

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Marcadores de inflamación en muestras de esputo inducido y sangre periférica, en una población infantil asmática de la clínica de asma del hospital de ginecopediatría del IMSS de Hermosillo Sonora.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Javier Arturo Salazar Salas

HERMOSILLO, SONORA.

SEPTIEMBRE DEL 2013

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Javier Arturo Salazar Salas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sean aceptados como requisitos para obtener el grado de Químico Biólogo Clínico.

M.C. Antonio Rascón Careaga
Presidente

M.C. Martha Judith Valdez Ortega
Secretaria

M.C. Moisés Navarro Navarro
Vocal

Q.B. María Teresa de Jesús Yocupicio Anaya
Suplente

CONTENIDO

FORMA DE APROBACION.....	2
LISTA DE TABLAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
OBJETIVOS.....	8
Objetivo General.....	8
Objetivos Específicos.....	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES.....	11
Inflamación de Vías Respiratorias en el Asma.....	12
Linfocitos T.....	13
Monocitos.....	15
Eosinófilos.....	18
Mediadores Involucrados en la Acumulación de Eosinófilos.....	19
Macrófagos.....	20
Neutrófilos.....	20
Epitelio Respiratorio en el Asma.....	21

Fisiopatología del Asma.....	22
Diagnóstico y Control del Asma.....	23
Espujo Inducido.....	26
Recuento Celular en Espujo Inducido.....	27
Marcadores de Inflamación en Espujo Inducido y Sangre.....	29
Proteína Catiónica del Eosinófilo.....	30
Otros Marcadores de Inflamación en Espujo Inducido y Sangre.....	32
 MATERIALES Y METODOS.....	 34
Población de Estudio y Criterios de Selección.....	34
Criterios de Inclusión.....	34
Criterios de Exclusión.....	35
Criterios de Eliminación.....	35
Inducción al Espujo y Procesamiento.....	35
Muestra sanguínea.....	36
Análisis de Espujo Inducido y Suero.....	36
Análisis Estadístico.....	36
 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	 37
 CONCLUSIONES.....	 43
 BIBLIOGRAFÍA.....	 44
 ANEXOS.....	 48

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación GINA del Asma.....	24
2	Mediciones en sangre y esputo al inicio del estudio.....	28
3	Principales Mediadores de Fase Liquida en Esputo.....	30
4	Principales Funciones de la ECP.....	31
5	Mediadores de Inflamación en Esputo Inducido.....	33
6	Mediciones en Suero y Esputo de Niños Asmáticos.....	37
7	Células Presentes en Esputo.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso Inflamatorio en el Asma.....	13
2	Polarización de Células T Vírgenes, hacia el Subconjunto Th2.....	14
3	Rol de los Mastocitos y sus Mediadores en la Patogénesis del Asma.....	17
4	Reclutamiento de Eosinófilos en el Asma.....	18
5	Exacerbaciones del Grupo Gestionado Mediante Esputo y BTS.....	29
6	Niveles de ECP en muestras de esputo inducido de sujetos asmáticos y controles sanos.....	32
7	Correlación Entre los Niveles de Histamina en Suero y Esputo.....	39
8	Correlación Entre Células Epiteliales y ECP en Expectoración.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

CD(4, 8,40) Clusters of differentiation, grupo de diferenciación

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: Células presentadoras de antígenos

ECP: Proteína catiónica del eosinófilo

FAP: Factor de activación plaquetario

GM-CSF: Factor estimulante de colonias-granulocito macrófago

ICAM-(1,2): Moléculas de adhesión intercelular

IFN: Interferón

IgE: Inmunoglobulina E

IL (1, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 25) Interleucinas

LBA: Lavado bronquialveolar

LT(A₄ ,B₄,C₄,D₄ , E₄): Leucotrienos

PG(D₂, E₂, G₂) Prostaglandinas

RANTES: Regulado a la activación, células T normales expresadas y secretadas

TNF: Factor de necrosis tumoral

TSLP: Linfopoyetina del estroma tímico

Tx: Tromboxanos

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1

VLA-4: Antígeno de activación tardada-4

¿

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la celularidad y marcadores de inflamación en muestras de esputo inducido y suero, en una población infantil con diagnóstico de asma alérgica.

Objetivos Específicos

- Evaluar los niveles de histamina, proteína catiónica del eosinófilo, triptasa e IL-5, tanto en suero como en esputo y su posible relación con el proceso inflamatorio característico del asma.
- Determinar la correlación entre los marcadores de inflamación y la citología en esputo.

