

## El estudio de la inflamación de la vía aérea en el asma bronquial mediante el análisis citológico y de químicos en la fase fluida de muestras de esputo inducido

*The study of the inflammation of the airway in bronchial asthma by cytological and chemical analysis in the fluid phase of samples taken by sputum induction*

J.M. Olaguíbel<sup>1</sup>, M.J. Álvarez<sup>1</sup>, B.E. García<sup>1</sup>, A.I. Tabar<sup>1</sup>, E. Urbiola<sup>2</sup>

### RESUMEN

Durante los últimos años, el estudio de muestras de biopsia bronquial, o lavado broncoalveolar ha permitido evidenciar la existencia de importante inflamación eosinofílica, incluso en los casos de asma bronquial leve. Esta circunstancia ha renovado el interés por el estudio de la inflamación de la vía aérea mediante técnicas no invasivas. La inducción de esputo es una técnica reproducible y segura para obtener muestras de secreciones de la vía aérea de sujetos asmáticos. En estas muestras se pueden realizar no sólo recuentos celulares diferenciales, sino también medidas de marcadores de inflamación de la vía aérea, en la fase fluida. En este artículo revisamos distintos estudios en los que se han realizado estas medidas en sujetos asmáticos, afectados de otras patologías respiratorias y sanos, e investigamos su validez. Finalmente también se considera posibles aplicaciones clínicas futuras de este estudio.

**Palabras clave:** Asma bronquial. Inflamación de la vía aérea. Eosinofilia. Esputo inducido.

### ABSTRACT

In recent years the study of samples of bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage fluid has made it possible to show the existence of significant airway mucosal inflammation, even in cases of mild bronchial asthma. This has led to a renewed interest in the use of sputum to assess airway inflammation non-invasively. Sputum induction has recently been proposed as a non-invasive alternative to bronchoscopy for the collection of airway secretions from asthmatic subjects. Sputum induction yields satisfactory samples of sputum in the great majority of asthmatic subjects, and both differential cell counts and the measurement of molecular markers of inflammation in the sputum fluid phase are feasible. In this paper we review studies where these measurements have been taken from subjects who were asthmatic, affected by other respiratory pathologies or healthy, and we assess their validity. Finally, we consider possible future clinical applications of sputum measurement of airway inflammation in asthma.

**Key words:** Bronchial asthma. Airway inflammation. Eosinophilia. Induced sputum.

ANALES Sis San Navarra 1998; 21 (2): 173-186.

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

Este trabajo ha sido en parte financiado mediante ayudas a proyectos de investigación del Gobierno de Navarra.

Aceptado para su publicación el 19 de mayo de 1998.

### Correspondencia

Dr. José M<sup>a</sup> Olaguíbel Rivera  
Sección de Alergología. C.S. Conde Oliveto  
Plaza de la Paz s/n  
31002 Pamplona  
Tfno. 948 429307

## INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad crónica de la vía aérea en la que múltiples células, inflamatorias y parenquimatosas, así como sus mediadores, interaccionan para dar lugar al proceso de inflamación / reparación característico de la enfermedad<sup>1</sup>. A partir de los años 60 aparecen los primeros estudios en sujetos vivos, en los que muestras relativamente grandes de mucosa bronquial eran obtenidas mediante broncoscopia rígida. Estos estudios sentaron las características básicas de la inflamación en el asma y su diferencia con otras patologías crónicas de la vía aérea, describieron la eficacia del tratamiento a largo plazo con corticoides y mostraron el enorme daño presente sobre la superficie epitelial<sup>2</sup>. La introducción del fibrobroncoscopio durante la década de los 80, permitió obtener, con mayor facilidad, muestras seriadas en distintas circunstancias y paralelamente se desarrollaron técnicas de microscopía electrónica, estudios inmunohistológicos y moleculares, que son la base actual del conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad<sup>3</sup>. La biopsia sigue siendo considerada, hoy en día, por algunos expertos como la prueba de referencia ("gold standard") para la investigación del proceso inflamatorio en desarrollo sobre la mucosa de la vía aérea<sup>3</sup>. No obstante, las muestras provienen de la vía aérea central, siendo los cambios existentes en este tramo, no necesariamente extrapolables a los presentes en tramos distales. Por otra parte, tampoco parece muy adecuada cuando se pretende estudiar las células presentes en la superficie epitelial. En este sentido, mediante la fibrobroncoscopia, podemos además obtener muestras del material existente en la luz de la vía aérea central mediante el lavado bronquial (LB), de la vía periférica y compartimento alveolar mediante el lavado broncoalveolar (LBA) o células de la superficie mucosa (cepillado bronquial), que complementan la información obtenida por la biopsia. Ello permite, en conjunto, estudiar la respuesta inmunoinflamatoria del asma de forma directa, y no mediante la extrapolación de los datos obtenidos de sangre periférica y/o lavado nasal, no representativos del microambiente bronquial y que ofrecen

por lo tanto una información sesgada e incompleta.

La exploración de la vía aérea mediante fibrobroncoscopio es una técnica invasiva y por lo tanto, su utilidad está limitada por su propia agresividad. Tampoco es una prueba aplicable a sujetos con asma grave o durante exacerbaciones del proceso ya que un 20% de asmáticos sometidos a fibrobroncoscopia presentan caídas de FEV1 superiores al 40%<sup>4,5</sup>. Y por último, y especialmente en el caso del LB y LBA, dadas las características propias de la ejecución de la técnica, siempre se produce una importante dilución de la muestra<sup>6</sup> que dificulta enormemente la comparación de medidas repetidas en un mismo sujeto o los resultados entre distintos individuos.

El estudio microscópico del esputo de pacientes asmáticos ha sido utilizado desde el siglo pasado, momento en que fueron descritos los cristales bipiramidales de Charcot-Leyden (derivados de la lisofosfolipasa del eosinófilo) y el resto de las características fundamentales del esputo del asmático, como son las espirales de pacientes asmáticos fue descrita por Gollash en 1889. Posteriormente, clínicos importantes como Jiménez-Díaz, Hansel o Morrow Brown<sup>7</sup>, han recomendado su utilización en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. No obstante, la utilización del esputo en el estudio de la inflamación bronquial se ha visto relegada debido a la dificultad para obtener muestras bronquiales adecuadas, al bajo rendimiento de los contajes celulares y a la falta de estudios que validasen la técnica<sup>8</sup>. En general, la importancia del estudio del esputo ha sido olvidada, tanto en la práctica clínica moderna como en la investigación en asma bronquial, hasta el comienzo de la década de los 90.

