

VALOR DEL ESTUDIO CELULAR DEL ESPUTO EN EL SEGUIMIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS DE LA VÍA AÉREA

JUAN ANTONIO MAZZEI¹, ADRIANA E. ROCHER², LUIS PALAORO²

¹Departamento de Medicina, Hospital de Clínicas Universidad de Buenos Aires, ²Laboratorio de Citología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires

Resumen El análisis celular del esputo, espontáneo u obtenido mediante la técnica de esputo inducido, se ha transformado en una herramienta ampliamente difundida para la evaluación y orientación del tratamiento de las enfermedades inflamatorias de la vía aérea, principalmente asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquitis eosinofílica. Se han aportado evidencias sobre la utilidad de la técnica del esputo inducido, validada y estandarizada, para ser empleada en pacientes con dificultades para expectorar. Numerosas investigaciones dieron cuenta de la efectividad de basar las decisiones terapéuticas en el componente inflamatorio de la vía aérea mediante el recuento de células en el esputo. Varios estudios mostraron que, en pacientes con asma el análisis celular de esputo guía en la determinación de estrategias para disminuir las exacerbaciones y para mejorar la función pulmonar, aun en pacientes con asma grave, para disminuir el remodelamiento; también se ha descrito su utilidad en pacientes con EPOC, para la disminución de las exacerbaciones.

Palabras clave: análisis celular del esputo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis eosinofílica, tos crónica

Abstract *Value of sputum analysis in the management of inflammatory airway diseases.* Cellular analysis of sputum either spontaneous or by induced sputum technique, has become a widespread tool for the evaluation and guidance of treatment of inflammatory diseases of the airway, primarily asthma, COPD and eosinophilic bronchitis. Induced sputum method is a validated, standardized and non-invasive technique, useful in patients with difficulties to expectorate. Its implementation is simple and cost effective. Numerous investigations have shown the effectiveness of basing treatment decisions on the inflammatory component of the airway by counting cells in sputum. Several studies have demonstrated that in patients with asthma, results of this analysis can guide in defining strategies to reduce exacerbations and to improve lung function even in patients with severe asthma, as well as to decrease the remodeling; in addition, a reduction in exacerbations in COPD patients, monitored by this sputum examination, has also been described.

Key words: cellular analysis of sputum, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, eosinophilic bronchitis, chronic cough

El análisis de la celularidad del esputo, espontáneo u obtenido mediante la técnica de esputo inducido se usa para evaluar y orientar el tratamiento de las enfermedades inflamatorias de la vía aérea.

La técnica de esputo inducido mediante la nebulización de solución salina hipertónica fue usada en las clínicas de tuberculosis desde los años '60, para obtener muestras de pacientes sospechosos de tuberculosis que no expectoraban y, también, de pacientes tuberculosos en tratamiento que habían dejado de expectorar con el

objetivo de confirmar la negativización bacteriológica. Originariamente se empleaba una muestra obtenida por inducción y una segunda muestra, generalmente más productiva, obtenida por expectoración espontánea unos 30 minutos después de terminar el procedimiento^{1,2}. el método cayó en desuso para ese propósito por varias razones, entre ellas la falta de medidas de bioseguridad necesarias para efectuarla.

Además de la tuberculosis, el examen y recuento celular en esputo se ha transformado en una herramienta

ampliamente difundida para diagnosticar infecciones respiratorias por *Pneumocystis jiroveci* y cáncer de pulmón. Esta revisión se enfocará en su uso para la evaluación y orientación del tratamiento de las enfermedades inflamatorias de la vía aérea, principalmente el asma, la EPOC y la bronquitis eosinofílica sin asma. La aceptación de este método se basa en su excelente perfil de seguridad y la facilidad con la que se puede realizar en comparación con otras técnicas de estudio de la inflamación de la vía aérea como la broncoscopía. Un tema controvertido es que la técnica de obtención de esputo por inducción no está exenta de riesgo si no se toman los recaudos correspondientes o no se respetan las contraindicaciones. Existen todavía algunos puntos sin resolver sobre la modalidad de inducción y el procesamiento de la muestra. La *European Respiratory Society* está afrontando el desafío de estandarizar el método de inducción con el objetivo de normalizar los pasos críticos de la inducción del esputo y su análisis y posibilitar la comparación entre estudios³.