RESUMEN

El asma es una enfermedad de gran importancia social, de evolución crónica y distribución universal. Existen varios intentos en definir el asma en términos de su impacto en la función pulmonar, tales como; limitación del flujo de aire, reversibilidad e hiperreactividad de las vías respiratorias. Globalmente se atribuyen al asma unas 250.000 muertes al año y su prevalencia en el mundo va en aumento. En México son frecuentes los errores en el diagnóstico del asma. En los últimos años se ha despertado un gran interés en la posibilidad de monitorear la severidad del asma y la respuesta al tratamiento antiinflamatorio, mediante técnicas no invasivas. Dos técnicas que han recibido cada vez más atención son el análisis de esputo inducido (EI) y la evaluación de marcadores en aire exhalado.

Debido al efecto de este padecimiento en la calidad de vida de los pacientes, desde el punto de vista del laboratorio clínico, es de suma importancia idear técnicas que guíen al clínico en el seguimiento de la enfermedad y a su posterior tratamiento. Por lo cual en el presente trabajo se estudiaron 103 casos de niños con diagnóstico de asma alérgica, a los cuales se les indujo al esputo y toma de muestra sanguínea, para la determinación de Histamina, Triptasa, IL-5 y Proteína Catiónica del Eosinófilo, utilizando las técnicas de ELISA y Fluoroinmunoensayo Enzimático, además se estudió la citología presente en muestras de esputo. Se realizó la determinación de los parámetros tanto en sangre como en esputo, para observar si existía una correlación significativa ($r= 0.75$) entre ellos.

Los niveles de ECP e histamina en suero, se encontraban incrementados en el 45.6% y 62.1% de las muestras analizadas respectivamente. Mientras que en esputo el 94.1% de los pacientes presentaron niveles de histamina mayor de lo normal, así como un incremento en los niveles de ECP en el 65.6%. Solo el 0.97% de los pacientes presentaron concentraciones elevadas de triptasa en muestras de suero y expectoración, al igual que los niveles de IL-5 en suero.

Si bien no se observó, una correlación significativa entre los diversos parámetros evaluados, el 100% de los pacientes presentó un incremento significativo en el porcentaje de eosinófilos y linfocitos. Lo que indica un proceso inflamatorio activo en vías respiratorias.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad uno de los problemas generados debido al avance y desarrollo de nuestra sociedad es la contaminación ambiental. Los contaminantes inhalables como polvos y sustancias químicas ambientales pueden desencadenar o agravar enfermedades de las vías respiratorias, entre las cuales el asma es una de las más importantes por su repercusión en la calidad de vida del paciente.

El asma es una enfermedad de gran importancia social, de evolución crónica y distribución universal. Existen varios intentos en definir el asma en términos de su impacto en la función pulmonar, tales como; limitación del flujo de aire, reversibilidad e hiperreactividad de las vías respiratorias. Sin embargo, estos intentos se han visto frustrados por la falta de comprensión de los mecanismos involucrados en el asma (NIH, 2002). Hoy en día el asma es considerada, una enfermedad crónica inflamatoria que se caracteriza por una inflamación preferentemente eosinofílica, hipersecreción de moco e hiperrespuesta bronquial, sus principales hallazgos distintivos son la inflamación y el remodelado de la pared bronquial, unido a la obstrucción reversible, parcial o total al flujo aéreo (Carrillo y col., 2006).

El costo global del asma excede el costo combinado del virus de la inmunodeficiencia humana y la tuberculosis, siendo en Europa de aproximadamente 17,7 billones de euros al año. El despliegue tecnológico acelerado está propulsando todos los campos de investigación biomédica lo cual ha facilitado avances importantes en el conocimiento de los mecanismos patogénicos del asma y ha dado lugar a avances en el manejo y control de la enfermedad. Sin embargo, el número de asmáticos continúa aumentando. Globalmente se atribuyen al asma unas 250.000 muertes al año. Aunque la distribución geográfica de los fallecimientos por asma muestra variaciones regionales en el mundo, factores como el tratamiento inadecuado, la pobreza y las limitaciones en la accesibilidad a servicios de salud apropiados explican solo parcialmente la mortalidad por asma (Ramos, 2007).

Esta enfermedad se presenta en cualquier sexo, edad o nivel socioeconómico. Afectando mayormente a infantes, sobre todo a los varones. Existe la creencia que el asma se cura espontáneamente en la adolescencia, un concepto erróneo, puesto que en dos tercios de los niños asmáticos la enfermedad persiste o reaparece en la edad adulta, periodo en que la razón entre sexos se invierte, haciéndose más frecuente en las mujeres (CMA, 2005).

Se estima que 300 millones de personas alrededor del mundo sufren de asma (Masoli y col.,2004). Se ha observado que la prevalencia de esta afección va en aumento, sin que se conozca la causa precisa, aunque se ha asociado con ello la conversión de zonas rurales en urbanas, las modificaciones en el medio ambiente intradomiciliario (construcciones, materiales sintéticos, poca ventilación, etc.) la mayor presencia de ácaros de polvo, así como factores socioeconómicos y hereditarios (Sienra y col., 1999). En México, según la información preliminar de la fase III del International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC), la prevalencia varía de 4.5 al 12 % con un promedio de 8%.(Barraza y col., 2001). Mientras que en Hermosillo, Sonora, Mendoza y col, encontraron una prevalencia del 9.5% en niños de ambos sexos con edad de 9.1 ± 1.8 (Mendoza y col., 2000).

