

# Inflamometría en Neumología

M. Ferrer Galván, V. Sánchez López, F.J. Álvarez Gutiérrez

## INTRODUCCIÓN

Como es conocido, el asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias que cursa con hiperrespuesta bronquial. Actualmente se considera un síndrome que incluye diversos fenotipos clínicos. A pesar de que el componente inflamatorio y la hiperrespuesta en asma son hechos esenciales para su propia génesis, desarrollo, pronóstico y tratamiento, hasta ahora su estudio se ha limitado básicamente a trabajos de investigación y en el caso de la hiperrespuesta para confirmar o descartar el diagnóstico. Únicamente en los últimos años se están comenzando a utilizar algunos de estos parámetros, no solo para el diagnóstico, sino para el seguimiento, fenotipar las formas graves de la enfermedad e incluso más recientemente para establecer la indicación de nuevos tratamientos biológicos.

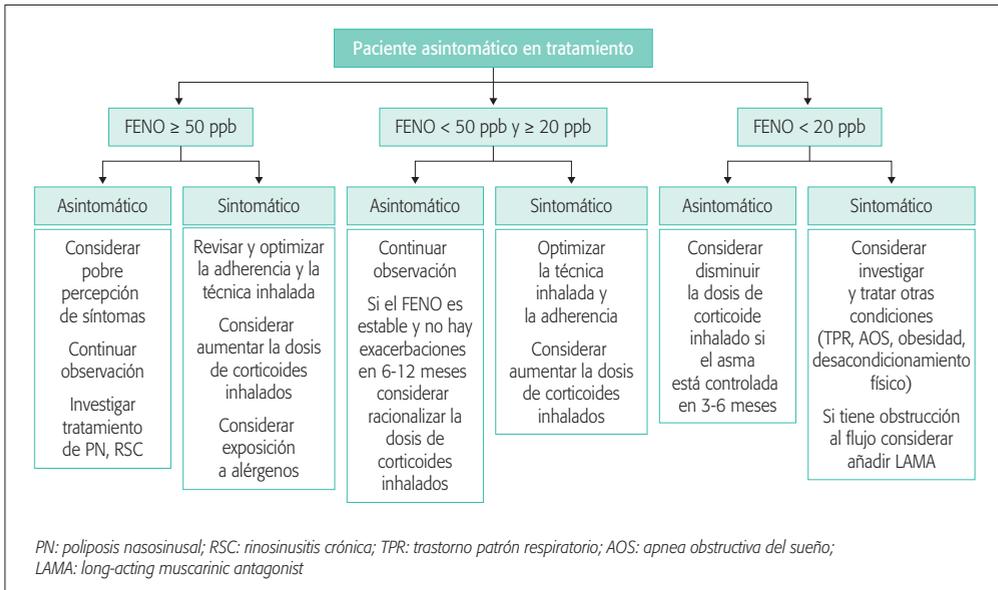
En este capítulo de inflamometría en el asma nos centraremos en aquellas técnicas y pruebas disponibles en el momento actual y otras que posiblemente sean de uso común en un futuro inmediato. Estas pruebas serán útiles para el diagnóstico, seguimiento y planteamiento de un tratamiento más personalizado en el asma. Como hemos referido la inclusión en el "menú" de terapias para el asma de varios fármacos biológicos, aconseja disponer la mayoría de estos instrumentos en la práctica habitual, para caracterizar mejor al paciente y servir de guía de indicación y efectividad.

## FRACCIÓN EXHALADA DE ÓXIDO NÍTRICO (FENO)

El óxido nítrico (NO) es un mediador biológico en humanos y animales. Se produce en el pulmón y se presenta en el aire exhalado. El NO se sintetiza a partir de la L-arginina mediante la acción de una enzima, la óxido-nítrico-sintetasa (NOS), que tiene dos formas de presentación: constitutiva (NOS-c) e inducible (NOS-i) por lipopolisacáridos o citocinas. El proceso es dependiente de oxígeno y NADPH, y origina L-citrulina como subproducto.

El FENO es una medida no invasiva de inflamación bronquial de tipo T2. Está relacionado, en parte, con la inflamación eosinofílica, existiendo estudios que demuestran una correlación significativa entre niveles de FENO y recuento de eosinófilos en diferentes localizaciones (esputo, lavado broncoalveolar, biopsia bronquial y sangre)<sup>(1)</sup>. Sin embargo aunque ambos biomarcadores (eosinofilia y FENO), son parte de la cascada inflamatoria T2, están regulados por diferentes vías inflamatorias<sup>(2)</sup>, teniendo un papel importante en su fisiopatología las interleuquinas IL-4 e IL-13<sup>(3)</sup>.

El procedimiento de determinación de FENO ha sido estandarizado<sup>(4)</sup>. El método más habitual consiste en analizar directamente la muestra en el dispositivo en tiempo real. Para ello el paciente se debe sentar de forma confortable, con la boquilla en posición adecuada y, si es posible, sin pinza nasal (porque al usarla se favorece que el NO nasal se vehiculice por la parte posterior



**Figura 1.** Algoritmo manejo del paciente en tratamiento en función de valores de FENO y clínica. (Modificado de Rupani H, et al. Using Fractional Exhaled Nitric Oxide Measurement in Clinical Asthma Management. Chest. 2021. Article in press).

de la nasofaringe). Se debe realizar una inhalación de 2-3 segundos a través de la boca hasta la capacidad total (TLC) y posteriormente exhalar rápidamente con un flujo de 0,05 L/segundo aproximadamente.

El óxido nítrico se ha empleado fundamentalmente como alternativa para el diagnóstico de asma y también en el seguimiento.

Recientemente para el diagnóstico de asma se ha establecido el punto de corte en  $> 40$  ppb en adultos que no están tomando glucocorticoides, según se recoge en la guía GEMA 5.1<sup>(2)</sup>. Este punto de corte coincide con otras guías como la NICE y el Consenso Escocés, sin embargo, la GINA no ha incluido el FENO en el algoritmo diagnóstico. Valores  $> 40$  ppb alcanzan una elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de asma en los pacientes no fumadores que no utilizan glucocorticoides inhalados, especialmente si se asocia a un FEV<sub>1</sub> reducido. Sin embargo, un valor normal de FENO no excluye el diagnóstico de asma, especialmente en las personas no atópicas<sup>(2)</sup>. Hay que tener en cuenta que los valores de FENO pueden verse afectados por otros factores como el hábito tabáquico, la edad, el peso, talla, uso de medicación antiinflamatoria, flujo espiratorio, tipo de dispositivo usado, técnica de medición, infección respiratoria coexistente e incluso contaminación nasal

por rinitis<sup>(5)</sup>. En los niños el punto de corte se ha establecido en 35 ppb.

La guía ATS recomienda también el uso del FENO para evaluar el control una vez iniciado el tratamiento<sup>(6)</sup>. En el gráfico adjunto se muestra un algoritmo de manejo de pacientes en función de la clínica y niveles de FENO (Fig. 1)<sup>(7)</sup>.

