systematic reviews [5] have shown that therapeutic strategies based on eosinophilic counts in induced sputum were highly effective in preventing exacerbations in difficult-to-treat asthma. However, the analysis of induced sputum is not currently recommended in clinical practice guidelines [13] because it is a complex,

time-consuming technique and requires trained personnel. Additionally, assessable samples are not always obtained, and special care must be taken in patients with uncontrolled or severe asthma. Our data support that the theory that the e-nose may be a simple alternative to identify airway inflammatory phenotypes in clinical practice.

The inclusion of phenotypically well-characterized asthma patients (eosinophilic, neutrophilic, and paucigranulocytic) and the use of an e-nose in a regular clinical practice setting are clear strengths of our study. It has, however, some limitations. First, because it was a proof-of-concept study, we investigated a relatively small number of patients in a single center. Further investigations are needed in larger, multicenter asthma cohorts. Second, we did not investigate the reproducibility of our results. Nevertheless, previous studies using the same methodology have reported good reproducibility with the same e-nose device [10]. Third, smoking and inhaled corticosteroid treatment may theoretically alter VOC patterns. However, in our study there were no differences between groups regarding the proportion of smokers or patients receiving high doses of inhaled corticosteroids. In addition, the e-nose was able to differentiate VOC patterns despite these potential confounding factors. And fourth, unlike a recent study [27], we did not investigate which VOC species formed the e-nose pattern, and our data analysis was limited to a discriminant analysis approach. Future studies may use more advanced data analysis techniques suitable for the e-nose data complexity, such as Support Vector Machines [34] or Back Propagation Neural Networks [35] to immediately differentiate between different asthma phenotypes in a clinical setting.

The use of an e-nose in a regular clinical setting can reliably discriminate different inflammatory asthma phenotypes in patients with persistent asthma.

Acknowledgments

We gratefully thank all study participants. We also thank Montserrat Torrejón, Jesús Bellido-Casado, and José Luis Valera for their technical support.

Funding

This study was funded by a grant from the Spanish Respiratory Society (SEPAR) 2010.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- GEMA. Spanish guideline on the management of asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20 Suppl 1:1–59.
- British guideline on the management of asthma. British Thoracic Society, Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Available on <http://www.sign.ac.uk/pdf/sign101.pdf>. 2014;
- Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, Keene ON, Ortega H, Chanez P. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2012;380(9842):651–9.
- Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, Wang L, Kirkeseli S, Rocklin R, Bock B, Hamilton J, Ming JE, Radin A, Stahl N, Yancopoulos GD, Graham N, Pirozzi G. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med* 2013;368(26):2455–66.
- Petsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ, Li AM, Turner C, Kynaston JA, Chang AB. A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax*.; 2012;67(3):199–208.
- 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.
- Broza YY, Haick H. Nanomaterial-based sensors for detection of disease by volatile organic compounds. *Nanomedicine*. 2013;8(5):785–806.
- Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MP, Spanevello A, Carratu P, Resta O, Rabe KF, Sterk PJ. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer*. 2009;64(2):166–70.
- Dragonieri S, van der Schee MP, Massaro T, Schiavulli N, Brinkman P, Pinca A, Carratú P, Spanevello A, Resta O, Musti M, Sterk PJ. An electronic nose distinguishes exhaled breath of patients with Malignant Pleural Mesothelioma from controls. *Lung Cancer*. 2012;75(3):326–31.
- Fens N, Zwinderman AH, van der Schee MP, de Nijs SB, Dijkers E, Roldaan AC, Cheung D, Bel EH, Sterk PJ. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(11):1076–82.
- Peled N, Hakim M, Bunn PA, Miller YE, Kennedy TC, Mattei J, Mitchell JD, Hirsch FR, Haick H. Non-Invasive Breath Analysis of Pulmonary Nodules. *J Thorac Oncol*. 2012;7(10):1528–33.
- Cohen-Kaminsky S, Nakhleh M, Perros F, Montani D, Girerd B, Garcia G, Simonneau G, Haick H, Humbert M. A proof of concept for the detection and classification of pulmonary arterial hypertension through breath analysis with a sensor array. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(6):756–9.
- GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma. 2014. Available on <http://www.ginasthma.org/>.
- Picado C, Badiola C, Perulero N, Sastre J, Olaguibel JM, Lopez Vina A, Vega JM; Covalair Investigator Group. Validation of the Spanish version of the Asthma Control Questionnaire. *Clin Ther*. 2008;30(10):1918–31.
- Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R, Sicherer S, Golden DB, Khan DA, Nicklas RA, Portnoy JM, Blessing-Moore J, Cox L, Lang DM, Oppenheimer J, Randolph CC, Schuller DE, Tilles SA, Wallace DV, Levetin E, Weber R. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;100(3 Suppl 3):S1–148.
- ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(8):912–30.
- Dragonieri S, Schot R, Mertens BJ, Le Cessie S, Gauw SA, Spanevello A, Resta O, Willard NP, Vink TJ, Rabe KF, Bel EH, Sterk PJ. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):856–62.
- Sibila O, Garcia-Bellmunt L, Giner J, Merino JL, Suarez-Cuartin G, Torrego A, Solanes I, Castillo D, Valera JL, Cosio BG, Plaza V, Agusti A. Identification of airway bacterial colonization by an electronic nose in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respir Med*. 2014;108(11):1608–14.
- 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(2 Pt 1):475–8.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47(1):25–9.
- Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(5):1043–4.
- Sanchis J, Casan P, Castillo J, González N, Palenciano L, Roca J. Normativa para la práctica de la espirometría forzada. *Arch Bronconeumol*. 1989;25:132.
- Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisin R, Casan P, Sans S. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir*; 1986;22(3):217–24.
- Fens N, Roldaan AC, van der Schee MP, Boksem RJ, Zwinderman AH, Bel EH, Sterk PJ. External validation of exhaled breath profiling using an electronic nose in the discrimination of asthma with fixed airways obstruction and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(10):1371–8.
- Montuschi P, Santonico M, Mondino C, Pennazza G, Mantini G, Martinelli E, Capuano R, Ciabattini G, Paolesse R, Di Natale C, Barnes PJ, D'Amico A. Diagnostic performance of an electronic nose, fractional exhaled nitric oxide, and lung function testing in asthma. *Chest*. 2010;137(4):790–6.
- Fens N, van der Schee MP, Brinkman P, Sterk PJ. Exhaled breath analysis by electronic nose in airways disease. Established issues and key questions. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(7):705–15.
- Ibrahim B, Basanta M, Cadden P, Singh D, Douce D, Woodcock A, Fowler SJ. Non-invasive phenotyping using exhaled volatile organic compounds in asthma. *Thorax*. 2011;66(9):804–9.
- Wagener A, Brinkman P, Zwinderman A, D'Amico A, Pennazza G, Santonico M. Exhaled Breath Profiling And Eosinophilic Airway Inflammation In Asthma - Results Of A Pilot Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;A2392.
- Van der Schee MP, Palmay R, Cowan JO, Taylor DR. Predicting steroid responsiveness in patients with asthma using exhaled breath profiling. *Clin Exp Allergy* 2013;43(11):1217–25.

