



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN MÉDICA

SECRETARÍA DE SALUD

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.

UNIDAD DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

EOSINOFILIA EN ESPUTO INDUCIDO COMO MARCADOR DE INFLAMACION EN
PACIENTES CON ASMA Y SOBREPESO/OBESIDAD DEL SERVICIO DE ALERGIA DEL
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LA ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA CLÍNICA Y ALERGIA

P R E S E N T A

DRA. ADRIANA BARRETO SOSA

ASESORES: DR. GUILLERMO VELÁZQUEZ SAMANO

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EOSINOFILIA EN ESPUTO INDUCIDO COMO MARCADOR DE INFLAMACION EN
PACIENTES CON ASMA Y SOBREPESO/OBESIDAD DEL SERVICIO DE ALERGIA
DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.

DRA. ADRIANA BARRETO SOSA

PRESENTA

DR. GUILLERMO VELÁZQUEZ SÁMANO

DIRECTOR DE TESIS

JEFE DE SERVICIO DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA
CLÍNICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.

DEDICATORIA

A MI ESPOSO por ser mi más grande apoyo y mi mejor amigo.

A MI BEBE ALEXANDER por ser mi fuente de inspiración y la razón de ser mejor persona cada día.

A MIS PADRES por darme la vida.

A MIS PACIENTES por enseñarme lo que hasta hoy se.

A MIS COMPAÑEROS Y MAESTROS de quien todos los días aprendo algo nuevo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	8
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	17
6. OBJETIVOS	17
7. METODOLOGÍA	18
8. RESULTADOS	22
9. DISCUSIÓN	25
10. CONCLUSIÓN	25
11. ANEXOS	26
12. BIBLIOGRAFÍA	32

1.RESUMEN

En la última década la prevalencia de obesidad y asma se ha incrementando de forma paralela. Se ha sugerido una relación entre ambas patologías, ya que con frecuencia la obesidad precede y predice el desarrollo de asma.^{1, 2} La obesidad es considerada como un factor de riesgo para la presencia y exacerbación del asma, observándose una relación directamente proporcional entre el índice de masa corporal y la severidad de esta enfermedad, dificultando además su control.

La relación directa entre asma y obesidad podría ser el resultado de la presencia concomitante de procesos inflamatorios crónicos, uno sistémico y otro localizado.^{8,9} La obesidad se considera una inflamación sistémica de bajo grado, con marcadores inflamatorios como PCR e IL-6 elevados además de incremento en los niveles de leptina, que incrementa la hiperreactividad y producción de citoquinas del tipo TH2.¹⁰ Los adultos obesos alérgicos con resistencia a la insulina, muestran mayor riesgo de sensibilización a aeroalergenos, con incremento de anticuerpos IgE específicos a los mismos.¹¹

A pesar de la reducción paulatina en la mortalidad por asma en nuestro país, su incidencia ha incrementado. De acuerdo a los datos proporcionados por el Sistema Nacional Epidemiológico, la incidencia de asma en 1996 fue de 239.7/100,000 y para el 2003 esta incidencia se incremento hasta 298.1/100,000 habitantes (19%), y en las proyecciones realizadas para el año 2007 se esperaba una tasa del 308.2 por 100 mil habitantes con un incremento del 22.4 %.^{17, 22}

Los eosinófilos son un biomarcador del “fenotipo eosinofílico”, interesantemente, este fenotipo parece identificar un grupo de pacientes con enfermedad más sintomática, mayor riesgo de exacerbaciones y en pacientes con asma severa con alto riesgo de eventos fatales³⁰. Sin embargo no hay estudios comparativos de pacientes con asma y sobrepeso/ obesidad grado I que utilicen este parámetro como biomarcador o en los cuales se asocie el grado de eosinofilia como grado de inflamación en pacientes con obesidad.

El análisis de esputo inducido es el método de elección para determinar parámetros cuantitativos de la inflamación bronquial aunque ha tenido poca difusión en diferentes

países, a pesar de que posee ventajas apreciables sobre los métodos invasivos utilizados con ese fin, entre estas ser reproducible.

Objetivo general

Determinar si los niveles de eosinofilia en las muestras de esputo inducido son directamente proporcionales al grado de sobrepeso/obesidad en pacientes con asma.

Metodología

Estudio clínico observacional, prospectivo, transversal y descriptivo. Se realizó con los pacientes de 23 a 55 años de edad de ambos sexos que acudieron al Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital General de México, O.D. para el estudio de su enfermedad alérgica y a quienes se les realizó inducción de esputo. Los pacientes proporcionaron su consentimiento informado para el estudio.

Resultados

Se analizaron los resultados de 34 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. De estos pacientes 27 (79.4%) fueron del género femenino, 7 (20.6%), la edad media fue de 41 años con una mínima de 23 y máxima de 56. Para poder realizar la inducción de esputo el paciente debería tener un FEP (Flujo espiratorio pico) mayor del 70% por lo que la mínima fue 70 y la máxima de 123 con una media de 88.64.

Como resultado final se obtuvo un índice de 0.64 utilizando el coeficiente de relación de Pearson, con una $p=0.01$, lo que significa que hay una asociación positiva entre el grado de sobrepeso y obesidad con la cantidad de eosinófilos en esputo, además se encontró un índice de -0.629 con una $p=0.01$ para la relación entre el porcentaje de neutrófilos vs el IMC por el mismo método, lo que significa que hay una relación inversamente proporcional con el grado de obesidad y el número de neutrófilos en expectoración.

Conclusiones

Este estudio demuestra que los eosinófilos en esputo son un marcador de inflamación en pacientes con asma y obesidad y que entre mayor es el índice de masa corporal mayor es el número de eosinófilos en expectoración, además se encontró una relación inversamente proporcional entre el número de polimorfonucleares y el índice de masa corporal en pacientes con asma y obesidad.

Se deben realizar más estudios con una población mayor y con controles para tener resultados más fidedignos respecto a lo ya comentado..

Palabras clave

Eosinofilia, esputo inducido, grado de severidad de asma, obesidad

2. INTRODUCCION

En la última década la prevalencia de la obesidad y asma se ha incrementado de forma paralela, se ha sugerido una relación entre ambas patologías, y que con frecuencia la obesidad precede y predice el desarrollo de asma.^{1,2}

Desde la década de los 70's ha incrementado la incidencia de obesidad a nivel mundial, con una mortalidad aproximada de 300,000 muertes por año en Estados Unidos. Como lo muestran dos estudios nacionales de dicho país con un incremento del 15% (1976-1980) a 32.9% (2003-2004), en los cuales también se observó incremento en sobrepeso entre niños y adolescentes³.