### CONDENSADO DE AIRE EXHALADO

El análisis del condensado de aire exhalado (CAE) es un método no invasivo de estudio de la inflamación que puede ser de utilidad, no solo en el diagnóstico y seguimiento de estas enfermedades, sino también para el estudio de su fisiopatología. El principal componente del CAE es vapor de agua condensado y solo una pequeña fracción corresponde a microgotas con un contenido variable de diferentes moléculas volátiles y no volátiles. Los equipos utilizados emplean normalmente válvulas bidireccionales, para evitar que el paciente inhale aire frío y evitar que se realice una provocación inespecífica con aire frío. El paciente respira a volumen corriente, con la nariz tapada con pinzas nasales durante 10-15 minutos. El aire exhalado pasa a través de una cámara refrigerada conectada a una vía donde se recoge el aire condensado. Posteriormente se desgasifica con un gas noble (helio o argón) y se procede a la medi-

**TABLA 1.** Equipos de condensación.

Nombre	Casa comercial	Sistema de enfriamiento	Foto
EcoScreen2	FILT Lungen-& Thorax Diagnostik GmbH, Alemania	Sistema eléctrico	
RTube	Respiratory Research, USA	Manguito preenfriado sensible a temperatura ambiental alta	
TurboDECCS	Medivac, Italia	Sistema eléctrico	

**TABLA 2.** Marcadores más frecuentemente detectados en el condensado de aire exhalado.

Marcador	Utilidad
pH	Puede estar disminuido en casos de asma grave refractaria al tratamiento, también en fases de agudización. Puede ser útil para la evaluación de pacientes con asma relacionada con el trabajo, aunque no se ha demostrado útil en el control del asma, ni tampoco que el nivel de pH guarde relación con el tipo celular subyacente
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Niveles elevados en sujetos asmáticos no tratados, en las exacerbaciones y tienen una correlación inversa con el volumen espiratorio forzado en primer segundo (FEV <sub>1</sub> ), pico flujo espiratorio máximo y la PC <sub>20</sub> . Pero la aplicabilidad clínica es baja, ya que no existen unos valores de concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> estandarizados
8-isoprostano	Marcador de estrés oxidativo. Está elevado en pacientes con asma respecto a sujetos sanos y aumenta en función de la gravedad del asma
Aldehídos	Los niveles están elevados en pacientes asmáticos en relación a sujetos sanos y disminuye cuando están tratados con corticoides inhalados
NOx: NO <sub>2</sub> , NO	Aumentan en pacientes con asma y disminuyen con el uso de corticoides inhalados y con el hábito tabáquico
Leucotrienos	Pacientes asmáticos fumadores tienen niveles más altos que individuos fumadores sin asma
Prostaglandinas	Pacientes asmáticos fumadores tienen niveles más altos que asmáticos no fumadores

ción de los distintos biomarcadores (normalmente por inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA). En la tabla 1 se muestran algunos de los sistemas más empleados.

Entre los biomarcadores más frecuentemente detectados se encuentran: el pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 8-isoprostano, aldehídos, NOx, leucotrienos, prostaglandinas, citosinas, glutatión, adenosina, endotelina (Tabla 2).

Al igual que el FENO, existen factores a tener cuenta que pueden condicionar el resultado obtenido; composición del aire ambiente, patrón ventilatorio del paciente, edad, sexo, raza, fármacos, contaminación en saliva o el consumo de comidas, bebidas o tabaco antes de realizar la prueba<sup>(8)</sup>.

Las aplicaciones potenciales del análisis de los biomarcadores presentes en el CAE podría ser: el estudio de fenotipos inflamatorios, estimación de la gravedad de la inflamación de la vía aérea, monitorización del tratamiento, detección temprana de agudizaciones de la enfermedad o la valoración del asma ocupacional. El CAE ha sido utilizado fundamentalmente en estudios de investigación. La comparación de los estudios publicados es difícil, debido a los problemas de estandarización de la técnica, pero en 2017 la ERS/ATS<sup>(9)</sup> publicó un monográfico sobre las recomendaciones para la recogida y procesamiento de las muestras, lo que podría ayudar a una generalización de su uso,

no solo para entender mejor la patología del asma sino también para ayudar al clínico en el manejo de esta patología.

### ESTUDIO DE MEDIADORES EN PLASMA

Entre los biomarcadores en plasma se encuentran: el número de eosinófilos, niveles de inmunoglobulina E, niveles de proteína catiónica del eosinófilo (ECP), reactantes de fase aguda y otras citocinas inflamatorias.

#### Eosinófilos en sangre

Los eosinófilos en el asma son biomarcadores útiles como predictor de exacerbaciones<sup>(10,11)</sup> y para medir la gravedad del asma<sup>(12,13)</sup>. En el estudio de Ulrik y cols.<sup>(14)</sup> se demostró una correlación entre el número de eosinófilos en sangre y la gravedad de la hiperreactividad bronquial. El análisis de eosinófilos en sangre es de utilidad para fenotipar a los pacientes con asma y un parámetro necesario para la indicación de algunos tratamientos biológicos. Resulta también de utilidad como predictor de respuesta clínica al tratamiento con los mismos (anti-IL-5, IL-5R)<sup>(15)</sup> y también al anticuerpo monoclonal omalizumab<sup>(16)</sup>.

#### Proteína catiónica del eosinófilo (ECP)

Ha sido investigada como posible biomarcador de las vías respiratorias. Refleja la inflamación de las vías respiratorias y se relaciona con la gravedad del asma. Además, existen diferencias significativas en función del grado de gravedad clínica y sensibilidad alérgica<sup>(17)</sup>.

Como inconvenientes: No es específica del asma, está presente también en otras enfermedades, como la dermatitis atópica, rinitis, fibrosis quística, neumonía eosinofílica crónica y EPOC. Además, se trata de un marcador limitado a las formas alérgicas del asma.

#### Inmunoglobulina E

Es producida por los linfocitos B bajo la dirección de 2 citoquinas: la interleuquina-4 (IL-4) y la interleuquina-13 (IL-13) que están producidas, a su vez, por varios tipos de células, incluyendo las células Th2 (prevalente en la atopia). La mayoría de los pacientes asmáticos tienen niveles de IgE circulantes elevados. La sensibilización alérgica resulta de la formación de IgE específica en respuesta a alérgenos inhalados como aquellos derivados de los ácaros, epitelio de perro o gato, pólenes, etc. No existe una clara correlación entre nivel de IgE con la gravedad de asma<sup>(18)</sup> pero sí

parece que hay una relación dosis-respuesta entre los niveles de IgE y el riesgo de exacerbaciones futuras<sup>(19)</sup>. Es necesaria su medición para establecer la indicación y dosis del tratamiento con el anticuerpo monoclonal omalizumab en pacientes con asma persistente grave mal controlada a pesar de tratamiento.

