

---

**Efecto de la exposición alérgica ambiental y de la provocación bronquial con alérgeno sobre la vía aérea de pacientes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus*. Modificación de la hiperreactividad y de la inflamación eosinofílica bronquial mediante el análisis de células y productos celulares en esputo inducido**

***Effect of environmental allergenic exposure and of bronchial provocation with allergen on the air path of patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus*. Modification of hyper-reactivity and of eosinophilic bronchial inflammation through the analysis of cells and cellular products in induced sputum***

J.M. Olaguibel<sup>1</sup>, M.J. Álvarez<sup>1</sup>, B.E. García<sup>1</sup>, A.I. Tabar<sup>1</sup>, S. Acero<sup>1</sup>, S. Echechipía<sup>1</sup>, A. Rodríguez<sup>1</sup>, E. Urbiola<sup>2</sup>

---

## INTRODUCCIÓN

El concepto actual del asma engloba las características clínicas, funcionales e histológicas de la enfermedad<sup>1</sup>. Los síntomas del asma: episodios de tos, disnea y sibilancias, secundarios a la obstrucción variable y reversible al flujo aéreo son por lo general percibidos de forma muy variable por el paciente<sup>2</sup>. El rasgo funcional propio del asma es la hiperreactividad bronquial (HRB), o la obstrucción exagerada de las vías aéreas ante diversos estímulos que, aunque muy sensible para el diagnóstico del asma, presenta baja especificidad, ya que se detecta también en otras patologías respiratorias o incluso en sujetos sanos<sup>3</sup>. La introducción del fibrobroncoscopio en la década de los 80, permitió describir que las vías aéreas de asmáticos leves o asintomáticos, presentaban alteraciones estructurales (infiltrado inflamatorio eosinofílico, edema de la mucosa, acúmulos de moco ocluyendo la luz,

destrucción del epitelio respiratorio y depósito de colágeno bajo de la membrana basal), hasta entonces consideradas propias de estadios avanzados de la enfermedad<sup>4</sup>. Este hallazgo modificó radicalmente el concepto del asma, definiéndose como una enfermedad inflamatoria crónica de la vía aérea<sup>1</sup>.

Los alérgenos son los únicos agentes que han demostrado ser capaces de inducir y mantener la inflamación propia del asma<sup>5</sup>, de modo que la exposición alérgica en asmáticos sensibilizados determina un incremento de los síntomas bronquiales<sup>5</sup>, de la HRB<sup>6</sup> y de la inflamación de la vía aérea<sup>5,7</sup>, siendo el efecto de los alérgenos perennes más intenso que el de los estacionales<sup>8</sup>. El *D. pteronyssinus* o ácaro del polvo doméstico, es el alérgeno perenne que con mayor frecuencia produce alergia respiratoria en nuestro medio<sup>8</sup>. Se ha establecido que la exposición a niveles de Der p1 superiores a 2 µg/g de polvo incrementa el riesgo de sensibilización y desarrollo

---

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 189-203.

1. Sección de Alergología. Hospital Virgen del Camino.
2. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Virgen del Camino.

Este estudio ha sido realizado con una ayuda a proyectos de investigación del Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica.

**Correspondencia:**  
Dr. José M<sup>a</sup> Olaguibel  
Sección de Alergia  
CS Conde Oliveto  
Plaza Paz s/n  
31002 Pamplona

de asma<sup>9</sup>. Sin embargo, diversos autores<sup>10,11</sup> han criticado la relevancia de estos valores umbrales describiendo importantes porcentajes de asmáticos expuestos a niveles de Der p1 muy inferiores a 2 µg/g. La provocación bronquial con alérgeno (PBCA), induce una respuesta bronquial inmediata superponible al asma agudo y una respuesta tardía en la que predomina el infiltrado inflamatorio eosinofílico de la vía aérea y es por tanto superponible al asma crónica. Por ello, a pesar de que la forma de exposición de la PBCA es muy diferente a la exposición ambiental<sup>12</sup>, dicha técnica ha aportado importantes conocimientos acerca de los mecanismos fisiopatológicos del asma. La cuantificación de los niveles de exposición a ácaros plantea múltiples problemas, en especial secundarios a que las partículas que lo vehiculizan, cuyo número es dependiente de la actividad doméstica, sedimentan rápidamente<sup>13</sup>. Hasta el momento, la cuantificación por medio de inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales de los alérgenos mayoritarios presentes en las muestras de polvo obtenidas de los reservorios domésticos, es el método más adecuado de valorar la exposición alérgica<sup>12</sup>.

El alérgeno inhalado es presentado a los linfocitos T "helper" (CD4+) los cuales se activan liberando un perfil de citoquinas, en función del cual se han descrito dos subpoblaciones: las células TH1 que a través de la producción de interferón (IF)- $\gamma$ , suprimen la síntesis de IgE y la proliferación de las células B, y la subclase TH2 que incrementan la producción de IgE (interleuquina-(IL)4 e IL-6) y favorecen la activación y quimiotaxis de los eosinófilos (IL-5). En el asma la subclase predominante es la TH2, por lo que se ha propuesto que la inflamación en el asma podría ser consecuencia de un predominio de las células TH2 sobre las TH1<sup>14</sup>.

El alérgeno, a través de la unión a la IgE específica, induce la liberación mastocitaria de histamina, que aumenta la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso dando lugar al asma aguda. Además, los mastocitos liberan también un perfil de citoquinas muy similar al de las células TH2, y triptasa, capaz de dañar el epitelio respiratorio, activar la colagena-

sa y aumentar la respuesta del músculo bronquial a agonistas<sup>15</sup>. Por ello, se ha sugerido que la activación mastocitaria podría constituir un paso intermedio entre el asma aguda y su cronificación<sup>15</sup>.

Como resultado, se instaura en la vía aérea un infiltrado inflamatorio de predominio eosinofílico. Los eosinófilos activados liberan sustancias capaces de dañar directamente el tejido pulmonar: radicales libres y las proteínas granulares, entre las que destaca la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), marcador específico de su activación. La activación eosinofílica también determina la liberación de citoquinas (IL-3, IL-5 y GM-CSF) que favorecen su propia quimiotaxis, activación y supervivencia.

La inflamación de la vía aérea se ha evaluado indirectamente (sangre periférica o exudado nasal) o directamente mediante la obtención con fibrobroncoscopio de muestras de biopsia, o del líquido que baña la luz bronquial (lavado broncoalveolar (LBA), lavado bronquial (LB) o cepillado bronquial). Sin embargo, la utilización del fibrobroncoscopio es una exploración invasiva y no exenta de riesgo, por lo que es poco aplicable a la práctica clínica diaria<sup>16</sup>.

Desde 1992 se ha desarrollado la técnica de inducción de esputo, consistente en la inhalación de soluciones hipertónicas que, a través del aumento del volumen de las secreciones permite obtener de forma segura y no invasiva material representativo de las vías aéreas inferiores. El tratamiento de la muestra con agentes dispersantes de la matriz de moco (ditiotreitól: DTT), ha facilitado la identificación celular, y ha permitido utilizar técnicas de análisis celular complejas (citometría de flujo, tinciones inmunocitoquímicas), así como obtener una fase libre de células en la que cuantificar los productos celulares de la inflamación<sup>17</sup>. Actualmente existen dos técnicas de evaluación de la muestra de esputo que básicamente difieren en el material que se analiza. El grupo de Hargreave<sup>18,19</sup> que selecciona acúmulos de moco y el grupo de Boushley<sup>7,20</sup> que analiza la muestra de esputo completa. Ambos han demostrado la reproductibilidad y validez<sup>7,18,20</sup> de su técnica para la evaluación de la respuesta inmunoinflamatoria bronquial.