La prevalencia de la obesidad, en nuestro país, es de 23.7 % de la población, lo que significa que 11.4 millones de mexicanos son obesos, con mayor afección en mujeres en una relación 2:1 respecto a los hombres.

La obesidad incrementa la prevalencia e incidencia de asma y reduce el control de la misma. Diversos mecanismos han sido implicados. Los sujetos obesos presentan alteraciones cardiovasculares y pulmonares similares a las encontradas en pacientes asmáticos; disnea al realizar ejercicio, aumento del esfuerzo respiratorio, disminución del calibre de las vías respiratorias en especial las de pequeño calibre, y reducción de la capacidad pulmonar y capacidad funcional residual, así como alteraciones de la mecánica ventilatoria con patrón restrictivo. Las comorbilidades del asma como dislipidemia, reflujo gastroesofágico, alteraciones de la respiración durante el sueño e hipertensión arterial, pueden provocar empeoramiento del asma.⁴

Como resultado de los eventos descritos, la obesidad es considerada como un factor de riesgo en la presencia y exacerbación del asma, existe una relación directamente proporcional entre el índice de masa corporal y la severidad del asma, dificultando además su control.⁵ Aunque existe controversia a respecto ya que algunos estudios muestran una asociación significativa entre IMC (Índice de Masa Corporal) y prevalencia de asma, pero investigadores como Brenner y Col no encontraron relación significativa entre ambas patologías.⁶

Los pacientes asmáticos obesos muestran acumulación de tejido adiposo a nivel visceral abdominal lo que disminuye el volumen pulmonar promoviendo el cierre de la vía aérea así como una reducción de la Capacidad Residual Funcional (CRF). La reducción de los volúmenes pulmonares incrementan la respuesta de la vía aérea. El Volumen Tidal (Vt) disminuido genera rigidez del musculo liso por alteración en la actividad Actina-Miosina, contribuyendo con la obstrucción y menor distensibilidad pulmonar, y todo ello genera reducción de la presión de O₂ causando hipoxia tisular incluyendo el tejido adiposo lo que contribuye con la inflamación sistémica que presentan los pacientes obesos.⁴

Los resultados de un meta-análisis publicado en 2006, que incluye 12 estudios al respecto, concluye que el incremento de peso al nacimiento y la presencia de obesidad durante la infancia incrementan el riesgo de asma y el asma en estos pacientes es más grave. Además de que los niños obesos asmáticos requirieren mayor cantidad de medicamentos, mayor periodo de tiempo con oxígeno suplementario y una estancia hospitalaria más prolongada⁷.

La relación directa entre asma y obesidad podría ser el resultado de la presencia concomitante de procesos inflamatorios crónicos, uno sistémico y otro localizado.^{8,9} La obesidad se considera una inflamación sistémica de bajo grado, con marcadores inflamatorios como PCR e IL-6 elevados además de incremento en los niveles de leptina, que incrementa la hiperreactividad y producción de citoquinas del tipo TH2.¹⁰ Los adultos obesos alérgicos con resistencia a la insulina, muestran mayor riesgo de sensibilización a aeroalergenos, con incremento de anticuerpos IgE específicos a los mismos.¹¹

Definición y característica del asma

El asma es un desorden inflamatorio crónico de las vías aéreas en el cual participan muchos elementos. Se desarrolla un evento conocido como hiperreactividad que se caracteriza por obstrucción del flujo de aire con broncoconstricción, tapones de moco, inflamación, daño-reparación y remodelamiento.¹²

El asma se caracteriza por episodios recurrentes de sibilancias, dificultad respiratoria, opresión torácica y tos de predominio nocturno o durante la madrugada. Estos episodios

usualmente están asociados con obstrucción variable del flujo aéreo el cual es reversible de forma espontánea o con tratamiento. ¹²

Incidencia y prevalencia del asma

A nivel mundial la prevalencia varía ostensiblemente en el mundo, oscila entre el 2% de Tartu (Estonia) y el 11,9% de Melbourne (Australia). ^{13,14}.

El asma es la enfermedad crónica más común en la población infantil, es un problema de salud pública y en los países en desarrollo ocurre el 80 % de los casos de mortalidad ¹⁵.

El Comité del International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISACC), mostraron una prevalencia de asma en México entre el 5 y el 10 % de la población general y en mujeres es de 34.5% y en hombres de 24.2% ¹⁶.

A pesar de la reducción paulatina en la mortalidad por asma en nuestro país, su incidencia ha incrementado. De acuerdo a los datos proporcionados por el Sistema Nacional Epidemiológico, la incidencia de asma en 1996 fue de 239.7/100,000 y para el 2003 esta incidencia se incremento hasta 298.1/100,000 habitantes (19%), y en las proyecciones realizadas para el año 2007 se esperaba una tasa del 308.2 por 100 mil habitantes con un incremento del 22.4 %. ^{17, 22}

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), el asma ocupó el primer lugar de morbilidad en el año 2004 y para el año 2005 fue la primera causa de consulta ¹⁸.

Distribución geográfica

Las cifras oficiales de asma en México, la incidencia promedio en los últimos cinco años fue mucho mayor en Tabasco y Yucatán (7.78 ± 0.92 y 7.75 ± 0.15 por cada 1000 habitantes respectivamente) que en Tlaxcala y Puebla (0.50 ± 0.02 y 1.02 ± 0.07 por cada 1000 habitantes, respectivamente) lo que confirma la variabilidad de su incidencia. ¹⁹

Los estados de la república mexicana con mayor índice de hospitalizaciones secundarias a asma son: Morelos, Baja California Sur, Nuevo León, Durango y Tamaulipas, y el estado con mayor índice de mortalidad es Tlaxcala. ^{20, 21, 22}

Etiopatogenia, factores de riesgo y desencadenantes de asma

Los factores de riesgo y desencadenantes del asma son múltiples, los más relevantes en la actualidad son: genéticos, de los cuales se han reportado más de 100 genes asociados con el asma o relacionado con sus fenotipos, ²³ infecciosos donde bacterias, virus, hongos o parásitos y el estrés ambiental pueden activar diferentes receptores celulares y vías de señalización que inducen cambios en la superficie celular, modificando su respuesta para estímulos o infecciones posteriores ²⁴. Alergenos ambientales, tabaquismo, irritantes, contaminantes de autos, industrias, ambiente laboral, etc.) y la obesidad, la gravedad del asma se ve influida por la edad, sexo, embarazo, inmadurez del sistema inmunológico y la marcha atópica. La patogenia del proceso inflamatorio alérgico involucra un desequilibrio Th1-Th2, células cebadas, eosinófilos e IgE, actualmente incluye la importante participación de otros elementos como: Th17 o IL-17, IL23, IL-25, IL-27, Células T reguladoras, TLRs, NODs, Mas, DCs, células del epitelio bronquial, neurocininas, quimiocinas, ICAM-1, NO, además de otros elementos que incluyen la amplificación de la respuesta inflamatoria y en la remodelación del epitelio de la vía aérea.