#### Proteína C reactiva

Fue uno de los primeros reactantes de fase aguda y es buen marcador sistémico de inflamación, infección y daño tisular. Se han visto niveles aumentados en pacientes asmáticos mal controlados, con peor función pulmonar, menor FEV<sub>1</sub> y mayor hiperreactividad bronquial<sup>(20)</sup>. Sin embargo, la PCR es inespecífica, ya que puede estar elevada en otras patologías inflamatorias.

#### Citocinas

La activación de las células T y la alteración de los niveles de citocinas están involucrados en la patogénesis del asma bronquial. Se han encontrado niveles elevados de citoquinas como la IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 y la IL-13, siendo consideradas actualmente dianas terapéuticas para las cuales se han desarrollado anticuerpos monoclonales<sup>(21)</sup>.

#### Periostina

La periostina (POSTN) es una proteína glicosilada extracelular secretada por las células epiteliales de la vía aérea tras estimulación por IL-13. Está estrechamente relacionada con la inflamación eosinofílica de la vía aérea tipo 2 y con el remodelado en el asma. Presenta como ventajas que es un biomarcador sencillo de obtener (se mide en sangre) y bastante estable en el tiempo a diferencia del FENO y los niveles séricos de eosinófilos. Como limitación tiene que los niveles de normalidad varían en función del kit ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizado, lo que dificulta la comparación directa de resultados en los diferentes estudios.

Los niveles de periostina están más elevados en pacientes asmáticos (hasta 4 veces más) que en sujetos sanos adultos<sup>(22)</sup>, y en niños asmáticos está diferencia es aún mayor<sup>(23)</sup>.

La periostina es un biomarcador de inflamación tipo-2 en el asma grave, siendo el mejor predictor de eosinofilia en pacientes con asma grave mal controlada a pesar de corticoides inhalados (CI) a dosis alta<sup>(24)</sup>. Más recientemente el grupo de trabajo U-BIOPRED

hizo un estudio para determinar los fenotipos moleculares del asma mediante el análisis de la transcripción de células de esputo de 104 sujetos con asma moderada a grave. Después de filtrar los 508 genes expresados diferencialmente entre los genes asociados a eosinófilos y no eosinófilos e inflamación del esputo, se identificaron tres cluster. El cluster TAC1 mostró el mayor número de genes para interleuquina-13, célula T colaboradora tipo 2 (Th2) y célula linfocitoide innata tipo 2, y se diferenció de los otros dos grupos por tener además niveles más altos de eosinófilos en sangre y periostina sérica<sup>(25)</sup>.

Por último, la periostina parece un buen biomarcador de respuesta al tratamiento con omalizumab<sup>(26)</sup>, lebrikizumab<sup>(27)</sup> y dupilumab<sup>(28)</sup>.

### ESTUDIO DE LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL. METACOLINA Y MANITOL

Las pruebas de provocación bronquial inespecíficas (PPB) pretenden objetivar la hiperrespuesta bronquial (HRB), entendida con el estrechamiento excesivo de la vía aérea ante estímulos químicos que habitualmente solo provocan una reducción escasa o nula en el calibre de la vía aérea. Este comportamiento anómalo pone en evidencia una de las singularidades significativas del asma, aunque se debe considerar que esta HRB puede detectarse de forma transitoria o permanente acompañando a otras situaciones o, a veces, en individuos aparentemente sanos<sup>(29)</sup>.

En la práctica clínica habitual, la indicación fundamental de las PPB es la de establecer o excluir el diagnóstico de asma, sobre todo en los casos en los que ni la clínica ni el test de broncodilatación lo permiten<sup>(29,30)</sup>.

Además de esta utilidad, puede permitir monitorizar la respuesta terapéutica y el grado de control conseguido<sup>(31)</sup>. El estudio se realiza en el laboratorio de exploración funcional utilizando sustancias que causan broncoconstricción al actuar directamente sobre las células implicadas en la génesis de la limitación al flujo aéreo, músculo liso de la vía aérea (MLVA), endotelio vascular, células productoras de moco, etc. Las sustancias manejadas a modo de estímulos inespecíficos directos son la metacolina e histamina y, aunque los resultados entre ambas son comparables siempre que las condiciones de medida lo sean, la más utilizada es la metacolina y es a la que nos referiremos en este capítulo.

La HRB se puede poner de manifiesto por igual con agentes que ocasionan la reducción del calibre

**TABLA 3.** Comparación entre estímulos directos e indirectos en la prueba de provocación bronquial.

	Directos	Indirectos
Función músculo liso	++++	++
Calibre de la vía aérea	++++	±
Inflamación	++	++++
Dosis necesaria	Baja	Alta
Limitación de dosis	No	Sí
Sensibilidad/especificidad	Alta/mediana	Baja/alta
Diagnóstico	Descartan	No descartan

de la vía aérea de manera indirecta, estimulando inicialmente células inflamatorias o neuronales que, una vez activadas, generan los mediadores adecuados para provocar la disminución de la luz bronquial. Dentro de estos agentes están los aerosoles iso o hipotónicos, el acetaldehído, el metabisulfito sódico, bradicinina y taquicinina o el propanolol. Estas sustancias referidas son poco manejadas habitualmente. Por el contrario, sí disponemos de otras dos opciones: la adenosina y el manitol. En este capítulo nos referiremos a este segundo agente por su mayor simplicidad y facilidad de uso.

En definitiva, los agentes directos (metacolina e histamina) ponen de manifiesto mejor el funcionamiento del MLVA y los indirectos (adenosina y manitol) reflejan con mayor precisión la magnitud de la carga inflamatoria (Tabla 3).

El grado de correlación de ambas pruebas no es perfecto y su información sobre las alteraciones en la vía aérea del paciente asmático son complementarias<sup>(32)</sup>.

Ambas pruebas de provocación se caracterizan por la inhalación de concentraciones crecientes y progresivas de un agente farmacológico hasta que llega a producirse una caída de la función pulmonar por encima de un límite establecido. El parámetro de uso común es el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>).

### Provocación bronquial con metacolina

La metacolina es un derivado sintético de la acetilcolina, sin acción nicotínica, que actúa sobre los receptores colinérgicos del árbol bronquial. Se presenta como sal cristalina en polvo y se ha aceptado su uso

**TABLA 4.** Protocolo rápido para la realización de la prueba de provocación bronquial con metacolina.

Variables a considerar	Dosis inicial (mg/ml)
FEV <sub>1</sub> /FVC > 80% y FEV <sub>1</sub> > 70% y caída del FEV <sub>1</sub> basal tras la inhalación de la solución salina < 10% y síntomas bien controlados con:	
• Corticoides inhalados u orales	0,125
• Broncodilatadores diarios	0,25
• Broncodilatadores ocasionales	1
• Ninguna medicación	2
FEV <sub>1</sub> /FVC < 80% o FEV <sub>1</sub> < 70% y caída del FEV <sub>1</sub> basal tras la inhalación de la solución salina < 10% y síntomas bien controlados con:	
• Corticoides inhalados u orales	0,03
• Cualquier otra medicación o ninguna medicación	0,125
Caída del FEV <sub>1</sub> basal > 10% tras la inhalación de la solución salina o síntomas no controlados	0,03*

Modificada de Juniper EF, et al. *Histamine and methacholine inhalation tests: tidal breathing method; laboratory procedure and standardisation*. 2<sup>nd</sup> ed. AB Draco; 1994. La omisión de concentraciones posteriores solo se puede realizar si, tras la concentración previa, la caída del FEV<sub>1</sub> es menor del 5% y no han aparecido síntomas.