El objetivo de nuestro estudio ha sido evaluar las interrelaciones existentes tanto en el nivel de exposición alérgica ambiental a *D. pteronyssinus*, como en el grado de reactividad bronquial alérgica específica, con la HRB y la respuesta inmuno-inflamatoria eosinofílica de la vía aérea, cuantificada de forma directa mediante el análisis de muestras de esputo, y de forma indirecta mediante el estudio de sangre periférica, en pacientes con asma y rinitis por sensibilización a *D. pteronyssinus*. Hemos pretendido así mismo analizar cómo estos fenómenos, inflamación e HRB están relacionados con la expresión clínica de la enfermedad, y cómo se modifican tras la PBCA.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Seleccionamos los 31 pacientes con asma y 15 con rinitis, que acudieron consecutivamente a las consultas externas de la Sección de Alergología del H. Virgen del Camino, durante el periodo de febrero a abril de 1996. Los criterios de inclusión y exclusión aplicados se muestran en la tabla 1. Incluimos como grupo control a 38 sujetos sanos, no atópicos. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del H. Virgen del Camino de Pamplona y por el Comité Ético de Investigación Clínica de Navarra. La elaboración del protocolo se realizó según las directrices de la Declaración de Helsinki. El protocolo se realizó en tres días consecutivos, tal como se muestra en la tabla 2. Los datos

**Tabla 1.** Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes seleccionados.

Criterios de inclusión
- Edad comprendida entre los 18 y los 50 años.
- Duración de síntomas superior a 1 año.
- Sensibilización a <i>D. pteronyssinus</i> .
- Consentimiento informado.
Criterios de exclusión
- Inmunoterapia previa.
- Sensibilización a otros alérgenos perennes.
- Sensibilización a alérgenos estacionales (pólenes) durante el periodo de exposición.
- Infección respiratoria en los dos meses previos.
- Hábito tabáquico.
- Mujeres en estado de gestación o durante el periodo de lactancia.
- Administración de corticoides o cromonas, tópicos o sistémicos, durante los tres meses previos al estudio, o de antihistamínicos durante las 2 semanas previas al estudio.
- Existencia de enfermedad pulmonar no alérgica.
- Incapacidad para realizar espirometrías reproducibles.
- Incapacidad para obtener muestras de esputo adecuadas.

**Tabla 2.** Diseño del protocolo.

<b>Día 1:</b>
- Cuestionario de síntomas.
- Realización de pruebas cutáneas.
- Obtención de muestra de sangre venosa.
- Inducción de esputo.
- Determinación de HRB con metacolina (curvas dosis respuesta completas).
<b>Día 2:</b>
- Provocación bronquial con <i>D. pteronyssinus</i> .
<b>Día 3:</b>
- Obtención de una muestra de sangre venosa.
- Inducción de esputo.
- Determinación de HRB con metacolina (curvas dosis respuesta completas).
<b>Día 7:</b>
- Recolección de una muestra de polvo doméstico.

clínicos y demográficos de los sujetos seleccionados se muestran en la tabla 3.

### Material

Se utilizó un extracto parcialmente purificado y estandarizado biológicamente

de *D. pteronyssinus* (Alergia e Inmunología Abelló), que contenía a una actividad de 100 unidades biológicas (UB)/ml, 40 µg/ml de Der p1 y 20 µg/ml de Der 2. Se utilizaron diluciones de dicho extracto para la realización de pruebas cutáneas y de PBCA.

**Tabla 3.** Datos clínicos y demográficos de los pacientes.

Diagnóstico	Asmáticos	Rinitis	Controles
Tamaño de muestra	31	15	38
Edad (años)	21 (IQR:19-29)	21 (IQR:18-23)	29 (IQR:25-32)
Sexo	17 varones, 14 mujeres	10 varones, 5 mujeres	18 varones, 20 mujeres
Evolución del asma (años)	2,0 (IQR:1,0-3,0)	-	-

IQR: índice intercuartílico

### Métodos "in vivo"

#### *Cuestionario de síntomas bronquiales*

Se realizó mediante una puntuación de síntomas combinada, cuya validez y reproducibilidad ha sido comprobada<sup>21</sup>. Se puntuó (de 0 a 4) la frecuencia con la que el paciente había presentado los siguientes síntomas: disnea de ejercicio, disnea de reposo durante el día, sibilancias diurnas, tos diurna, sibilancias nocturnas, tos nocturna, disturbio del sueño, miedo por el asma, opresión torácica, durante el último mes.

#### *Pruebas cutáneas*

Se realizaron mediante el método de "prick", según las normas de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) (22), por duplicado con tres concentraciones del extracto de *D. pteronyssinus* (150, 30 y 5 UB/ml), y con los neumoaergenos más frecuentes en nuestro medio. Se determinó el área de las pápulas resultantes mediante planimetría.

#### *Pruebas funcionales respiratorias*

Las pruebas de función respiratoria se realizaron con un mismo espirómetro (CPR. Medical Graphics Corp.), siguiendo la normativa de la American Thoracic Society (ATS)<sup>23</sup>. Los pacientes no se administraron fármacos β-agonistas de acción prolongada durante las 24 horas previas al

estudio ni de acción corta las 6 horas previas al estudio. Se requirió un valor basal del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) igual o superior al 70% del predicho como normal para iniciar la prueba. Se administró el agonista (metacolina) o el alergen mediante un dosímetro (MEFAR s.r.l.), que liberaba una cantidad prefijada de solución (1ml) durante 1 s, bajo control espirométrico. Previo al inicio de cada prueba los pacientes inhalaban solución salina al 0,9%, requiriéndose una variación del valor de FEV1 inferior al 5% para iniciar el estudio.

#### *Provocación bronquial con metacolina*

Se utilizó metacolina como agonista para la determinación de la HRB, realizándose todas las exploraciones al menos 6 horas después de la inducción de esputo. Se realizaron diluciones en tampón salino a 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0, 100,0 y 200,0 mg/ml. Los pacientes inhalaban de forma sucesiva las diluciones de metacolina, determinándose el valor de FEV1 3 minutos después de cada dosis. La prueba concluía cuando el paciente inhalaba la concentración más alta (200 mg/ml) o cuando el valor del FEV1 descendía por debajo del 40% respecto al basal.

La respuesta bronquial a la metacolina se cuantificó según los valores de PD20 (dosis de metacolina, en µmol, necesaria para descender el valor de FEV1 en un

20%), pendiente de la curva dosis respuesta (CDR) (cociente entre el porcentaje de la máxima caída de FEV1 y la máxima dosis de metacolina inhalada) y respuesta máxima (porcentaje de descenso del valor de FEV1 a partir del cual no se producen caídas superiores a pesar de la administración de dosis crecientes de agonista).

#### *Provocación bronquial con D. pteronyssinus*

Se realizaron siguiendo la normativa de la EAACI<sup>23</sup>, con el extracto de *D. pteronyssinus*, a partir del cual se elaboraron diluciones en tampón salino a las concentraciones de: 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 UB/ml. En el estadio basal se registró el valor de pico espiratorio de flujo (PEF). Los pacientes inhalaban sucesivamente las dosis de alérgeno, determinándose a los 10 minutos el valor de FEV1. La prueba concluía cuando el paciente inhalaba la dosis más alta (10 UB/ml) o cuando se obtenía un descenso del 20% en el valor del FEV1. El paciente registró horariamente el valor de PEF durante las 12 h siguientes.