A lo largo de los últimos 8 años, el profesor Hargreave junto con el Asthma Research Group de la Universidad de Mac Master (Hamilton, Ontario, Canada) han escrito una serie de elegantes publicaciones a través de las que se ha validado y difundido el estudio del esputo: en 1989, Gibson<sup>9</sup> demuestra elevada repetitividad en el análisis del esputo espontáneo obtenido en dos días consecutivos. Pin en

1992<sup>10</sup> salva el problema de obtención de muestras mediante la inhalación de salino hipertónico que induce la expectoración y mejora la calidad de la muestra. Desgraciadamente el análisis de las muestras de esputo seguía siendo poco rentable debido a la mala definición de las células en las preparaciones y no permitía realizar mediciones adicionales al recuento celular. En 1994 Popov<sup>11</sup>, describe la técnica, que basada en la adición de ditiotreitól (DTT) a la muestra, permite la obtención de citocentrífugados, que mejoran la calidad de los recuentos celulares, y de una fase líquida en la que es posible la cuantificación de químicos y mediadores. Esta escuela preconiza la selección de acúmulos de moco

para ser posteriormente tratados y estudiados. El otro gran grupo de trabajo encabezado por Fahy y Boushey de la Universidad de California (San Francisco, USA), ha tenido también un papel importante en la estandarización y difusión de la técnica, defendiendo el estudio de todo el material completo expectorado por el paciente<sup>12</sup>.

### FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA INDUCCIÓN DE ESPUTO

Tanto la eficacia como los resultados de la inducción de esputo pueden estar influenciados por diferentes factores tanto técnicos como referentes a los sujetos seleccionados para el estudio, tal como se presenta esquematizado en la tabla 1.

**Tabla 1.** Factores que pueden influir en el resultado de la inducción de esputo.

<ul style="list-style-type: none"> <li>• FACTORES TÉCNICOS                             <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nebulizador: tipo, output, tamaño de las partículas.</li> <li>2. Salino isotónico o hipertónico.</li> <li>3. Concentraciones de salino y el tiempo de inhalación.</li> <li>4. Uso previo de broncodilatadores.</li> <li>5. Método de dispersión celular empleado.</li> <li>6. Tratamiento de la muestra.</li> </ol> </li> <li>• FACTORES NO TÉCNICOS                             <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Selección de los sujetos: diagnóstico, edad, tabaquismo, capacidad de producir esputo de forma espontánea.</li> <li>2. Estadío de la enfermedad: exacerbación, tratamiento de base.</li> </ol> </li> </ul>
--

### A. Factores técnicos

#### Nebulización

El método utilizado para la administración del salino: tipo de nebulizador, débito y tamaño de las partículas, puede modificar la eficacia de la prueba. En la tabla 2 se presentan diversos estudios que muestran la efectividad de la técnica de esputo inducido, realizados con distintos nebulizadores. Las cifras varían entre 9%-100% de obtención de muestras adecuadas, siendo en general, superiores cuando se utilizan nebulizadores con mayor débito (Ultrasónico DeVilbiss). Popov<sup>13</sup> compara los resultados de eficacia obtenidos con dos nebu-

lizadores ultrasónicos con distinto débito y tamaño de partículas similar y con un nebulizador tipo jet, con débito y tamaño de partículas inferior al de los anteriores, en la inducción de esputo de sujetos asmáticos incapaces de producirlo espontáneamente. Aunque el disconfort producido por la técnica era considerablemente menor cuando se utilizaba el nebulizador tipo jet, el porcentaje de muestras adecuadas fue del 60% con los dos nebulizadores ultrasónicos, mientras que fue sólo del 9% con el nebulizador jet. Parece, por lo tanto que es el débito del nebulizador el factor que determina un mayor rendimiento de la

**Tabla 2.** Eficacia de las distintas técnicas en función del tipo de nebulizador empleado.

Modelo	Débito	Tamaño partícula	Concentración de salino	Tiempo nebulización	Eficacia (porcentaje de muestras válidas)	Referencia
DeVilbis	2,5	4	3%	20	100%	12
Ultraneb			3%	20	60%	13
			5-10%	20	91%	50
			3%	20	91%	36
Fisoneb	0,9	5,9	3-5%	30	76%	10
			3-5%	20	79%	24
			3%	20	60%	13
Mistogen	1,1	4	4-5%	20	100%	47
			3,5-10%	20	62%	43
			4,5%	30	96%	23
Pari	0,49	3,1	3%	20	9%	13

prueba, aunque ha de tenerse también en cuenta en un segundo plano el tiempo de inhalación.

#### **Administración de soluciones de salino iso o hipertónicas**

No se conoce el mecanismo a través del que la inhalación de salino hipertónico induce la expectoración en el paciente asmático, pero parece probable que sea un efecto volumen sobre las secreciones, ya que la inducción de esputo es más efectiva cuando se utilizan soluciones hipertónicas que isotónicas<sup>13</sup>. No parece que un efecto principal sea el de aumentar el movimiento mucociliar y la tos espontánea como es el caso de pacientes afectados de fibrosis quística<sup>14</sup>, ya que en asmáticos no incrementa la tos espontánea<sup>15</sup> salvo cuando se inhala a concentraciones muy elevadas superiores al 10%<sup>16</sup>. El incremento de volumen de las secreciones puede ser debido a la atracción osmótica de agua hacia la luz de la vía aérea, pero se debe recordar que la inhalación de salino hipertónico con la secundaria hiperosmolaridad periciliar, produce un incremento en la permeabilidad vascular<sup>15</sup>, y provoca la degranulación de los mastocitos<sup>17</sup>, con liberación de mediadores.

La inhalación de soluciones hipertónicas induce broncoespasmo en asmáticos<sup>18</sup>, lo que unido a su efecto de incremento de permeabilidad vascular y la degranulación de mastocitos, plantea el problema de que los resultados obtenidos del esputo pudie-

ran no corresponder a la situación basal del sujeto y hubieran sido inducidos por la hiperosmolaridad. Sin embargo, no se han descrito incrementos significativos en el nivel de reactividad frente a metacolina (al menos cuando se tiene en cuenta la reproductibilidad de la prueba), ni existen datos claros de que pueda orquestar una respuesta inflamatoria compleja como la secundaria a la exposición frente a un alérgeno<sup>19</sup>. Makker<sup>20</sup> demuestra mediante la obtención de LBA inmediatamente después de la provocación simultánea con salino isotónico e hipertónico en dos subsegmentos pulmonares que no hay variaciones en el número de mastocitos, ni en los marcadores de su activación (histamina, triptasa ni PGD<sub>2</sub>), por lo que no parece probable que la hipertonicidad modifique, al menos de forma inmediata, las características inflamatorias de la vía aérea. Recientes publicaciones<sup>13, 21</sup>, que comparan el esputo inducido en los mismos sujetos con salino isotónico e hipertónico, demuestran que la hipertonicidad no modifica el volumen de la muestra, el número total de células o los recuentos porcentuales. Por el contrario, la viabilidad de las células y la calidad de las preparaciones es mayor, mientras que la contaminación por células escamosas es inferior. Pizzichini<sup>21</sup> compara el efecto de la hiperosmolaridad sobre los químicos del esputo, examinando muestras obtenidas de forma espontánea y comparándolas