\*No omitir ninguna concentración.

en humanos (Provocholine®, viales de 100 mg). Las diluciones se han de elaborar a medida que se vayan a utilizar, diluciones de metacolina en suero salino isotónico superiores a 0,125 mg/ml, a 4°C mantienen la estabilidad durante tres meses. Para la realización de la prueba cabe utilizar dos métodos de inhalación: los sistemas de generación continua de aerosol y la técnica dosimétrica<sup>(33)</sup>.

Los sistemas de generación continua emplean un nebulizador tipo impactador de chorro (jet), dotado de válvula unidireccional y acoplado a una fuente de aire comprimido cuyo flujo se ajusta buscando conseguir un *output* constante de 0,13-0,16 ml/min. La prueba comienza con la inhalación del diluyente y continúa con la administración de concentraciones crecientes de metacolina (desde 0,03 hasta 16 mg/ml), tras cada inhalación y transcurridos de 30-90 segundos se realiza una espirometría. Si el FEV<sub>1</sub> cae un 20% o más, la PPB finaliza. De lo contrario, se pasa a la concentración siguiente hasta alcanzar ese descenso o completar el resto de las preparaciones. Dado que el procedimiento íntegro consume bastante tiempo, se han propuesto modificaciones que permiten comenzar la PPB con dosis de agente broncoconstrictor superiores a las recomendadas en el protocolo original, de modo que la primera concentración a administrar se decide considerando la presencia de síntomas respiratorios, la medicación habitual, el FEV<sub>1</sub> basal y su caída tras la administración del diluyente (Tabla 4).

En cuanto a la técnica dosimétrica, el aerosol se genera de manera intermitente mediante una válvula solenoide activada eléctricamente y que controla el flujo de aire que pasa a través del nebulizador. Con esta técnica el paciente realiza una inspiración lenta, desde volumen residual hasta capacidad inspiratoria forzada y la maniobra abre la válvula durante un tiempo estipulado, liberando una dosis exacta y conocida de solución, se manejan cinco dosis crecientes de metacolina (de 0,0625 a 16 mg/ml) a dos minutos de inhalación por dosis<sup>(34)</sup>.

El resultado se representa mediante una curva de dosis-respuesta, en la que el eje de abscisas refleja la dosis o concentración de agonista inhalado y el de ordenadas muestra la modificación observada de la función pulmonar. El parámetro más clásico que se debe estimar es la PD<sub>20</sub>, definida como la dosis de metacolina que reduce el FEV<sub>1</sub> en un 20% (PD<sub>20</sub> FEV<sub>1</sub>) respecto al valor obtenido tras la administración del disolvente. Los valores de PD<sub>20</sub> son únicamente calculables cuando se utiliza dosímetro; en los sistemas de generación continua, al desconocer con exactitud la dosis recibida, se emplea la concentración de agonista previa (C<sub>1</sub>) y la que induce la caída del FEV<sub>1</sub> ≥ 20% (C<sub>2</sub>) y el PC<sub>20</sub> será el índice resultante. Se aceptan que valores de PD<sub>20</sub> FEV<sub>1</sub> o PC<sub>20</sub> FEV<sub>1</sub> < 1 mg/ml expresan una HRB moderada-intensa; entre 1-4 mg/ml, HRB ligera; de 4 a 16 mg/ml, HRB dudosa y cifras superiores a 16 mg/ml son indicativas de una PPB negativa.

### Prueba de provocación con manitol

El manitol es un azúcar perteneciente al grupo de los polialcoholes, de propiedades osmóticas, con uso terapéutico para aliviar la hipertensión intracraneal y como sustituto del plasma sanguíneo o por su acción diurética. Cuando se utiliza por vía inhalada, produce un aumento de la osmolaridad del tracto respiratorio y la liberación de mediadores broncoconstrictores. El manitol se comercializa en forma de cápsulas con dosis prefijadas de polvo seco (Osmohale™)<sup>(35)</sup>. Los datos de uso durante el embarazo son limitados. Los estudios en animales no sugieren efectos perjudiciales directos ni indirectos en términos de toxicidad para la reproducción. No obstante, se aconseja no administrar a mujeres embarazadas. En cuanto a la lactancia, no se prevén efectos en niños o recién nacidos lactantes. El kit Osmohale™ está compuesto por 19 cápsulas (una sin producto activo, una de 5 mg, una de 10 mg, una de 20 mg y 15 de 40 mg) acompañadas de un dispositivo inhalador de polvo seco. Para el registro de la respuesta, se emplea el FEV<sub>1</sub><sup>(29,35,36)</sup>. La prueba comienza con la inhalación de la cápsula de 0 mg, desde el dispositivo de polvo seco suministrado por el kit, tras retener la respiración durante 5 segundos, se exhala por la boca y, pasados 60 segundos, se realiza la espirometría. Todo este mismo proceso se repite con las dosis siguientes de 5, 10, 20 y 40 mg: las dosis de 80 y 160 mg se administran mediante múltiplos de cápsulas de 40 mg. La prueba finaliza cuando el paciente muestre una respuesta positiva o haya recibido una cantidad acumulada total de manitol de 635 mg. Se considera respuesta positiva cuando: a) se objetiva una caída del FEV<sub>1</sub> ≥ 15 % respecto al valor basal (se usa el valor del FEV<sub>1</sub> tras la administración de 0 mg como comparador; PD15); o b) aparece una disminución del FEV<sub>1</sub> ≥ 10% entre dos dosis consecutivas<sup>(29,35,36)</sup>.

La prueba con manitol traduce en buena medida la intensidad de la inflamación de la vía aérea asmática y es modificada por la acción de los corticoides inhalados. La especificidad del manitol en el diagnóstico de asma es superior al 95%, y su sensibilidad se acerca al 60%<sup>(29)</sup>. La sensibilidad aumenta hasta casi un 90% cuando se excluyen pacientes en tratamiento.

Paralelamente, la técnica facilita la colección de secreciones bronquiales (que aumentan tras su realización), lo cual proporciona, si se quiere, una fuente adicional de análisis de la inflamación bronquial en un momento determinado.

Por último, y no menos importante, el test de manitol inhalado constituye una alternativa a considerar para el diagnóstico del asma de esfuerzo, con una eficacia similar a la obtenida con la hiperventilación eucápnica<sup>(29)</sup>. Exige menos equipamiento que la prueba de provocación por ejercicio y puede aportar resultados razonablemente superponibles. En este sentido, el Comité Olímpico Internacional ha aprobado su uso para el estudio de la HB en atletas de élite y para justificar el empleo de agonistas β<sub>2</sub>-adrenérgicos antes de una competición deportiva<sup>(37)</sup>.

