

Inflamometría en Neumología

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

INTRODUCCIÓN

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

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

FRACCIÓN EXALADA DE ÓXIDO NÍTRICO (FENO)

El óxido nítrico (NO) es un mediador biológico en humanos y animales. Se produce en el pulmón y se

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

El FENO refleja la inflamación bronquial subyacente y, de forma más concreta, la inflamación eosinofílica. Hay estudios que demuestran una significativa correlación entre niveles de FENO y recuento de eosinófilos en diferentes localizaciones (esputo, lavado broncoalveolar, biopsia bronquial y sangre)⁽¹⁾.

El procedimiento de determinación de FENO ha sido estandarizado⁽²⁾. El método más habitual consiste en analizar directamente la muestra en el dispositivo en tiempo real. Para ello el paciente se debe sentar de forma confortable, con la boquilla en posición adecuada y, si es posible, sin pinza nasal (porque al usarla se favorece que el NO nasal se vehicule por la parte posterior de la nasofaringe). Se debe realizar una inhalación de 2-3 segundos a través de la boca hasta la capacidad total (TLC) y posteriormente exhalar rápidamente con un flujo de 0,05 L/segundo aproximadamente.

Aunque hay estudios que han establecido para el diagnóstico de asma puntos de corte de FENO entre 20-26 ppb⁽³⁻⁵⁾, en la guía ATS⁽⁶⁾ y la reciente guía GEMA 4.0⁽⁷⁾, se ha establecido el punto de corte para el diagnóstico en 50 ppb para los adultos. Hay que tener en cuenta que los valores de FENO pueden verse afectados por otros factores como el hábito tabáquico, la edad, el peso, talla, uso de medicación antiinflamatoria,

TABLA 1. Recomendaciones de la American Thoracic Society para el uso clínico de la medición de la fracción de óxido nítrico en aire espirado.		
Recomendaciones	Grado de recomendación	Nivel de evidencia
Diagnóstico de inflamación de la vía aérea eosinofílica	Fuerte	Moderado
Estimación de la probabilidad de respuesta a esteroides en pacientes con síntomas respiratorios crónicos	Fuerte	Bajo
Diagnóstico de asma en situaciones que necesitan evidencia objetiva	Débil	Moderado
Valores de FENO < 25 ppb (< 20 ppb en niños) predicen ausencia de eosinofilia y respuesta a corticoides	Fuerte	Moderado
Valores de FENO > 50 ppb (> 35 ppb en niños) predicen eosinofilia y respuesta a corticoides	Fuerte	Moderado
Se recomienda monitorizar el FENO en asmáticos	Fuerte	Bajo
En pacientes con valores de FENO persistentemente elevados, descartar persistencia de exposición a alérgeno	Fuerte	Moderado
Se considera un aumento significativo del FENO el 20% en pacientes con valores altos (> 50 ppb) y el 10% en pacientes con valores bajos (< 50 ppb)	Débil	Bajo
Se considera un descenso significativo del FENO el 20% en pacientes con valores altos (> 50 ppb) y el 10% en pacientes con valores bajos (< 50 ppb) y se interpreta como respuesta al tratamiento.	Débil	Bajo

Modificado de referencia 9.

flujo espiratorio, tipo de dispositivo usado, técnica de medición, infección respiratoria coexistente en incluso contaminación nasal por rinitis⁽⁸⁾. Alcanza una elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de asma en no fumadores que no utilizan glucocorticoides inhalados, especialmente si se asocia a un FEV₁ reducido. Sin embargo, un valor normal de FENO no excluye el diagnóstico de asma, especialmente en personas no atópicas. En los niños el punto de corte se ha establecido en 35 ppb.

La guía de la ATS⁽⁶⁾ establece una serie de recomendaciones sobre las aplicaciones clínicas de la medición del FENO y su utilidad para el diagnóstico y como predictor de control de enfermedad (Tabla 1)⁽⁹⁾.

CONDENSADO DE AIRE EXHALADO

El análisis del condensado de aire exhalado (CAE) es un método no invasivo de estudio de la inflamación que puede ser de utilidad, no solo en el diagnóstico y seguimiento de estas enfermedades, sino también para el estudio de su fisiopatología. El principal componente del CAE es vapor de agua condensado y solo una pequeña fracción corresponde a microgotas con un contenido variable de diferentes moléculas volátiles

y no volátiles. Los equipos utilizados emplean normalmente válvulas bidireccionales, para evitar que el paciente inhale aire frío y evitar que se realice una provocación inespecífica con aire frío. El paciente respira a volumen corriente, con la nariz tapada con pinzas nasales durante 10-15 minutos. El aire exhalado pasa a través de una cámara refrigerada conectada a una vía donde se recoge el aire condensado. Posteriormente se desgasifica con un gas noble (helio o argón) y se procede a la medición de los distintos biomarcadores (normalmente por inmuoabsorción ligado a enzimas, ELISA).

Entre los biomarcadores más frecuentemente detectados se encuentran: el pH, H₂O₂, 8-isoprostano, aldehídos, NOx, leucotrienos, prostaglandinas, citosinas, glutatión, adenosina, endotelina (Tabla 2).

Al igual que el FENO, existen factores a tener cuenta que pueden condicionar el resultado obtenido; composición del aire ambiente, patrón ventilatorio del paciente, edad, sexo, raza, fármacos, contaminación en saliva o el consumo de comidas, bebidas o tabaco antes de realizar la prueba⁽¹⁰⁾.