Técnica de obtención de esputo espontáneo

Usualmente la recolección de la muestra de esputo expectorado espontáneamente la hacía el personal de enfermería, en la actualidad se le suelen explicar al paciente los pasos a seguir entregándole material escrito detallado como refuerzo. En primer lugar el paciente debe realizar un prolijo lavado de dientes con cepillo y dentífrico. Luego debe preparar una suspensión con una a dos cucharadas de bicarbonato disueltas en agua y hacerse buches, sin tragarla. Después de ello debe destapar el frasco de recolección. Finalmente debe toser varias veces y expectorar las secreciones bronquiales así obtenidas en el interior del frasco. Es muy importante advertirle al paciente que la muestra que se estudiará debe estar constituida por secreciones bronquiales, no por saliva.

Técnica de obtención de esputo inducido

La inducción del esputo es un procedimiento utilizado cuando no es posible obtener esputo espontáneamente. Usualmente se obtiene nebulizando con solución hipertónica en aerosol, en concentraciones del 3, 4 y 5%; realizando cuatro inhalaciones en 5 minutos o tres en 7 minutos. También se puede usar una concentración de 4.5% durante 30 segundos seguida de inhalaciones en los minutos 1°, 2° y 4°. Se ha estandarizado que debe utilizarse un nebulizador ultrasónico con un flujo de alrededor de 0.9 ml/min. Luego de cada inhalación el paciente debe soplar por la nariz, enjuagarse la boca con agua y tragar; estas maniobras tienen como objetivo minimizar la contaminación de la muestra con goteo posnasal o saliva. Luego debe toser en un recipiente limpio^{4,5}. El procedimiento demanda aproximadamente una hora pero

puede suspenderse en el momento en que se obtenga una muestra suficiente (> 2 ml)⁶. Dado que la solución salina es un potente bronco constrictor es importante disminuir al mínimo este riesgo. Se utilizan para ello el nebulizador ultrasónico y la inhalación de un agonista β_2 adrenérgico antes del procedimiento (por ejemplo: 200 μ g de albuterol). En pacientes con VEF₁ muy bajo o en tratamiento prolongado con agonistas β_2 o preparados de acción corta más de 2 veces al día la solución salina se debe aplicar por periodos breves, inferiores a 30 segundos. En todos los casos se debe medir el VEF₁ antes y después de cada inhalación y suspenderse el estudio si se detecta una disminución $\geq 20\%$ ^{7,8}.

Una parte muy importante de la técnica es respetar las normas de protección del operador y el ambiente, en este sentido el paciente siempre debe considerarse como posible infeccioso. Para minimizar el riesgo de transmisión de agentes microbianos se recomienda realizar el procedimiento en una habitación con presión negativa y, de ser posible, separada del operador mediante un cristal; como alternativa se deberá disponer de un equipo portátil para realizarlo en áreas alejadas de las que usan otros pacientes y el personal, con corriente de aire natural dirigida a cielo abierto y que contemplen la privacidad⁹. Una vez concluido el procedimiento, el paciente debe permanecer en el área de recolección de la muestra hasta haber cesado de toser o, en caso contrario, usar un barbijo adecuado. Para el operador la recomendación consiste en emplear un barbijo ajustado siempre que ingresa o permanece en el área donde se realiza la inducción. Antes de permitir el ingreso del siguiente paciente se deben eliminar convenientemente los residuos y elementos descartables, lavar los elementos reutilizables y desinfectarlos con glutaraldehído, y deben transcurrir al menos cinco minutos para que se eliminen del aire los contaminantes⁹.