30. Fens N, de Nijs SB, Peters S, Dekker T, Knobel HH, Vink TJ, Willard NP, Zwinderman AH, Krouwels FH, Janssen HG, Lutter R, Sterk PJ. Exhaled air molecular profiling in relation to inflammatory subtype and activity in COPD. *Eur Respir J*; 2011;38(6):1301-9.
31. Basanta M, Ibrahim B, Dockry R, Douce D, Morris M, Singh D, Woodcock A, Fowler SJ. Exhaled volatile organic compounds for phenotyping chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study. *Respir Res*. 2012;13:72.
32. Lotvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, Lemanske RF Jr, Wardlaw AJ, Wenzel SE, Greenberger PA. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(2):355-60.
33. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, Adcock IM, Bateman ED, Bel EH, Bleecker ER, Boulet LP, Brightling C, Chané P, Dahlen SE, Djukanovic R, Frey U, Gaga M, Gibson P, Hamid Q, Jajour NN, Mauad T, Sorkness RL, Teague WG. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 2014;43(2):343-73.
34. Pardo M, Sberveglieri G. Classification of electronic nose data with support vector machines. *Sensors Actuators B Chem*. 2005;107(2):730-7.
35. Kermani BG, Schiffman SS, Nagle HT. Using neural networks and genetic algorithms to enhance performance in an electronic nose. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1999;46(4):429-39.