con muestras de esputo inducidas inmediatamente después, con salino hipertónico en los mismos asmáticos. En el esputo espontáneo, encuentran concentraciones superiores de ECP y fibrinógeno, aunque sólo en el caso de éste último alcanzan diferencias significativas, lo que atribuyen al efecto dilucional que podría tener el influjo de líquido a la luz de la vía aérea inducido por la hiperosmolaridad. En cambio estos resultados contrastan con los obtenidos por Fahy<sup>22</sup>, que no encuentra aumento de la concentración de fibrinógeno en esputo tras la provocación bronquial específica con alérgeno, lo que atribuye, a que al ser éste un marcador de permeabilidad vascular, sus valores podrían estar falsamente incrementados en el esputo basal, debido al estímulo hipertónico. Por lo tanto, parece probable que las mediciones detectadas en el esputo inducido con salino hipertónico correspondan a células y químicos de fase fluida (ECP, EPX, citoquinas) preexistentes en la vía aérea y no reclutadas de forma aguda como consecuencia del estímulo hipertónico. Sin embargo, son necesarios más estudios para interpretar los valores de mediadores solubles, estableciendo cuáles son preexistentes y cuáles inducidos por el estímulo hipertónico.

#### **Concentraciones de salino y tiempos de inhalación utilizados**

En la literatura se han utilizado múltiples pautas de administración de salino hipertónico, a concentraciones fijas o crecientes (oscilando entre el 3% y el 10%). Fahy<sup>12</sup> apunta que la administración de distintas concentraciones de salino en tiempos diferentes podrían modificar las características celulares y bioquímicas del esputo, invalidando la realización de comparaciones intersujetos. Popov<sup>13</sup> no encuentra diferencias en las características celulares del esputo obtenido tras la administración de una única concentración al 3% o de concentraciones crecientes del 3% al 5%.

El tiempo durante el que se administra la solución podría tener efecto sobre la muestra final: la dilución de ésta podría ser mayor tras un tiempo de inhalación prolongado. Sin embargo, el tiempo de

inhalación que requiere cada sujeto para expectorar es variable. No hay hasta la fecha estudios que valoren la dilución de la muestra de esputo en función del tiempo de inhalación y para ello se requeriría emplear un protocolo en que, a concentraciones constantes de salino se fueran doblando los tiempos de inhalación<sup>18,23</sup>.

#### **Uso previo de broncodilatadores**

El uso de broncodilatadores  $\beta$  adrenérgicos, previo a la inducción de esputo, ha demostrado ser eficaz para prevenir la broncoconstricción excesiva y conferir seguridad a la prueba<sup>6,24</sup>. Sin embargo, ya que los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos aumentan el aclaramiento mucociliar<sup>25</sup>, inhiben la liberación de mediadores por mastocitos<sup>26</sup> y disminuyen la permeabilidad vascular<sup>27</sup>, es posible que su utilización modifique las características celulares y bioquímicas de la muestra. La inducción de esputo a asmáticos, administrando en los 30 minutos previos salbutamol o placebo, no determina diferencias en el perfil celular del esputo de ambos grupos<sup>13</sup>. Sin embargo, el grupo tratado con placebo tenía caídas superiores de FEV1 y hubo sujetos que debido a la broncoconstricción tuvieron que abandonar la prueba sin que se obtuviera muestra de esputo, mientras que al repetirles la inducción de esputo tras la administración de salbutamol se pudo obtener una muestra adecuada.

No se puede descartar por otra parte, que el uso de salbutamol pueda interferir en la cuantificación de los marcadores de inflamación y permeabilidad vascular. Estudios preliminares<sup>21</sup>, encuentran niveles de fibrinógeno significativamente inferiores en muestras de esputo espontáneas, sin la administración previa de  $\beta$  adrenérgicos que en las de esputo inducido en la que previamente se había administrado salbutamol, lo que podría estar relacionado con el mecanismo del fármaco disminuyendo la permeabilidad vascular<sup>27</sup>. En cualquier caso, parece poco probable, a la luz de nuestros conocimientos de los mecanismos de acción y usos clínicos de los fármacos  $\beta$  adrenérgicos inhalados, que interfieran significativamente en las mediciones de marcadores de inflamación de la vía aérea.

**Método de dispersión celular empleado**

Aunque en algunos estudios se ha utilizado tripsina<sup>9</sup> o metilcisteína<sup>23</sup>, el agente dispersante celular más ampliamente empleado es el DTT. El DTT, utilizado para procesar el esputo por primera vez por Wooten<sup>28</sup>, actúa rompiendo los puentes disulfuro y liberando a las células de la matriz mucoproteica. El filtrado y centrifugado posterior de la muestra permite obtener material para realizar contajes celulares, manualmente o por inmunohistoquímica y una fase líquida en la que realizar determinaciones de factores solubles. Varios estudios han valorado la influencia que la adición de DTT a la muestra puede ejercer sobre los contajes celulares y de químicos en la fase fluida. La incubación con DTT durante 3 tiempos distintos (10, 20 y 30 minutos) y el posterior filtrado y centrifugado de la muestra, disminuye el número total de células pero no modifica significativamente los porcentajes de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos ni linfocitos<sup>5</sup>. Tampoco se modifican los valores de IL-8, GM-CSF, TNF- $\alpha$ <sup>29</sup>, albúmina<sup>30</sup> o fibrinógeno<sup>31</sup>. Sin embargo, la adición de DTT a la proteína de referencia de ECP, aunque no modifica la forma de la curva estándar, determina que los puntos individuales de la curva se sitúen un 2% por debajo con respecto a los de la proteína no tratada con DTT<sup>21</sup>, de lo que cabe esperar encontrar valores de ECP ligeramente inferiores en el esputo tratado con DTT. La IL-5 está constituida por dos subunidades unidas por un puente disulfuro. Debido al mecanismo de acción del DTT, cabría esperar que el tratamiento de la muestra con DTT modificase los niveles de IL-5. Pizzichini mide IL-5 en esputo tratado con IL-5 o con PBS, concluyendo que la adición de DTT a la muestra no modifica sus valores<sup>30, 31</sup>. En cambio, en otros estudios publicados<sup>32</sup>, no se detectan valores de IL-5 en el esputo tratado con DTT. Sin embargo, más que a la adición de DTT a la muestra, las discrepancias entre ambos estudios<sup>31, 32</sup>, podrían ser debidas a la técnica de procesado, ya que parece probable que la IL-5, al igual que otras citoquinas como RANTES o GM-CSF, se encuentren unidas a la matriz de moco, con lo que el proceso de filtrado de la muestra, válido para retirar el moco,

también eliminaría las citoquinas de la muestra<sup>32</sup>. Por otra parte los niveles detectados de IL-5 son en general bajos, lo que disminuye notablemente la reproductibilidad de este ensayo, siendo muy difícil interpretar los resultados de este tipo de estudios.