Como inconveniente, la PPB con manitol puede presentar una peor tolerancia en su realización que la metacolina, independientemente del resultado de la prueba<sup>(38)</sup>.

### PRUEBAS DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL POR EL EJERCICIO (PPBE)

En algunos pacientes asmáticos, el ejercicio físico puede provocar broncoespasmo<sup>(39)</sup> (BIE). Además, en determinados pacientes el deporte o esfuerzo físico puede ser el único desencadenante del asma, denominada en estos casos como asma inducida por el ejercicio (AIE)<sup>(40)</sup>.

Las principales indicaciones de la PPBE son: a) confirmar el diagnóstico de AIE, especialmente en sujetos con espirometría normal y prueba de broncodilatación negativa con alta sospecha clínica, por su mayor sensibilidad que la hiperventilación isocápnica con aire frío; b) estratificar la gravedad del asma; c) prevención en profesiones y deportistas en los que un BIE puede poner en riesgo la vida propia o ajena; d) control de la terapia antiinflamatoria, y e) estudios epidemiológicos<sup>(39)</sup>.

Las modalidades de ejercicio más utilizadas son el tapiz rodante y el cicloergómetro. La BIE comienza, en general, a los 2-4 minutos de realizar el esfuerzo, es máxima a los 5-10 minutos posesfuerzo y desaparece espontáneamente en unos 20-40 minutos. En algunos casos, se mantiene durante más de una hora<sup>(41)</sup>. En aproximadamente un 50% de sujetos con BIE, un fenómeno poco explicado llamado periodo refractario provoca que haya escasa o nula respuesta broncoconstrictora si se repite el ejercicio 2 horas después, lo que confiere un intervalo de protección de esa duración<sup>(41)</sup>. La respuesta que permite diagnosticar BIE se calcula como el porcentaje de caída del FEV<sub>1</sub> respecto al valor previo a la prueba de esfuerzo. Una caída del FEV<sub>1</sub>

≥ 10% respecto al valor basal en cualquiera de las espirometrías realizadas se considera una respuesta positiva para BIE. Es recomendable que esta caída se produzca en dos mediciones consecutivas. En niños, resulta más específico exigir una caída del FEV<sub>1</sub> ≥ 15% para realizar el diagnóstico<sup>(34)</sup>.

## ESTUDIO DE INFLAMACIÓN A TRAVÉS DE FIBROBRONCOSCOPIA

La introducción de la fibrobroncoscopia en el análisis de las muestras de lavado alveolar y sobre las biopsias bronquiales ha permitido analizar las bases histológicas de la enfermedad, aunque no es empleada habitualmente en la práctica clínica para el estudio y control de la inflamación en el asma.

- Lavado broncoalveolar: consiste en la administración de 100-400 ml de suero salino isotónico y estéril en alícuota de 20 a 60 ml, dejando el broncoscopio encajado en un segmento pulmonar. La cantidad de fluido recuperado varía desde un 50% en pacientes con asma moderada a grave hasta el 80-90% en el asma leve. Permite observar el aumento de celularidad a expensas de eosinófilos activados, correlacionándolo con el nivel de HRB. En los casos de asma grave, puede hallarse un predominio de neutrófilos y un incremento de mediadores de la cascada inflamatoria. También se ha utilizado el LBA para evaluar el efecto del tratamiento farmacológico y para estudiar la pequeña vía aérea. El espectro celular obtenido mediante LBA se correlaciona con los hallados en el esputo inducido.
- Prueba de provocación segmentaria mediante broncoscopia: consiste en la exposición a alérgenos para estudiar los mecanismos de desarrollo de inflamación de la vía respiratoria mediante una instilación directa sobre una localización determinada de la vía respiratoria, de modo similar al LBA, permite además utilizar una mayor dosis de alérgeno para inducir una mayor inflamación local con menos efectos secundarios. El problema de esta técnica es la variabilidad inter e intrasegmentaria en la respuesta inflamatoria. Diferentes estudios demuestran un aumento de leucotrieno C<sub>4</sub> tras su realización, hoy en día su uso está limitado a la investigación. Su principal riesgo es el broncoespasmo, además de los que conlleva el LBA.

- Biopsia bronquial: consiste en la obtención de un máximo de seis biopsias con una profundidad subepitelial de al menos 0,3 a 0,5 mm y tomadas de las bifurcaciones de bronquios segmentarios o subsegmentarios. Permite cuantificar las células inflamatorias mediante técnica de inmunohistoquímica y para el estudio de las citoquinas. Las muestras deben ser rápidamente procesadas y congeladas para permitir la hibridación *in situ* y el análisis mediante proteína C de la expresión del ARN mensajero de citocinas o moléculas de adhesión<sup>(42)</sup>.
- Cepillado bronquial: consiste en la extracción de células epiteliales de la mucosa bronquial con la finalidad de realizar estudios de células *in vitro*. Para su realización se debe evitar el uso de anestésicos tópicos. La seguridad en pacientes asmáticos es buena, aunque el principal riesgo es el sangrado<sup>(43)</sup>.

Recientemente se ha publicado un estudio realizado con EBUS para evaluar el remodelado de la vía aérea en pacientes con asma, EPOC y ACO (*asthma, copd overlap*). Se evaluó no solo el engrosamiento de la pared bronquial total si no de cada una de sus capas, encontrándose estas significativamente más engrosadas en los pacientes con asma, seguido de pacientes ACO y EPOC<sup>(44)</sup>. En un futuro, paralelo al desarrollo de las nuevas tecnologías en broncoscopia, se abrirán nuevas vías de estudio de la inflamación en la patología asmática.

## ESTUDIO DE MUESTRAS DE ESPUTO INDUCIDO

### Definición

La inducción de esputo consiste en la inhalación por parte del paciente de suero salino hipertónico para conseguir una muestra de secreción de procedencia bronquial que no es posible obtener de forma espontánea<sup>(45,46)</sup>. El esputo se compone fundamentalmente de mucosa en el que se encuentran inmersas células del sistema inmunitario, productos intracelulares y extracelulares<sup>(47)</sup>. Su análisis permite el recuento diferencial de células inflamatorias, identificación de agentes infecciosos y cuantificación de mediadores inflamatorios. Por ello se considera una herramienta valiosa en gran parte de los pacientes con enfermedades respiratorias. El procesamiento del esputo inducido fue descrito por

primera vez en 1958 por Bickerman y cols. para el diagnóstico del cáncer de pulmón<sup>(48)</sup>. Desde entonces su aplicación en el estudio de patologías de vías respiratorias se ha extendido. Existe una amplia variedad en cuanto a la metodología utilizada para la inducción y el procesamiento que dificulta la comparación de resultados entre los diferentes hospitales. En este sentido, la Sociedad Europea de Respiratorio (ERS) creó un grupo de trabajo que publicó en 2002 recomendaciones para la estandarización de la inducción y el procesamiento del esputo<sup>(49,50)</sup>. El presente capítulo se basa en las recomendaciones de la ERS y los procedimientos descritos en la literatura reciente sobre el análisis de esputo inducido en pacientes asmáticos<sup>(45,46,51-54)</sup>.