■ *Manuscript received March 17, 2015; accepted for publication, June 19, 2015.*

■ **Vicente Plaza**

Servei de Pneumologia
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
C/ Sant Antoni M^a. Claret, 167
08025 Barcelona, Spain
E-mail: vplaza@santpau.cat

9. Bibliografía

1. Plaza Moral V. GEMA (4.0). Guidelines for Asthma Management. Arch Bronconeumol. 2015;51 Suppl 1:2-54. doi: 10.1016/S0300-2896(15)32812-X. Epub 2015 Nov 30. English, <http://www.gemasma.com>
2. GINA. Global strategy for asthma management and prevention, global initiative for asthma (GINA). Disponible en <http://Www.ginasthma.org/>.2012.
3. BTS. British Thoracic Society, Scottish intercollegiate guidelines network. British guideline on the management of asthma. Disponible en <http://www.sign.ac.uk/pdf/sign101.pdf>. 2012
4. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. Thorax 1997;52:498-501.
5. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, 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;154:308-317.
6. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. Eur Respir J 2002; 20:1s-52s.
7. Kips JC, Peleman RA, Pauwels RA. Methods of examining induced sputum: do differences matter? Eur Respir J 1998;11:529-533.
8. 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; 161:475-478.
9. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, et al. Induced sputum cellularity: reference values and distribution in normal volunteers. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1172-74.

10. Thomas RA, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wardlaw AJ, et al. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest* 2004;126:1811-1814.
11. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992 Jan;47(1):25-9.
12. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanović R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:3s-8s.
13. Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, Djukanović R, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep; 37:9s-18s.
14. 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 hybridisation. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:19s-23s.
15. Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, Kips JC, Inman MD, Louis R, et al. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:40s-43s.
16. Gibson PG, Grootendor DC, Henry RL, Pin I, Ryttila PH, Wark P, et al. Sputum induction in children. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep; 37:44s-46s.
17. Kips JC, Inman MD, Jayaram L, Bel EH, Parameswaran K, Pizzichini MM, et al. The use of induced sputum in clinical trials. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep; 37:47s-50s.
18. Vignola AM, Rennar SI, Hargreave FE, Fah JV, Bonsignore MR, Djukanović R, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing. Future directions. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep; 37:51s-55s.
19. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Feb;155(2):449-53.

20. Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J*. 2000 Jul; 16(1):150-8.
21. Belda J. La inflamación en el asma: aspectos diagnósticos y marcadores de la evolución. *Arch Bronconeumol* 2004;40:23-26.
22. Berlyne GS, Efthimiadis A, Hussack P, Groves D, Dolovich J, Hargreave FE. Sputum in asthma: color versus cell counts. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jan;105(1 Pt 1):182-3.
23. "Manual del esputo inducido". GlaxoSmithKline S.A. 2014. Capítulo 9. Valores de referencia e interpretación.
24. Woltmann G, Ward RJ, Symon FA, Rew DA, Pavord ID, Wardlaw AJ. Objective quantitative analysis of eosinophils and bronchial epithelial cells in induced sputum by laser scanning cytometry. *Thorax*. 1999 Feb; 54(2):124-30.
25. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Nov;154(5):1505-10.
26. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanovic R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):9-16.
27. Al-Samri MT, Benedetti A, Prefontaine D, Olivenstein R, Lemiere C, Nair P, et al. Variability of sputum inflammatory cells in asthmatic patients receiving corticosteroid therapy: A prospective study using multiple samples. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1161-3.
28. Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. *Thorax*. 2012;67(8):675-81.
29. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-765.
30. Lex C, Ferreira F, Zacharasiewicz A, Nicholson AG, Haslam PL, Wilson NM, et al. Airway eosinophilia in children with severe asthma: predictive values of non-invasive tests. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Dec 15;174(12):1286-91.

31. Lim S, Jatakanon A, Meah S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma. *Thorax*. 2000 Mar;55(3):184-8.
32. Schleich FN, Seidel L, Sele J, Manise M, Quaedvlieg V, Michils A, et al. Exhaled nitric oxide thresholds associated with a sputum eosinophil count $\geq 3\%$ in a cohort of unselected patients with asthma. *Thorax*. 2010 Dec;65(12):1039-44.
33. Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005 Sep;35(9):1175-9.
34. American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 912-30.
35. Fortuna AM, Feixas T, Casan P. Determinación del óxido nítrico en aire espirado mediante un equipo portátil en población sana. *Arch Bronconeumol* 2007; 43 (3):176-9.
36. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol*. 1998 Aug;85(2):653-66.
37. Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, Flannery EM, Hancox RJ, McLachlan CR, et al. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Sep. 1;164(5):738-43.
38. Gratziou C, Lignos M, Dassiou M, Roussos C. Influence of atopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. *Eur Respir J*. 1999 Oct;14(4):897-901.
39. Jatakanon A, Kharitonov S, Lim S, Barnes PJ. Effect of differing doses of inhaled budesonide on markers of airway inflammation in patients with mild asthma. *Thorax*. 1999 Feb;54(2):108-14.
40. Kharitonov SA, Donnelly LE, Montuschi P, Corradi M, Collins JV, Barnes PJ. Dose-dependent onset and cessation of action of inhaled budesonide on exhaled nitric oxide and symptoms in mild asthma. *Thorax*. 2002 Oct;57(10):889-96.