**Tipo de muestra procesado**

La muestra de esputo inducido es una mezcla de secreciones del tracto subglótico y de la boca. Actualmente hay dos técnicas fundamentales de tratamiento de la muestra. Hasta el momento, ningún estudio ha comparado los resultados obtenidos con cada una, pero cada técnica tiene ventajas e inconvenientes (Tabla 3):

a) *Selección de acúmulos de moco*: descrito por Pin<sup>10</sup>, brevemente consiste en la selección de las porciones de moco que parecen libres de contaminación salivar mediante la observación de la muestra con microscopio de inversión, desechando el resto. Se añade un volumen en ml de DTT al 0,1% 1,5 veces el peso del material seleccionado en mg, se mezcla y filtra. La concentración de células totales medida con un hemocitómetro, se ajusta con PBS para llegar a una concentración determinada y se centrifuga. Con el material del sedimento se realizan preparaciones para el contaje celular. Pizzichini<sup>30</sup> para valorar la dilución de la muestra modifica el proceso, midiendo el volumen de acúmulos de moco seleccionados y añadiendo un volumen 4 veces mayor de DTT al 0,1%.

La técnica de selección de acúmulos, asegura que el material que se valora procede del tracto subglótico. Al descartar la saliva, elimina también los factores de contaminación y dilución que ésta ejerce sobre los números totales de células y químicos, y permite expresar los valores finales sobre un volumen o peso determinado de esputo, lo que permite la realización de comparaciones intra o intersujeto. Sin embargo, el hecho de que se deseche la parte de material que no forma acúmulos, implica incertidumbre acerca de los resultados obtenidos, ya que es posible que éstos no sean representativos del fluido que baña la vía aérea. Recientemente, Pizzichini<sup>33</sup>, procesa por separado los acúmulos de moco y el material restante del

**Tabla 3.** Ventajas e inconvenientes de los métodos de tratamiento de la muestra de esputo inducido.

**Selección de acúmulos de moco**

• VENTAJAS

1. Seguridad de que estudia material subglótico.
2. Permite expresar los resultados de los recuentos celulares y mediciones de químicos por mg o ml de esputo.

• INCONVENIENTES

1. El contenido de células y químicos puede no ser representativo del fluido de la vía aérea.
2. Significa el establecimiento de conceptos arbitrarios de fiabilidad.
3. Necesita más tiempo para su realización.

**Selección de la muestra completa**

• VENTAJAS

1. Incluye todo el volumen expectorado del tracto subglótico.
2. El recuento diferencial de células no escamosas representa el del fluido que baña la vía aérea.
3. Los químicos son representativos del tracto subglótico (previa demostración de que sus niveles son inferiores y no se modifican en la saliva).
4. Rápido.
5. No precisa de criterios arbitrarios de validez de la muestra.

• INCONVENIENTES

1. La saliva ejerce un efecto dilucional variable sobre la cuantificación de químicos en el esputo, que puede dificultar la repetitividad en los químicos del sobrenadante.

esputo, encontrando que aunque los acúmulos de moco tenían menor contaminación de células escamosas, las preparaciones eran de mejor calidad y la viabilidad de las células era mayor. No se detectaron diferencias en los porcentajes de eosinófilos, neutrófilos ni linfocitos, aunque el número de células totales era superior en las muestras procedentes de acúmulos de moco.

b) *Muestra de esputo completa*: Descrita por Fahy<sup>12</sup>, brevemente consiste en la utilización de todo el material expectorado que mezclan a partes iguales con DTT al 10%, filtran, centrifugan y realizan preparaciones. En un ensayo paralelo<sup>12,22</sup> realizado en muestras de saliva de los mismos sujetos, confirman que más del 99% de las células en saliva son escamosas y deducen

que las células nucleadas que se cuentan en el esputo proceden del tracto subglótico y que la realización del recuento diferencial de células nucleadas es representativo del perfil celular subglótico. Para el recuento de químicos este método acepta que la saliva es un factor de dilución variable de los niveles de químicos medidos. Los niveles de ECP, albúmina, fibrinógeno y glicoproteína similar a la mucina en saliva, son muy inferiores a los detectados en esputo, por lo que su efecto sobre éste será dilucional. No ocurre lo mismo con los valores de histamina, que se encuentran elevados en las muestras de saliva, lo que se atribuye al metabolismo de los microorganismos de la boca. Sin embargo, los niveles de químicos, incluida la histamina en saliva, no se modifican tras la pro-

vocación con alérgeno<sup>22</sup>, por lo que deduce que los cambios encontrados en el esputo corresponden a cambios producidos en el tracto subglótico. El hecho de que se utilice la muestra entera y de que la contaminación con saliva sea prevista, implica que no se requiere el establecimiento de criterios arbitrarios para determinar su validez.

La desventaja de esta técnica es que aunque permite la valoración de cambios en los químicos medidos en el esputo, no permite estudiar la variabilidad de las mediciones, dato necesario para las comparaciones intra e intersujetos. Fahy<sup>12</sup> apunta que el fibrinógeno, marcador de la permeabilidad vascular y cuyos valores son indetectables en saliva, probablemente debido a la impermeabilidad de la mucosa oral a macromoléculas, podría utilizarse como marcador de las secreciones subglóticas en el esputo inducido. Una esmerada preparación del enfermo y un cuidado meticuloso en la obtención de la muestra de forma que pueda separarse la recolección de saliva de la de material procedente del tracto subglótico, mejoran notablemente los resultados de esta variante, incrementándose los niveles de químicos como ECP en el sobrenadante<sup>34</sup>.

## B. Factores no técnicos

La eficacia y los resultados de la inducción de esputo pueden modificarse en función de una serie de factores que no dependen de la técnica utilizada, tales como la selección de sujetos, ya que la edad, existencia de enfermedad respiratoria, hábito tabáquico o la capacidad de producir esputo espontáneo, pueden modificar los resultados de efectividad.

Por otra parte, en el caso de los asmáticos, la gravedad de la enfermedad y, por supuesto, la terapéutica empleada en su tratamiento, modulan notablemente los resultados del estudio.

Por último, parece decisivo que el paciente entienda perfectamente que el objetivo de la inducción de la muestra es obtener una porción de esputo de alta calidad. En este sentido el papel que desempeña el técnico que conduce la prueba es decisivo de forma que el paciente entienda el procedimiento, olvide los posibles pre-

juicios de comportamiento y utilice adecuadamente la musculatura laringeo-faríngea. Sólo de esta forma se obtendrán muestras de calidad.