^{25, 26}

Fisiopatología del asma

El hecho fisiológico principal de la exacerbación asmática es el estrechamiento de la vía aérea y la subsiguiente obstrucción al flujo aéreo, que de forma característica es reversible. Se produce por contracción del músculo liso bronquial, edema e hipersecreción mucosa. La contracción del músculo liso bronquial es el mecanismo predominante del estrechamiento de la vía aérea que revierte con los broncodilatadores, el edema de la vía aérea es debido al exudado microvascular en respuesta a mediadores inflamatorios, La hipersecreción de moco se debe al aumento en el número de las células caliciformes en el epitelio y al aumento en el tamaño de las glándulas submucosas. Además se acumulan exudados inflamatorios que pueden formar tapones mucosos. Hay cambios estructurales de la vía aérea fibrosis subepitelial, por depósito de fibras de colágeno y proteinglucanos por debajo de la membrana basal; hipertrofia e hiperplasia del músculo liso y aumento de circulación en los vasos sanguíneos de la pared bronquial, con mayor permeabilidad.

Diversos factores desencadenantes puede ocasionar la exacerbación. La broncoconstricción aguda inducida por alérgenos es consecuencia de la liberación de mediadores de los mastocitos. Los AINE pueden también causar obstrucción aguda de la vía aérea en algunos pacientes por un mecanismo no dependiente de la IgE. Otros estímulos como el ejercicio, el aire frío o irritantes inespecíficos pueden causar obstrucción aguda de la vía aérea. La intensidad de la respuesta a estos estímulos se relaciona con la inflamación subyacente. La variación o fluctuación de los síntomas y de la función pulmonar en el tiempo, incluso en un mismo día, más allá de los cambios fisiológicos circadianos, es una característica típica del asma que se puede determinar con la medida diaria del flujo espiratorio máximo (PEF) y se conoce como variabilidad.

Conforme la enfermedad se hace más persistente y la inflamación progresa, otros factores contribuyen a la limitación del flujo aéreo: el edema de la vía aérea, la hipersecreción de moco y la formación de tapones compuestos por exudados celulares y restos mucosos. Una circunstancia característica de la enfermedad, aunque no exclusiva, es el fenómeno de la hiperrespuesta bronquial (HRB). Definida como una “respuesta broncoconstrictora exagerada a una variedad de estímulos físicos, químicos o biológicos”, la inflamación es un factor fundamental para determinar el grado de HRB, pero no es el único. El grado de HRB se correlaciona parcialmente con la gravedad clínica del asma y con marcadores de inflamación, aunque no de forma muy estrecha. Influyen también los cambios estructurales, la disfunción neuroreguladora y los factores hereditarios. El tratamiento antiinflamatorio mejora el control del asma y reduce la HRB, pero no la elimina del todo.²⁷

Biomarcadores de inflamación en el asma

Biomarcadores se definen como una célula o compuestos de interés que han sido medidos en por lo menos en dos diferentes estudios, los cuales se han asociado con enfermedad, un fenotipo o proceso específico asociado con esa enfermedad.

Por muchos años se creyó que los eosinófilos eran biomarcadores específicos para asma, pero más recientemente muchos estudios usaron tejido y muestras de esputo para demostrar que los eosinófilos están presentes solo en un porcentaje de sujetos con asma, aproximadamente entre 40-60% de los asmáticos.^{28, 29}

Los eosinófilos son un biomarcador del “fenotipo eosinofílico”, interesantemente, este fenotipo parece identificar un grupo de paciente con enfermedad más sintomática, mayor riesgo de exacerbaciones y en pacientes con asma severa alto riesgo de eventos fatales³⁰. Recientemente, la terapia específica dirigida a la reducción de los eosinófilos circulantes y tejidos ha mostrado resultados prometedores para los pacientes con asma con eosinofilia persistente. Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal humanizado contra la IL-5, mepolizumab, reduce las exacerbaciones, mejora la calidad de vida y permite disminuir la dosis de prednisona en pacientes con asma refractaria y eosinofilia en esputo.^{31, 32, 34}

Varios fenotipos inflamatorios han sido descritos en pacientes con dificultades de tratar el asma, incluyendo el asma eosinofílica y no eosinofílica. La inflamación eosinofílica de las vías que persiste a pesar del tratamiento anti-inflamatorio, se ha asociado con asma más grave, exacerbaciones frecuentes, y la pérdida de la función pulmonar. En particular, la persistencia de eosinofilia en esputo tiene consecuencias terapéuticas, ya que permite adaptar la terapia de esteroides, así como el tratamiento específico con nuevos biológicos en el asma refractaria grave.^{33, 35}

Clasificación del asma

El asma como enfermedad inflamatoria crónica, muestra variaciones en sus manifestaciones clínicas y en el grado de obstrucción al flujo de aire, por lo que su severidad puede modificarse en el tiempo en el mismo paciente.

La Global initiative for Asthma (GINA) estableció un sistema práctico de clasificación, considerando aspectos clínicos y funcionales como frecuencia de los síntomas respiratorios diurnos y nocturnos, así como la función pulmonar; su combinación permite establecer la gravedad clasificando al asma como intermitente y persistente (leve, moderada y grave).¹²

La clasificación de la enfermedad por gravedad es de gran utilidad en la evaluación inicial del paciente por sus implicaciones terapéuticas y pronóstico.

Recientemente, se ha propuesto clasificar al asma de acuerdo al grado de control en; Controlada, parcialmente controlada y no controlada. Los parámetros que se emplean en este sistema son: frecuencia de síntomas respiratorios diurnos y nocturnos, limitación de actividades, uso de medicamentos de rescate, determinación del volumen respiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) o flujo espiratorio máximo (PEF) y la aparición de exacerbaciones. Esta clasificación, también tiene implicaciones terapéuticas ya que dependiendo del grado de control en el que se encuentre el paciente recibirá mayor o menor dosis de antiinflamatorio esteroideo y requerirá o no de más de un medicamento controlador ¹².