-
41. Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Aug;152(2):609-12.
 42. Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, Lissner L, Bake B, Torén K. Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest*. 2006 Nov;130(5):1319-25.
 43. Jilma B, Kastner J, Mensik C, Vondrovec B, Hildebrandt J, Krejcy K, et al. Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. *Life Sci*. 1996;58(6):469-76.
 44. Kharitonov SA, Logan-Sinclair RB, Busset CM, Shinebourne EA. Peak expiratory nitric oxide differences in men and women: relation to the menstrual cycle. *Br Heart J*. 1994 Sep; 72(3):243-5.
 45. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med* 2011 Sep 1;184(5):602-15.
 46. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005 Sep;26(3):523-48.
 47. Izquierdo-García JL, Peces-Barba G, Heili S, Díaz R, Want E, Ruiz-Cabello J. Is NMR-based metabolomic analysis of exhaled breath condensate accurate? *Eur Respir J*. 2011 Feb; 37(2):468-70.
 48. Paredi P, Kharitonov, Barnes P. Faster rise of exhaled breath temperature in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002, 165,2:181-184.
 49. Piacentini GL, Bodini A, Peroni D, Ressa M, Costella S, Boner AL. Exhaled air temperature and eosinophil airway inflammation in allergic asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:202-4.

50. Piacentini GL, Peroni D, Crestani E, Zardini F, Bodini A, Costella S, et al. Exhaled air temperature in asthma: methods and relationship with markers of disease. *Clinical and Experimental Allergy*, 2007, 37, 415-419.
51. Popov TA, Dunev S, Kralimarkova TZ, Kraeva S, DuBuske LM. Evaluation of a simple, potentially individual device for exhaled breath temperature measurement. *Respir Med* 2007; 101: 2044-50.
52. Dragonieri S, Schot R, Mertens BJ, Le Cessie S, Gauw SA, Spanevello A, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Oct;120(4):856-62. Epub 2007 Jul 20.
53. Ibrahim B, Basanta M, Cadden P, Singh D, Douce D, Woodcock A, et al. Non-invasive phenotyping using exhaled volatile organic compounds in asthma. *Thorax*. 2011 Sep;66(9):804-9.
54. Fens N, Zwinderman AH, van der Schee MP, de Nijs SB, Dijkers E, Roldaan AC, et al. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Dec 1;180(11):1076-82.
55. Montuschi P, Santonico M, Mondino C, Pennazza G, Mantini G, Martinelli E, et al. Diagnostic performance of an electronic nose, fractional exhaled nitric oxide, and lung function testing in asthma. *Chest*. 2010 Apr;137(4):790-6.
56. Timms C, Thomas PS, Yates DH. Detection of gastro-oesophageal reflux disease (GORD) in patients with obstructive lung disease using exhaled breath profiling. *J Breath Res*. 2012 Mar;6(1):016003.
57. Dragonieri S, van der Schee MP, Massaro T, Schiavulli N, Brinkman P, Pinca A, et al. An electronic nose distinguishes exhaled breath of patients with Malignant Pleural Mesothelioma from controls. *PJ. Lung Cancer*. 2012 Mar;75(3):326-31.
58. Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MP, Spanevello A, Carratú P, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *PJ. Lung Cancer*. 2009 May;64(2):166-70.
59. Lazar Z, Fens N, van der Maten J, van der Schee MP, Wagener AH, de Nijs SB, et al. Electronic nose breath prints are independent of acute changes in airway calibre in asthma. *Sensors (Basel)*. 2010;10(10):9127-38.

-
60. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet*. 1999;353(9171):2213-4.
61. 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(12):1043-9.
62. Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(2):148-55.
63. Iwamoto H, Yokoyama A, Shiota N, Shoda H, Haruta Y, Hattori N, et al. Tiotropium bromide is effective for severe asthma with noneosinophilic phenotype. *Eur Respir J*. 2008;31(6):1379-80.
64. Magnussen H, Holz O, Sterk PJ, Hargreave FE. Non-invasive methods to measure airway inflammation: future considerations. *Eur Respir J* 2000; 16:1175–1179.
65. García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, del Campo F, Gáldiz JB, et al. Normativa SEPAR. Espirometría. [Article in Spanish]. *Arch Bronconeumol*. 2013;49: 338-401.
66. Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986;22: 217-224.
67. Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R, et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;100 (3 Suppl 3): S1-S148.
68. Vega JM, Badia X, Badiola C, López-Viña A, Olaguíbel JM, Picado C, et al. Validation of the Spanish version of the asthma control test (ACT). *J Asthma*. 2007;44: 867-872.
69. Logie KM, Kusel MM, Sly PD, Hall GL: Exhaled breath temperature in healthy children is influenced by room temperature and lung volume. *Pediatr Pulmonol* 2011; 46: 1062– 1068