ANTECEDENTES

El asma se clasifica según su presentación como extrínseca, intrínseca, inducida por ejercicio, ocupacional e inducida por aspirina.

Asma extrínseca, también llamada asma bronquial alérgica (ABA) mediada por inmunoglobulina E (IgE). Generalmente se caracteriza por tener ABA aquellos sujetos que experimentan predeciblemente síntomas después de ser expuestos a alérgenos específicos como pólenes vegetales, esporas de hongos, caspa de animales y polvos domésticos. El 90% de los niños asmáticos presentan este tipo de asma (Bochner y col., 1994).

Asma intrínseca. Aquí se encuentran individuos asmáticos por lo regular adultos, sin antecedentes de enfermedad atópica con reacciones negativas para las pruebas cutáneas y niveles normales de IgE séricas (Bochner y col., 1994). En este tipo de pacientes esta enfermedad suele ser desencadenada por infecciones, especialmente respiratorias virales o sinusitis. Además pueden llevar al desarrollo del asma intrínseca el estrés emocional, la contaminación del aire, el humo del tabaco y los extremos de calor, frío y humedad. En general tienen una mayor hiperreactividad y su enfermedad es más severa, incapacitante y progresiva.

Desde la primera descripción del asma intrínseca, se ha debatido sobre la relación de esta variante de la enfermedad con la atopia. Una sugerencia es que el asma intrínseca representa una forma de autoinmunidad desencadenada por alguna infección. Otros han

sugerido que las personas con asma intrínseca son simplemente sensibilizadas con un antígeno aun indetectable (Humbert y col., 1999). Si bien el asma intrínseca tiene un perfil clínico diferente al asma atópica, si presentan el mismo perfil inmunopatológico. Estudios de tejidos de las vías respiratorias de autopsias de sujetos con asma intrínseca, muestran un perfil de citocinas Th2 y células inflamatorias, al igual que en los asmáticos atópicos (Umibe y col., 2000).

Inflamación de Vías Respiratorias en el Asma

Como se señala en la definición del asma, la inflamación de la vía aérea implica la interacción de diversas células, mediadores y el epitelio respiratorio. Lo que resulta en los aspectos fisiopatológicos característicos de la enfermedad: inflamación bronquial y limitación del flujo aéreo que da lugar a episodios recurrentes de tos y sibilancias (Holgen, 2008; NAEPP, 2007).

El factor clave en la homeostasis inmunológica de las vías respiratorias depende de la capacidad del sistema inmune para discriminar entre antígenos intrínsecos inofensivos y los asociados a microorganismos patógenos. En infantes el asma es particularmente compleja ya que varios elementos del sistema inmunitario, como la presentación antigénica, la función de los linfocitos T y la producción de anticuerpos son inmaduros, lo que facilita las respuestas atópicas (Bacharie y col., 2008).

La respuesta asmática se divide: En inmediata (RI) y tardía (RT) la primera es de inicio rápido, se presenta minutos después de la exposición al desencadenante y alcanza su pico máximo a los 15 minutos, con una duración de 1 a 2 horas. Su característica principal es que depende del espasmo del musculo liso bronquial. La RT, inicia de 2 a 4 horas después del estímulo; su máxima acción se presenta entre 5 y 12 horas después, puede llegar a durar varios días. Los broncodilatadores tienen poco efecto, por lo que se considera que la broncoconstricción, en esta etapa no es tan importante como la inflamación.

Como se puede observar en la figura 1 los linfocitos T poseen un papel central en la inmunopatología del asma. Se han identificado dos tipos de linfocitos T CD4⁺ según el perfil de citocinas que produzcan: los linfocitos Th1 y Th2, este último subtipo está implicado en los mecanismos inmunitarios del asma, segregando numerosas citocinas, destacándose entre ellas

la (IL-4), causando el cambio de isotipo en las células B hacia la producción de IgE. La respuesta Th2 tiene como consecuencia el incremento en la producción de moco, edema de mucosa, obstrucción reversible de las vías aéreas, hiperrespuesta bronquial, restructuración tisular y síntomas clínicos de asma.