Las aplicaciones potenciales del análisis de los biomarcadores presentes en el CAE podría ser: el estudio

TABLA 2. Marcadores más frecuentemente detectados en el condensado de aire exhalado.	
Marcador	Utilidad
pH	Puede estar disminuido en casos de asma grave refractaria al tratamiento, también en fases de agudización. Puede ser útil para la evaluación de pacientes con asma relacionada con el trabajo aunque no se ha demostrado útil en el control del asma, ni tampoco que el nivel de pH guarde relación con el tipo celular subyacente.
H ₂ O ₂	Niveles elevados en sujetos asmáticos no tratados, en las exacerbaciones y tienen una correlación inversa con el volumen espiratorio forzado en primer segundo (FEV ₁) , pico flujo espiratorio máximo y la PC ₂₀ . Pero la aplicabilidad clínica es baja, ya que no existen unos valores de concentración de H ₂ O ₂ estandarizados.
8-isoprostano	Marcador de estrés oxidativo. Está elevado en pacientes con asma respecto a sujetos sanos y aumenta en función de la gravedad del asma.
Aldehídos	Los niveles están elevados en pacientes asmáticos en relación a sujetos sanos y disminuye cuando están tratados con corticoides inhalados.
NOx: NO ₃ , NO ₂	Aumentan en pacientes con asma y disminuyen con el uso de cortioides inhalados y con el hábito tabáquico.
Leucotrienos	Pacientes asmáticos fumadores tienen niveles más altos que individuos fumadores sin asma.
Prostaglandinas	Pacientes asmáticos fumadores tienen niveles más altos que asmáticos no fumadores.

de fenotipos inflamatorios, estimación de la gravedad de la inflamación de la vía aérea, monitorización del tratamiento, detección temprana de agudizaciones de la enfermedad o la valoración del asma ocupacional. En la actualidad, el CAE es utilizado únicamente en estudios de investigación debido a los problemas de estandarización de la técnica.

ESTUDIO DE MEDIADORES EN PLASMA

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

Eosinófilos en sangre

Son varios los estudios que demuestran una asociación entre eosinofilia y gravedad del asma^(11,12) y una disminución de los mismos tras tratamiento con corticoesteroides. Además, el análisis de eosinófilos en sangre puede ser de utilidad para fenotipar a los pacientes con asma. En el estudio de Ulrik y cols.⁽¹³⁾ se demostró una correlación entre el número de eosinófilos en sangre y la gravedad de la hiperreactividad bronquial. Además, el aumento de eosinófilos en sangre es más frecuente en paciente con patología nasosinusal extensa⁽¹⁴⁾.

También podría tener utilidad como predictor respuesta clínica al tratamiento con el anticuerpo

monoclonal omalizumab. Así, en el estudio de Busse y cols.⁽¹⁵⁾ se establece que una medida de > 300 eosinófilos/ μ l pretratamiento en sangre puede predecir una buena respuesta al tratamiento.

En el futuro, el recuento de eosinófilos en sangre probablemente será un parámetro necesario para establecer la indicación de algunos nuevos tratamientos biológicos.

Proteína catiónica del eosinófilo (ECP)

Ha sido investigada como posible biomarcador de las vías respiratorias. Refleja la inflamación de las vías respiratorias y se relaciona con la gravedad del asma. Además, existen diferencias significativas en función del grado de gravedad clínica y sensibilidad alérgica⁽¹⁶⁾.

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

Inmunoglobulina E

Es producida por los linfocitos B bajo la dirección de 2 citoquinas: la interleukina-4 (IL-4) y la interleukina-13 (IL-13) que están producidas, a su vez, por varios tipos de células, incluyendo las células Th2 (prevalente en la atopia). La mayoría de los pacientes asmáticos tienen niveles de IgE circulantes elevados. La

sensibilización alérgica resulta de la formación de IgE específica en respuesta a alérgenos inhalados como aquellos derivados de los ácaros, epitelio de perro o gato, pólenes, etc. No existe una clara correlación entre nivel de IgE con la gravedad de asma⁽¹⁷⁾ pero sí parece que hay una relación dosis-respuesta entre los niveles de IgE y el riesgo de exacerbaciones futuras⁽¹⁸⁾. Hoy es necesaria su medición para establecer la indicación y dosis del tratamiento con el anticuerpo monoclonal omalizumab en pacientes con asma persistente grave mal controlada a pesar de tratamiento.

Proteína C reactiva

Fue uno de los primeros reactantes de fase aguda y es buen marcador sistémico de inflamación, infección y daño tisular. Se han visto niveles aumentados en pacientes asmáticos mal controlados, con peor función pulmonar, menor FEV₁ y mayor hiperreactividad bronquial⁽¹⁹⁾. Sin embargo, la PCR es inespecífica, ya que puede estar elevada en otras patologías inflamatorias.

Citocinas

La activación de las células T y la alteración de los niveles de citocinas están involucrados en la patogénesis del asma bronquial. Se han encontrado niveles elevados de citosinas como la IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 y la IL-13, siendo consideradas actualmente dianas terapéuticas para las cuales se han desarrollado anticuerpos monoclonales⁽²⁰⁾.

Periostina

La periostina (POSTN), que es una proteína glicosilada extracelular encontrada originalmente en los osteoblastos, pero también expresada en las células mesenquimales de otros órganos y también por los fibroblastos pulmonares. Los estudios de microarrays de la expresión génica han mostrado que la POSTN está aumentada hasta 4 veces más en el epitelio de la vía aérea de los pacientes asmáticos que en los sujetos sanos⁽²¹⁾.