-
70. Sibila O, Garcia-Bellmunt L, Giner J, Merino JL, Suarez-Cuartin G, Torrego A, et al. Identification of airway bacterial colonization by an electronic nose in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respir Med*, Nov;108(11):1608-14.
 71. Strunk RC, Szeffler SJ, Phillips BR, Zeiger RS, Chinchilli VM, Larsen G, et al. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Nov;112(5):883-92.
 72. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax*. 1998 Feb;53(2):91-5.
 73. 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 Jun; 13(6):1391-5.
 74. Payne DN, 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;164:1376-1381
 75. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, Vicentini L, Mazzi P, Sperandio S, et al. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J*. 1999 Jun;13(6):1386-90.
 76. Warke TJ, Fitch PS, Brown V, Taylor R, Lyons JD, Ennis M, et al. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002;57:383-387
 77. Berry M, Hargadon B, Morgan A, Shelley M, Richter J, Shaw D, et al. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. *Eur Respir J*. 2005 Jun;25(6):986-91.
 78. Obata H, Dittrick M, Chan H, Chan-Yeung M. Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthma reaction in patients with western red cedar asthma. *Eur Respir J*. 1999;13: 489-495.

-
79. Malerba M, Ragnoli B, Radaeli A, Tantucci C. (Chest 2008) Usefulness of exhaled nitric oxide and sputum eosinophils in the long-term control of eosinophilic asthma. *Chest*. 2008 Oct;134(4):733-9. doi: 10.1378/chest.08-0763.
 80. Taylor DR. Advances in the clinical application of exhaled nitric oxide measurements. *J Breath Res*. 2012;6 047102.
 81. Brusselle GG, Maes T, Bracke KR. Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nat Med*. 2013;19: 977-979.
 82. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012;18: 716-725. doi: 10.1038/nm.2678.
 83. Cordeiro D, Rudolphus A, Snoey E, Braunstahl GJ. Utility of nitric oxide for the diagnosis of asthma in an allergy clinic population. *Allergy Asthma Proc*. 2011 Mar- Apr;32(2):119-26
 84. Gupta N, Goel N, Kumar R. Correlation of exhaled nitric oxide, nasal nitric oxide and atopic status: A cross-sectional study in bronchial asthma and allergic rhinitis. *Lung India*. 2014 Oct;31(4):342-7.
 85. García G, Bergna M, Uribe E, Yañez A, Soriano JB. Increased exhaled breath temperature in subjects with uncontrolled asthma. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; Jul;17(7):969-72.
 86. Peroni DG, Chinellato I, Piazza M, Zardini F, Bodini A, Olivieri F, et al. Exhaled breath temperature and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children. *Pediatr Pulmonol* 2012; Mar;47(3):240-4.
 87. Svensson H, Bjermer L, Tufvesson E. Exhaled breath temperature in asthmatics and controls after eucapnic voluntary hyperventilation and a methacholine challenge test. *Respiration* 2014;87(2):149-57.
 88. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes P. Correlation of exhaled breath temperature with bronchial blood flow in asthma. *Respiratory Research* 2005;6:15.

-
89. Piacentini GL, Bodini A, Zerman L, Costella S, Zanolla L, Peroni DG, et al. Relationship between exhaled air temperature and exhaled nitric oxide in childhood asthma. *Eur Respir J* 2002; 20: 108-11.
 90. Svensson H, Nilsson D, Bjermer L, Tufvesson E. Exhaled Breath Temperature Increases after Exercise in Asthmatics and Controls. *Respiration* 2012;84:283–290
 91. Tavares B, Goncalves I, Gomes S, Jacinto T: Reference values for exhaled breath temperature in healthy subjects aged 17 to 25 years old. *Eur Resp J* 2012; (suppl 56):3204.
 92. Fens N, Roldaan AC, van der Schee MP, Boksem RJ, Zwinderman AH, Bel EH, et al. External validation of exhaled breath profiling using an electronic nose in the discrimination of asthma with fixed airways obstruction and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy*. 2011 Oct;41(10):1371–8.
 93. Wagener A, Brinkman P, Zwinderman A, D'Amico A, Pennazza G, Santonico M. Exhaled Breath Profiling And Eosinophilic Airway Inflammation In Asthma - Results Of A Pilot Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;A2392.
 94. Van der Schee MP, Palmay R, Cowan JO, Taylor DR. Predicting steroid responsiveness in patients with asthma using exhaled breath profiling. *Clin Exp Allergy* 2013 Nov;43(11):1217-25.
 95. Fens N, de Nijs SB, Peters S, Dekker T, Knobel HH, Vink TJ, et al. Exhaled air molecular profiling in relation to inflammatory subtype and activity in COPD. *Eur Respir J* 2011 Dec;38(6):1301-9.
 96. Basanta M, Ibrahim B, Dockry R, Douce D, Morris M, Singh D, et al. Exhaled volatile organic compounds for phenotyping chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study. *Respir Res*. 2012 Aug 23;13:72.