La respuesta inmediata al alérgeno se valoró mediante el valor de PD20 alérgeno (dosis de alérgeno, en µg de Der p1, necesaria para descender en un 20% el valor basal del FEV1), la pendiente CDR (cociente entre el porcentaje máximo de caída de FEV1 y la máxima dosis de alérgeno administrada) y el área debajo de la CDR (determinado por planimetría y expresado en cm<sup>2</sup>). La respuesta tardía se evaluó mediante el porcentaje máximo de descenso del valor del PEF con respecto al valor basal, y el área debajo de la curva tiempo respuesta (CTR) (determinado por planimetría).

#### *Inducción de esputo*

Antes de iniciar la técnica de inducción de esputo, los pacientes inhalaban salbutamol (4 puff). Para evitar la contaminación de la muestra se les indicó que se enjuagasen la boca y limpiaran la nariz. Se administró salino hipertónico mediante un nebulizador ultrasónico (Ultraneb 99, DeVibiss), al 5% en 2 periodos y al 10% en un último período, todos de 10 min de duración, al final de cada uno de los cuales los pacientes intentaron expectorar. La técnica finalizaba al obtenerse una mues-

tra de esputo adecuada o al inhalarse la última concentración de salino.

#### **Métodos "in vitro"**

##### ***Estudio de la exposición ambiental a D. pteronyssinus***

Los pacientes recogieron muestras de polvo del domicilio de acuerdo al método estandarizado de Mosbech<sup>24</sup>. Las muestras obtenidas se congelaron a -70°C hasta su posterior análisis, que se realizó por duplicado y en un único ensayo basado en anticuerpos monoclonales, en el que se cuantificaron los niveles de alérgenos mayoritarios de *Dermatophagoides*: Der p1 y Der f1 mediante el método de Ventas<sup>25</sup> y Der 2 mediante la técnica de Heyman<sup>26</sup>.

##### ***Procesado de la muestra de esputo***

La muestra de esputo se procesó según la técnica de Fahy<sup>20</sup> modificada. Se midió el volumen total de la muestra, mezclándose a partes iguales con DTT en un agitador espiral a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se procedió al filtrado a través de poros de 0,42µm y centrifugado de la mezcla, obteniéndose una fase líquida que se congeló a -70°C hasta su posterior análisis. Con el sedimento se realizaron tinciones citológicas convencionales (Papanicolaou y Giemsa) para el recuento porcentual celular. Se consideró una muestra como válida, cuando la contaminación escamosa era inferior al 20% y se visualizaban macrófagos alveolares<sup>20</sup>.

##### ***Cuantificación de productos celulares en suero y esputo***

Se determinaron los valores de IgE total y específica en todas las muestras de suero obtenidas en situación basal. Se midieron los niveles de ECP en todas las muestras de suero y de esputo, y los de triptasa en todas las muestras de esputo. La cuantificación de IgE total y específica, de ECP y de triptasa se realizó mediante fluoroenzimoimmunoensayo comercial (Pharmacia CAP system). Se determinó la concentración de albúmina en todas las muestras de esputo mediante nefelometría automatizada y las de IL-5 mediante un ELISA comercial (Quantikine, R&D system). Todas las determinaciones se realizaron en un único ensayo y por duplicado.

### Análisis estadístico

Los datos se expresaron como valores de mediana e índice intercuartílico (IQR). Los valores de PD20 y pendiente CDR metacolina y alérgeno fueron transformados logarítmicamente. Las diferencias entre grupos se estudiaron mediante el análisis de la varianza y el test de Kruskal-Wallis para variables no paramétricas. Las diferencias entre 2 grupos se estudiaron mediante el test U de Mann Whitney.

Los incrementos inducidos por el alérgeno sobre los índices inflamatorios, así como sobre los porcentajes de FEV1 y de FEV1-respuesta máxima se expresaron como la diferencia entre los valores post-PBCA y los basales. La modificación de los valores de PD20 y de pendiente-CDR metacolina se expresó como el cociente entre la diferencia de logaritmos y el logaritmo de 2. Para evaluar las diferencias entre los

valores antes y después de la PBCA se utilizó el test de Wilcoxon. La correlación entre variables se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0,05, y todos los cálculos de p fueron de doble cola.

## RESULTADOS

### Descripción del estadio basal

El valor de la mediana de la graduación de los síntomas bronquiales en asmáticos fue de 8 puntos (IQR: 5-12). Los valores de exposición alérgica y sensibilización, función pulmonar y respuesta a la metacolina y de los índices inflamatorios medidos en sangre y esputo de los grupos de pacientes obtenidos en el estadio basal se muestran en la tabla 4. No existían diferen-

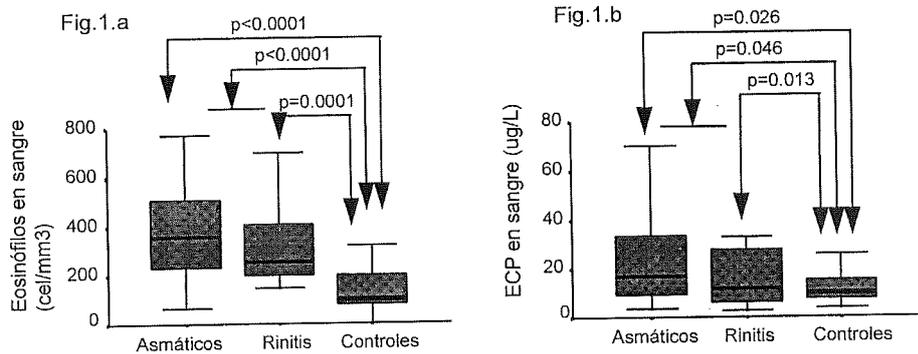
**Tabla 4.** Valores (mediana e índice intercuartílico: IQR) de exposición alérgica, sensibilización, función pulmonar y respuesta a la metacolina, e índices inflamatorios cuantificados en sangre periférica (S.P) y esputo de asmáticos, rinitis y controles, en el estadio basal.

Diagnóstico	Asmáticos	Rinitis	Controles
Exposición Der p1 (mg/g)	1,28 (IQR: 0,23-3,30)	1,85 (IQR:0,3-18,87)	No realizado
P. Cutánea (mm <sup>2</sup> )	88,5 (IQR:72,2-109)	68,92 (IQR:51,9-98,8)	Negativo
FEV1 basal (%)	100 (IQR: 94-108)	103 (IQR: 93-108)	1,1 (IQR: 1,0-1,1)
PD20 metacolina (mmol)	4,40 (IQR:1,6-15,6)	49,6(IQR:24,1-200)	Indetectable
FEV1 R. Máxima (%)	20,0 (IQR:14,7-29,0)	16,0(IQR:10,0-22,0)	10,0 (IQR: 6,0-14,0)
Eosinófilos S.P. (cel/mm <sup>3</sup> )	359 (IQR: 233-542)	255 (IQR: 194-490)	100 (IQR:80-200)
ECP sérica (mg/L)	16,8 (IQR: 8,6-34,0)	11,7 (IQR: 6,0-28,6)	10,1(IQR7,5-15,7)
Eosinófilos esputo (%)	10,0 (IQR: 3-20)	3,0 (IQR: 0,0-8,0)	0,0 (IQR: 0,0-0,0)
Macrófagos esputo (%)	60,0 (IQR: 46,0-70,0)	69,0(IQR:61,0-87,0)	73,5 (IQR: 55,0-100,0)
ECP esputo (mg/L)	19,0 (IQR: 13,0-63,6)	11,8 (IQR: 3,7-20,5)	3,39 (IQR:1,9-10,1)
Albúmina esputo (mg/ml)	10,8 (IQR: 5,7-119,0)	8,33 (IQR: 0,0-18,2)	5,22 (IQR:0,8-43)
Triptasa esputo (mg/L)	0,0 (IQR: 0,0-0,75)	Indetectable	Indetectable
IL-5 esputo (pg/ml)	Indetectable	Indetectable	Indetectable