Análisis de la muestra

El análisis de la muestra requiere personal entrenado en cuyas manos los resultados del recuento celular pueden estar disponibles en apenas 1.5 horas.

De acuerdo al color el esputo se clasifica como mucoso, mucopurulento o purulento. La muestra se puede examinar como un todo o, colocándola en una placa de Petri, separando la fracción de esputo opaca y densa de la de saliva, lo cual suele disminuir la contaminación con células escamosas a < 5%⁴. Luego se realiza el recuento celular, se analiza su viabilidad y se separa la fase fluida de la celular. En la fase fluida se pueden medir marcadores inflamatorios como interleucinas (IL-5; IL-8, etc.), proteína catiónica eosinofílica (ECP), etc.^{10,11}. En la Tabla 1 se mencionan los valores normales de la celularidad del esputo⁴.

Indicaciones para la realización del análisis celular del esputo

El análisis de la celularidad del esputo tiene actualmente múltiples indicaciones en el estudio de la enfermedad inflamatoria de la vía aérea. Probablemente su utilidad mayor en el campo clínico es la valoración de la respuesta al tratamiento antiinflamatorio tanto en el asma como en la EPOC y la necesidad de utilización de antibióticos en la exacerbación de estas dos enfermedades. Los lineamientos actuales de manejo de las enfermedades inflamatorias de las vías aéreas incluyen el análisis de esputo entre sus recomendaciones. Conocer en detalle sus indicaciones y utilidad contribuye a aprovechar al máximo los resultados (Tabla 2)¹².

Asma

La eosinofilia en esputo (> 3%) es una característica clásica del asma, es útil para predecir la respuesta al tratamiento, investigar causas de mala respuesta a la terapéutica y predecir una exacerbación. Mantener su recuento en niveles bajos parecería una estrategia terapéutica eficaz. Hace más de una década^{13, 14} se observó que no todos los asmáticos presentaban eosinofilia durante una exacerbación; existen asma no eosinofílicas y asma neutrofílicas dependiendo de la etiología.

Los corticoides tanto sistémicos como inhalatorios son los medicamentos con mayor poder para disminuir el número de eosinófilos, por lo que el recuento de estas

células en esputo contribuye a predecir la respuesta a corto plazo a estos medicamentos y ajustar las dosis en los pacientes con asma grave. Se ha informado disminución significativa del recuento de eosinófilos en esputo (2.7% vs. el valor inicial; $p < 0.05$) asociada al uso de budesonide inhalatorio¹⁵. La utilidad del análisis de esputo se extiende también a pacientes con asma grave refractaria. Después de dos semanas de tratamiento con 0.5 mg/kg de prednisona oral los pacientes con eosinofilia inicial disminuyeron las interleucinas IL-5 e IL-8 y los eosinófilos; en aquellos sin eosinofilia únicamente disminuyó la IL-8¹⁶. Un estudio doble ciego, aleatorizado, mostró aumento de la PC20 ($p < 0.0001$) y disminución del porcentaje de eosinófilos ($p = 0.004$) con propionato de fluticasona y, también con salbutamol; un dato importante que surge de este estudio es que estos cambios no se reflejaron en el BAL¹⁷.

La teofilina también ejerce efectos sobre los eosinófilos del esputo. Se trataron 24 pacientes con asma leve a moderada con 200 a 600 mg/día de teofilina durante 4 semanas observándose una disminución del recuento de eosinófilos respecto del inicio de 41.3% a 23.6% así como una reducción de internaciones por asma (1 vs. 6; $p = 0.047$) en comparación con otros 24 individuos que no recibieron el mismo tratamiento¹⁸. Un ensayo clínico en 117 adultos con asma moderada a grave, comparativo entre un tratamiento basado en la evaluación clínica y espirométrica, u otro que incluyera también el monitoreo del esputo mostró que esta última estrategia resultó eficaz para disminuir la gravedad de las exacerbaciones sin necesidad de aumentar la dosis de corticoides inhalados¹⁹.