## ESTUDIOS DE VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA. PRINCIPALES HALLAZGOS

### Validez de la muestra

Antes de efectuar estudios de validez y fiabilidad se debe conocer si el material obtenido es adecuado y representativo, es decir procedente del tracto subglótico. Los criterios utilizados para ello varían en los distintos grupos de trabajo: Pin<sup>10</sup>, emplea los siguientes: el tamaño de todos los acúmulos de moco (0= no acúmulos, 1=tamaño <4,5x9mm y 2= tamaño >4,5x9mm), contaminación de células escamosas (0>10% de las células nucleadas, 1<10% y 2=0%) y la contaminación salivar establecida como el porcentaje de células escamosas en las preparaciones (0=demasiadas para permitir el recuento, 1=hay células escamosas, pero permiten el recuento, 2=no hay células escamosas). Una muestra con una puntuación final  $\leq 2$  es inadecuada, = 3 intermedia y  $\geq 4$  adecuada. En publicaciones más recientes, los mismos autores<sup>21</sup> simplifican estos criterios, considerando una muestra adecuada si: existe poca contaminación salivar (porcentaje de células escamosas <20%) y la viabilidad celular >50%. La observación microscópica y diferenciación celular es realmente dificultosa cuando la proporción de células escamosas supera el 80%, lo que convierte la muestra en inservible para su estudio, siendo éste el criterio en la actualidad más universalmente utilizado<sup>34</sup>.

Los hallazgos más relevantes en pacientes asmáticos obtenidos por distintos autores y la técnica empleada se presentan en la tabla 4. En la tabla 5 se presentan los valores normales del recuento diferencial propuestos por Hargreave. En general los porcentajes celulares son similares mientras que el nivel de las mediciones de fase fluida (ECP) tienden a ser inferiores mediante la metodología de estudio de muestras completas. No obstante, como se observa en la tabla, cuando se



**Tabla 4.** Porcentajes de células y químicos en esputo de pacientes asmáticos (medianas). \* Medias aritméticas.

Autor	Situación paciente	Muestra	% Eosinófilos	% Metacromáticas	ECP (ug/L)	Triptasa	Referencia
Pin	Basal	Acúmulos	18	0,5	-	-	10
Pin	Basal	Acúmulos	3,8	0,05	-	-	24
Pin	Tras BPT	Acúmulos	18,2	0,25	-	-	24
Fahy	Basal	Completo	2,5*	-	58,2*	0,9	22
Fahy	Post BPT	Completo	21,5*	-	186,7*	3,5	22
Fahy	Basal	Completo	8,1*	-	142*	-	12
Claman	Basal	Completo	14	-	35,4	-	36
Gutierrez	Basal	Acúmulos	10	-	50,4	-	43
In't Veen	Basal/leve	Completo	6,1	-	54,2	-	38
In't Veen	Basal/severa	Completo	16	-	102	-	38
Gershman	Basal	Completo	6	-	261*	-	34
Pizzichini	Crisis severa	Acúmulos	20	-	1960	-	53

**Tabla 5.** Valores normales del recuento diferencial de células propuestos por FE Hargreave.

Recuento celular	Mediana intercuartílico	Rango
Recuento de células totales (*10 <sup>6</sup> /ml)	3,1	4,0
Eosinófilos (%)	0,5	1,1
Neutrófilos (%)	24,1	26,8
Macrófagos (%)	62,9	30,2
Linfocitos (%)	1,3	1,6

recogen por separado las muestras de saliva y esputo los resultados mejoran notablemente.

### Validación de la técnica

La validación de la técnica de inducción de esputo se ha realizado en primer lugar, mediante la demostración de su reproductibilidad (los resultados obtenidos a lo largo del tiempo en sujetos que permanecen estables no muestran diferencias). En segundo lugar, mediante la demostración de su validez o capacidad de discernir entre sujetos con distintas patologías respiratorias y condiciones clínicas (validez de contenido). Por último, por medio de la comparación de los resultados obtenidos con la inducción de esputo y otras técnicas válidas para el estudio de la enfermedad (validez de criterio). No obstante, se debe ya señalar que no existe un "gold standard" definido para el estudio

de la inflamación o sus índices de actividad, lo que dificulta realmente establecer la validez de criterio<sup>35</sup>.

La valoración de las muestras de esputo ha demostrado ser altamente reproducible respecto a los contajes porcentuales de eosinófilos, macrófagos, polimorfonucleares y células metacromáticas, tanto en las muestras obtenidas de forma espontánea y tratadas con tripsina<sup>9</sup> como tras la inducción de esputo con salino hipertónico<sup>12</sup>. Posteriormente otros estudios han confirmado la repetitividad de dichos contajes, en muestras completas<sup>36</sup> y en las que se seleccionan y procesan los acúmulos de moco<sup>10,37</sup>. En general, los resultados más satisfactorios se han obtenido en los porcentajes de eosinófilos, con coeficientes de correlación intraclase superiores a 0,80<sup>30,38</sup>. Los resultados obtenidos en lo que respecta al contaje de células totales han sido más dispares, encontrando rangos de variación del coeficiente de correlación que oscilan entre 0,89<sup>37</sup> y 0,25<sup>10</sup>. La repetitividad del recuento porcentual de linfocitos es, en general, más baja<sup>30</sup>, lo que se debe probablemente a los métodos de identificación celular utilizados, ya que al emplear técnicas más sofisticadas como la citometría de flujo, que identifica las células a través de anticuerpos monoclonales frente a sus marcadores de membrana, se encuentra alta repetitividad en los contajes de linfocitos totales, así como para linfocitos T helper y supresores<sup>39</sup>. Con respecto a las mediciones de la fase fluida, la

cuantificación de ECP, MBP, EDN, albúmina y fibrinógeno en esputo ha demostrado ser también altamente reproducible<sup>30</sup>, mientras que la de otros químicos como la tripsina y la interleuquina 5 (IL-5) es moderada o baja.

La validez de contenido de la técnica se ha demostrado en primer lugar, mediante el análisis de células y químicos en esputo de sujetos asmáticos, sanos o con otra patología pulmonar, y en segundo lugar, mediante la valoración de los cambios inducidos por la provocación con alérgeno o el tratamiento con corticoides sobre estos parámetros.