cias entre los grupos de asmáticos y rinitis en el grado de exposición alérgica, en el área media de la prueba cutánea ni en los valores de FEV1 basal, los cuales fueron en ambos grupos inferiores a los de controles ( $p=0,0004$  y  $p=0,013$ ). Los valores de PD20 fueron inferiores en asmáticos que en rinitis ( $p<0,0001$ ) y en ambos grupos respecto a los controles ( $p=0,005$  y  $p=0,05$ ). Se identificaron valores de máxima respuesta bronquial en todos los controles y en la

mayor parte de los pacientes con rinitis; en cambio, el número de asmáticos en los que se detectó un valor de "plateau" fue inferior en asmáticos que en rinitis ( $p=0,0003$ ).

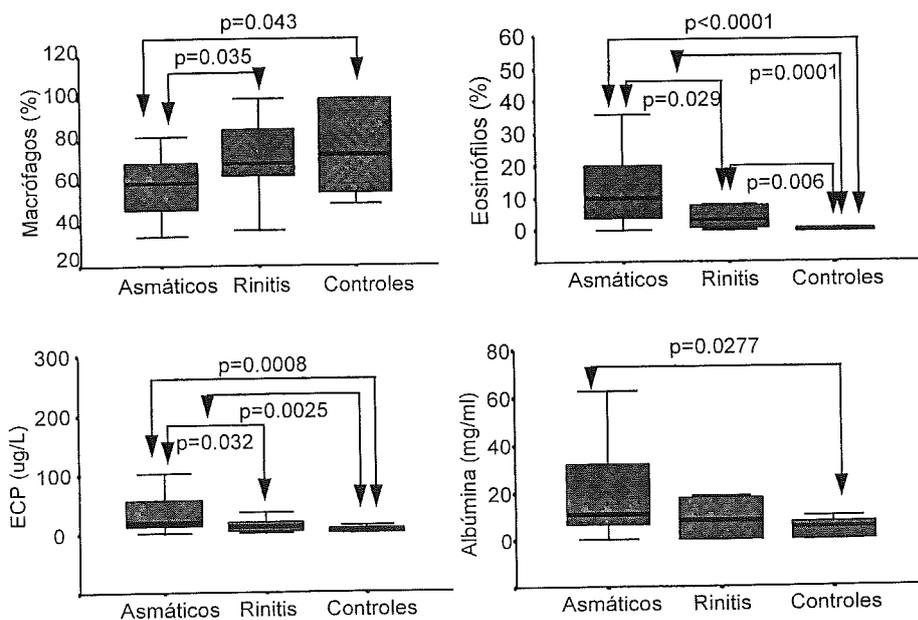
Los valores de eosinófilos en sangre y de ECP sérica, superiores en asmáticos y rinitis respecto a controles, no diferían entre ambos grupos de pacientes (Fig.1). Se identificaron macrófagos alveolares en todas las



**Figura 1.** Comparación de los valores de eosinófilos en sangre periférica (células/mm<sup>3</sup>) (Figura 1.a) y de ECP sérica (ug/L) (Figura 1.b) entre los grupos de pacientes.

muestras de esputo (Fig. 2a). El porcentaje de eosinófilos en esputo fue superior en asmáticos que en rinitis y en éstos que en controles (Fig. 2b). Se detectaron niveles de ECP y de albúmina en la mayor parte de las muestras de esputo, siendo los valores de ECP superiores en asmáticos que en rinitis y

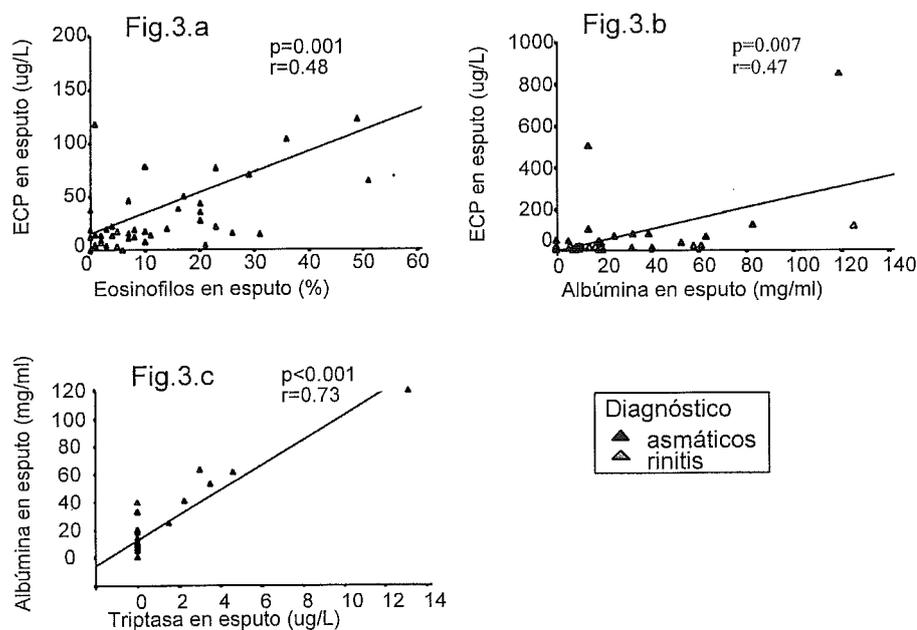
controles, aunque no existían diferencias entre estos últimos (Fig. 2c). Los valores de albúmina en esputo fueron superiores en asmáticos que en controles (Fig. 2d). Se detectó triptasa en el 24% de las muestras de esputo de asmáticos. No se detectó IL-5 en ninguna de las muestras.



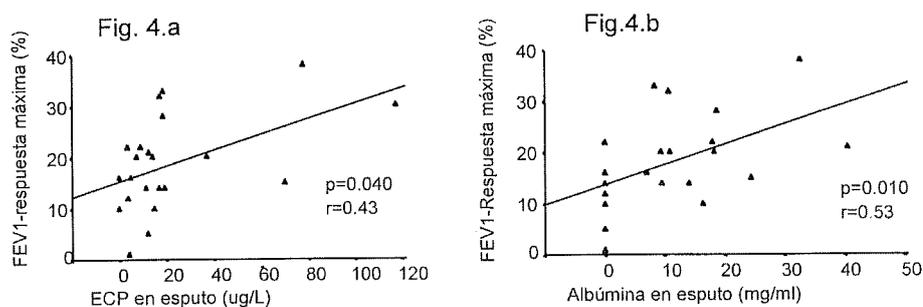
**Figura 2.** Comparación de los porcentajes de macrófagos (Figura 2.a), eosinófilos (Figura 2.b) y los valores de ECP (Figura 2.c) y albúmina (Figura 2.d) en las muestras de esputo de asmáticos, rinitis y controles.