TABLA 1.— Recuento celular diferencial en esputo en adultos normales

Células	Porcentaje medio	Percentil 10	Percentil 90
Macrófagos	60.8	33	86.1
Neutrófilos	36.7	11	64.4
Eosinófilos	0.0	0.0	1.10
Linfocitos	0.5	0.01	2.6
Células epiteliales bronquiales	0.30	0.0	4.40

Recuento total de células < 9.7×10^6 / ml

TABLA 2.— Utilidad del estudio de la celularidad del esputo, espontáneo o inducido

- El recuento celular es útil para identificar el tipo de bronquitis
- El recuento de celularidad total y de neutrófilos es útil para diagnosticar bronquitis infecciosa
- El tipo de bronquitis se relaciona con la causa de la exacerbación, por ende el esputo se debería analizar en cada episodio
- El recuento celular no es un criterio diagnóstico de asma
- El recuento celular en esputo no es imprescindible para orientar un tratamiento, pero debería ser considerado a fin de evitar errores terapéuticos

Un estudio doble ciego, aleatorizado, en pacientes con asma estable, asintomáticos, halló que, comparativamente con el tratamiento continuo con bajas dosis de corticoides inhalados el grupo placebo se asoció a un aumento significativo de la eosinofilia en el esputo respecto del valor inicial durante las recurrencias sintomáticas (8.2% vs. 0.9%; $p < 0.05$) y las exacerbaciones (8.2% a 16.6%; $p < 0.05$)²⁰. En otra investigación en pacientes estables tratados con dosis medias a altas de corticoides inhalados, la disminución de la dosis se asoció a aumento del número de exacerbaciones y la eosinofilia en esputo (13.6% vs. 0.2%), también se notó una correlación entre la eosinofilia y la disminución de los parámetros de función pulmonar²¹. Mediante el examen de esputo antes y una hora después de la provocación con adenosín monofosfato (AMP) se demostró ausencia de eosinofilia en las personas sanas (mediana 0.2% inicial vs. 0.2% final) en comparación con un aumento significativo en los asmáticos (0.5% inicial vs. 2.6% final)²². Los estudios descriptos aportan evidencias de la eficacia del método para predecir exacerbaciones e identificar pacientes que pueden reducir o discontinuar el tratamiento. En términos generales se señala que cuando el recuento de eosinófilos es $\geq 2\%$ se debe aumentar la dosis de antiinflamatorios, si está entre el 1% y 2% el tratamiento no debe modificarse (Fig. 1)³⁹.

La persistencia o recurrencia de una bronquitis neutrofílica sugiere la existencia de bronquiectasias con infección, esta situación puede enmascarar una bronquitis subyacente por lo que se debe esperar su resolución

antes de modificar la terapia con corticoides²³. La combinación de neutrofilia más eosinofilia persistente sugiere sensibilización alérgica a hongos debiendo descartarse una aspergilosis asociada a bronquiectasias²⁴.

Si bien es cierto que desde el punto de vista de la patogenia de las enfermedades inflamatorias resulta racional conocer las células y moléculas solubles involucradas, algunos autores sostienen que en la vasta mayoría de los pacientes el estudio del esputo no se halla indicado debiendo ser utilizado únicamente para definir el fenotipo eosinofílico del asma o para realizar tratamientos muy específicos²⁵.

EPOC

Varias investigaciones señalan la utilidad del examen de la celularidad del esputo para estudiar la inflamación de la vía aérea en pacientes con EPOC^{4,26}. El aumento del recuento celular se asocia con las exacerbaciones de la enfermedad; en esta circunstancia generalmente aumentan los neutrófilos, pero también se han descrito aumento de eosinófilos, neutrófilos y eosinófilos combinados u otros tipos celulares. Tal como en el asma, el aumento de unos u otros depende de la etiología.