### Inducción del esputo

Se trata de una técnica reproducible, no invasiva y generalmente bien tolerada por el paciente. El paciente debe inhalar con un nebulizador ultrasónico soluciones salinas isotónicas o hipertónicas a diferentes concentraciones. Las concentraciones de suero salino inhalado más empleadas son 3-5% durante 15-20 minutos en total. Dado que la solución salina hipertónica puede ser un potente broncoconstrictor al paciente se le debe realizar una espirometría con inhalación de un agonista  $\beta_2$ -adrenérgico antes de empezar la prueba. También se deben realizar espirometrías de control entre cada inhalación de suero salino y una espirometría al final de la prueba. Tras la última inhalación se debe intentar que mediante maniobras de tos progresiva y profunda el paciente expectore.

### Aspectos a tener en cuenta para el éxito de la prueba

- Estudios previos han observado una mayor tasa de éxito en la inducción cuando se utilizan nebulizadores ultrasónicos con un flujo de alrededor de 1 ml/min<sup>(45,55)</sup> y con un tamaño de partícula nebulizada entre 2  $\mu$  y 5  $\mu$ <sup>(45,56)</sup>.
- Para minimizar la contaminación de la muestra con goteo posnasal el paciente debe sonarse la nariz tras las inhalaciones de suero salino.
- Realizar la prueba a primera hora de la mañana y con el paciente en ayunas facilita la obtención de muestra.
- Una buena interacción entre el paciente y el personal encargado de realizar la inducción es fundamental para el éxito de la misma.

### Procesamiento

Lo más correcto es empezar a procesar la muestra en cuanto sea obtenida o en las 2 horas siguientes a su obtención si se almacena en refrigeración. En la figura 2 se resume uno de los protocolos de procesamiento de esputo comúnmente empleados. Un aspecto clave dentro de este procesamiento es la correcta disgregación del esputo durante el tratamiento con el agente mucolítico<sup>(53)</sup>.

### Criterios de identificación celular

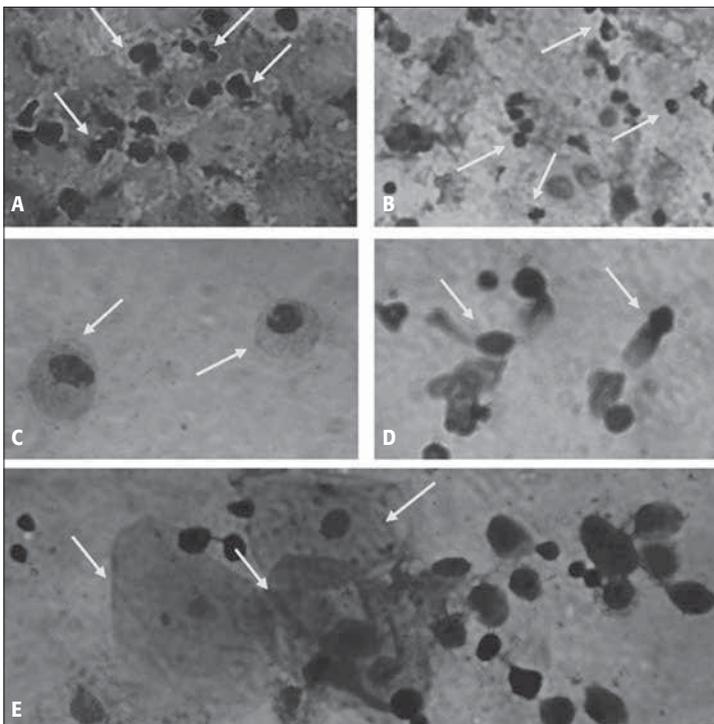
- **Eosinófilos:** células de 9 a 14  $\mu$ m de diámetro. Se caracterizan por un núcleo violáceo redondeado que frecuentemente presenta una estrangulación muy acentuada en la zona central dando lugar a dos lóbulos muy separados entre sí (núcleo con aspecto de ojos de mosca). Citoplasma con gránulos anaranjados refringentes (Fig. 3A).
- **Neutrófilos:** de similar tamaño al eosinófilo. Su núcleo puede presentar entre 2 y 5 lóbulos. Su citoplasma es grisáceo y con presencia no abundante de gránulos (Fig. 3B).
- **Linfocitos:** células de 5-8  $\mu$ m. Núcleo redondo que ocupa la mayor parte de la superficie celular.
- **Macrófagos:** células de 15-30  $\mu$ m de diámetro. Núcleo redondo y citoplasma azul y vacuolado. Morfológicamente similar al aspecto de un huevo frito (Fig. 3C).
- **Células epiteliales bronquiales:** son células alargadas. Hay dos tipos: ciliadas y caliciformes. Las ciliadas tienen un citoplasma azulado, núcleo en la zona basal y cilios en la zona apical (Fig. 3D). Las caliciformes son menos abundantes en el esputo presentan forma de cáliz con citoplasma laxo y grisáceo.
- **Células epiteliales orofaríngeas:** células grandes con núcleo pequeño redondeado y en el centro de la célula. Citoplasma grande no vacuolado y azulado. Suelen aparecer varias juntas formando una estructura similar a los paneles de abeja (Fig. 3F).

### Fenotipos inflamatorios

El recuento diferencial del esputo inducido ha permitido identificar 4 fenotipos inflamatorios; eosinofílico, neutrofílico, mixto y paucigranulocítico. Los valores de referencia considerados para definir cada fenotipo varían entre los diferentes estudios realizados

<p><b>1. Descripción macroscópica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Color y aspecto: mucoso/purulento</li> </ul>	<p><b>6. Centrifugación:</b> 1.500 rpm 5 min</p> <p>Obtenemos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sobrenadante: fase líquida de interés para estudio de marcadores inflamatorios solubles</li> <li>• Botón o pellet celular: se resuspende en tampón fosfato salino y se extiende en portaobjetos. Se deja secar</li> </ul>
<p><b>2. Selección tapones mucosos</b></p>	<p><b>7. Tinción modificada de Wright y Giemsa</b></p> <p>Permite diferenciar los tipos celulares marcando las estructuras celulares de diferente color en función de su pH</p>
<p><b>3. Homogeneización</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agente mucolítico (ditiotreitol)</li> <li>• Agitación (20-25 min) con ayuda de vórtex y banco mecedor</li> <li>• Diluir con tampón fosfato salino</li> </ul>	<p><b>8. Recuento diferencial</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contaje al microscopio de al menos 400 células a 40 o 100 aumentos</li> </ul>
<p><b>4. Recuento celular y determinación validez de la muestra</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contaje en cámara de Neubauer de células totales, células escamosas, medición viabilidad celular mediante tinción de azul de tripano. Obtención de células/g de esputo</li> <li>• Muestra válida si viabilidad &gt; 50% y porcentaje células escamosas &lt; 5%</li> </ul>	
<p><b>5. Filtración</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Separación física mucosa/células. Se utilizan filtros de nylon tamaño poro 48 <math>\mu\text{m}</math> (permite pasar de células pero no de moco)</li> </ul>	

**Figura 2.** Protocolo procesamiento del esputo inducido<sup>(53)</sup>. El volumen ( $\mu\text{l}$ ) de ditiotreitol y tampón fosfato que se añade es 4 veces peso (mg) del esputo.