Los valores de ECP en esputo se correlacionaron con los de eosinófilos (Fig. 3a) y de albúmina (Fig. 3b) en esputo. En el grupo de asmáticos los niveles de triptasa se correlacionaron con los de ECP ( $r=0,39$ ) y con los de albúmina (Fig. 3c). Entre los asmáticos, la exposición a Der p1 tendió a correlacionarse con la graduación clínica ( $r=0,36$ ) y con los valores de triptasa en

esputo ( $r=0,40$ ). Existía asociación inversa entre el índice Tiffenau y los valores de albúmina ( $r=-0,39$ ) y de triptasa ( $r=-0,44$ ) en esputo. Los valores de PD20 metacolina se correlacionaron inversamente con los eosinófilos ( $r=-0,31$ ) y con los valores de ECP ( $r=-0,25$ ) en esputo. Los valores de FEV1-respuesta máxima se asociaron con los niveles de ECP y de albúmina en esputo (Fig. 4).



**Figura 3.** Correlación entre los valores de ECP y el porcentaje de eosinófilos en esputo (Fig. 3.a) y de albúmina (Fig. 3.b) en esputo del total de los pacientes. Correlación entre los valores de triptasa y de albúmina (Fig. 3.c) en esputo del grupo de pacientes asmáticos.



**Figura 4.** Correlación entre los valores de respuesta máxima bronquial y los índices inflamatorios en esputo basal: ECP (Figura 4.a) y albúmina (Figura 4.b)

### Respuesta a la PB con *D. pteronyssinus*

Todos los asmáticos y el 80% de rinitis presentaron respuesta positiva a la PBCA. Los índices de respuesta bronquial al alérgeno en los grupos de asmáticos y rinitis, así como las diferencias entre ambos se muestran en la Tabla 5. Los asmáticos inhalan dosis inferiores de alérgeno, presentando una respuesta inmediata y tardía más intensa que el grupo de rinitis (Tabla 5).

Los valores de PD20 alérgeno se correlacionaron con los de PD20 metacolina ( $p=0,51$ ) y con el porcentaje de eosinófilos en esputo ( $r=-0,26$ ). La magnitud de la respuesta tardía se correlacionó en el grupo de asmáticos con la exposición a Der p1 ( $r=0,44$ ) y en el total de la muestra con los valores basales de PD20 metacolina ( $r=-$

0,43), tendiendo a asociarse con los niveles de ECP ( $r=0,29$ ) y con los de triptasa ( $r=0,33$ ) en esputo.

### Resultados tras la PB con *D. pteronyssinus*

La modificación de los valores de función pulmonar, respuesta a la metacolina y de los índices inflamatorios en sangre y esputo de asmáticos y rinitis se muestra en la tabla 6. En el grupo de asmáticos los valores de PD20 metacolina descendieron respecto al valor basal ( $p<0,001$ ), no identificándose en la mayor parte, la respuesta máxima bronquial. En el grupo de rinitis, no se modificaron los valores de PD20 metacolina, pero sí los de respuesta máxima ( $p=0,008$ ). En ambos grupos se elevaron los valores de eosinófilos y de ECP en sangre (Fig.5), sin que se apreciaran dife-

Tabla 5. Respuesta a la PBCA en los grupos de asmáticos y de rinitis.

Diagnóstico	Asmáticos	Rinitis	Diferencia
Respuesta tardía (%)	51,6%	35,7%	$p=0,0023$
Dosis de Der p1 (mg)	18,7 (IQR: 8,7-38,7)	38,7 (IQR: 38,7-38,7)	$p=0,0004$
PD20 (mg Der p1)	11,0 (IQR: 5,2-30,2)	0,49 (IQR: 0,18-1,19)	$p=0,0010$
Pendiente CDR (%/mg Der p1)	1,6 (IQR: 0,67-3,56)	1,27 (IQR: 1,07-2,23)	$p=0,0215$
Área inmediata (cm <sup>2</sup> )	2,63 (IQR: 1,80-3,76)	11,3 (IQR: 0,0-16,36)	NS
Caída PEF (%)	15,0 (QR: 3,23-25,9)	0,27 (IQR: 0,0-0,64)	$p=0,0399$
Área tardía (cm <sup>2</sup> )	7,0 (IQR: 4,5-10,0)		

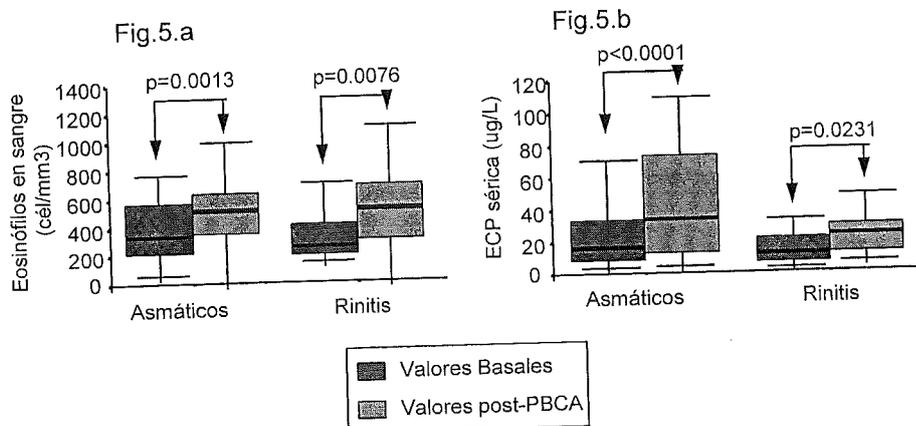


Figura 5. Comparación de los valores basales y tras la PBCA sobre el número total de eosinófilos en sangre periférica (Figura 5.a) y los valores de ECP sérica (Figura 5.b) en los grupos de asmáticos y rinitis.

rencias en los incrementos de ambas variables entre asmáticos y rinitis (Tabla 6). Los valores de eosinófilos y de ECP en esputo se elevaron tras la PBCA en ambos grupos (Fig.6a,b), siendo el incremento de los niveles de ECP superior entre los asmáticos (Fig.6.c). Ni los valores de albúmina ni de triptasa en esputo se modificaron tras la PBCA. La detección de IL-5 fue negativa.

La magnitud de la respuesta tardía al alérgeno se correlacionó con los niveles de albúmina en esputo tras la PBCA ( $r=0,32$ ) y con el incremento de eosinófilos en el espu-

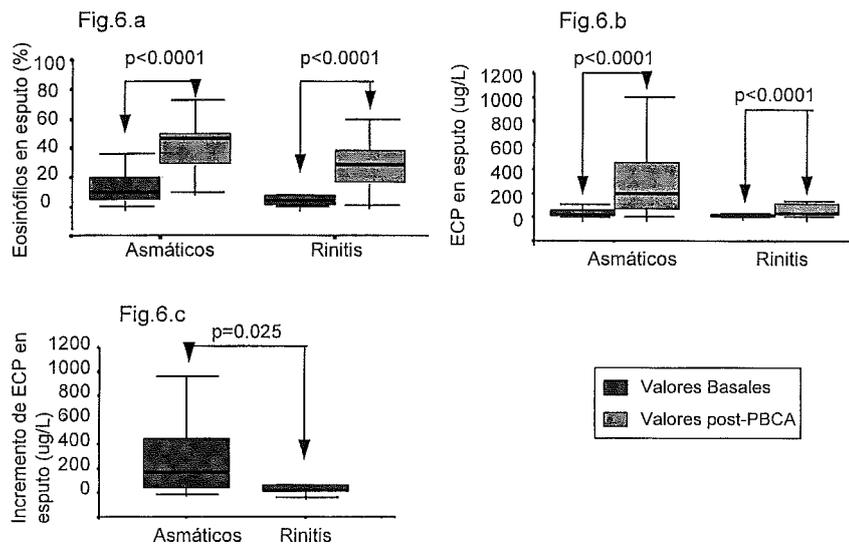
to ( $r=0,35$ ). El incremento de eosinófilos en esputo se correlacionó con el grado de exposición a Der p1 ( $r=0,37$ ) y el incremento de ECP en esputo con los valores basales de PD20 metacolina ( $r=-0,40$ ). Los niveles basales de ECP en esputo se asociaron con el incremento de los valores de PD20 ( $r=-0,40$ ).