Clasificación de la gravedad del asma

Clasificación	Frecuencia de los síntomas	Función pulmonar
Asma intermitente	Síntomas < 1 vez por semana. Exacerbaciones breves Síntomas nocturnos no más de 2 veces por mes.	FEV1 o PEF > 80% del predicho Variabilidad del FEV1 o PEF <20% del predicho
Asma leve persistente	Síntomas > 1 vez por semana pero > 1 vez al día Las exacerbaciones pueden afectar la actividad y el sueño. Síntomas nocturnos >2 veces por mes	FEV1 o PEF >80% del predicho. Variabilidad del FEV1 o PEF 20-30%
Asma moderada persistente	Síntomas diariamente Las exacerbaciones pueden afectar la actividad y el sueño Síntomas nocturnos >1 vez por semana Uso diario de B2-agonistas inhalado de acción rápida	FEV1 o PEF 60 – 80% del predicho Variabilidad del FEV1 o PEF >30%
Asma grave persistente	Síntomas diariamente Exacerbaciones frecuentes Síntomas nocturnos frecuentes Limitación de actividades físicas	FEV1 o PEF <60% Variabilidad FEV1 o PEF >30%

Clasificación del asma de acuerdo a niveles de control

Características	Controlado	Parcialmente controlado	No controlado
Síntomas durante el día	Ninguno (menos de dos veces por semana)	Más de dos veces por semana	Tres o más características de parcialmente controlado en cualquier semana
Limitación de las actividades	No	Si	
Síntomas nocturnos	No	Si	
Uso de medicamentos de rescate	No (menos de dos veces por semana)	Más de dos veces por semana	
Función pulmonar FEV1 o FEM	Normal	<80% del predicho	
Exacerbaciones	Ninguna	Una o más por año	Una en cualquier semana

Esputo inducido

El esputo inducido es una técnica no invasiva que abre una nueva ventana en el campo de las enfermedades profesionales de los pulmones y se puede integrar para el diagnóstico y seguimiento de estas enfermedades, especialmente cuando las técnicas invasivas son clínicamente contraindicadas o poco prácticas ³⁶.

El análisis de esputo inducido es el método de elección para determinar parámetros cuantitativos de la inflamación bronquial aunque ha tenido poca difusión en diferentes países, a pesar de que posee ventajas apreciables sobre los métodos invasivos utilizados con ese fin, entre estas ser reproducible. Se ha observado que en pacientes asmáticos hay predominio de eosinófilos que los diferencio de los controles sanos. En los fumadores, a diferencia de los sanos y los asmáticos, se ha detectado mayor proporción de neutrófilos, mientras que en los controles sanos se observó una mayor proporción de macrófagos que en los fumadores ³⁷.

La muestra de esputo inducido es un método no invasivo útil para la evaluación de las vías respiratorias y las enfermedades del parénquima pulmonar. Estudios recientes compararon la técnica de esputo inducido y el líquido del lavado broncoalveolar y la composición celular de pacientes con enfermedad pulmonar encontrando que el porcentaje de macrófagos fue significativamente menor en el inducido de esputo que en

LBAL y el porcentaje de neutrófilos fue mayor en los que se indujo esputo que en LBAL.

38, 39

La broncoscopia con toma de biopsias, cepillados y lavado broncoalveolar (BAL) han sido fundamentales en el análisis de la inflamación existente en el asma, sin embargo la agresividad de la técnica impide su uso en la práctica habitual, especialmente en asmáticos severos y niños. Un estudio realizado con 54 pacientes con tos crónica 56.9% presentaron eosinófilos en el esputo mientras que los neutrófilos en casi todos ellos (93,1%). El análisis ANOVA mostró diferencias significativas entre los pacientes sin eosinófilos y aquellos con alto número de eosinófilos.³⁹

El estudio del esputo en el control del asma se abandonó por la dificultad para obtener muestras bronquiales adecuadas y su bajo rendimiento en los recuentos celulares. Ha recuperado su importancia durante esta década al resolverse el problema de la obtención de muestras mediante la técnica del esputo inducido con inhalación de solución salina hipertónica (induce expectoración y mejora la calidad de la muestra) y por la mejora en el procesado de la muestra.

En la muestra se pueden analizar los siguientes parámetros: Celularidad, proteína catiónica de eosinófilo (ECP) y otros mediadores del eosinófilo, Marcadores de activación mastocitaria (Triptasa e histamina), o Citoquinas (IL-5), Marcadores de permeabilidad microvascular: albúmina, fibrinógeno.

Análisis de esputo inducido en asma

La inducción de esputo por la inhalación de líquido isotónico o hipertónico hace posible la recolección segura y no invasiva de las células de las vías respiratorias de los pacientes con asma, independientemente de la severidad de la enfermedad. El análisis de esputo células ha ayudado a identificar los diferentes fenotipos de asma refractaria y se muestra que el asma como puede ser eosinófilos, neutrófilos, o ambos. Los niveles elevados de eosinófilos en el esputo indican un riesgo de exacerbación si la dosis de corticoides se reduce en pacientes estabilizados. Vigilancia de los niveles de eosinofilia como un indicador para el ajuste de corticosteroides en el asma refractaria permite reducir la frecuencia de las exacerbaciones graves.^{40, 41}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se necesitan biomarcadores que puedan medir el grado de inflamación pulmonar y correlacionar el grado de obesidad y severidad asma, que sean métodos no invasivos como la medición de eosinófilos en esputo inducido en los pacientes alérgicos del Servicio de Alergia del Hospital General de México, O.D.

JUSTIFICACION

Es bien conocida la asociación que existe en la obesidad y asma, pero no existe información en la literatura que relacione ambas patologías con eosinofilia en esputo inducido, ambas patologías son importantes problemas de salud en México. El esputo inducido es un método de laboratorio no invasivo y que nos puede proporcionar información importante acerca del estado actual de inflamación en el paciente asmático, además de ser reproducible y económicamente accesible. La inflamación eosinofílica de las vías aéreas contribuye a la limitación del flujo aéreo persistente en adultos con asma por lo que es importante contar con estudios de apoyo que nos ayuden a valorarla.

HIPOTESIS

Es posible utilizar la inducción del esputo como biomarcador de inflamación en pacientes con asma y sobrepeso/obesidad del Servicio de Alergia del Hospital General de México O.D.

OBJETIVOS

General

1. Determinar si los niveles de eosinofilia en las muestras de esputo inducido son directamente proporcionales al grado de sobrepeso/obesidad en pacientes con asma.

Específicos

2. Valorar la utilidad del esputo inducido como auxiliar diagnóstico en pacientes con asma.
3. Demostrar la ausencia de complicaciones con el uso de un método no invasivo para la inducción del esputo
4. Valorar si la reproducibilidad del esputo inducido nos puede ayudar como auxiliar en el seguimiento de pacientes con asma y tratamiento esteroideo.

METODOLOGÍA

Tipo y diseño del estudio

Estudio clínico observacional, transversal y descriptivo.