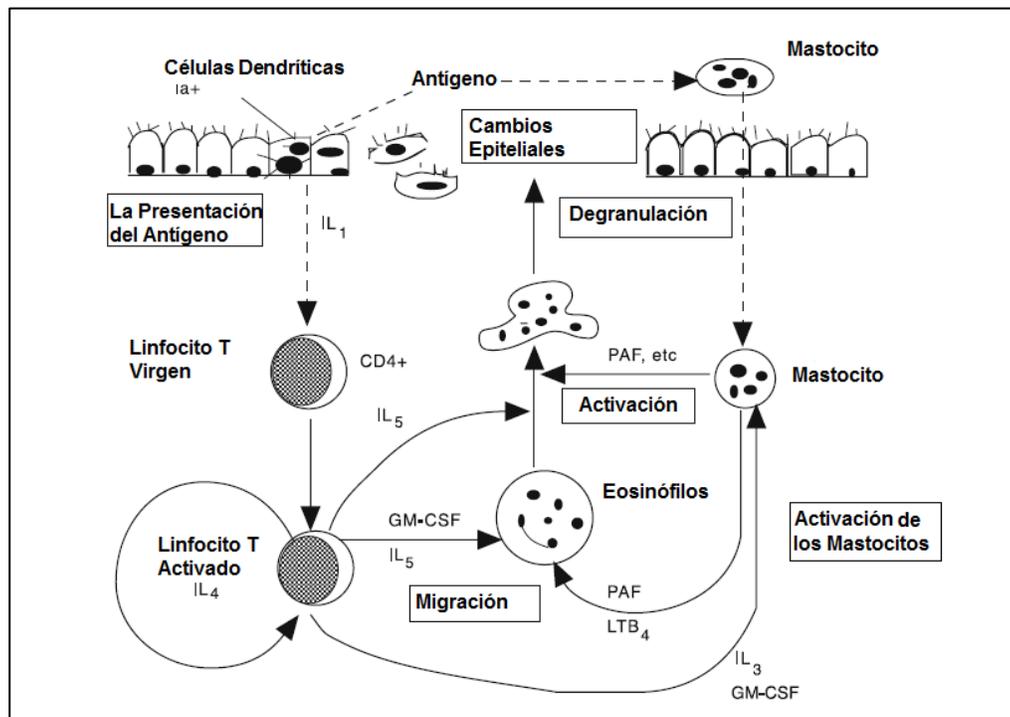


Figura 1. Proceso Inflamatorio en el Asma. Fuente: Cantani, 2008.

Linfocitos T

El componente central del asma alérgica es la producción de inmunoglobulina E (IgE). Los alérgenos inhalados son procesados por las células dendríticas y posteriormente presentados a

los linfocitos T CD4⁺ nativos, mediante el complejo principal de histocompatibilidad de clase II. Las células dendríticas controlan la naturaleza de la respuesta inmune mediante la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ nativos, en linfocitos cooperadores (Th por sus siglas en inglés) ya sea Th1 o Th2. La estimulación de un tipo de respuesta frente a la otra se basa en la naturaleza de los mediadores producidos por las células dendríticas, que a su vez, están influenciadas por productos del epitelio de las vías respiratorias entre los que se encuentran factor estimulante de colonias granulocitos y monocitos (GM-CSF), TSLP e IL-25.

Como se puede ver en la figura 2 la Linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), induce importantes cambios en las células dendríticas. La captación del antígeno y el efecto de la TSLP provocan la maduración de las células dendríticas (DC), así como su migración a los ganglios linfáticos del mediastino. Cuando las células dendríticas entran a los ganglios linfáticos, inducen la activación y polarización de los linfocitos Th nativos. Este proceso involucra la interacción entre las moléculas coestimuladoras OX40 (CD134) presentes en la membrana de los linfocitos T nativos y el ligando OX40L (CD134L) en las membranas de las células dendríticas. Dichas interacciones dan como resultado la liberación de IL-4 por parte de las células T, citocina que induce la polarización de células T al subgrupo Th2 (Buc y col., 2009).