Los valores de PD20 metacolina tras la PBCA se correlacionaron inversamente con los valores de eosinófilos, ECP, albúmina y con los de triptasa en el grupo de asmáticos, de las muestras de esputo post-PBCA (Fig.7). El incremento de los niveles

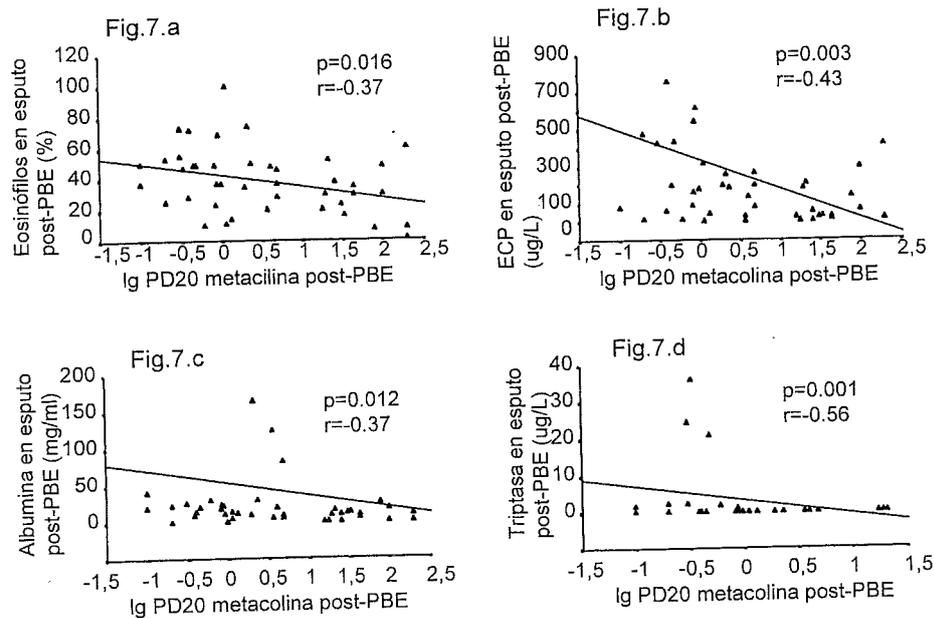
**Tabla 6.** Modificación de los valores (mediana e índice intercuartílico:IQR) de función pulmonar, de respuesta a la metacolina y de los índices inflamatorios en sangre periférica y esputo indicadas por la PBCA en los grupos de asmáticos y rinitis y diferencias entre ambos.

Diagnóstico	Asmáticos	Rinitis	Diferencias
$\Delta$ FEV1 (%)	-9,0(IQR:-15,2—3,2)	-4,0(IQR:-9,0-1,0)	NS
$\Delta$ PD20 metacolina (PDC)	-2,0(IQR:-3,3—0,7)	0,0(IQR:-2,2-0,4)	$p=0,0036$
$\Delta$ R. Máxima (PDC)	10,0(IQR:4,3-Indetectable)	2,0(IQR: 0,0-10,5)	No realizado
$\Delta$ eosinófilos S.P. (cel/mm <sup>3</sup> )	507 (IQR: 341-668)	516 (IQR: 208-686)	NS
$\Delta$ ECP sérica ( $\mu$ g/L)	12,4(IQR:0,9-33,0)	6,6 (IQR: 0,7-21,0)	NS
$\Delta$ eosinófilos esputo (%)	26,0 (IQR: 18-36)	18,0 (IQR: 8,5-39,0)	NS
$\Delta$ ECP esputo ( $\mu$ g/L)	168 (IQR: 22-463)	22 (IQR: 7,2-63,9)	$p=0,025$
$\Delta$ albúmina esputo (mg/ml)	4,4 (IQR:-9,2-22,3)	0,0 (-7,1-17,2)	NS
$\Delta$ triptasa esputo ( $\mu$ g/L)	0,0(IQR: 0,0-0,2)	Indetectable	No realizado

PDC: pasos de doble concentración.



**Figura 6.** Comparación de los valores basales y post-PBCA del porcentaje de eosinófilos (Figura 6.a) y los valores de ECP (Figura 6.b) en las muestras de esputo de los pacientes asmáticos y con rinitis. Comparación del incremento inducido por la PBCA sobre los valores de ECP en esputo de los pacientes con asma y rinitis (Figura 6.c).



**Figura 7.** Correlación entre el grado de HRB post-PBCA y los índices inflamatorios post-PBCA: eosinófilos (Figura 7.a), ECP (Figura 7.b), albúmina (Figura 7.c) y triptasa (Figura 7.d) en las muestras de esputo.

de ECP en esputo se correlacionó con la modificación de los valores de pendiente ( $r=0,33$ ) y con el descenso de los valores de respuesta máxima bronquial ( $r=-0,64$ ).

## DISCUSIÓN

Hemos tratado de analizar los fenómenos que giran alrededor del desarrollo de la inflamación de la vía aérea en sujetos con alergia respiratoria sensibilizados a *D. pteronyssinus* (exposición, sensibilización, función pulmonar basal y respuesta a la metacolina analizada mediante curvas dosis-respuesta completas y sensibilidad bronquial al alérgeno), así como de evaluar las interrelaciones existentes entre ellos.

En nuestro estudio, al igual que en otros realizados en el área de Pamplona<sup>11,27</sup>, o en regiones de clima continental<sup>10</sup>, la mayor parte de los sujetos estaban expuestos a niveles de Der p1 inferiores a 2 µg/g de polvo, valor considerado umbral

de sensibilización y desarrollo de asma<sup>8</sup>. Es bien conocido que el aumento de la exposición alérgica incrementa el grado de inflamación eosinofílica de la vía aérea<sup>5,7</sup> y la HRB<sup>6</sup>. Sin embargo, no encontramos asociación entre el grado de exposición ambiental y la inflamación eosinofílica o la HRB, lo que podría ser atribuido a que el diseño transversal del estudio valora fundamentalmente el papel del alérgeno como desencadenante y no como inductor del asma<sup>28</sup>, para lo cual hubiera sido necesario realizar un estudio longitudinal, quizás desde etapas previas al inicio de la clínica de la enfermedad. Dicha hipótesis se apoya en la asociación existente en el grupo de asmáticos entre la exposición alérgica, la expresión clínica del asma y los valores de triptasa en el esputo, sugiriendo que la exposición alérgica determina un estado de estimulación de los mastocitos que a su vez conduciría al

aumento de la expresión clínica de la enfermedad.