La periostina es un biomarcador que se mide en sangre. Las investigaciones realizadas hasta el momento han demostrado que la expresión de la POSTN predice una buena respuesta clínica al tratamiento con corticosteroides y a los anticuerpos monoclonales^(22,23).

Además, la periostina sérica parece ser un buen predictor de la eosinofilia en tejido y en esputo, incluso

superior a la determinación sanguínea de eosinofilia, la IgE y la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO)⁽²⁴⁾.

ESTUDIO DE LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL. METACOLINA Y MANITOL

Las pruebas de provocación bronquial inespecíficas (PPB) pretenden objetivar la hiperrespuesta bronquial (HRB), entendida con el estrechamiento excesivo de la luz aérea ante estímulos químicos que habitualmente solo provocan una reducción escasa o nula en el calibre de la vía aérea. Este comportamiento anómalo pone en evidencia una de las singularidades significativas del asma, aunque se debe considerar que esta HRB puede detectarse de forma transitoria o permanente acompañando a otras situaciones o, a veces, en individuos aparentemente sanos⁽²⁵⁾.

En la práctica clínica habitual, la indicación fundamental de las PPB es la de establecer o excluir el diagnóstico de asma, sobre todo en los casos en los que ni la clínica ni el test de broncodilatación lo permiten^(25,26).

Además de esta utilidad, puede permitir monitorizar la respuesta terapéutica y el grado de control conseguido⁽²⁷⁾. El estudio se realiza en el laboratorio de exploración funcional utilizando sustancias que causan broncoconstricción al actuar directamente sobre las células implicadas en la génesis de la limitación al flujo aéreo, músculo liso de la vía aérea (MLVA), endotelio vascular, células productoras de moco, etc. Las sustancias manejadas a modo de estímulos inespecíficos directos son la metacolina e histamina y, aunque los resultados entre ambas son comparables siempre que las condiciones de medida lo sean, la más utilizada es la metacolina y es a la que nos referiremos en este capítulo.

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

TABLA 3. Comparación entre estímulos directos e indirectos en la prueba de provocación bronquial.		
	Directos	Indirectos
Función músculo liso	++++	++
Calibre de la vía aérea	++++	±
Inflamación	++	++++
Dosis necesaria	Baja	Alta
Limitación de dosis	No	Sí
Sensibilidad/especificidad	Alta/mediana	Baja/alta
Diagnóstico	Descartan	No descartan

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

El grado de correlación de ambas pruebas no es perfecto y su información sobre las alteraciones en la vía aérea del paciente asmático son complementarias⁽²⁸⁾.

Ambas pruebas de provocación se caracterizan por la inhalación de concentraciones crecientes y progresivas de un agente farmacológico hasta que llega a producirse una caída de la función pulmonar por encima de un límite establecido. El parámetro de uso común es el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁).

Provocación bronquial con metacolina

La metacolina es un derivado sintético de la acetilcolina, sin acción nicotínica, que actúa sobre los receptores colinérgicos del árbol bronquial. Se presenta como sal cristalina en polvo y se ha aceptado su uso en humanos (Provocholine®, viales de 100 mg). Las diluciones se han de elaborar a medida que se vayan a utilizar, diluciones de metacolina en suero salino isotónico superiores a 0,125 mg/ml, a 4°C mantienen la estabilidad durante tres meses. Para la realización de la prueba cabe utilizar dos métodos de inhalación: los sistemas de generación continua de aerosol y la técnica dosimétrica⁽²⁹⁾.

Los sistemas de generación continua emplean un nebulizador tipo impactador de chorro (jet), dotado de válvula unidireccional y acoplado a una fuente de aire comprimido cuyo flujo se ajusta buscando conseguir un *output* constante de 0,13-0,16 ml/min. La prueba

comienza con la inhalación del diluyente y continúa con la administración de concentraciones crecientes de metacolina (desde 0,03 hasta 16 mg/ml), tras cada inhalación y transcurridos de 30-90 segundos se realiza una espirometría. Si el FEV₁ cae un 20% o más, la PPB finaliza. De lo contrario, se pasa a la concentración siguiente hasta alcanzar ese descenso o completar el resto de las preparaciones. Dado que el procedimiento íntegro consume bastante tiempo, se han propuesto modificaciones que permiten comenzar la PPB con dosis de agente broncoconstrictor superiores a las recomendadas en el protocolo original, de modo que la primera concentración a administrar se decide considerando la presencia de síntomas respiratorios, la medicación habitual, el FEV₁ basal y su caída tras la administración del diluyente (Tabla 4).

En cuanto a la técnica dosimétrica, el aerosol se genera de manera intermitente mediante una válvula solenoide activada eléctricamente y que controla el flujo de aire que pasa a través del nebulizador. Con esta técnica el paciente realiza una inspiración lenta, desde volumen residual hasta capacidad inspiratoria forzada y la maniobra abre la válvula durante un tiempo estipulado, liberando una dosis exacta y conocida de solución, se manejan cinco dosis crecientes de metacolina (de 0,0625 a 16 mg/ml) a dos minutos de inhalación por dosis⁽²⁷⁾.