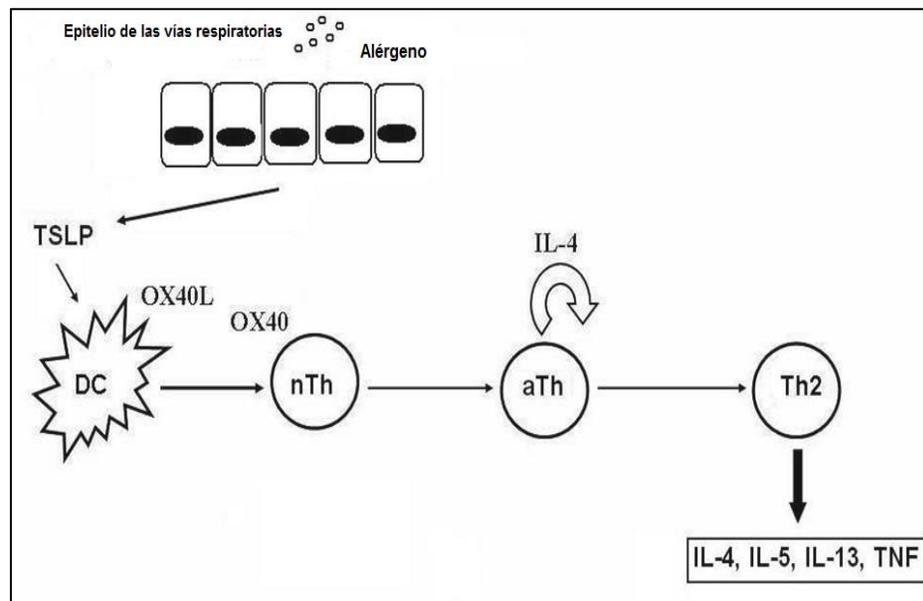


Figura 2. Polarización de Células T Vírgenes, hacia el Subconjunto Th2 Fuente: Buc y col., 2009.

Los linfocitos Th2 diferenciados estimulan el cambio en la síntesis de IgE, mediante la secreción de IL-4 e IL-13. Por otro lado la IL-13 tiene un claro papel en los cambios estructurales de las vías respiratorias como lo son la producción de moco y la proliferación celular en el musculo liso bronquial.

Otra citocina secretada por el subgrupo Th2 es la IL-5 que participa en la tanto en la diferenciación de los eosinófilos como en su supervivencia. De esta manera las citocinas secretadas por los linfocitos Th2 modulan las respuestas fisiológicas características del asma alérgica incluyendo la inflamación, hiperactividad y remodelación de las vías respiratorias.

Se ha postulado que las poblaciones Th1 y Th2 se equilibran entre sí, con la liberación de citocinas Th1 se suprime la diferenciación y proliferación de células Th2 y viceversa, sin embargo este modelo no es observado en el asma. Por lo cual el IFN- γ secretado por las células Th1 no suprimen las reacciones inflamatorias mediadas por Th2 en los modelos animales con asma, sino más bien causan inflamación neutrofílica grave, además de la inflamación eosinofílica impulsada por Th2. Ambas reacciones inflamatorias Th1 y Th2 son suprimidas por IL-10, sin embargo en individuos asmáticos existe un nivel bajo de IL-10.

Mastocitos

Como se puede observar en la figura 3 los mastocitos desempeñan un papel clave en el asma. Estas células se concentran en los tejidos de las mucosas y reclutados hacia la superficie de las vías respiratorias. Las células del músculo liso bronquial liberan IL-8 e IL-10, que participan en el reclutamiento de células cebadas mediante la interacción con sus respectivos receptores CXCR2 y CXCR3 (Buc y col., 2009). El entrecruzamiento entre IgE- Fc ϵ RI en la superficie de las células cebadas, conduce en pocos minutos a la llamada fase inicial de la reacción alérgica, la cual implica la desgranulación y liberación de mediadores preformados como; histamina, triptasa, heparina y algunas citoquinas, así como eicosanoides recién formados; leucotrieno C₄ (LTC₄) leucotrieno D₄ (LTD₄), leucotrieno E₄ (LTE₄), prostaglandina G₂ (PG₂) y tromboxano A₂ (TXA₂). Estos mediadores son potentes agentes contráctiles del musculo liso que además aumentan la permeabilidad micro vascular (Vestralen y col., 2008).

Los mastocitos infiltran el epitelio bronquial en el asma. Teniendo un importante rol en la patogénesis del asma por dos razones, en primer lugar estas células se sitúan en el portal de entrada de estímulos nocivos, proporcionándole una función efectora en la respuesta inmunológica (presentación de antígeno, diferenciación de células Th2 y síntesis de IgE). En segundo lugar es probable que la degranulación de mastocitos tenga efecto en la función epitelial. Ejemplo, La triptasa estimula el epitelio de las vías respiratorias para la liberación de IL-8 que regular positivamente la expresión de moléculas de adhesión (Bradding y col.,2006).

La histamina es una amina básica generada por los basófilos y mastocitos, su bajo peso molecular le permite difundirse muy rápidamente dentro de los tejidos. Este mediador se encuentra en grandes cantidades en fluidos de lavados bronquioalveolares (LBA) de asmáticos, sobre todo al cabo de minutos o incluso después de horas de llevada a cabo la provocación antigénica. (Bochner y col., 1994) La histamina actúa uniéndose a sus respectivos receptores (H_1 , H_2 , H_3) presentes en diversas células. Sus acciones son de corta duración, ya que los sistemas de transporte específicos de las aminas la eliminan con rapidez del medio extracelular. Este mediador induce vasodilatación, permeabilidad vascular y contracción de músculo liso a través de los receptores de histamina. Los antagonistas del receptor H_1 , por lo general bloquean los efectos de la histamina, sin embargo en el asma, los antihistamínicos no bloquean la reacción con la eficacia suficiente. Además se ha observado que la broncoconstricción que se observa en el asma es más prolongada que los efectos de la histamina, lo que indica la participación de otros mediadores.