El recuento diferencial de eosinófilos y células metacromáticas es superior en el esputo de asmáticos que en el de sujetos sanos, tanto en muestras de esputo completas<sup>6,12</sup>, como en las constituidas por acúmulos de moco<sup>10,30,37</sup>. Utilizando citometría de flujo, se encuentra que el esputo de asmáticos contiene mayor número de células T y B<sup>39</sup> y de células CD4+ y linfocitos que expresan ICAM-1 en la membrana<sup>32</sup> que el de controles. En cuanto a los químicos, los valores de ECP, fibrinógeno, albúmina<sup>12,30,32</sup> y los de ICAM-1<sup>32</sup>, RANTES, TNF- $\alpha$  e IL-8<sup>40</sup>, son superiores en asmáticos comparados con sujetos sanos. Los resultados con respecto a la cuantificación de otros químicos, tales como la tripsina son discordantes, encontrándose en asmáticos valores superiores<sup>30</sup> o similares<sup>12</sup> a los de controles. De forma similar, la cuantificación de IL-5 en esputo es superior en asmáticos<sup>30</sup> o no es detectable en la gran mayoría de las muestras tanto de asmáticos como de controles<sup>32</sup>.

Por otra parte, el esputo inducido es capaz de discernir a los asmáticos en función de la severidad de la enfermedad, siendo los eosinófilos en esputo de niños sintomáticos significativamente superiores a los de niños asmáticos asintomáticos<sup>41</sup> y los niveles de diversas citoquinas como IL-1- $\beta$ , IL-6, IL-8 ó RANTES, parecen ser significativamente más elevados en sujetos sintomáticos que en pacientes con asma no activo<sup>42</sup>. No obstante, no se ha demostrado una correlación estrecha entre los índices de actividad en esputo y la expresión clínica de la enfermedad<sup>43</sup>. La

técnica permite también diferenciar asmáticos, en los que el tipo celular predominante son los eosinófilos, de sujetos con otra patología pulmonar: bronquitis crónica obstructiva<sup>47</sup>, en la que predominan los macrófagos y neutrófilos y sus mediadores como la mieloperoxidasa o liocalina<sup>44</sup>. También con respecto a la fase fluida, los niveles de ECP en esputo<sup>15</sup> son también superiores en el asma que en otras enfermedades pulmonares como la bronquitis crónica, neumonía o infección respiratoria<sup>46</sup>, mientras que los niveles de IL-8 parecen en general más elevados en pacientes afectados de bronconeumopatía crónica obstructiva al compararlos con asmáticos<sup>40</sup>.

Por otra parte, los valores de eosinófilos<sup>24,47</sup> y de ECP<sup>22,24,47</sup> se elevan en el esputo obtenido entre las 4 y las 32 horas tras la provocación bronquial alérgeno específica, con respecto a los valores basales y se reducen tras la evitación prolongada del alérgeno<sup>48</sup> y el tratamiento con corticoides en relación a los valores basales y al grupo tratado con placebo<sup>36,37,49</sup>.

Con respecto a la validez de criterio, los resultados comparativos con otras técnicas como el lavado bronquial o broncoalveolar son dispares y los malos resultados obtenidos por algunos autores no suponen una falta de validez de la técnica de esputo inducido, sino que sugieren la existencia de otro tipo de razones. Fahy<sup>6</sup> compara en asmáticos y controles sanos los resultados obtenidos mediante inducción de esputo y broncoscopia, y concluye que, aunque comparables, tanto los valores de células (eosinófilos, linfocitos y neutrófilos) como los de químicos (ECP, albúmina) son superiores en las muestras de esputo que en las de LBA, siendo menores las diferencias al comparar con el LB. El porcentaje relativo de macrófagos es habitualmente superior en las muestras de LBA<sup>35</sup>. En el análisis de la fase fluida los niveles de ECP fueron 200 y 800 veces superiores en las muestras de esputo comparadas con las de LB y LBA, respectivamente. Se observó una discreta correlación entre los porcentajes de eosinófilos y ECP entre las muestras de esputo y LBA, siendo esta correlación indetectable entre las muestras de esputo inducido y BAL.

Otros autores han obtenido resultados similares<sup>49</sup>, los cuales sugieren que las muestras de esputo y LB/LBA reflejan compartimentos pulmonares distintos (vía central versus vía aérea periférica y alvéolo) y pone de manifiesto el importante efecto dilucional secundario a estas dos últimas técnicas. No existen, en la actualidad, estudios comparativos con el cepillado bronquial.

### SEGURIDAD DE LA TÉCNICA EN ASMÁTICOS

Aunque la inhalación de soluciones hipertónicas puede provocar broncoconstricción en asmáticos<sup>18</sup> la administración de fármacos  $\beta$  adrenérgicos previos a la inducción de esputo, ha demostrado ser eficaz para prevenir dicha broncoconstricción y hacer que el uso de la técnica en sujetos asmáticos estables<sup>11,43,50</sup>, en niños<sup>11,48</sup> o incluso en asma graves o durante exacerbaciones<sup>24,47</sup> sea segura. El prurito faríngeo y las náuseas son los efectos adversos que aparecen con mayor frecuencia documentados, seguidos de accesos leves de broncoespasmo<sup>16, 23, 50</sup>.

### EL FUTURO: APLICACIONES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

El esputo inducido, de acuerdo a las consideraciones señaladas anteriormente, es una técnica reproducible y válida para el estudio de la inflamación en la vía aérea, que ofrece una información posiblemente en conjunto superior al lavado bronquial o broncoalveolar, con la ventaja de no ser invasiva, de modo que se puede utilizar incluso en niños, pacientes graves o descompensados, es más barata y rápida y las secreciones obtenidas están más concentradas. Sin embargo, y debido a los múltiples factores tanto técnicos como derivados de los sujetos que pueden modificar sus resultados, debemos ser cautos en su interpretación. Tampoco debemos olvidar que las muestras de esputo son representativas de las alteraciones presentes en la luz de la vía aérea, pero no tienen por qué reflejar las anomalías presentes a nivel subepitelial.

En la actualidad no parece apropiado hablar formalmente de indicaciones o con-

traindicaciones del estudio, si bien existen situaciones clínicas en las que disponemos de datos preliminares sobre su utilidad. Por supuesto habría que añadir toda la información disponible sobre la citología convencional de esputo. La seguridad de la prueba, como ya se ha comentado, está fuera de duda, de forma que puede ser utilizada incluso en situaciones de crisis asmática.

La constatación de la presencia de eosinofilia en esputo es de utilidad diagnóstica clara en situaciones en las que exista una clínica atípica, o en el diagnóstico diferencial con otras patologías respiratorias que cursan con hiperreactividad bronquial (reacción asmática secundaria) como la bronquitis crónica. Existen ya estudios que sugieren la utilidad diagnóstica de la inducción de esputo en el diagnóstico de la tos crónica<sup>51</sup>, o en sujetos en el diagnóstico de estadios muy tempranos de la enfermedad<sup>52</sup> y estudios preliminares sobre su sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de asma frente a sujetos sanos, con buenos resultados<sup>53</sup>.