El resultado se representa mediante una curva de dosis-respuesta, en la que el eje de abscisas refleja la dosis o concentración de agonista inhalado y el de ordenadas muestra la modificación observada de la función pulmonar. El parámetro más clásico que se debe estimar es la PD₂₀, definida como la dosis de metacolina que reduce el FEV₁ en un 20% (PD₂₀ FEV₁) respecto al valor obtenido tras la administración

TABLA 4. Protocolo rápido para la realización de la prueba de provocación bronquial con metacolina.	
Variables a considerar	Dosis inicial (mg/ml)
FEV₁/FVC > 80% y FEV₁> 70% y caída del FEV₁ basal tras la inhalación de la solución salina < 10% y síntomas bien controlados con:	
• Corticoides inhalados u orales	0,125
• Broncodilatadores diarios	0,25
• Broncodilatadores ocasionales	1
• Ninguna medicación	2
FEV₁/FVC < 80% o FEV₁< 70% y caída del FEV₁ basal tras la inhalación de la solución salina < 10% y síntomas bien controlados con:	
• Corticoides inhalados u orales	0,03
• Cualquier otra medicación o ninguna medicación	0,125
Caída del FEV₁ basal > 10% tras la inhalación de la solución salina o síntomas no controlados	0,03 ^a

Modificada de Juniper y cols.⁽²⁴⁾. La omisión de concentraciones posteriores solo se puede realizar si, tras la concentración previa, la caída del FEV₁ es menor del 5% y no han aparecido síntomas. ^aNo omitir ninguna concentración.

del disolvente. Los valores de PD₂₀ son únicamente calculables cuando se utiliza dosímetro; en los sistemas de generación continua, al desconocer con exactitud la dosis recibida, se emplea la concentración de agonista previa (C₁) y la que induce la caída del FEV₁ ≥ 20% (C₂) y el PC₂₀ será el índice resultante. Se aceptan que valores de PD₂₀ FEV₁ o PC₂₀ FEV₁ < 1 mg/ml expresan una HRB moderada-intensa; entre 1-4 mg/ml, HRB ligera; de 4 a 16 mg/ml, HRB dudosa y cifras superiores a 16 mg/ml son indicativas de una PPB negativa.

Prueba de provocación con manitol

El manitol es un azúcar perteneciente al grupo de los polialcoholes, de propiedades osmóticas, con uso terapéutico para aliviar la hipertensión intracraneal y como sustituto del plasma sanguíneo o por su acción diurética. Cuando se utiliza por vía inhalada, produce un aumento de la osmolaridad del tracto respiratorio y la liberación de mediadores broncoconstrictores. En nuestro país, está comercializado en forma de cápsulas con dosis prefijadas de polvo seco que se acompañan de un dispositivo de inhalación (Osmohale®). Está compuesto de 19 cápsulas (una sin producto activo, 3 de 5, 10 y 20 mg, respectivamente, y 15 de 40 mg). La prueba comienza con la inhalación de la cápsula de 0 mg, desde el dispositivo de polvo seco suministrado por el kit, tras retener la respiración durante 5 segundos, se exhala por la boca y, pasados 60 segundos, se realiza la espirometría. Todo este mismo proceso se

repite con las dosis siguientes de 5, 10, 20 y 40 mg: las dosis de 80 y 160 mg se administran mediante múltiplos de cápsulas de 40 mg. La prueba finaliza cuando el paciente muestre una respuesta positiva o haya recibido una cantidad acumulada total de manitol de 635 mg. Se considera una respuesta positiva cuando el paciente experimenta una disminución del 15% en el FEV₁ con respecto al valor basal (dosis de 0 mg; PD₁₅ FEV₁) o un descenso incremental del 10% en el FEV₁ entre las dosis.

La PPB con manitol se presenta como una herramienta de gran interés a la hora de evaluar la efectividad del tratamiento antiasmático y establecer el grado de control alcanzado e, incluso, monitorizar la evolución del asma ocupacional⁽³⁰⁾. Paralelamente, la técnica facilita la colección de secreciones bronquiales (que aumentan tras su realización), lo cual proporciona, si se quiere, una fuente adicional de análisis de la inflamación bronquial en un momento determinado.

Por último, y no menos importante, el test de manitol inhalado constituye una alternativa a considerar para el diagnóstico del asma de esfuerzo, con una eficacia similar a la obtenida con la hiperventilación eucápnica. Exige menos equipamiento que la prueba de provocación por ejercicio y puede aportar resultados razonablemente superponibles. En este sentido, el Comité Olímpico Internacional ha aprobado su uso para el estudio de la HB en atletas de élite y para justificar el empleo de agonistas β₂-adrenérgicos antes de una competición deportiva⁽³¹⁾.

Como inconveniente, la PPB con manitol puede presentar una peor tolerancia en su realización que la metacolina, independientemente del resultado de la prueba⁽³²⁾.

PRUEBAS DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL POR EL EJERCICIO (PPBE)

En un alto porcentaje, los pacientes asmáticos refieren episodios de broncoespasmo con el ejercicio y, en ciertos casos, la clínica de la enfermedad se manifiesta exclusivamente con la actividad física.

Las principales indicaciones de la PPBE son: a) confirmar el diagnóstico de asma inducida por el ejercicio (AIE), especialmente en sujetos con espirometría normal y prueba de broncodilatación negativa con alta sospecha clínica, por su mayor sensibilidad que la hiperventilación isocápnica con aire frío; b) estratificar la gravedad del asma; c) prevención en profesiones y deportistas en los que un BIE puede poner en riesgo la vida propia o ajena; d) control de la terapia antiinflamatoria, y e) estudios epidemiológicos⁽³³⁾.

Las modalidades de ejercicio más utilizadas son el tapiz rodante y el cicloergómetro.