Variables independientes:

Se estudiaron las siguientes variables relacionadas con los pacientes alérgicos:

- Edad: Cuantitativa continua (número de años)
- Sexo: Nominal dicotómica (Masculino o femenino)
- Eosinofilia en esputo inducidos: Cuantitativa discreta
- Índice de masa corporal IMC: Cuantitativa continua

Variables dependiente:

- Pacientes con asma intermitente y leve persistente
- Pacientes con sobrepeso/obesidad
- Tipo de variable: Cualitativa
- Escala de medición: Ordinal

Población y tamaño de la muestra

Población y tamaño de la muestra

Se realizó con los pacientes de 23 a 55 años de edad de ambos sexos que acudieron al Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital General de México, O.D. para el

estudio de su enfermedad alérgica y a quienes se les realizó inducción de esputo. Los pacientes proporcionaron su consentimiento informado para el estudio.

Criterios de inclusión

- Pacientes de 18 a 60 años de edad
- Pacientes de ambos sexos
- Pacientes con asma alérgica
- Pacientes con antecedentes familiares de atopia
- Pacientes con sobrepeso y obesidad Grado I de la OMS
- Pacientes con IMC normal como controles
- Pacientes que otorguen su consentimiento informado para realizar estudio
- Pacientes que puedan expectorar

Criterios de exclusión

- Pacientes embarazadas
- Pacientes con inmunodeficiencias
- Pacientes que cursen con crisis aguda o reciente de asma
- Pacientes que se encuentren en tratamiento con esteroide inhalado o sistémico
- Pacientes que cursen con padecimientos que contraindiquen la realización de la espirometría por ejemplo. Hemoptisis importante de origen desconocido, neumotórax activo o reciente, enfermedad cardiovascular inestable, aneurismas cerebrales, torácicos o abdominales, desprendimiento de retina reciente, o cirugía del ojo reciente, cirugía reciente de tórax o abdomen

Criterios de eliminación

- Pacientes que no puedan realizar una espirometría reproducible y aceptable
- Pacientes que no puedan expectorar después de inducir la expectoración
- Pacientes con un PEF menor al 70%
- Pacientes que presenten alguna complicación durante la inducción de esputo

Procedimiento

El estudio se realizó en pacientes que acuden a consulta del Servicio de Alergia e Inmunología clínica del HGM O.D. con diagnóstico de asma, los cuales se encuentran en seguimiento y que cuentan con estudios de laboratorio y gabinete con el propósito de identificar aquellos pacientes asma intermitente y leve persistente de tipo inmunológica. A aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión se les realizó un cuestionario para la captura de datos (Anexo 1).

A estos pacientes se les explicó en qué consiste el estudio conocido como esputo inducido, sus indicaciones y posibles complicaciones y se solicitó su consentimiento informado para realizar dicho estudio (Anexo 2).

El procedimiento por el cual se realizó la toma de esputo inducido fue la siguiente:

- 1.Registro de los datos del paciente en la hoja correspondiente
- 2.Explicación al paciente sobre el procedimiento a realizar
- 3.Firma de consentimiento informado
- 4.Toma de signos vitales
- 5.Se envía al paciente al servicio de neumología a realizar toma de radiografía posteroanterior de tórax y espirometría
- 6.Una vez con resultado espirométrico y con un PEF mayor al 70% se inicia la inducción de esputo.
- 7.Se coloco al paciente en sedestación lo más confortable posible, se indica enjuagar varias veces la boca para evitar que haya restos alimentarios en la muestra y limpiará muy bien su nariz, se administran 200 mcg de salbutamol, se coloca mascarilla para nebulización, se inicia nebulización con solución salina hipertónica al 5% y se mantiene por 15 minutos o menos si el paciente logra expectorar, cuando no lograba expectorar se nebulizo por 15 minutos más, si a pesar de ello no consigue expectorar se eliminará del protocolo.
8. Se toman nuevamente signos vitales
- 9.Se auscultan campos pulmonares para descartar presencia de broncoespasmo
10. Se reenvia a realización de una segunda espirometría para asegurarnos de que su PEF no se modificó.
11. En caso de que se presente broncoespasmo persistente se dará tratamiento

con broncodilatador y en caso necesario esteroide y se mantendrá en observación por 30 minutos.

Aspectos éticos y de bioseguridad

Se realizó a los pacientes a que se les explicó el procedimiento espirometria e inducción de esputo y que aprobaron la realización del estudio mediante su firma en la hoja de consentimiento informado.

Se realizaron las pruebas con personal calificado para dar atención integral al paciente en caso de complicaciones las cuales no se presentaron..

Recursos disponibles

Para este estudio se utilizó:

- Personal médico y paramédico necesario para la atención del paciente, la elaboración de la Historia clínica e inducción de esputo.
- Papelería necesaria para la elaboración de la historia clínica, del cuestionario de datos.
- Solución salina hipertónica al 5%
- Frascos para muestra de esputo
- Diluyente carbowax
- Nebulizador y micronebulizador
- Equipo y programa de cómputo necesario para el registro de la información y análisis estadístico de los datos de cada paciente y resultados.

Recursos a solicitar

Ninguno.

Anexos

1. Hoja de recolección de datos
2. Carta de consentimiento informado

RESULTADOS

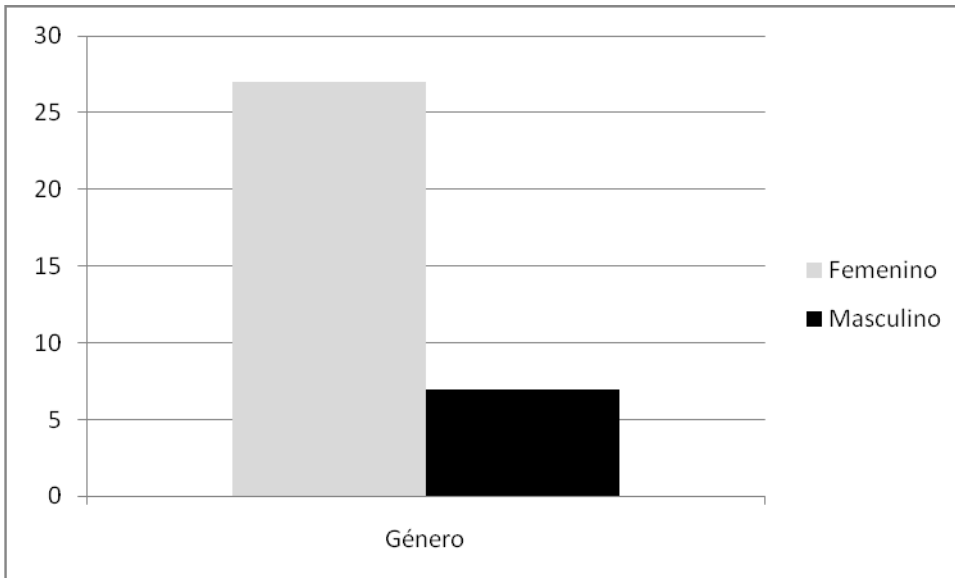
El presente estudio se realizó en el servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital General de México, O.D. durante los meses de Mayo y Junio. Fue aprobado por el Comité de investigación y de ética del HGM.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico en el programa PASW statistics 18 (Antes SPSS), calculándose los resultados con coeficiente de correlación de Pearson.