El estudio de muestras seriadas de esputo inducido, permite monitorizar de forma objetiva las modificaciones que aparecen en la luz bronquial a lo largo del curso clínico de la enfermedad, incluyendo procesos agudos. Esta monitorización seriada, cuando se realiza tras la exposición controlada o natural a alérgenos, a todas luces aporta una información objetiva sobre la posible aparición de cambios inmuno-inflamatorios en la luz bronquial, siendo esta información de mayor relevancia que el seguimiento aislado de los cambios espirométricos. Estos datos van a permitir una valoración más precisa del efecto inducido por éstos en un determinado sujeto, tanto en el contexto del ambiente laboral<sup>54</sup> como en la exposición a alérgenos domésticos<sup>55</sup>. La inducción de esputo seriada puede ser también de notable interés clínico en situaciones en que el diagnóstico o la evolución son inciertos<sup>56</sup>.

Otras patologías inmunoalérgicas de las vías respiratorias pueden ser también estudiadas mediante la inducción de esputo. En este sentido se han descrito incrementos de los niveles de eosinófilos y ECP

en muestras de sujetos afectados de rinitis alérgica por ácaros, cuando se les compara con sujetos sanos<sup>57</sup>. Este tipo de estudios pueden ayudar a comprender mejor las interrelaciones entre la rinitis y el asma bronquial.

Por último, existe un fuerte debate sobre la utilidad clínica de distintos índices o marcadores de inflamación bronquial. Diversos estudios<sup>36,37,49,58-60</sup> han demostrado la sensibilidad de la técnica para detectar cambios de estos índices tras el tratamiento con fármacos antiinflamatorios como corticoides orales o inhalados. Las dificultades son, sin embargo, importantes y no se dispone de datos que indiquen un posible papel a la hora de fijar los requerimientos terapéuticos de un determinado paciente, si bien no cabe duda de que de todas las técnicas existentes en la actualidad, la inducción de esputo sería la más apropiada para desarrollar estos fines.

### BIBLIOGRAFÍA

- BOUSQUET J, CHANEZ P, LACOSTE JY, WHITE R, VIC P, GODARD P, MICHEL FB. Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy* 1992; 47: 3-11.
- JEFFERY PK. Bronchial biopsies and airway inflammation. *Eur Respir J* 1996; 9: 1583-1587.
- JEFFERY PK, WARDLAW A, NELSON FC. Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural quantification study. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1745-1753.
- VAN VYVE T, CHANEZ P, BOUSQUET J, LACOSTE JY, MICHEL FB, GODARD P. Safety of broncoalveolar lavage and bronchial biopsies in patients with asthma of variable severity. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 116-121.
- DJUKANOVIC R, WILSON JW, LAI CKW, OFLGATE ST, OFWARTH PH. The safety aspects of fiberoptic bronchoscopy, broncoalveolar lavage, and endobronchial biopsy in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 772-777.
- FAHY JV, WONG H, LIU J, BOUSHEY HA. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 53-58.
- HANSEL TT. The cardinal importance of sputum. *Clin Exper Allergy* 1994; 24: 695-697.
- COFDOSH S, ZACCHEO CW, SEGAL MS. The cytology and histochemistry of sputum cells: preliminary differential counts in chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85: 635-648.
- GIBSON PG, GIRGIS-GABARDO A, MORRIS MM. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax* 1989; 44: 693-699.
- PIN I, GIBSON PG, KOLENDOWICZ R, GIRGIS-GABARDO A, DENBURG JA, HARGREAVE FE, DOLOVICH J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47: 25-29.
- POPOV T, GOTTSCHALK R, KOLENDOWITZ R, DOLOVICH J, POVERES P, HARGREAVE FE. The Evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin and Exp Allergy* 1994; 24: 778-783.
- FAHY JV, LIU J, WONG H, BOUSHEY HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1126-1131.
- POPOV TA, PIZZICHINI MMM, PIZZICHINI R, KOLENDOVICH R, PUNTHAKEE Z, DOLOVICH J, HARGREAVE FE. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995; 8: 559-565.
- ROBINSON M, KING M, TOMKIEWKZ RP. Effect of hypertonic saline, amiloride and cough on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: A669.
- UMENO E, McDONALD D, NADEL JA. Hypertonic saline increases vascular permeability in the rat trachea by producing neurogenic inflammation. *J Clin Invest* 1990; 85: 1905-1908.
- OLAGUIBEL JM, GONZÁLEZ DE LA CUESTA C, RODRÍGUEZ A, TABAR AI. Provocación con salino hipertónico nebulizado ultrasónicamente en el asma bronquial. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1991; 6: 223-228.
- EGGLESTON PA, KAGEL-SOBOTKA A, LICHTENSTEIN LM. A comparison of osmotic activation of basophils and human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1043-1048.
- SMITH CM, ANDERSON SD. Inhalational challenge using hypertonic saline in asthmatic subjects: a comparison of responses to hyperpnoea, methacoline and water. *Eur J Respir* 1990 3: 144-151.
- OLAGUIBEL JM. Symposium Internacional de la SEAIC. Asma e inflamación. Hiperreactividad bronquial como expresión de la inflamación. Cáceres 1991.
- MAKKER HK, WALLS AF, GOULDING D, MONTEFORT S, VARLEY JJ, CARROLL M, OFWARTH PH, OFLGATE ST. Airway effects of local challenge with hypertonic saline in exercise induced asthma.