- **Tapiz rodante:** en esta prueba, la velocidad y la inclinación del tapiz se adapta en cada paciente con el fin de obtener un ejercicio mantenido durante 4-6 minutos sobre un total de 6 a 8 minutos de duración del esfuerzo. Durante los 2-3 primeros minutos se va incrementando la velocidad hasta alcanzar el 80-90% de la frecuencia cardíaca máxima predicha ($220 - \text{edad en años}$); la ventilación tendrá lugar al 40-60% de la máxima ventilación voluntaria teórica: $FEV_1(L) \times 35^{(34)}$.
- **Cicloergómetro:** los cálculos de trabajo y la ventilación se llevarán a cabo aplicando distintas ecuaciones que toman en consideración el trabajo realizado frente al consumo de oxígeno y el consumo de oxígeno respecto a la ventilación. El 60% del trabajo estimado deberá lograrse en el primer minuto, el 75% en el segundo, el 90% en el tercero y el 100% en el cuarto.

Se debe realizar una espirometría de referencia inmediatamente antes del ejercicio y repetirla a los 5, 10, 15, 20 y 30 min de su finalización. Si el FEV_1 ha retornado a su valor basal ($\pm 5\%$) a los 20 min, se puede evitar la espirometría de los 30 min post-ejercicio. En cada etapa del registro se obtendrán 2 maniobras reproducibles para la variable de medida

(diferencia $FEV_1 < 0,15 L$) y se elegirá la que tenga el mayor FEV_1 . Las maniobras espirométricas deben cumplir los criterios de aceptabilidad para el inicio de la maniobra, aunque no es preciso prolongar el tiempo espiratorio más allá de los 2-3 primeros segundos.

ESTUDIO DE INFLAMACIÓN A TRAVÉS DE FIBROBRONCOSCOPIA

La introducción de la fibrobroncoscopia en el análisis de las muestras de lavado alveolar y sobre las biopsias bronquiales ha permitido analizar las bases histológicas de la enfermedad⁽⁹⁾, aunque no es empleada habitualmente en la práctica clínica para el estudio y control de la inflamación en el asma.

- **Lavado broncoalveolar:** consiste en la administración de 100-400 ml de suero salino isotónico y estéril en alícuota de 20 a 60 ml, dejando el broncoscopio encajado en un segmento pulmonar. La cantidad de fluido recuperado varía desde un 50% en pacientes con asma moderada a grave hasta el 80-90% en el asma leve. Permite observar el aumento de celularidad a expensas de eosinófilos activados, correlacionándolo con el nivel de HRB. En los casos de asma grave, puede hallarse un predominio de neutrófilos y un incremento de mediadores de la cascada inflamatoria. También se ha utilizado el LBA para evaluar el efecto del tratamiento farmacológico y para estudiar la pequeña vía aérea. El espectro celular obtenido mediante LBA se correlaciona con los hallados en el esputo inducido.
- **Prueba de provocación segmentaria mediante broncoscopia:** consiste en la exposición a alérgenos para estudiar los mecanismos de desarrollo de inflamación de la vía respiratoria mediante una instilación directa sobre una localización determinada de la vía respiratoria, de modo similar al LBA, permite además utilizar una mayor dosis de alérgeno para inducir una mayor inflamación local con menos efectos secundarios. El problema de esta técnica es la variabilidad inter e intrasegmentaria en la respuesta inflamatoria. Diferentes estudios demuestran un aumento de leucotrieno C_4 tras su realización, hoy en día su uso está limitado a la investigación. Su principal riesgo es el broncoespasmo, además de los que conlleva el LBA.
- **Biopsia bronquial:** consiste en la obtención de un máximo de seis biopsias con una profundidad

subepitelial de al menos 0,3 a 0,5 mm y tomadas de las bifurcaciones de bronquios segmentarios o subsegmentarios. Permite cuantificar las células inflamatorias mediante técnica de inmunohistoquímica y para el estudio de las citoquinas. Las muestras deben ser rápidamente procesadas y congeladas para permitir la hibridación *in situ* y el análisis mediante proteína C de la expresión del ARN mensajero de citocinas o moléculas de adhesión⁽³⁵⁾.

- **Cepillado bronquial:** consiste en la extracción de células epiteliales de la mucosa bronquial con la finalidad de realizar estudios de células *in vitro*. Para su realización se debe evitar el uso de anestésicos tópicos. La seguridad en pacientes asmáticos es buena, aunque el principal riesgo es el sangrado⁽³⁶⁾.

En un futuro, paralelo al desarrollo de las nuevas tecnologías en broncoscopia, se abrirán nuevas vías de estudio de la inflamación en la patología asmática. A modo de ejemplo, con la utilización de ultrasonidos mediante EBUS lineal o tomografía de coherencia óptica se podrá evaluar el grosor y la estructura de la pared bronquial en pacientes con asma, así como la respuesta a los diferentes tratamientos.

ESTUDIO DE MUESTRAS DE ESPUTO INDUCIDO

Definición

La inducción de esputo consiste en la inhalación por parte del paciente de suero salino hipertónico para conseguir una muestra de secreción de procedencia bronquial que no es posible obtener de forma espontánea^(37,38). El esputo se compone fundamentalmente de mucosa en el que se encuentran inmersas células del sistema inmunitario, productos intracelulares y extracelulares. Su análisis ha permitido progresar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo del asma y en la relación entre inflamación e hiperrespuesta bronquial⁽³⁹⁾. Permite el recuento diferencial de células inflamatorias, identificación de agentes infecciosos así como la cuantificación de mediadores inflamatorios y múltiples biomarcadores. Por ello se considera una herramienta valiosa en gran parte de los pacientes con enfermedades respiratorias.