Durante el periodo mencionado anteriormente, se realizó inducción de esputo a 48 pacientes del servicio. De estos pacientes se excluyeron 7 pacientes por no contar con los criterios de inclusión propuestos para este trabajo. Se eliminaron 7 pacientes del estudio ya que 4 no lograron expectorar después de la inducción y 3 reportes de citología fueron no valorables por no presentar celularidad en la muestra. Se presentó broncoespasmo en 6 pacientes el cual revirtió a los 2 minutos con la aplicación de 200 mcg de salbutamol, algunos paciente refirieron náusea, presencia de temblor distal fino e irritación faríngea, no se presentaron complicaciones mayores durante la inducción de esputo.

Se analizaron los resultados de 34 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. De estos pacientes 27 (79.4%) fueron del género femenino, 7 (20.6%), la edad media fue de 41 años con una mínima de 23 y máxima de 56 (Gráfica 1). Para poder realizar la inducción de esputo el paciente debería tener un FEP (Flujo espiratorio pico) mayor del 70% por lo que la mínima fue 70 y la máxima de 123 con una media de 88.64.



Gráfica 1. Distribución de pacientes por género

Como resultado final se obtuvo un índice de 0.64 utilizando el coeficiente de relación de Pearson, con una $p=0.01$, lo que significa que hay una asociación positiva entre el grado de sobrepeso y obesidad con la cantidad de eosinófilos en esputo (Gráfica 2), además se encontró un índice de -0.629 con una $p=0.01$ para la relación entre el porcentaje de neutrófilos vs el IMC por el mismo método (Gráfica 3), lo que significa que hay una relación inversamente proporcional con el grado de obesidad y el número de neutrófilos en expectoración.

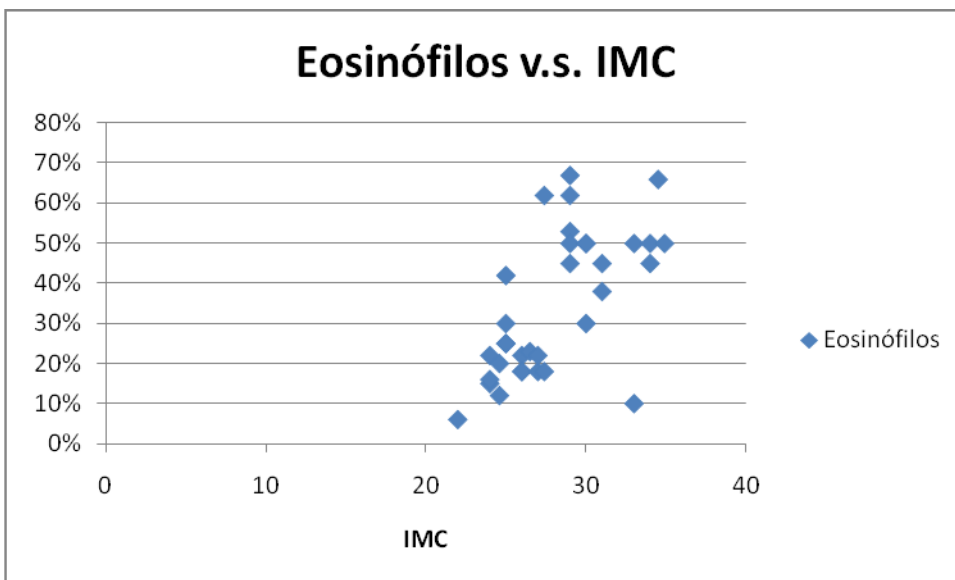


Gráfico 2. Asociación de porcentaje de eosinófilos con el IMC

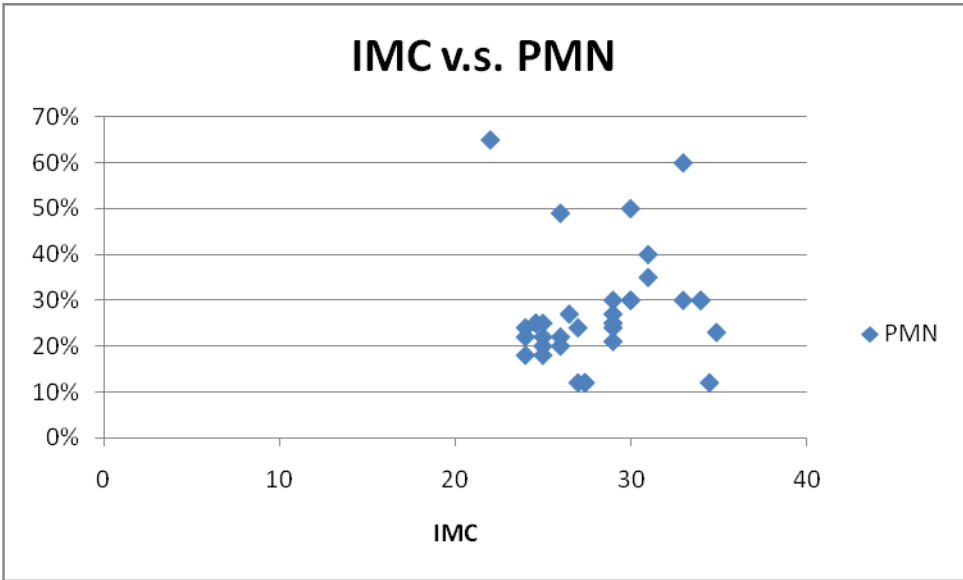


Gráfico 3. Asociación del porcentaje de polimorfonucleares con el IMC.

DISCUSION

En el presente trabajo se corroboró que la inducción de esputo es un procedimiento con pocas complicaciones y las cuales no son graves, es reproducible y accesible y nos aporta información importante porque generalmente la muestra es de buena calidad ya que se consigue obtener citología de vías respiratorias inferiores, además del estudio citológico se pueden obtener otros parámetros como es la citometria de flujo. Otra utilidad importante sería seguimiento en caso de pacientes que se encuentren con tratamiento esteroideo para ver el grado de remisión del proceso inflamatorio.

Los resultados obtenidos es que entre mayor es el IMC en nuestros sujetos de estudio mayor es el porcentaje de eosinófilos en expectoración, lo que nos habla de un mayor grado de inflamación secundario a la obesidad.

También se vio reflejado que el número de polimorfonucleares fue menor entre mayor era el índice de masa corporal.