El recuento celular se utiliza, también, para valorar la respuesta terapéutica, una cantidad elevada de eosinófilos en la muestra se asocia a una mejor respuesta clínica a la prednisona (VEF₁ posbroncodilata-

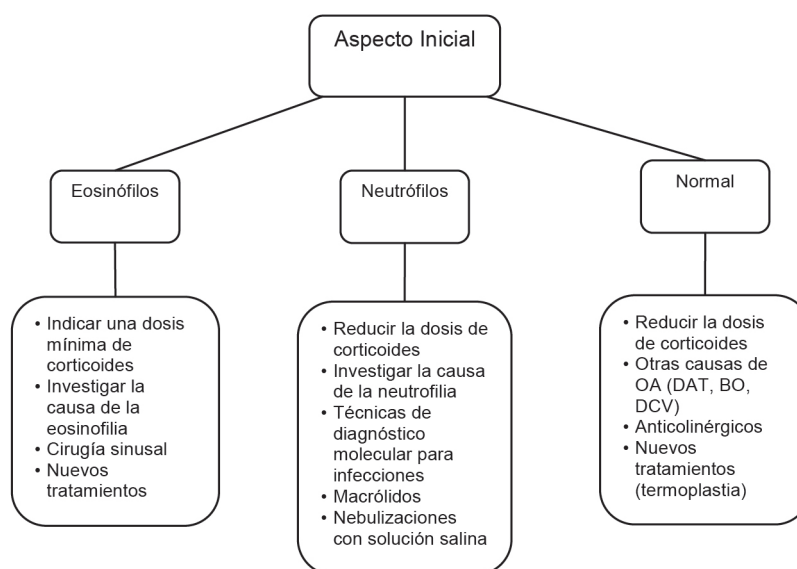


Fig. 1.– Algoritmo de manejo diagnóstico terapéutico del asma basado en la celularidad del esputo (Basada en Nair P, Hargreave FE. *Chest* 2010⁴⁰)

OA: Obstrucción vía aérea; DCV: disfunción cuerdas vocales; DAT: deficiencia α antitripsina; BO: Bronquiolitis obliterante

dor) y mejoría de la calidad de vida²⁷. En fumadores con bronquitis obstructiva crónica se notó un efecto favorable de la prednisona en aquellos con recuento de eosinófilos $\geq 3\%$ con una diferencia respecto del placebo de 0.8 puntos en el ítem disnea del Cuestionario de enfermedades respiratorias crónicas (CQR) ($p = 0.008$) y de 1.96 puntos en la calidad de vida usando el mismo cuestionario ($p = 0.01$). El VEF₁ previo a la administración del broncodilatador fue de 0.1 l y de 0.11 después del broncodilatador ($p = 0.05$). También en estos pacientes hubo una disminución significativa de los eosinófilos de 9.7% a 0.5% ($p = 0.002$), ECP de 6 000 $\mu\text{g/l}$ a 1 140 $\mu\text{g/l}$ ($p < 0.001$) y fibrinógeno de 25.3 mg/l a 5.4 mg/l ($p < 0.001$)²⁸. En el estudio de Brightlin²⁹ aleatorizado, doble ciego, en pacientes tratados con broncodilatadores se informa que aquellos a quienes se agregó prednisona 30 mg/día durante 2 semanas, con intervalos de 4 semanas presentaron una disminución significativa de los eosinófilos versus el ingreso (2.4% a 0.4%), no así en durante la administración del placebo. Estos estudios sugieren que el recuento de eosinófilos es una herramienta eficaz para identificar subgrupos de pacientes con EPOC que responden mejor al tratamiento a largo plazo con corticoides inhalados. No obstante, es menester aclarar que los lineamientos de la *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* no menciona la técnica de examen de la celularidad del esputo entre las herramientas para el manejo de la EPOC³⁰.