**Figura 3.** Identificación de los diferentes tipos celulares en el recuento diferencial del esputo. Muestras de esputo inducido de pacientes asmáticos procesadas. En cada imagen la flecha indica: A) Eosinófilos. B) Neutrófilos. C) Macrófagos. D) Células epiteliales bronquiales ciliadas. E) Células epiteliales escamosas. Imágenes del microscopio óptico con objetivo 40X.

**TABLA 5.** Fenotipos inflamatorios del esputo inducido en el asma.

	Asma no eosinofílica (eosinófilos < 2%)	Asma eosinofílica (eosinófilos ≥ 2%)
Valor normal de neutrófilos < 61%	Fenotipo paucigranulocítico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Asma buen control</li> <li>• Asma no inflamatoria</li> <li>• Asma intermitente</li> </ul>	Fenotipo eosinofílico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Asma alérgica</li> <li>• Incumplimiento/inadecuado tratamiento</li> <li>• Atopia</li> </ul>
Valor elevado de neutrófilos ≥ 61%	Fenotipo neutrofílico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infección</li> <li>• Tabaquismo</li> <li>• Obesidad</li> <li>• Polución</li> <li>• Exposición laboral</li> </ul>	Fenotipo mixto <ul style="list-style-type: none"> <li>• Asma aguda</li> <li>• Asma refractaria</li> </ul>

Modificado de Ramos Barbón D PMVe. Esputo inducido. En: Plaza Moral V, ed. *Inflamometría en Asma EPOC y rinitis*. Barcelona: Viguera Editores; 2012. p. 143-64 y de Haldar P, et al. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119(5): 1043-52; quiz 53-4.

sobre todo a la hora de definir el punto de corte de la eosinofilia<sup>(57-59)</sup>. En la tabla 5 se resumen los patrones inflamatorios del esputo inducido en el asma con valores de referencia comúnmente empleados<sup>(53,60)</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

- Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic count ≥ 3% in a cohort of unselected patients with asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35: 1175-9.
- Guía Española para el manejo del asma GEMA 5.1. Disponible en <https://gemasma.com>
- Parulekar AD, Diamant Z, Hanania NA. Role of T2 inflammation biomarkers in severe asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2016; 22(1): 59-68.
- ATS/ERS2005. American Thoracic Society/European Respiratory Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 912-30.
- Dressel H, de la Motte D, Reichert J, Ochmann U, Petru R, Angerer P, et al. Exhaled nitric oxide: independent effects of atopy, smoking, respiratory tract infection, gender and height. *Respir Med*. 2008; 102: 962-9.
- Khatri SB, Laccarino JM, Barochia A, Soghier I, Akuthota P, Brady A, et al. Use of Fractional Exhaled Nitric Oxide to Guide the Treatment of Asthma An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021; 204(10): e97-109.
- Rupani H, Kent BD. Using Fractional Exhaled Nitric Oxide Measurement in Clinical Asthma Management. *Chest*. 2021. Article in press. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.10.015>
- Horváth I, Hunt J, Barnes PF. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005; 26: 523-48.
- Horváth I, Barnes PJ, Högman M, Olin A, Amann A, Antus B, et al. A European Respiratory Society Technical Standard: Exhaled Biomarkers in Lung Disease. *Eur Respir J*. 2017; 49(4): 1600965.
- Mallah N, Rodriguez-Segade S, Gonzalez-Barcala FJ, Takkouche B. Blood eosinophil count as predictor of asthma exacerbation. A meta-analysis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2021; 32: 465-78.
- Gonzalez-Barcala FJ, San-Jose ME, Nieto-Fontarigo JJ, Carreira JM, Calvo- Alvarez U, Cruz MJ, et al. Association between blood eosinophil count with asthma hospital readmissions. *Eur J Intern Med*. 2018; 53: 34-9.
- Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc*. 2009; 6: 256-9.
- Bousquet J, Chanez P, Vignola AM, Lacoste J-Y, Michel FB. Eosinophil inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150(Suppl): S33-8.
- Ulrik CS. Peripheral eosinophil counts as a marker of disease activity in intrinsic and extrinsic asthma. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25: 820-7.
- Alexis NE. Biomarker sampling of the airways in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2014; 20: 46-52.
- Busse W, Spector S, Rosén K, Wang Y, Alpan O. High eosinophil count: a potential biomarker for assessing successful omalizumab treatment effects. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132: 485.
- Álvarez Gutiérrez FJ, Rodríguez Portal JA, Valenzuela Mateos F, Capote Gil F, Sánchez Gil R, Castillo Gómez. Mediadores de la inflamación (proteína catiónica del eosinófilo, ECP) en población normal y pacientes con asma bronquial o rinitis alérgica. *Arch Bronconeumol*. 1995; 31: 280-6.
- Irani AM. The relationship between a specific IgE level and asthma outcomes: Results from the 2005-2006 national health and nutrition examination survey. *Pediatrics*. 2014; 134(Suppl 3): S168.