CONCLUSION

Este estudio demuestra que los eosinófilos en esputo son un marcador de inflamación en pacientes con asma y obesidad y que entre mayor es el índice de masa corporal mayor es el número de eosinófilos en expectoración, además se encontró una relación inversamente proporcional entre el número de polimorfonucleares y el índice de masa corporal en pacientes con asma y obesidad.

Se deben realizar más estudios con una población mayor y con controles para tener resultados más fidedignos respecto a lo ya comentado..

ANEXOS

Anexo 1 Cuestionario y hoja de recolección de datos

CUESTIONARIO DE SINTOMAS

Número_____

NOMBRE:_____

SEXO: Masculino Femenino

PESO: _____ TALLA: _____ IMC _____

EDAD: _____

LUGAR DE RESIDENCIA:

D.F. _____ EDO. MEX. _____ OTRO _____

Municipio o Delegación: _____

Código Postal: _____

5. ¿Desde cuándo está enfermo?

6. Valoración del grado de control de su asma

¿Tiene más de dos veces al día síntomas de asma (tos, falta de aire, silbido de pecho)?

¿Su actividad o ejercicio físico se encuentran limitados por el asma

¿Le despierta el asma por la noche?

¿Necesita tomar su broncodilatador más de dos veces al día?

Si utiliza el medidor de flujo (FEM), los valores son inferiores a

Resultados de laboratorio:

Biometría hemática	Resultado	Citología nasal	Resultado	Espirometria	Resultado Pre	Resultado Post
Hb		Eosinófilos		FVC		
Hct		Neutrófilos		FEV1		
NT		Bacterias		FEV/FVC		
LT				PEF		

Biometría hemática	Resultado	Citología nasal	Resultado	Espirometria	Resultado Pre	Resultado Post
Eo						
Plaq						

IgE _____ UI/ml

RX DE TORAX _____

Complicaciones durante el prodecimiento _____



SERVICIO DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del protocolo: **“Eosinofilia en esputo inducido como marcador de inflamación en pacientes con asma y sobrepeso/obesidad del servicio de Alergia del Hospital General de México, O.D.”**

Investigador principal: **Dr. Guillermo Velázquez Samano**

Sede donde se realizará el estudio: **Servicio de Alergia e Inmunología clínica del Hospital General de México, O.D.**

El proyecto de investigación corresponde a: **Investigación con riesgo mínimo**

Nombre del Paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

I. Justificación y objetivos del estudio

El asma y la obesidad son enfermedades crónicas más frecuentes en nuestro país. En ambas enfermedades se encuentran alteraciones de las células del sistema inmune relacionadas con la inflamación. Específicamente se ha observado un aumento en células llamadas eosinófilos, las cuales se pueden encontrar en las secreciones de la vía respiratoria. Para obtener estas muestras de secreción se cuenta con estudios sencillos, con escasas o ninguna complicación y de rápida elaboración. Uno de estos estudios es conocido como “inducción de esputo” con lo que se obtiene una muestra de secreción de la vía respiratoria.

II. Procedimientos

En caso de que acepte participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre sus antecedentes médicos y se realizará una radiografía del pulmón. Posteriormente se realizará una prueba de esfuerzo respiratorio llamada espirometría. Si el resultado de la espirometría es normal, se realizará la inducción de esputo que consiste en la aplicación de una solución concentrada de sal estéril mediante nebulización con oxígeno, durante 5 minutos para facilitar la expulsión de secreción de la vía respiratoria. La muestra se coloca en frascos estériles y se envía al servicio de patología donde se buscan las células ya comentadas anteriormente.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del protocolo: “Eosinofilia en esputo inducido como marcador de inflamación en pacientes con asma y sobrepeso/obesidad del servicio de Alergia del Hospital General de México, O.D.”

III. Riesgos esperados.

El estudio de espirometría es seguro, teniendo amplia experiencia en el servicio de neumología en donde se solicita una radiografía del pulmón antes de realizarse para descartar enfermedades que impidan su realización. Algunos pacientes pueden presentar complicaciones como náuseas, dolor de cabeza, mareo, tos, o crisis de asma.

La inducción de esputo también es un procedimiento seguro en el que se puede presentar tos y rara vez una crisis asmática.

En caso de que usted desarrolle alguna complicación o requiera otro tipo de atención, ésta se le brindará en los términos que siempre se le ha ofrecido.

IV. Beneficios del estudio

Al contar con estudios sencillos, rápidos y con escasa complicaciones se puede realizar un mejor estudio del paciente asmático, así como valorar la respuesta al tratamiento.

V. Procedimientos alternativos

Otro estudio de utilidad para medir de forma indirecta el grado de inflamación en el pulmón del paciente asmático es la medición de unas sustancias llamadas óxido nítrico y proteína básica del eosinófilo. Por el momento no se cuenta con este estudio en el hospital.

VI. Garantía de recibir respuestas y aclaraciones

En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable. Todas sus preguntas e inquietudes serán contestadas en el momento en que usted las solicite.

VII. Libertad de retirar su consentimiento

Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria y usted puede retirarse del mismo en el momento que lo desee, informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad y sin que esto afecte su atención subsecuente en este servicio.



SERVICIO DE ALERGI A E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

CONSENTIMIENTO INFORMADO



Título del protocolo: **“Eosinofilia en esputo inducido como marcador de inflamación en pacientes con sobrepeso/obesidad del servicio de Alergia del Hospital General de México, O.D.”**

VIII. Privacidad

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

IX. Información actualizada

El equipo de investigadores se compromete a que en caso de obtener información actualizada con respecto al estudio, ésta se le proporcionará, aunque esta pudiera afectar su voluntad para continuar participando en el mismo.

X. Indemnización

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.

XI. Gastos adicionales

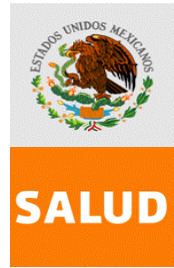
En caso de existir gastos adicionales, estos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa a este documento.



Anexo 2 Hoja de consentimiento informado

SERVICIO DE ALERGI A E INMUNOLOGÍA CLÍNICA



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del protocolo: **“Eosinofilia en esputo inducido como marcador de inflamación en pacientes con asma y sobrepeso/pacientes del servicio de Alergia del Hospital General de México, O.D.”**

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante o representante legal

Dirección del participante

Fecha

Firma del testigo participante

Relación con el

Dirección del testigo

Fecha

Firma del testigo participante

Relación con el

Dirección del testigo

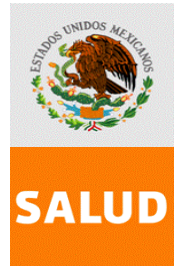
Fecha

Esta parte debe ser completada por el investigador (o representante):

He explicado al Sr. (a) _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar estudios con seres humanos y me apegó a ella.