Bronquitis eosinofílica sin asma

La bronquitis eosinofílica sin asma es una causa de tos crónica (12% de los casos) frecuentemente no diagnosticada. Una de las principales aplicaciones del análisis de la celularidad en esputo en pacientes con tos crónica es la identificación de esta entidad ya que una eosinofilia $> 3\%$ es uno de sus criterios diagnósticos³¹. Otra aplicación del examen de esputo es la orientación terapéutica. Si bien la ausencia de hiperreactividad bronquial cuestiona la indicación de corticoides inhalados la respuesta al tratamiento de la tos crónica causada por bronquitis eosinofílica parece depender de la presencia de eosinófilos en el esputo. Ello justifica la prescripción de corticoides que producen una mejoría clínica y disminuyen las cifras de eosinófilos³².

En un estudio sobre 86 pacientes con tos crónica³³ el análisis de esputo confirmó el diagnóstico de bronquitis eosinofílica en 13 (15%), todos ellos con función respiratoria normal y test de provocación bronquial negativo. En este grupo el recuento de eosinófilos y la concentración de ECP fueron significativamente más altos comparados con los individuos normales ($p < 0.01$). Después del tratamiento con corticoides la

tos remitió en todos los casos. En otro ensayo, en 11 pacientes se halló una asociación entre el tratamiento con budesonide por vía inhalatoria y una disminución de la eosinofilia en esputo de 12.8% a 2.9% (4.4 veces) con disminución de la puntuación de la tos en una escala analógica visual de 27.2.6.6 mm a 12.6.5.7 mm y de la sensibilidad de la tos mediante la medición de la concentración de capsaicina requerida para causar 5 toses que se duplicó 1.3 veces³⁴.

Discusión

El examen de la celularidad del esputo aporta información respecto de los mecanismos involucrados en la respuesta subóptima al tratamiento y posibilita la exclusión o identificación de la bronquitis eosinofílica (40% a 70% de los pacientes con asma, 30% EPOC y 15% a 30% tos crónica), neutrofílica o mixta.

Se ha comprobado en numerosas investigaciones la efectividad de basar las decisiones terapéuticas en el componente inflamatorio de la vía aérea mediante el recuento de células en esputo. En pacientes con asma esta estrategia disminuye las exacerbaciones^{18, 19}; mejora la función pulmonar aun en pacientes con asma grave^{9, 35, 36} y disminuye el remodelamiento³⁵; también en los individuos con EPOC disminuyen las exacerbaciones³⁷. Asimismo, este método permite orientar la terapéutica antibiótica y antiinflamatoria o ambas; siendo en todos los casos es una estrategia costo efectiva³⁸. Dos puntos fundamentales de las decisiones terapéuticas basadas en el recuento de células del esputo son la reevaluación del esputo 4-6 semanas después de cada modificación terapéutica y el añadido de agonistas beta 2 adrenérgicos de acción prolongada una vez que se ha controlado la bronquitis (Tabla 3)³⁹. Por otra parte es importante señalar que la inducción del esputo es un procedimiento validado y estandarizado, relativamente seguro, no invasivo, que permite la evaluación directa de la inflamación de las vías aéreas en los pacientes con dificultades para expectorar. Es una técnica económica aunque insume tiempo y requiere un cierto entrenamiento.

En cuanto a los otros parámetros (mediadores inflamatorios) la correcta interpretación de los resultados requiere que se hayan empleado pruebas validadas, confirmadas en investigaciones sólidas de los propios métodos. Estos obstáculos no deben llevar al desaliento, por el contrario la habilidad de medir con relativa facilidad y sensibilidad tales mediadores significa que está a nuestro alcance una herramienta poderosa que se puede aplicar en los ensayos clínicos y epidemiológicos, investigación de los efectos antiinflamatorios de medicamentos y ampliación de los conocimientos de la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias. Sería deseable que las personas accedieran con mayor facilidad a este tipo de exámenes

TABLA 3.— Pautas de tratamiento basadas en el recuento de células en esputo
(Modificada de Nair P, Hargreave FE. Chest 2010⁴⁰)