En 1980, Hargreave y sus colaboradores fueron pioneros en la utilización del recuento de los eosinó-

filos en la muestra de esputo como posible medida indirecta de la inflamación de la vía aérea en pacientes asmáticos⁽⁴⁰⁾. La *European Respiratory Society* ha elaborado un documento con recomendaciones para la estandarización de la inducción, colección, procesamiento y análisis del esputo inducido⁽⁴¹⁾.

Inducción del esputo

Se trata de una técnica reproducible, no invasiva y generalmente bien tolerada por el paciente. Este debe inhalar en un nebulizador ultrasónico soluciones salinas hipertónicas a diferentes concentraciones. Las concentraciones de suero salino inhalado más empleadas son 3%, 4% y 5% durante 7 minutos cada una. Dado que la solución salina hipertónica puede ser un potente broncoconstrictor, al paciente se le debe realizar una espirometría con inhalación de un agonista β_2 adrenérgico antes de empezar la prueba. También se deben realizar espirometrías de control entre cada inhalación de suero salino y una espirometría al final. Tras la última inhalación se debe intentar que, mediante maniobras de tos progresiva y profunda, el paciente expectore. Es importante insistirle en que debe esforzarse en que la muestra proceda de vías aéreas bajas para poder obtener una muestra de esputo válida.

Aspectos a tener en cuenta para el éxito de la prueba

- Estudios previos han observado una mayor tasa de éxito en la inducción cuando se utilizan nebulizadores ultrasónicos con un flujo de alrededor de 1 ml/min^(37,42) y con un tamaño de partícula nebulizada aproximadamente de $3 \mu^{(1)}$.
- Para minimizar la contaminación de la muestra con goteo postnasal el paciente debe sonarse la nariz tras las inhalaciones de suero salino.
- Realizar la prueba a primera hora de la mañana y en ayunas facilita la obtención de muestra.
- Una buena interacción entre el paciente y el personal encargado de realizar la inducción es fundamental para el éxito de la misma.

Procesamiento

Lo más correcto es empezar a procesar la muestra en cuanto sea obtenida o en las 2 horas siguientes a su obtención si se almacena en refrigeración. En la figura 1 se resume uno de los protocolos de procesamiento

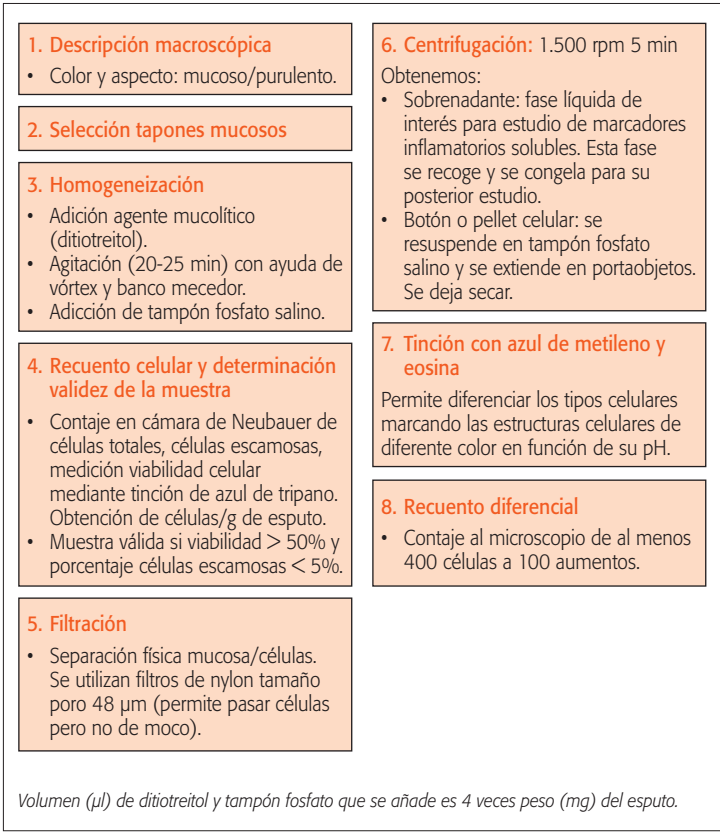


Figura 1. Protocolo procesamiento del esputo inducido⁽⁹⁾.

de esputo comúnmente empleados. Un aspecto clave dentro de este procesamiento es la correcta disgregación del esputo durante tratamiento con el agente mucolítico⁽⁴³⁾.

Criterios de identificación celular

- **Eosinófilos:** células de 9 a 14 µm de diámetro. Se caracterizan por un núcleo violáceo redondeado que frecuentemente presenta una estrangulación muy acentuada en la zona central, dando lugar a dos lóbulos muy separados entre sí (núcleo con aspecto de ojos de mosca). Citoplasma con gránulos anaranjados refringentes (Fig. 2).
- **Neutrófilos:** de similar tamaño al eosinófilo. Su núcleo puede presentar entre 2 y 5 lóbulos. Su citoplasma es grisáceo y con presencia no abundante de gránulos (Fig. 2).
- **Linfocitos:** células de 5- 8 µm. Núcleo redondo que ocupa la mayor parte de la superficie celular (Fig. 2).