- ma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1012-1019.
21. PIZZICHINI MM, POPOV TA, EFTHIMIADIS A, HUS-SACK P, EVANS S, PIZZICHINI E, DOLOVICH J, HARGREAVE FE. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 866-869.
  22. FAHY JV, LIU J, WONG H, BOUSHLEY HA. Analysis of cellular and biochemical constituents of induced sputum after allergen challenge: a method for studying allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 1031-1039.
  23. IREDALE MJ, WANKLYN SAR, PHILLIPS IP, KRAUSZ T, IND PW. Non invasive assessment of bronchial inflammation in asthma: no correlation between eosinophilia of induced sputum and bronchial responsiveness to inhaled hypertonic saline. *Clin Exper Allergy* 1994; 24: 940-945.
  24. PIN I, FREITAG AP, O'BYRNE PM, GIRGIS-GABARDO A, WATSON RM, DOLOVICH J, DENBURG JA, HARGREAVE FE. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis* 1992; 143: 1265-1269.
  25. PAVIA D, AGNEW JE, SUTTON PP. Effect of terbutaline administration from metered dose inhaler (2mg) and subcutaneously (0.25mg) on tracheobronchial clearance in mild asthma. *Br J Dis Chest* 1987; 81: 361.
  26. RADERMECKER M, GUSTIN M. A in vivo demonstration of the antianaphylactic effect of terbutaline. *Clin Allergy* 1981; 11: 79.
  27. ERIEFALT Y, PERSSON CGA. Pharmacologic control of plasma exudation into tracheobronchial airways. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 1008.
  28. WOOTEN OJ, DULFANO MJ. Improved homogenization techniques for sputum cytology counts. *Ann Allergy* 1978; 41: 150-154.
  29. KEATINGS VM, COLLINS PD, SCOTT DM, BARNES PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 530-534.
  30. PIZZICHINI E, PIZZICHINI M, EFTHIMIADIS A, EVANS S, MORRIS MM, SQUILLACE D. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell fluid measurements. *Am J Respir Crit Care Dis* 1996; 154: 308-317.
  31. EFTHIMIADIS A, PIZZICHINI MMM, WESTON S et al. Sputum cellular and fluid phase components: Comparison of the effect with Dithiothreitol vs. phosphated buffered saline (Abstract). *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: A513.
  32. LOUIS R, SHUTE J, BIAGI S, STANCIU L, MARRELLI F, TENOR H, HIDI R, DJANOVICH R. Cell infiltration, ICAM-1 expression, and eosinophil chemotactic activity in asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 466-472.
  33. PIZZICHINI E, PIZZICHINI MM, 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.
  34. GERSHMAN NH, WONG HH, LIU JT, MAHLMEISTER MJ, FAHY JV. Comparison of two methods of collecting induced sputum in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1996; 9: 2448-2453.
  35. O'BYRNE PM, INMAN MD. Induced sputum to assess airway inflammation in asthma. *Eur Respir J* 1996; 9: 2435-2436.
  36. CLAMAN DM, BOUSHLEY HA, LIU J, WONG H, FAHY JV. Analysis of induced sputum to examine the effects of prednisone in airway inflammation in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 861-869.
  37. VIRCOFW JC, KROEGEL C, HAGE U, KORTSIK C, MATTHYS H, WERNER P. Comparison of sputum ECP levels in bronchial asthma and chronic bronchitis. *Allergy* 1993; 48: 112-118.
  38. IN'T VEEN JCCM, DE GOUW HWFM, SMITS HH. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur Respir J* 1996; 9: 2441-2447.
  39. KIDNEY JC, WONG AG, EFTHIMIDAIAS A, MORRIS MM, SEARS MR, DOLOVICH J, HARGREAVE FE. Elevated B cells in sputum of asthmatics. Close relation with eosinophils. *Am J Respir Crit Care Dis* 1996; 153: 540-544.
  40. KEATINGS VM, COLLINS PD, SCOTT DM, BARNES PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 530-534.
  41. PIN I, RADFORD S, KOLENOVICH R, JENNINGS B, DENBURG JA, HARGREAVE FE, DOLOVICH J. Airway inflammation in symptomatic and asymptomatic children with methacholine hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 1993; 6: 1249-1256.
  42. KONNO S, GONOKAMI Y, KUROKAWA M, KAWASU, K, ASANO K, OKAMOTO K. Cytokine concentrations in sputum of asthmatic patients. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1996; 109: 73-78.
  43. GUTIERREZ VALL DE CABRES V. Marcadores de inflamación en muestras de esputo inducido

- de pacientes con asma leve: relación con los parámetros fisiológicos y clínicos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia 1996.
44. KEATINGS VM, BARNES PJ. Granulocytes activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 449-453.
  45. MOTOJIMA S, AKATSU I, FUKUDA T, MAKINO S, TAKATSU K. Clinical significance of measuring levels of sputum and serum ECP and serum IL-5 in bronchial asthma. *Allergy* 1993; 48: 98-106.
  46. GIBSON PG, DOLOVICH J, DENBURG J, RAMSDALE EH, HARGREAVE FE. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet* 1989; 1: 1346-1348.
  47. MAESTRELLI P, CALCAGNI PG, SAETTA M, DI STEFANO A, OFSSELET JJ, SANTONASTASO A, FABBRI LM, MAPP CE. Sputum eosinophilia after asthmatic responses induced by isocyanates in sensitized subjects. *Clin and Exp Allergy* 1994; 24: 29-34.
  48. PIACENTI GL, MARTINATI L, MINGONI S, BONER AL. Influence of allergen avoidance on the eosinophil phase of airway inflammation in children with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1079-1084.
  49. GIBSON PG, HARGREAVE FE, GIRGIS-GABARDO A, MORRIS M, DENBURG JA, DOLOVICH J. Chronic cough with eosinophilic bronchitis: examination for variable airflow obstruction and response to corticosteroid. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 127-132.
  50. ALVAREZ MJ, OLAGUIBEL JM, ACERO S, LIZASO MT, GARCÍA BE, TABAR AI. Seguridad de la técnica de inducción de esputo en asmáticos. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1996; 11: 182-183.
  51. FUJIMURA M, SONGUR N, KAMIO Y, MATSUDA T. Detection of eosinophils in hypertonic saline-induced sputum in patients with chronic non productive cough. *J Asthma* 1997; 34: 119-126.
  52. METSO T, KILPIO K, BJORKESTEN F, KIVIRANTA K, HAAHTELA T. Can early asthma be confirmed by laboratory tests?. *Allergy* 1996; 51: 226-231.
  53. PIZZICHINI E, PIZZICHINI MM, EFTHIMIALDIS A, DOLOVICH J, HARGREAVE FE. Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and ECP in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 539-544.
  54. OLAGUIBEL JM. Asma ocupacional por substancias de alto peso molecular: látex. Reunión anual Sociedad Aragonesa Alergología. Formigal 1997.
  55. OLAGUIBEL JM, ALVAREZ MJ, URBIOLA E, GARCÍA BE, TABAR AI. Changes in induced sputum and nonspecific bronchial hyperresponsiveness after allergen bronchial test in allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: A978.
  56. WONG AG, PAVORD ID, SEARS MR, HARGREAVE FE. A case for serial examination of sputum inflammatory cells. *Eur Respir J* 1996; 9: 2174-2175.
  57. OLAGUIBEL JM, ALVAREZ PUEBLA MJ, GARCÍA BE *et al*. Induced sputum and bronchial hyperresponsiveness in allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 3: A578.
  58. PIZZICHINI MM, KIDNEY JC, WONG BJ *et al*. Effect of salmeterol compared with beclomethasone on allergen-induced asthmatic and inflammatory responses. *Eur Respir J* 1996; 9: 449-455.
  59. KEATING VM, JATAKANON A, WORSDELL YM, BARNES PJ. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 542-548.
  60. PIZZICHINI MMM, PIZZICHINI E, CLELLAND L, EFTHIMIALDIS A, MAHONY J, DOLOVICH J, HARGREAVE FE. Sputum in severe exacerbations of asthma. Kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1501-1508.