<p>Bronquitis eosinofílica</p> <ul style="list-style-type: none"> • > 3% - Aumentar la dosis de corticoides aun en pacientes asintomáticos • 2-3% o eosinófilos libres de gránulos - Aumentar la dosis de corticoides en pacientes con síntomas • 1-2% - No modificar la dosis • 0-1% - Considerar disminuir la dosis, evaluar el tratamiento de ahorro de prednisona
<p>Bronquitis neutrofílica</p> <ul style="list-style-type: none"> • RTC > 25 × 106/g, N > 80% - Antibióticoterapia • RTC > 10-25 × 106/g, N > 80% - Considerar antibióticoterapia • RTC < 10 × 106/g, o aislado N > 80% - No administrar antibióticos • RTC > 60 × 106/g, N > 80% - Bronquiectasias

que a una broncoscopia, y que su uso se extendiera a la población pediátrica.

Conflictos de interés: No existen conflictos financieros o personales que hayan influenciado en forma inapropiada este trabajo.

Bibliografía

- Hensler MM, Spivey CG Jr, Dees TM. Use of hypertonic aerosol in production of sputum for diagnosis of tuberculosis. Comparison with gastric specimens. *Dis Chest* 1961; 40: 639-42.
- Elliot RC, Reichel J. The efficacy of sputum specimens obtained by nebulizations versus gastric aspirates in the bacteriologic diagnosis of pulmonary tuberculosis. A comparative study. *Am Rev Respir Dis* 1963; 88: 223-7.
- Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, et al. On behalf of the American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma. Control and Exacerbations. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Asthma Control and Exacerbations. Standardizing Endpoints for Clinical Asthma Trials and Clinical Practice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 59-99.9.
- Crapo R., Jensen R., Hargreave F. Airway inflammation in COPD: physiological outcome measures and induced sputum. *Eur Respir J Suppl* 2003; 41:19s-28s.
- Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, et al. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 2002; 20: 3s-8s.
- Kiska DL, Bartholoma NY, Forbes BA. Acceptability of low-volume, induced sputum specimens for diagnosis of *Pneumocystis carinii pneumonia*. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 335-7.
- Pizzichini E., Leigh R., Djukanovic R., Sterk P. Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 2002; 20 9s-18s.
- Rytilä P., Lindqvist A., Laitinen A. Safety of sputum induction in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000; 15: 1116-9.
- Verkuijl S. Sputum Induction. Standard Operating Procedures for Health Care Workers. HIV care and treatment facilities. 2010. En: <http://www.columbia-icap.org>; consultado el 23/7/2011.
- Kelly MM, Keatings V, Leigh R, Peterson C, Shute J, Venge P, et al. Analysis of fluid-phase mediators. *Eur Respir J* 2002; 7: 4-39.
- Uribe Echevarría EM, Maldonado CA, Uribe Echavarría AM, Aoki A. Neutrophil predominance in induced sputum from asthmatic patients. Therapeutic implications and role of clara cell 16-KD protein. *Medicina (B Aires)* 2001; 71: 343-9.
- Hargreave FE, Parameswaran Nair. Point: Is measuring sputum eosinophils useful in the management of severe asthma? Yes. *Chest* 2011; 139: 1270-2.
- Turner MO, Hussack P, Sears MR, Dolovich J, Hargreave FE. Exacerbations of asthma without sputum eosinophilia. *Thorax* 1995; 50: 1057-61.
- Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 843-52.
- Aldridge RE, Hancox RJ, Cowant JO, Frampton CM, Town GI, Taylor DR. Eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum and blood: effects of budesonide and terbutaline treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89: 492-7.
- Dente FL, Bacci E, Bartoli ML, et al. Effects of oral prednisone on sputum eosinophils and cytokines in patients with severe refractory asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;104: 464-70.
- Nocker R, Out T, Weller F, Riemer M, Jansen H, van der Zee J. Induced sputum and bronchoalveolar lavage as tools for evaluating the effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 2000; 136: 39-49.
- Aizawa H, Iwanaga T, Inoue H, Takata S, Matsumoto K, Takahashi N, et al. Once-daily theophylline reduces serum eosinophil cationic protein and eosinophil levels in induced sputum of asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121: 123-8.
- Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomized controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 1715-1721.
- Giannini D, Di Franco A, Cianchetti S, Bacci E, Dente FL, Vagaggini B, ET al. Analysis of induced sputum before and after withdrawal of treatment with inhaled corticosteroids in asthmatic patients. *Clin Exp Allerg.* 2000; 30: 1777-1784.

21. Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 64-72
22. Volbeda F, Ten Hacken NH, Lodewijk ME, Dijkstra A, Hylkema MN, Broekema M, Timens W, Postma DS. Can AMP induce sputum eosinophils, even in subjects with complete asthma remission? *Respir Res* 2010; 11: 106.
23. Pallan Sh., Mahony J., O'Byrne P., Nair P. Asthma management by monitoring sputum neutrophil count. *Chest* 2008; 134: 628-630
24. Wark PA, Saltos N, Simpson J, et al. Induced sputum eosinophils and neutrophils and bronchiectasis severity in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur Respir J* 2000; 16: 1095-1101
25. Peters SP. Counterpoint: is measuring sputum eosinophils useful in the management of severe asthma? No, not for the vast majority of patients. *Chest* 2011, 139: 1273-5.
26. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas N. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respiratory Medicine* 2003; 97: 863-871
27. Confalonieri M, Mainardi E, Della Porta R, et al. Inhaled corticosteroids reduce neutrophilic bronchial inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1998; 53: 583-585.
28. Pizzichini E, Pizzichini MM, Gibson PG, et al. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1511-1517.
29. Brightling CD, Monteiro W, Ward R, et al. Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 2000; 357: 1480-1485.
30. Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD (GOLD Guidelines) Updated December 2011. En: <http://www.goldcopd.org/guidelines-global-strategy-for-diagnosis-management.html>, consultado el 10 de junio 2012.
31. Birring SS, Berry M, Brightling CE, Pavord ID. Eosinophilic bronchitis: clinical features, management and pathogenesis. *Am J Respir Med* 2003; 2:169-73.
32. Brightling, Ward R, Wardlaw A, Pavord I. Airway inflammation, airway responsiveness and cough before and after inhaled budesonide in patients with eosinophilic bronchitis. *Eur Respir J* 2000; 15: 682-686
33. Ma HM, Zhu LX, Lai KF, Zhu T, Sun BQ, Zhong NS. Clinical feature and airway inflammation in eosinophilic bronchitis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2003; 26: 362-5.
34. Brightling CE, Ward R, Woltmann G, et al. Induced sputum inflammatory mediator concentrations in eosinophilic bronchitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 878-882.
35. Chakir J., L. Loubaki, M. Laviolette, J. Milot, S. Biardel, L. Jayaram, M. Pizzichini, E. Pizzichini, F. E. Hargreave, P. Nair and L-P. Boulet. Monitoring sputum eosinophils in mucosal inflammation and remodelling: a pilot study. *Eur Respir J*, 2010, 35: 48-53
36. Castro M, and Gerard Cox On behalf of the AIR2 Trial Study Group Outcome Reporting in Asthma Research. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 132-133
37. Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med* 2009; 360:985-93.
38. Siva R. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. *Eur Respir J* 2007; 29: 906-913
39. D'silva L, Gafni A, Thabane L, et al. Cost analysis of monitoring asthma treatment using sputum cell counts. *Can Respir J* 2008; 15: 370-4.
40. Nair P, Hargreave FE. Measuring bronchitis in airway diseases: clinical implementation and application: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* 2010; 138(Suppl 2): 38S-43S.

*A qui prend la mer sans décider de son port de destination,
le vent n'est jamais favorable.*

Para quien emprenda viaje sin elegir un puerto de destino,
el viento nunca será favorable.

Michel de Montaigne (1533-1592)