La coexistencia en el asma bronquial de la inflamación eosinofílica de la vía aérea y de la HRB ha determinado que múltiples autores hayan intentado establecer una relación causal entre ambas entidades. En nuestro estudio, la HRB cuantificada por los valores de PD20 estaba parcialmente influenciada por el porcentaje de eosinófilos y los niveles de ECP en las muestras de esputo basal, lo que concuerda con estudios previos realizados en LBA<sup>29</sup> y esputo<sup>30</sup>. La mayor parte de los autores han utilizado el valor de PD20, indicativo de la sensibilidad bronquial al agonista, para cuantificar la HRB. Sin embargo, los factores determinantes de la sensibilidad al agonista (destrucción del epitelio respiratorio, infiltración de la submucosa por células inflamatorias activadas y disminución de la degradación de mediadores), son probablemente diferentes de los que determinan la respuesta bronquial (aumento de la contractilidad del músculo liso, el engrosamiento de la pared bronquial determinando una mayor estenosis de la luz que para una misma contracción del músculo liso, y la pérdida de las fuerzas elásticas que se oponen a la contracción de la vía aérea)<sup>31</sup>. Los eosinófilos, a través de la producción de radicales libres y de proteínas catiónicas (ECP), dañan el epitelio bronquial, incrementando la sensibilidad al agonista<sup>32</sup>. Por otra parte, la ECP aumenta la producción de moco y estimula la liberación mastocitaria de histamina<sup>32</sup>, determinando un incremento de la permeabilidad vascular y de los niveles de albúmina en esputo, lo que conduce a un aumento del grosor de la pared a la vez que una disminución de la luz bronquial, determinando una mayor respuesta broncoconstrictora. Todo ello está de acuerdo con la asociación que en nuestro estudio existía entre la máxima respuesta bronquial y los valores de ECP y de albúmina en el esputo. La triptasa, marcador específico de activación mastocitaria, a través de su capacidad de incrementar el edema de la mucosa y de estimular la síntesis de colágeno y fibronectina<sup>15</sup> contribuye a la desestructuración de la geometría bronquial y cabe por lo tanto esperar que

esté implicada en la respuesta bronquial al agonista. Sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado asociación entre los valores de triptasa en esputo y el valor de máxima respuesta bronquial, lo que probablemente es debido a que la detección de triptasa fue baja y selectiva para el grupo de asmáticos, en los cuales la identificación de respuesta máxima bronquial fue inferior.

No están claros los mecanismos que determinan que un sujeto sensibilizado desarrolle síntomas bronquiales o no ante la inhalación del alérgeno. De acuerdo con estudios previos<sup>6</sup> en la mayoría de los pacientes con rinitis la PBCA fue positiva, aunque con dosis de alérgeno superiores a las de asmáticos. Sin embargo, tanto la intensidad de la respuesta como la frecuencia de reacciones tardías fueron inferiores en rinitis que en asmáticos, a pesar de haber precisado inhalar dosis superiores de alérgeno. Nuestros resultados sugieren que la respuesta a la PBCA es un proceso multifactorial, en el que el infiltrado eosinofílico de la vía aérea y la HRB contribuyen a determinar la respuesta inmediata, mientras que la carga alérgica ambiental, el grado de activación basal de eosinófilos y mastocitos en esputo y la HRB interactúan para determinar la respuesta tardía. La exposición alérgica ambiental ejerce un efecto potenciador sobre la frecuencia e intensidad de respuestas tardías<sup>33</sup>, lo que está de acuerdo con la asociación que en el grupo de asmáticos hallamos entre la exposición alérgica y la intensidad de la respuesta tardía. El aumento del número y de la activación de células inflamatorias que infiltran la mucosa bronquial determina un incremento del grosor de la pared, que se traduce en una mayor estenosis de la luz ante la contracción del músculo liso. Además, el infiltrado inflamatorio basal podría, a través de la liberación de mediadores, potenciar la respuesta inflamatoria originada por la PBCA.

La PBCA, como ya ha sido descrito por otros autores, determinó un incremento de la sensibilidad<sup>34</sup> y de la respuesta a la metacolina, así como de la inflamación eosinofílica en sangre periférica<sup>34</sup> y en la vía aérea<sup>5,7</sup>. Aunque la magnitud de los cam-

bios inflamatorios y en la HRB no se asociaban, encontramos en nuestro estudio que las correlaciones existentes entre los índices inflamatorios en esputo y la HRB obtenidas tras la PBCA se incrementaban respecto a las halladas en el estadio basal. Como se ha comentado con anterioridad, la HRB es un proceso multifactorial en el que interactúan diversos mecanismos entre los que se encuentra la inflamación de la vía aérea. Sin embargo, la HRB es ampliamente dependiente de los cambios estructurales que se han establecido en la vía aérea (pérdida de las fuerzas elásticas, aumento del grosor y de la rigidez bronquial) secundarios al menos en parte, al mantenimiento del infiltrado inflamatorio a lo largo del tiempo. El hecho de que la correlación entre ambas entidades se eleve tras la PBCA podría ser consecuencia de que la aplicación de un estímulo alérgico puntual determinaría un incremento agudo de la celularidad, el edema y la secreción de moco, que potenciarían directamente la HRB.

Cabe destacar que en el grupo de rinitis de nuestro estudio, la PBCA no modificó la sensibilidad a la metacolina, a pesar de que se evidenció una respuesta eosinofílica de la vía aérea y de que los valores de obstrucción bronquial con los que se obtuvo la respuesta máxima se incrementaron. Estos datos, junto con el hecho de que los pacientes con rinitis presentaban en estadio basal un infiltrado eosinofílico de la vía aérea, sugieren que la inhalación del alérgeno en los sujetos con rinitis induce cambios profundos de la dinámica de la vía aérea que, aunque no se traducen en un incremento de la sensibilidad bronquial al agonista, determinan una mayor respuesta broncoconstrictora del músculo liso. Todo ello apoya la hipótesis de que la rinitis alérgica constituye un estadio inicial o de riesgo para el desarrollo de asma bronquial<sup>35</sup>.

Por último, hemos demostrado que el análisis de la inflamación eosinofílica en las muestras de esputo inducido aporta una información superior a la de sangre periférica. En primer lugar, el estudio de las muestras de esputo, pero no el de sangre periférica, permitía diferenciar sujetos sensibilizados con asma, de los sujetos

que únicamente presentaban síntomas de vías aéreas superiores. En segundo lugar y aunque los índices de inflamación eosinofílica se elevaban tanto en asmáticos como en rinitis tras la PBCA, el grado de activación eosinofílica en asmáticos sólo era superior cuando se evaluaban las muestras de esputo. En tercer lugar, la HRB, la exposición alérgica o la expresión clínica de la enfermedad se correlacionaban con el grado de inflamación cuando ésta se evaluaba en las muestras de esputo pero no en sangre periférica.

La IL-5 es un potente factor quimiotáctico y de activación de eosinófilos; sin embargo, a pesar de que evidenciamos una respuesta eosinofílica frente a la PBCA, superior en asmáticos, la detección de IL-5 fue en todos los casos, tanto en estadio basal como tras la PBCA, negativa. Estos resultados se podrían atribuir a la dilución de la muestra de esputo, o a un posible efecto del DTT destruyendo los puentes disulfuro que conforman la molécula de IL-5. Sin embargo, creemos que la ausencia de detección de IL-5 es más probablemente secundaria a la alta afinidad que dicha molécula presenta por la matriz de moco, por lo que cabe la posibilidad que durante el proceso de filtrado previo a la obtención del sobrenadante se pierda la IL-5 de la muestra<sup>36</sup>.

Como conclusión, el análisis de las muestras de esputo inducido es un medio adecuado para evaluar la inflamación eosinofílica de la vía aérea, que aporta información superior a la de sangre periférica, y complementaria al control espirométrico utilizado para cuantificar la respuesta a la PBCA. Por ello, creemos que la evaluación del esputo debiera ser contemplada en el diagnóstico y seguimiento del paciente asmático, así como en la valoración de la respuesta de la vía aérea a la provocación con alérgeno.