El bloqueo de los receptores H_1 , tiene como resultado la disminución del factor nuclear κB , un factor de transcripción importante en la regulación de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión. También se ha observado que la histamina juega un papel importante en la migración, acumulación y activación de células inflamatorias como eosinófilos, neutrófilos y basófilos (Bakker y col., 2001).

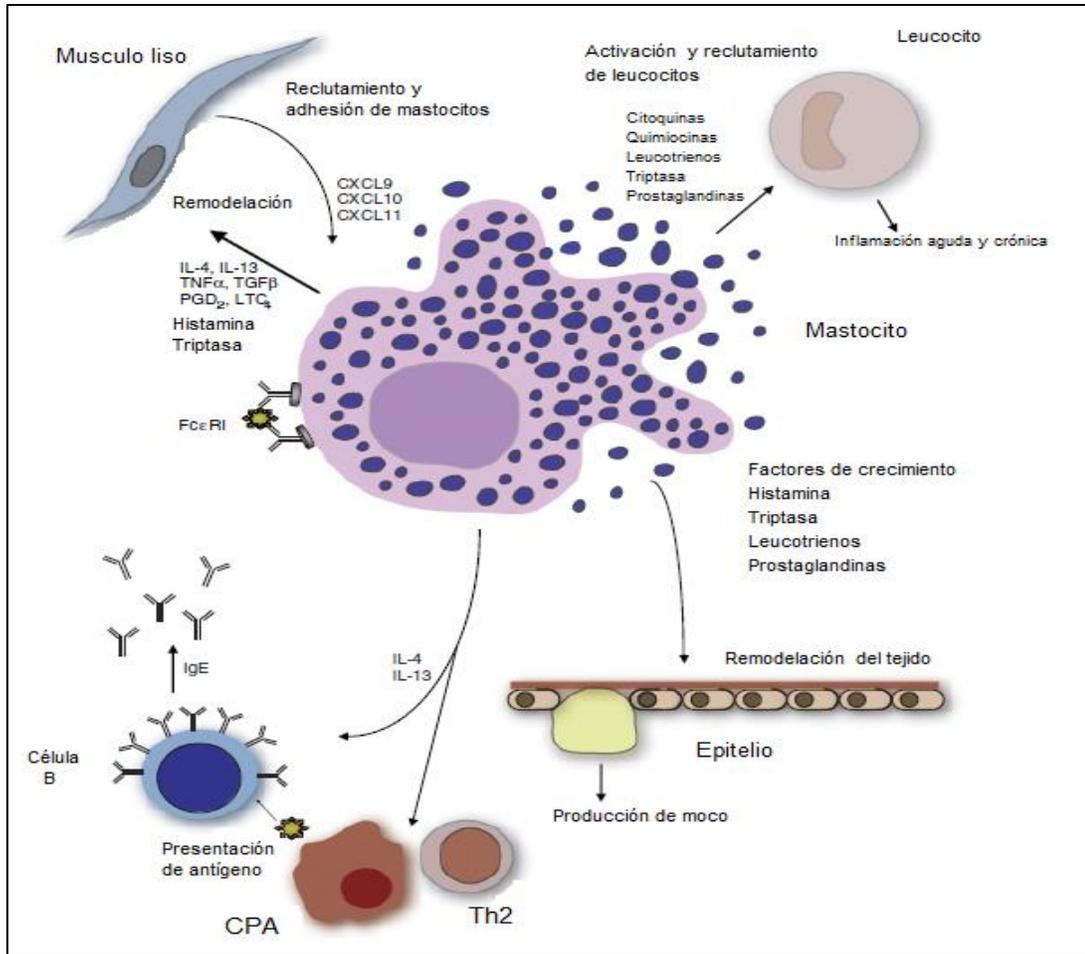


Figura 3. Rol de los Mastocitos y sus Mediadores en la Patogénesis del Asma. Fuente: Brown J y col., 2007.

Todos los mastocitos contienen triptasa, su síntesis no se ha detectado en ningún otro tipo de célula. Por lo tanto la presencia de triptasa en los líquidos biológicos humanos es un marcador de la activación de los mastocitos. Actualmente no se conocen efectos in vivo de esta enzima, sin embargo, varios estudios in vitro indican, que la triptasa es capaz de degradar el fibrinógeno y activar la colágenasa, causando lesiones hísticas. Diversos estudios han demostrado que la triptasa induce la liberación de histamina, por parte de los mastocitos.