SERVICIO DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Título del protocolo: **“Eosinofilia en esputo inducido como marcador de inflamación en pacientes con asma y sobrepeso/obesidad del servicio de Alergia del Hospital General de México, O.D.”**

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuesta, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del Investigador

Fecha

En caso de dudas o de requerir información adicional en relación con el proyecto de investigación, usted puede contactar al Dr. Guillermo Velázquez Samano Jefe de Servicio de Alergia e Inmunología Clínica en el número de teléfono 2789-2000 extensión 1265 ó 04455 2739 9073 las 24 horas del día; o bien a la Dr. Carlos Ibarra Pérez Presidente de la Comisión de Ética del Hospital General de México al teléfono 2789-2000 extensión 1368.

BIBLIOGRAFIA

1. Castro-Rodríguez José A.. Relación entre obesidad y asma; Arch Bronconeumol 2007;43(3): 171-175
2. Segura NH, Salas RM. 2Estudio Descriptivo de la Morbilidad y Mortalidad por Asma en una institución de Salud., Mexico : s.n., 1994, Vol. 41. 42-45.
3. Prevention, Centers for Disease Control and. <http://www.cdc.gov/nccdphp/dnpa/obesity/index>
4. Stephanie A. Shore. Obesity and asthma: Posible mecanism. Boston Mass : Journal of Allergy Clinical Immunology, 2008, Vol. 121.
5. O'Brien Paul E., Jhon B Et Al. The Extend of The Problem Of Obesity; The american Journal of Surgery 2002; 184: 4-8
6. Brenner JS, Kelly CS, Wenger AD, et al. Asthma and obesity in adolescents: is there an association? J Asthma 2001;38(6):509–515
7. Flaherman V, Rutherford GW. A meta-analysis of the effect of high weight on asthma. Arch Dis Child 2006;91:334–339.
8. Dela Cruz Charles S., Beuther David A. The Obesity epidemic; Clin Chest Med 2009; 30: 415-444
9. Chen CL, Liu IH, Fliesler SJ, Han X, Huang SS, Huang JS. Cholesterol suppresses cellular TGF-beta responsiveness: implications in atherogenesis. J Cell Sci 2007; 120:3509-21.
10. Husemoen LL, Glumer C, Lau C, et al. Association of obesity and insulin resistance with asthma and aeroallergen sensitization. Allergy 2008;63(5):575–82
11. National Institutes of Health (NIH). Global Strategy for Asthma Management and Prevention (GINA). The GINA Report 2008. www.ginasthma.org
12. ECRHHS. The European Community Respiratory Health Survey II. Eur Respir J. 2002; 20: 1071
13. ISAAC. ISAAC STEERING COMMITTEE. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). Eur Respir. 1996; 9: 687-95.
14. World Health Organization Asthma Facts. World Health Organization Asthma Facts 2009. <http://www.who.int/respiratory/asthma/scope/en/index.html>

15. Masoli Matthew Fabian, Denise y Holt, Shaun. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report: *Allergy*, 2004, Vol. 5
16. Vargas M, Díaz G, Furuya M, Salas J, Trends of asthma in México: an 11-yr analysis in a nationwide institution. *Chest* 2004; 125: 1993-1997
17. Guajardo V, Cadena F. Calidad de vida en niños y adolescentes con Asma en una población Mexicana. Mexico : *Revista de Enfermería Universitaria*, 2008, Vol. 5
18. Mario Humberto; *Epidemiología del asma*; *Revista de alergia México*, Vol. 56, Suplemento1, 2009 S3-S10
19. Vargas Becerra Martinez-Cairo S, Segura N. Epidemiologic aspects of bronchial asthma in Mexican Republic. 131, Mexico : *Gad. Med. Mez*, 1995, Vol. 3.
20. Salas M, Segura N, Martinez-Cairo S Asthma mortality trends in Mexico .. 116, Mexico : *Bol. Oficina Sanit Panam*, 1994, Vol. 4.
21. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática INEGI. <http://www.inegi.org.mx>
22. Zhas J. Paré PD, Sandford Aj. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res.* 2008; 9:4
23. Mota Pinto A, Todo-Bom A. The role of the epithelial cell in asthma. *Rev Port Pneumol* 2009; 15 (3); 461-72
24. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39 (9); 1314-23.
25. Suarez CJ, Parker NJ, Finn PW. Innate immune mechanism in allergic asthma. *Curr Allergy and Asthma Re.* 2008;8: 451-9
26. O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. *Chest.* 2003; 123: 411S-6S
27. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(3):1001-8.
28. Miranda C. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(1):101-8.
29. Menzies-Gow A, Flood-Page P, Sehmi R, et al. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy induces bone marrow eosinophil maturational arrest and decreases eosinophil

- progenitors in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(4):714–9.
30. June Y. Zhang, Sally E. Wenzel, Tissue and BAL Based Biomarkers in Asthma; *Immunol Allergy Clin N Am* 2007; 27:623-632
 31. Consistency of sputum eosinophilia in difficult to treat asthma: A 5-year follow-up study
 32. Haldar P., CE Brightling, B. Hargadon, S. Garcia, W. Monteiro, A. Sousa, et al: Mepolizumab y exacerbaciones de refractarios eosinofílica asma. *N Engl J Med* 360. 973-984.2009
 33. P. Nair, MM Pizzichini, M. Kjarsgaard, MD Inman, A. Efthimiadis, E. Pizzichini, et al: Mepolizumab para el asma dependiente de la prednisona con esputo eosinofilia. *N Engl J Med* 360
 34. Hara J, Sputum eosinophilia, airway hyperresponsiveness and airway narrowing in young adults with former asthma *Allergol Int* - 01-SEP-2008; 57(3): 211-7
 35. Fireman E , Induced sputum and occupational diseases other than asthma. - *Curr Opin Allergy Clin Immunol* - 01-APR-2009
 36. Uribe Echeverría Elisa; Safety, reproducibility and validity of induced sputum technique; *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* 2003; 34; 2: 41-46
 37. Tan CW - *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, The clinical significance of noninvasive inflammatory markers in exhaled breath condensate and induced sputum in persistent asthmatic patients April 2009; 48(4): 299-303
 38. Sobiecka M - *J Physiol Pharmacol*. Induced sputum in patients with interstitial lung disease: a non-invasive surrogate for certain parameters in bronchoalveolar lavage fluid. December 2008, 59 Suppl 6: 645-57
 39. Busacker A, Balzar S, et al. Induced sputum in Chronic cough. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*: Vol. 123, Issue 2, Supple
 40. Louis R. Analysis of induced sputum in refractory asthma. *Presse Med* January 2008; 37: 155-9
 41. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – May 2010 Volume 125