10. Anexos

10.1. Otras publicaciones en relación con la temática de la tesis

10.1.1. Suárez-Cuartín G, **Crespo A**, Mateus E, Torrejón M, Giner J, Belda A, Ramos-Barbón D, Torrego A, Plaza V. **Variability in Asthma Inflammatory Phenotype in Induced Sputum. Frequency and Causes.** Arch Bronconeumol. 2016 Feb;52(2):76-81. Impact factor: 1.823. Q4.

10.1.2. Barril S, Sebastián L, Cotta G, **Crespo A**, Mateus E, Torrejón M, Ramos-Barbón D, Plaza V. **Utility of Induced Sputum in Routine Clinical Practice.** Arch Bronconeumol. 2015 Dec 2. pii: S0300-2896(15)00445-7. doi: 10.1016/j.arbres.2015.10.002. Impact factor: 1.823. Q4

10.1.3. S. Vidal, J Bellido, C. Granel, **A Crespo**, V. Plaza, C. Juárez. **Flow cytometry analysis of leukocytes in induced sputum from asthmatic patients.** Immunobiology 2011 Dec 2. Impact factor: 4.114. Q2.

10.1.4. Artículo especial: **esputo inducido.** **A. Crespo.** Revista espacio asma. Mayo 2016.

10.1.5. CAPÍTULO: **MEDIDAS NO INVASIVAS DE LA INFLAMACIÓN EN EL ASMA DE CONTROL DIFÍCIL.** Del libro titulado: Asma grave: Evidencias y carencias. Viguera Editores. **Astrid Crespo**, Vicente Plaza. Octubre 2013.

10.1.6. CAPÍTULOS del libro: **“Manual del esputo inducido”.** **A. Crespo.** GlaxoSmithKline S.A. 2014.

- 8. Calidad y viabilidad de la muestra.
- 9. Valores de referencia e interpretación.
- Atlas fotográfico.

10.2 Actividad científica generada en relación con la temática de la tesis

10.2.1. CORRELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE LA MICROSCOPIA ÓPTICA Y DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL RECUENTO DE LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS DEL ESPUTO INDUCIDO. INFLUENCIA DE LA CALIDAD DE LA MUESTRA. Astrid Crespo, Eder Mateus, Montserrat Torrejón, Jordi Giner, Alicia Belda, Lorena Soto, Silvia Vidal, David Ramos, Alfons Torrego, Cándido Juárez, Vicente Plaza.

-XXXII Diada Pneumològica. Manresa. 4 i 5 d'abril de 2014. Món St Benet, Sant Fruitós de Bages.

-47º Congreso Nacional SEPAR. Bilbao 2014.

10.2.2. UTILIDAD DEL ESPUTO INDUCIDO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA HABITUAL EN UN SERVICIO DE NEUMOLOGÍA DE UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL ASISTENCIAL. L. Sebastian, S. Barril, G. Cotta, A. Crespo, E. Mateus, A. Belda, D. Ramos, V. Plaza.

-XXXII Diada Pneumològica. Manresa. 4 i 5 d'abril de 2014. Món St Benet, Sant Fruitós de Bages.

-47º Congreso Nacional SEPAR. Bilbao 2014.

10.2.3. VARIABILIDAD DEL FENOTIPO INFLAMATORIO DEL ASMA BRONQUIAL EN EL ESPUTO INDUCIDO. Guillermo Suárez Cuartín, Astrid Crespo, Eder Mateus, Montserrat Torrejón, Jordi Giner, Alicia Belda, David Ramos, Vicente Plaza.

-XXXII Diada Pneumològica. Manresa. 4 i 5 d'abril de 2014. Món St Benet, Sant Fruitós de Bages.

-47º Congreso Nacional SEPAR. Bilbao 2014.