Eosinófilos

Los eosinófilos son granulocitos circulantes producidos en médula ósea, representan del 1 al 3 % de leucocitos totales en el torrente sanguíneo. Como se observa en la figura 4, su desarrollo en médula ósea es estimulado por diversos factores como; GM-CSF, IL-5 e IL-3 los cuales favorecen tanto su desarrollo, maduración y reclutamiento al sitio de inflamación. Estas células tienen un rol primordial en la patogénesis del asma debido a la producción de diversos mediadores tóxicos y proinflamatorios, almacenados en gránulos. Estudios inmunohistoquímicos en células obtenidas mediante lavado bronquioalveolar (LBA) demuestra la movilización de eosinófilos 30 minutos después de la provocación antigénica.

La atracción de eosinófilos y su infiltración de los tejidos dependen de la quimiocina eotóxina (CCL11), que es sintetizada por las células endoteliales en los focos de reacción alérgica y se une al receptor de quimiocina CCR3, que se expresa constitutivamente en los eosinófilos. Por otro lado diversos mediadores liberados por los mastocitos como lo son el factor de activación plaquetaria (PAF), prostaglandinas y leucotrienos (LTC_4) actúan como quimiotácticos de eosinófilos, contribuyendo al proceso inflamatorio.

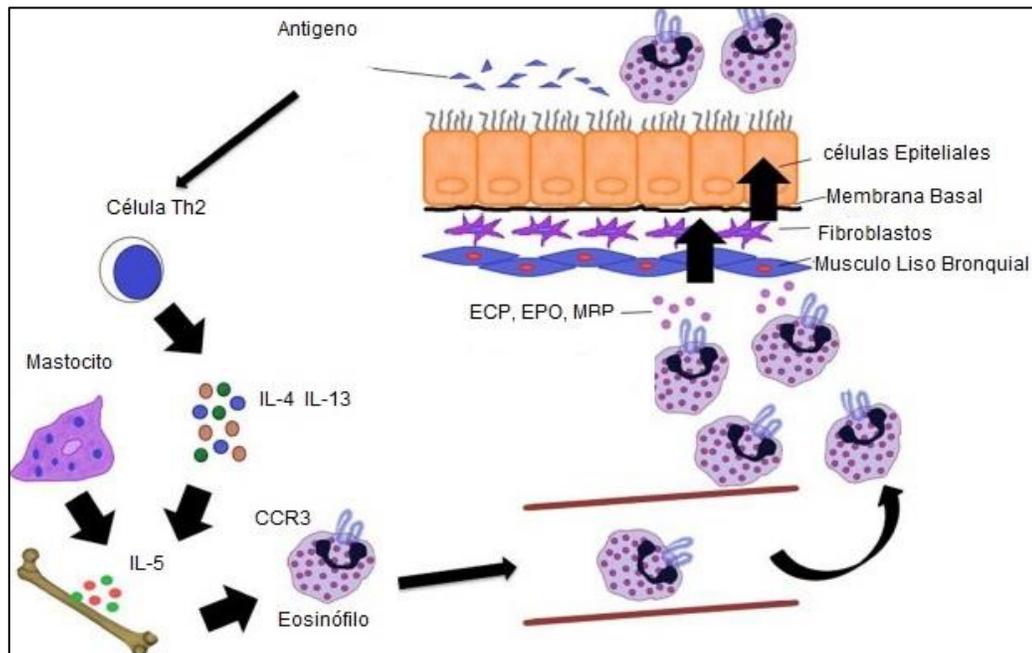


Figura 4. Reclutamiento de Eosinófilos en el Asma. Fuente: Possa y col., 2013.

Existen diversos mecanismos que permiten al eosinófilo modular la intensidad de la inflamación pulmonar. Mediante síntesis de citocinas, intermediarios de oxígeno (peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo), así como la producción de lípidos mediadores de inflamación, como lo son derivados de leucotrienos cisteinílicos (PGE₂ y PAF) y mediante la secreción de enzimas, como la elastasa, colagenasa y ribonucleasas que afectan la estructura pulmonar.

Los gránulos de los eosinófilos tienen hidrolasas lisosómicas similares a las de otros granulocitos y proteínas específicas de los eosinófilos que son especialmente tóxicas para los helmintos, como la proteína principal básica y proteína catiónica del eosinófilo. Estos dos polipéptidos catiónicos no tienen actividad enzimática conocida, pero son tóxicos para los helmintos, bacterias y el tejido normal. Además los gránulos de los eosinófilos contienen también peroxidasa del eosinófilo, que cataliza la síntesis de los ácidos hipocloroso e hipobromoso, productos que son igualmente tóxicos para helmintos y células huésped. Además poseen la capacidad de generar factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), contribuyendo a la proliferación y maduración de fibroblastos (Buc y col., 2009).