- **Macrófagos:** células de 15-30 µm de diámetro. Núcleo redondo y citoplasma azul y vacuolado. Morfológicamente es similar al aspecto de un huevo frito (Fig. 2). En la tinción con aceite rojo utilizada para la identificación de macrófagos cargados de lípidos (lipófagos), las vacuolas lipídicas se observan de color rojizo.
- **Células epiteliales bronquiales:** son células alargadas. Hay dos tipos: ciliadas y caliciformes. Las ciliadas tienen un citoplasma azulado, núcleo en la zona basal y cilios en la zona apical (Fig. 2). Las caliciformes son menos abundantes en el esputo y presentan forma de cáliz con citoplasma laxo y grisáceo.
- **Células epiteliales orofaríngeas:** células grandes con núcleo pequeño redondeado y en el centro de la célula. Citoplasma grande no vacuolado y azulado. Suelen aparecer varias juntas, formando una estructura similar a los paneles de abeja (Fig. 2).

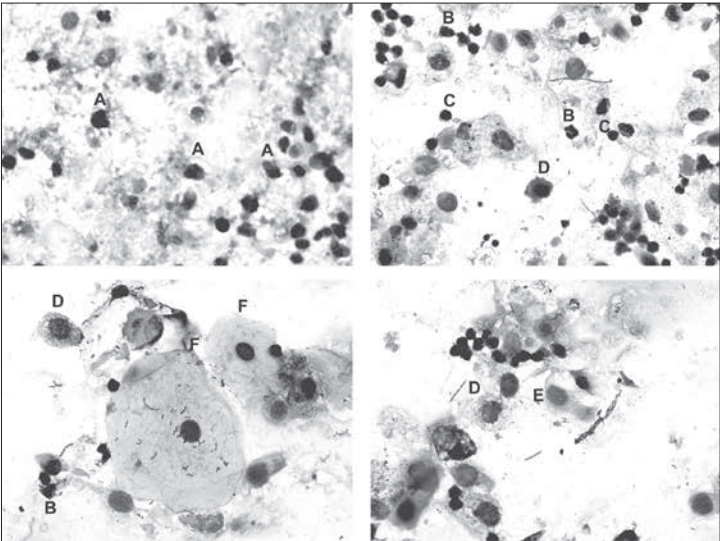


Figura 2. Identificación de los diferentes tipos celulares en el recuento diferencial del esputo. Imágenes recogidas al microscopio con objetivo 100X. A: eosinófilos, B: neutrófilos, C: linfocitos, D: monocito/macrófago, E: célula epitelial bronquial ciliada, F: células escamosas.

TABLA 5. Fenotipos inflamatorios del esputo inducido en el asma.		
	Eosinófilos ≤ 2%	Eosinófilos > 2%
Neutrófilos ≤ 61%	Fenotipo paucigranulocítico • Asma buen control • Asma no inflamatoria • Asma intermitente	Fenotipo eosinofílico • Asma alérgica • Incumplimiento tratamiento • Atopia
Neutrófilos > 61%	Fenotipo neutrofilico • Infección • Tabaquismo • Obesidad • Polución • Exposición laboral	Fenotipo mixto • Asma aguda • Asma refractaria

Modificado de^(44,45)

- **Basófilos:** tamaño similar al del eosinófilo. El núcleo suele ser ovalado o bilobulado y citoplasma con abundantes gránulos azules oscuros.

Fenotipos inflamatorios

El recuento diferencial del esputo inducido ha permitido identificar 4 fenotipos inflamatorios; eosinofílico, neutrofilico, mixto y paucigranulocítico. Los valores de referencia considerados para definir cada fenotipo varían entre los diferentes estudios realizados, sobre todo a la hora de definir el punto de corte de la eosinofilia^(44,45). En la tabla 5 se resumen los patrones inflamatorios del esputo inducido en el asma con los valores de referencia comúnmente empleados^(43,46).

Como es conocido en la reciente guía GEMA 4.0, el estudio de la celularidad en esputo inducido puede ser útil para fenotipar el asma grave, pudiendo tener repercusiones en el tratamiento a proponer⁽⁷⁾.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berry MA, Shaw DE, Green RH, et al. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic count ≥ 3% in a cohort of unselected patients with asthma. Clin Exp Allergy. 2005; 35: 1175-9.
2. ATS/ERS2005. American Thoracic Society/European Respiratory Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. Am J Respir Crit Care Med. 2005; 171: 912-30.

3. Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, et al. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176: 231-7.
4. Arora R, Thornblade CE, Dauby PA, Flanagan JW, Bush AC, Hagan LL. Exhaled nitric oxide levels in military recruits with new onset asthma. *Allergy Asthma Proc*. 2006; 27: 493-8.
5. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, et al. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169: 473-8.
6. Dweik RA, Boogs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al; American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. An official ATS clinical practice guideline: Interpretation of exhaled nitric oxide levels (FeNO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184: 602-15.
7. Guía española para el manejo del asma GEMA 4.0 Disponible en: <http://www.gemasma.com>.
8. Dressel H, de la Motte D, Reichert J, Ochmann U, Petru R, Angerer P, et al. Exhaled nitric oxide: independent effects of atopy, smoking, respiratory tract infection, gender and height. *Respir Med*. 2008; 102: 962-9.
9. Pérez de Llano L. Óxido nítrico en aire espirado. En: Plaza Moral V, ed. *Inflamometría en asma, EPOC y rinitis*. Barcelona: Vígüera editores; 2012. p. 119-43.
10. Horváth I, Hunt J, Barnes PF. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005; 26: 523-48.
11. Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc*. 2009; 6: 256-9.
12. Bousquet J, Chané P, Vignola AM, Lacoste J-Y, Michel FB. Eosinophil inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150(Suppl): S33-8.
13. Ulrik CS. Peripheral eosinophil counts as a marker of disease activity in intrinsic and extrinsic asthma. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25: 820-7.
14. Newman LJ, Platts-Mills TA, Phillips CD, Hazen KC, Gross CW. Chronic sinusitis. Relationship of computed tomographic findings to allergy, asthma, and eosinophilia. *JAMA*. 1994; 271: 363-7.
15. Busse W, Spector S, Rosén K, Wang Y, Alpan O. High eosinophil count: a potential biomarker for assessing successful omalizumab treatment effects. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132: 485.
16. Álvarez Gutiérrez FJ, Rodríguez Portal JA, Valenzuela Mateos F, Capote Gil F, Sánchez Gil R, Castillo Gómez. Mediadores de la inflamación (proteína catiónica del eosinófilo, ECP) en población normal y pacientes con asma bronquial o rinitis alérgica. *Arch Bronconeumol*. 1995; 31: 280-6.
17. Irani AM. The relationship between a specific IgE level and asthma outcomes: Results from the 2005-2006 national health and nutrition examination survey. *Pediatrics*. 2014; 134(supl 3): S168.
18. Bahceciler NN, Arıkan C, Akkoc T, Barlan IB. Predictors for the severity of bronchial hyperreactivity in childhood Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 1150-3.
19. Zietkowski Z, Tomasiak-Lozowska MM, Skiepo R, Mrocko B, Szmitkowski M, Bodzenta-Lukaszyk A. High-sensitivity C-reactive protein in the exhaled breath condensate and serum in stable and unstable asthma. *Respir Med*. 2009; 103: 379-85.
20. Chung KF. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. *Lancet*. 2015; 386: 1086-96.
21. Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 15858-63.
22. Hanania NA, Wenzel S, Rosen K, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 187: 804-11.
23. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *New Eng J Med*. 2011; 365: 1088-98.
24. Jia G, Erickson RW, Choy DF, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 130: 647-54.
25. Perpiñá Tordera M, García Río F, Álvarez Gutiérrez FJ, Cisneros Serrano C, Compte Torroero L, Entrenas Costa LM, et al. Normativa sobre el estudio de la hiperrespuesta bronquial inespecífica en el asma. *Arch Bronconeumol*. 2013; 49: 432-46.
26. Perpiñá Tordera M. Hiperrespuesta bronquial inespecífica. En: Plaza Moral V, ed. *Inflamometría en asma, EPOC y rinitis*. Barcelona: Vígüera editores; 2012. p. 87-92.
27. Pellicer Ciscar C, Sanchis Aldas J. Prueba de provocación farmacológica bronquial. En: Perpiñá Tordera M, ed. *Hiperreactividad bronquial inespecífica*. Barcelona: Doyma; 1994. p. 99-115.
28. Parra-Pérez M, Romero-Falcón A, Álvarez-Gutiérrez FJ, Medina Gallardo JF, Ferrer Galván M. Comparative study of bronchial provocation test using methacholine or mannitol in bronchial asthma. *ERS Amsterdam International Congress*, 26-30 september, 2015.
29. Juniper EF, Cockcroft DW, Hargreave FE. Histamine and methacholine inhalation tests: tidal breathing method; laboratory procedure and standardisation, 2nd ed. *AB Draco*; 1994.
30. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 16: 309-29.
31. Parkerson J, Ledford D. Mannitol as an indirect bronchoprovocation test for the 21st century. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011; 106: 91-96.
32. Romero Falcón A, Medina Gallardo JF, Ferrer Galván M, Pérez-Morilla P, Pérez Navarro P, Álvarez Gutiérrez FJ.

- Estudio comparativo de los efectos secundarios de las pruebas de provocación bronquial para el diagnóstico de asma bronquial. *Rev Esp Patol Torac*. 2015; 27: 161-7.
33. Randolph C. Diagnostic exercise challenge testing. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011; 11: 482-90.
 34. Torrego Fernández A. *Rev Espacioasma*. 2015; 8: 37-41.
 35. Moore WC, Evans MD, Bleecker ER, et al.; for the National Heart, Lung and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Safety of investigative bronchoscopy in the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 128: 328-36.
 36. Good JT, et al. Refractory asthma: importance of bronchoscopy to identify phenotypes and direct therapy. *Chest*. 2012; 141: 599-606.
 37. Torrejón Lázaro M. Inducción y obtención del esputo. En: Plaza Moral V, ed. *Manual del esputo inducido*. Madrid: GlaxoSmithKline; 2014. p. 23-30.
 38. Mateus Eder F. Procesamiento de la muestra y recuento celular convencional. En: Plaza Moral V, ed. *Manual del esputo inducido*. Madrid: GlaxoSmithKline; 2014. p. 31-41.
 39. Prieto L. Induced sputum as a method for the study of bronchial inflammation. *Arch Bronconeumol*. 2011; 47: 323-4.
 40. Gibson PG, Girgis-Gabardo A, Morris MM, Mattoli S, Kay JM, Dolovich J, et al. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax*. 1989; 44: 693-9.
 41. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *European Respir J Suppl*. 2002; 37: 1s-2s.
 42. Hunter CJ, Ward R, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. The safety and success rate of sputum induction using a low output ultrasonic nebuliser. *Respir Med*. 1999; 93: 345-8.
 43. Ramos Barbón D. Esputo inducido. En: Plaza Moral V, ed. *Inflamometría en asma EPOC y rinitis*. Barcelona: Vígüera editores; 2012. p.143-164.
 44. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, et al. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000; 162(3 Pt 1): 1172-4.
 45. Thomas RA, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wardlaw AJ, et al. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest*. 2004; 126: 1811-4.
 46. Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007; 119: 1043-52; quiz 53-4.