19. Bahceciler NN, Arıkan C, Akkoc T, Barlan IB. Predictors for the severity of bronchial hyperreactivity in childhood. *Asthma Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 1150-3.
20. Zietkowski Z, Tomasiak-Lozowska MM, Skiepkó R, Mrocko B, Szmitkowski M, Bodzenta-Lukaszyk A. High-sensitivity C-reactive protein in the exhaled breath condensate and serum in stable and unstable asthma. *Respir Med.* 2009; 103: 379-85.
21. Chung KF. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. *Lancet.* 2015; 386: 1086-96.
22. James A, Janson C, Malinowski A, Holweg C, Alving K, Ono J, et al. Serum periostin relates to type-2 inflammation and lung function in asthma: data from the large population-based cohort Swedish GA(2) LEN. *Allergy.* 2017; 72(11): 1753-60.
23. Anderson HM, Lemanske Jr RF, Arron JR, Holweg CTJ, Rajamanickam V, Gangnon RE, et al. Relationships among aeroallergen sensitization peripheral blood eosinophils and periostin in pediatric asthma development. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 139: 790-6.
24. Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, Solberg OD, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 130(3): 647-54.e10.
25. Kuo SHS, Pavlidis S, Loza M, Baribaud F, Rowe A, Pandis I, et al. T-helper cell type 2 (Th2) and non-Th2 molecular phenotypes of asthma using sputum transcriptomics in U-BIOPRED. *Eur Respir J.* 2017; 49(2): 1602135.
26. Tajiri T, Matsumoto H, Gon Y, Ito R, Hashimoto S, Izuhara K, et al. Utility of serum periostin and free IgE levels in evaluating responsiveness to omalizumab in patients with severe asthma. *Allergy.* 2016; 71: 1472-9.
27. Hanania NA, Korenblat P, Chapman KR, Bateman ED, Kopecky P, Paggiaro P, et al. Efficacy and safety of lebrikizumab in patients with uncontrolled asthma (LAVOLTA I and LAVOLTA II): replicate, phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *Lancet Respir Med.* 2016; 4(10): 781-96.
28. Castro M, Corren J, Pavord ID, Maspéro J, Wenzel Z, Rabe KF, et al. Dupilumab efficacy and safety in moderate-to-severe uncontrolled asthma. *N Engl J Med.* 2018; 378: 2486-96.
29. Perpiñá Tordera M, García Río F, Álvarez Gutiérrez FJ, Cisneros Serrano C, Compte Torrero L, Entrenas Costa LM, et al. Normativa sobre el estudio de la hiperrespuesta bronquial inespecífica en el asma. *Arch Bronconeumol.* 2013; 49: 432-46.
30. Perpiñá Tordera M. Hiperrespuesta bronquial inespecífica. En: Plaza Moral V, ed. *Inflamometría en asma, EPOC y rinitis.* Barcelona: Vigüera Editores; 2012. p. 87-92.
31. Pellicer Ciscar C, Sánchis Aldas J. Prueba de provocación farmacológica bronquial. En: Perpiñá Tordera M, ed. *Hiperreactividad bronquial inespecífica.* Barcelona: Doyma; 1994. p. 99-115.
32. Parra-Pérez M, Romero-Falcón A, Álvarez-Gutiérrez FJ, Medina Gallardo JF, Ferrer Galván M. Comparative study of bronchial provocation test using methacholine or mannitol in bronchial asthma. ERS Amsterdam International Congress, 26-30 september, 2015.
33. Juniper EF, Cockcroft DW, Hargreave FE. Histamine and methacholine inhalation tests: tidal breathing method; laboratory procedure and standardisation. 2<sup>nd</sup> ed. AB Draco; 1994.
34. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 16: 309-29.
35. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad SSEL. Ficha técnica Osmohale<sup>TM</sup> polvo para inhalación. Revisión ficha técnica: Enero 2013. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es> (último acceso 16/04/21).
36. Joos GF, O'Connor B, Anderson SD, Chung F, Cockcroft DW, Dahlén B, et al. Indirect airway challenges. *Eur Respir J.* 2003; 21: 1050-68.
37. Parkerson J, Ledford D. Mannitol as an indirect bronchoprovocation test for the 21<sup>st</sup> century. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011; 106: 91-6.
38. Romero Falcón A, Medina Gallardo JF, Ferrer Galván M, Pérez-Morilla P, Pérez Navarro P, Álvarez Gutiérrez FJ. Estudio comparativo de los efectos secundarios de las pruebas de provocación bronquial para el diagnóstico de asma bronquial. *Rev Esp Patol Torac.* 2015; 27: 161-7.
39. Randolph C. Diagnostic exercise challenge testing. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011; 11: 482-90.
40. Carlsen KH, Anderson SD, Bjerner L, Bonini S, Brusasco V, Canonica W, et al. Exercise-induced asthma, respiratory and allergic disorders in elite athletes: epidemiology, mechanisms and diagnosis: part I of the report from the Joint Task Force of the European Respiratory Society (ERS) and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) in cooperation with GA2LEN. *Allergy.* 2008; 63: 387-403.
41. Burghard M, Hulzebos EJJ, Olin JT, Takken T. Exercise testing in children with respiratory diseases. In: Palange P, Laveneziana P, Neder JA, Ward SA, eds. *Clinical Exercise Testing.* European Respiratory Society; 2018. p. 196-215.
42. Moore WC, Evans MD, Bleecker ER, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, et al.; for the National Heart, Lung and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Safety of investigative bronchoscopy in the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 128: 328-36.
43. Good JT, Kolakowski CA, Groshong SD, Murphy JR, Martin RJ. Refractory asthma: importance of bronchoscopy to identify phenotypes and direct therapy. *Chest.* 2012; 141: 599-606.
44. Gorka K, Gross-Sondej I, Gorka J, Stachura T, Polok K, Celejewska N, et al. Assessment of Airway Remodeling Using Endobronchial Ultrasound in Asthma-COPD Overlap. *J Asthma Allergy.* 2021; 14: 663-74.

45. Torrejón Lázaro M. Inducción y obtención del esputo. En: Plaza Moral V, ed. Manual del esputo inducido. Madrid: GlaxoSmithKline; 2014. p. 23-30.
46. Mateus Eder F. Procesamiento de la muestra y recuento celular convencional. En: Plaza Moral V, ed. Manual del esputo inducido. Madrid: GlaxoSmithKline; 2014. p. 31-41.
47. Prieto L. Induced sputum as a method for the study of bronchial inflammation. *Arch Bronconeumol.* 2011; 47: 323-4.
48. Bickerman HA, Sproul EE, Barach AL. An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technic for the detection of lung cancer. *Dis Chest.* 1958; 33(4): 347-62.
49. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl.* 2002; 37: 1S-2.
50. Vignola AM, Rennar SI, Hargreave FE, Fahy JV, Bonsignore MR, Djukanovic R, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing. Future directions. *Eur Respir J Suppl.* 2002; 37: 51S-5.
51. 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(2 Pt 1): 308-17.
52. Nejman-Gryz P, Paplinska-Goryca M, Proboszcz M, Grabczak M, Hermanowicz-Salamon J, Krenke R. The expression of IL17RA on sputum macrophages in asthma patients. *Cytokine.* 2021; 143: 155518.
53. Ramos Barbón D. PMVe. Esputo inducido. En: Plaza Moral V, ed. Inflamometría en Asma EPOC y rinitis. Barcelona: Viguera Editores; 2012. p. 143-64.
54. Crespo-Lessmann A, Curto E, Mateus E, Soto L, Garcia-Moral A, Torrejon M, et al. Total and specific immunoglobulin E in induced sputum in allergic and non-allergic asthma. *PLoS One.* 2020; 15(1): e0228045.
55. Hunter CJ, Ward R, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. The safety and success rate of sputum induction using a low output ultrasonic nebuliser. *Respir Med.* 1999; 93(5): 345-8.
56. 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; 47(1): 25-9.
57. 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(3 Pt 1): 1172-4.
58. 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(6): 1811-4.
59. Marc-Malovrh M, Camlek L, Skrgat S, Kern I, Flezar M, Dezman M, et al. Elevated eosinophils, IL5 and IL8 in induced sputum in asthma patients with accelerated FEV1 decline. *Respir Med.* 2020; 162: 105875.
60. Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119(5): 1043-52; quiz 53-4.