## BIBLIOGRAFÍA

1. International Consensus Report on Diagnosis and Management of asthma. International Asthma Management Project. Definition, Diagnosis and Classification. *Allergy* 1992; 47: Suppl. 13; 1-5.
2. SALOME CM, XUAN W, GRAY EJ, BELOAISSOVA E, PEAL JK. Perception of airway narrowing in a

- general population sample. *Eur Respir J* 1997; 10: 1052-1058.
3. COCKCROFT DW, BERSHCHEID BA, MURDOCK KY. Unimodal distribution of bronchial responsiveness to inhaled histamine in a random human population. *Chest* 1983; 83: 751-754.
  4. JEFFERY PK, WARDLAW AJ, NELSON FC, COLLINS JV, KAY AB. Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1745-1753.
  5. LIU MC, HUBBAR WC, PROUD D, STEADEY BA, GALLI SJ, KAGEY-SOBOTKA A. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheal airways in allergic asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 51-58.
  6. BONAVIA M, CRIMI E, QUAGLIA A, BRUSSASCO V. Comparison of early and late asthmatic responses between patients with allergic rhinitis and mild asthma. *Eur Respir J* 1996; 9: 905-909.
  7. FAHY JV, LIU J, WONG H, BOUSHLEY HA. Analysis of cellular and biochemical constituents of induced sputum after allergen challenge: a method for studyng allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 1031-1039.
  8. SEAIC. Alergologica-92. Mapa epidemiológico de la alergia en España. Madrid: Nilo IG, 1993.
  9. SPORIK R, HOLGATE ST, PLATTS-MILLS TAE, COGSWELL JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood- a prospective study. *N Engl J Med* 1990; 323: 502-508.
  10. WICKMAN M, NORDVALL SL, PERSHAGEN G, SUNDELL J, SCHWARTZ B. House dust mite sensitization in children and residential characteristics in a temperate region. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 89-95.
  11. OLAGUIBEL JM, QUIRCE S, GARCÍA FIGUEROA BE, BARBER D, RICO P, TABAR AI. Grado de exposición alérgica a Dermatophagoides spp y eficacia de las medidas físicas de desalergenización en el área de Pamplona. *Rev Esp Alergol Clin Immunol* 1994; 9: 2: 83-90.
  12. PLATTS-MILLS TAE, HEYMANN PW, LONGBOTTOM JL, WILKINS SR. Airborne allergens associated with asma: particle sizes carrying dust mite and rat allergens measured with a cascade impactor. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 850-857.
  13. TOVEY ER, CHAPMAN MD, WELLS CW, PLATTS-MILLS TAE. The distribution of dust mite allergen in the houses of patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124: 630-635.
  14. GONZÁLEZ MC, DIAZ P, GALLEGUILLOS FR, ANDIA P, CROMWELL O, KAY AB. Allergen-induced recruitment of bronchoalveolar helper (OKT4) and supressor (OKT8) T-cells in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 600-604.
  15. GALLI SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 1993; 328: 257-56.
  16. VAN VYVE T, CHANEZ P, BOUSQUET J, LACOSTE JY, MICHEL FB, GODARD P. Safety of bronchoalveolar lavage and bronchial byopsies in patients with asthma of variable severity. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 116-121.
  17. POPOV T, GOTTSCHALK R, KOLENDOWITZ R, DOLOVICH J, POVERES P, HARGREAVE FE. The Evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 778-783.
  18. PIZZICHINI E, PIZZICHINI M, EFTHIMIADIS A, EVANS S, MORRIS MM, SQUILLACE D et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproductibility and validity of cell fluid measurements. *Am J Respir Crit Care Dis* 1996; 154: 308-317.
  19. PIZZICHINI E, PIZZICHINI MMM, EFTHIMIADIS A, HARGREAVE FE, DOLOVICH J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996; 9: 1174-1180.
  20. FAHY JV, LIU J, WONG H, BOUSHLEY HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1126-1131.
  21. STEEN N, HUTCHINSON A, MCCOLL E, ECCLES MP, HEWISON J, MEADOWS KA, BLADES SM, FOWLER P. Development of a symptom based outcome measure for asthma. *Br Med J* 1994; 309: 1065-1068.
  22. DREBORG S, ed. Skin tests used in type I allergy testing. Position Paper. *Allergy*, 1989 (Suppl. 10) 44.
  23. STERK PJ, FABBRI LM, QUANJER PH, COCKCROFT DW, O'BYRNE PM, ANDERSON SD, JUNIPER EF, MALO JL. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Eur Respir J* 1993; 6, (Suppl 16); 53-83.
  24. MOSBECH H, LIND P. Collection of house dust for analysis of mite allergens. *Allergy* 1986; 41: 373-378.

25. VENTAS P, LOMBARDEO M, DUFFORT O, CARREIRA J. Cuantificación de los alergenos Der p1 y Der f1 de los ácaros y Fel d1 de gato mediante un ELISA en fase sólida. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1990; 5: 71-75.
26. HEYMAN PW, CHAPMAN MD, AALBERSE RC, FOX JW, PLATS-MILLS TAE. Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der pII and Der fII) from house dust mites *Dermatophagodes spp.*. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 1055-1067.
27. ALVAREZ MJ, OLAGUIBEL JM, ACERO S, QUIRCE S, GARCÍA BE, CARRILLO T, CORTÉS C, TABAR AI. Indoor allergens and dwelling characteristics in two cities in Spain. *Invest Allergol Clin Immunol* 1997; 7: 572-577.
28. CALHOUM WJ, DICK EC, SCHATZ LB, BUSSE WW, a common cold virus, rhinovirus 16, potentiates airway inflammation after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *J Clin Invest* 1994; 94: 2200-2008.
29. WARDLAW AJ, DUNNETTE S, GLEICH GJ, COLLINS JV, KAY AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma: Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 62-69.
30. RONCHI MC, PIRAGINO C, ROSI E, STENDARDI L, TANINI A, GALLI G, DURANTI R, Scano G. Do sputum eosinophils and ECP relate to the severity of asthma? *Eur Respir J* 1997; 10: 1809-1813.
31. MORENO RH, HOGG JC, PAR'E PD. Mechanics of airway narrowing. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 272-277.
32. SUR S, GLEICH GJ, OFFORD KP, SWANSON MC, OHNISHI T, MARTIN LB, WAGNER JM, WEILER DA, HUNT LW. Allergen challenge in asthma: association of eosinophils and lymphocytes with interleukin5. *Allergy* 1995; 50: 891-898.
33. LAM S, TAN F, CHAN H, CHAN-YEUNG M. Relationship between types of asthmatic reaction, nonspecific bronchial hyperreactivity, and specific IgE antibodies in patients with red cedar asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72: 134-139.
34. DURHAM SR, GRANEEK BJ, HAWKINS R, NEWMAN TAYLOR AJ. The temporal relationship between increases in airway hyperresponsiveness to histamine and late asthmatic responses induced by occupational agents. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 398-406.
35. FORESI A, LEONE C, PELUCCHI A, MASTROPASQUA B, CHETTA A, D'IPPOLITO R et al. Eosinophils, mast cells, and basophils in induced sputum from patients with seasonal allergic rhinitis and perennial asthma: relationship to methacholine responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 58-64.
36. LOUIS R, SHUTE J, BIAGI S, STANCIU L, MARRELLI L, TENOR H et al. Cell infiltration, ICAM-1 expression, and eosinophil chemotactic activity in asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Dis* 1997; 155: 466-472.