10.2.4. CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-FUNCIONAL DE LOS FENOTIPOS INFLAMATORIOS DE LOS PACIENTES ASMÁTICOS. Helena Sintés, Astrid Crespo, Eder Mateus, Montserrat Torrejón, Alicia Belda, Lorena Soto, Vicente Plaza.

-XXXII Diada Pneumològica. Manresa. 4 i 5 d'abril de 2014. Món St Benet, Sant Fruitós de Bages.

-47º Congreso Nacional SEPAR. Bilbao 2014.

10.2.5. DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN EXHALADA DE ÓXIDO NÍTRICO NASAL.

Jordi Giner, Teresa Garriga, Lorena Soto, Josep M^a Montserrat, Jossep R Gras, **Astrid Crespo**, Vicente Plaza.

-47º Congreso Nacional SEPAR. Bilbao 2014.

10.2.6. EFICACIA DE LA NARIZ ELECTRÓNICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HIPERRESPUESTA BRONQUIAL ASMÁTICA.

Jordi Giner, **Astrid Crespo**, José Luis Merino, Patricia Peñacoba, Lorena Soto, Alfons Torrego, Oriol Sibila, Vicente Plaza.

-47º Congreso Nacional SEPAR. Bilbao 2014.

10.2.7. COMPARACIÓN DE LA MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA DEL AIRE EXHALADO CON TRES MÉTODOS DIFERENTES.

Jordi Giner, Montserrat torrejón, **Astrid Crespo**, Lorena Soto, Alfons Torrego, Vicente Plaza.

-47º Congreso Nacional SEPAR. Bilbao 2014.

10.2.8. RELACIÓN ENTRE LA FRACCIÓN EXHALADA DEL ÓXIDO NÍTRICO Y EL RECUENTO DE EOSINÓFILOS EN EL ESPUTO INDUCIDO DE PACIENTES ASMÁTICOS.

M Torrejón, J Giner, E Mateus, **A Crespo**, T Garriga, A Belda, C Granel, V Plaza. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

-46 Congreso Nacional SEPAR 2013. Barcelona. Del 14 al 16 de Junio.

10.2.9. DISCRIMINACIÓN DEL FENOTIPO INFLAMATORIO DEL ASMA MEDIANTE LA MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA DEL AIRE EXHALADO.

J Giner, **A Crespo**, E Mateus, M Torrejón, A Belda, A Torrego, T Garriga, C Granel, V Plaza.

-XXXI Diada Pneumològica. Sitges, 12 i 13 d'abril de 2013. Hotel Meliá Sitges. Premio a la mejor comunicación oral en enfermería.

-46 Congreso Nacional SEPAR 2013. Barcelona. Del 14 al 16 de Junio.

10.2.10. DISCRIMINACIÓN DEL FENOTIPO INFLAMATORIO BRONQUIAL DE PACIENTES ASMÁTICOS MEDIANTE EL USO DE LA NARIZ ELECTRÓNICA. Astrid Crespo, Jordi Giner, Oriol Sibila, José Luis Merino, Patricia Peñacoba, Eder Mateus, Montserrat Torrejón, Alicia Belda, Teresa Garriga, Carmen Granel, Vicente Plaza.

-**XXXI Diada Pneumològica.** Sitges, 12 i 13 d'abril de 2013. Hotel Meliá Sitges.

-**46 Congreso Nacional SEPAR 2013.** Barcelona. Del 14 al 16 de Junio.

-**European Respiratory Society,** del 7 al 11 de Septiembre 2013. Barcelona (comunicación oral).

10.2.11. ¿PERMITE LA TEMPERATURA DEL AIRE EXHALADO PLATÓ IDENTIFICAR EN LOS PACIENTES ASMÁTICOS EL FENOTIPO INFLAMATORIO, LA GRAVEDAD Y EL NIVEL DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD? Astrid Crespo, Jordi Giner, Ana María Muñoz, Alfons Torrego, Carmen Granel, Montserrat Torrejón, Eder Mateu, Teresa Garriga, Vicente Plaza.

-**XX Diada Pneumològica.** 23-24 de Marzo 2012. Sant Joan Despí. Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP).

-**45 Congreso Nacional SEPAR 2012.** Del 8 al 11 de Junio 2012. Madrid.

10.3. Becas concedidas en relación con la temática de la tesis

10.3.1. Beca Leti 2011. Fundació Catalana de Peumologia (FUCAP). EXPRESIÓN DE RECEPTORES TOLL LIKE EN CÉLULAS DE ESPUTO INDUCIDO DE PACIENTES ASMATICOS. RELACIÓN CON EL FENOTIPO, LA GRAVEDAD Y EL NIVEL DE CONTROL DEL ASMA. XXIX Diada Pneumològica. 23-24 de marzo de 2012. 7-9 de abril de 2011. Badalona Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP). **Investigadora principal: Astrid Crespo.**

10.3.2. Beca Maria Ravà 2012 (FUCAP). EXPRESIÓN DE RECEPTORES TOLL-LIKE 2 Y 4 EN PACIENTES ASMÁTICOS. RELACIÓN CON EL FENOTIPO INFLAMATORIO, LA GRAVEDAD Y EL NIVEL DE CONTROL DEL ASMA. Beca becario. XXX Diada Pneumològica. 23-24 de marzo de 2012. Sant Joan Despí. Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP). **Investigadora principal: Astrid Crespo.**

10.3.3. Beca Becario SEPAR 2012. EXPRESIÓN DE RECEPTORES TOLL-LIKE 2 Y 4 EN PACIENTES ASMÁTICOS. RELACIÓN CON EL FENOTIPO INFLAMATORIO, LA GRAVEDAD Y EL NIVEL DE CONTROL DEL ASMA. 45 Congreso Nacional SEPAR. Del 8 al 11 de Junio 2012. **Investigadora principal: Astrid Crespo.**

10.3.4. Beca SEPAR-FAES Farma 2012. Beca de colaboración para la asistencia al Congreso anual de la SPP en Tróia. Portugal. 9 y 11 de Noviembre 2012. Como autora, primera firmante y presentadora de la comunicación ¿Permite la temperatura del aire exhalado plató identificar en los pacientes asmáticos el fenotipo inflamatorio, la gravedad y el nivel de control de la enfermedad? 45 Congreso Nacional SEPAR. Del 8 al 11 de Junio 2012. **Investigadora principal: Astrid Crespo.**

10.3.5. Beca de investigación para licenciados post-MIR (MIA). Del Plan social y de investigación de la Muy Ilustre administración de la Fundación Privada del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Convocatoria 2012. Por el proyecto: EXPRESIÓN DE RECEPTORES TOLL-LIKE 2 Y 4 EN PACIENTES ASMÁTICOS. RELACIÓN CON EL FENOTIPO INFLAMATORIO, LA GRAVEDAD Y EL NIVEL DE CONTROL DEL ASMA. **Investigadora principal: Astrid Crespo.**

10.3.6. Beca SEPAR 2013 por el proyecto: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL ASMÁTICO HIPERSECRETOR. PAPEL DE LAS MUCINAS Y DE LOS RECEPTORES TOLL-LIKE. 46 Congreso Nacional SEPAR. Del 14 al 17 de Junio 2013. IP: Vicente Plaza. **Investigadora colaboradora: Astrid Crespo.**

10.3.7. BECA VIFOR PHARMA 2014 (FUCAP) por el proyecto: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL ASMÁTICO HIPERSECRETOR. PAPEL DE LAS MUCINAS Y DE LOS RECEPTORES TOLL-LIKE. XXXII Diada Pneumològica. Manresa. 4 i 5 d'abril de 2014. Món St Benet, Sant Fruitós de Bages. **Investigadora principal: Astrid Crespo.**

10.3.8. PRIMER PREMIO EN CATEGORÍA EDAD ADULTA DEL I CONCURSO DE PÓSTERES DE LA UNIVERSIDAD DEL ASMA GRAVE. Por el póster titulado: "Determinación del fenotipo inflamatorio bronquial de pacientes asmáticos mediante el uso de la nariz electrónica". Novartis. Premio: **Máster relacionado con la práctica clínica y con la asistencia/práctica médica.** Jurado: Dr. Luis Manuel Entrenas Costa (Presidente del jurado). Dr. Antonio Nieto García. Dr. Santiago Quirce Gancedo. Febrero 2014. **Investigadora principal: Astrid Crespo.**

10.3.9. Premio Barcelona Lung Conference. Enero 2015. Beca para acudir a la ERS 2015 con todos los gastos pagados. Inscripción, alojamiento y traslado al 25th Annual Congress of the ERS que se celebrará en Amsterdam del 26 al 30 de Septiembre del 2015. Por el proyecto: Caracterización fenotípica del asmático hipersecretor. Expresión de las mucinas y de los receptores toll-like. **Investigadora principal: Astrid Crespo.**

10.3.10. PREMIOS SEPAR-NOVARTIS 2015. Premios para asistir al congreso internacional europeo (ERS). Premio a las mejores comunicaciones presentadas en el área de Asma. Por el proyecto: Caracterización fenotípica del asma con hipersecreción bronquial. Expresión de las mucinas y de los receptores TOLL-LIKE. **Investigadora principal: Astrid Crespo.**