Mediadores involucrados en la acumulación de eosinófilos. Los mediadores lipídicos FAP y LTB₄ liberados de los mastocitos inducen la activación de eosinófilos y neutrófilos *in vitro* y acumulación *in vivo* en cobayos, pero no está claro aún el sitio de acción de estos quimioatrayentes (Norsharg, 1993).

La IL-1 no actúa directamente sobre estos leucocitos pero sí sobre las células endoteliales, a las cuales las vuelve adhesivas para este tipo de leucocito, se ha visto que el TNF tiene la misma función. Se ha demostrado en estudios *in vivo* con cobayos que la IL-1 está implicada en la acumulación de eosinófilos antígeno-inducida.

Las citocinas IL-3, IL-5 y GM-CSF promueve la estimulación de eosinófilos por diferenciación eosinofílica, aunque la IL-5 es quimiotáctica *in vitro* para eosinófilos, su función principal *in vivo* parece ser la estimulación de específica del desarrollo y diferenciación de eosinófilos en la médula ósea (Norsharg, 1993).

Por otra parte la citocina RANTES en conjunto con IL-5 y GM-CSF promueve la migración trasendotelial de eosinófilos pero no de neutrófilos *in vitro*; los eosinófilos de fluidos de LBA de

pacientes asmáticos después de 19 horas de la provocación endobronquial muestran una migración trasendotelial semejante a aquella observada después del tratamiento con RANTES, IL-5 o GM-CSF *in vitro*.

Macrófagos

La mayoría de los macrófagos activados derivan de monocitos circulantes. El macrófago alveolar es la principal célula fagocítica del espacio alveolar. Aunque estos se incrementan significativamente en los asmáticos su proliferación en las vías respiratorias es generalmente despreciable, lo que lleva a subestimar su contribución en la inflamación. Estas células se encuentran equipadas con moléculas de CMH de clase II siendo capaces de procesar y presentar antígenos a las células T CD4, sin embargo el macrófago alveolar tienen poco efecto como CPA (Buc y col., 2009).

Como células efectoras se encargan de la liquidación de microorganismos y de restos celulares, debido a que poseen la capacidad de migrar a los sitios de inflamación liberando diversos productos, como lípidos bioactivos, radicales libres de oxígeno y nitritos. Los macrófagos participan en la regulación de la inflamación mediante la liberación de ciertas interleucinas y factores de crecimiento. Así como en la activación de mastocitos y eosinófilos. Todos estos efectos estimulan la liberación de mediadores vaso activos capaces de provocar broncoconstricción y secreción de moco. Existe evidencia que indica que los macrófagos alveolares tienen el potencial de inhibir la afluencia de células inflamatorias en los pulmones mediante la liberación de factores que promueven la polarización a una respuesta Th1, como los son IFN- γ , IL-12, IL-18 (Vestralen y col., 2008).

Neutrófilos

Los neutrófilos son leucocitos polimorfonucleares, representan la primera línea de defensa contra las infecciones por bacterias y hongos. Hasta hace poco solo su papel en el proceso inflamatorio estaba restringido a su capacidad de fagocitosis, liberación de enzimas y agentes

citotóxicos. En la actualidad se sabe que estas células tienen la capacidad de liberar diversos mediadores que pueden tener efecto en las vías aéreas de los pacientes asmáticos. Entre los que se incluyen las metaloproteinasas, que destruyen la matriz extracelular, o los radicales de oxígeno tóxicos, que catalizan la producción de ácido hipocloroso. Los neutrófilos también son una fuente importante de TNF- α , IL-1, IL-6, e IL-8 (Carrillo y col., 2006).

Epitelio Respiratorio en el Asma

Anteriormente se pensaba que la función del epitelio respiratorio solo consistía en ser una barrera y un medio para la transferencia de gases, en la actualidad se le reconoce un rol importante en la respuesta inflamatoria. El epitelio respiratorio funciona como una interfaz entre el ambiente externo y el anfitrión, el cual está expuesto a numerosos estímulos; alérgenos, agentes infecciosos, contaminación y oxidantes. Esta primera línea de defensa del organismo es una parte integral de la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria, siendo capaz de producir numerosos mediadores que pueden activar diversos mecanismos del sistema inmune.

Diversos componentes microbianos, incluyendo ácidos nucleicos y glicoproteínas, pueden unirse a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo Toll (TLRs), y estimular la producción de citocinas y quimiocinas. Ciertos contaminantes y oxidantes pueden alterar la estructura y actividad de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, afectando las vías de señalización o incluso lesionar a las células. Algunos alérgenos se encuentran dotados de proteasas, activando la señal inmune, mediante los receptores activados por proteasas (PAR). Estos estímulos modulan la función de epitelio de las vías respiratorias, e induce la producción de mediadores con poder quimiotáctico de leucocitos, aumentando el desarrollo de una respuesta alérgica.

Cuando el epitelio de las vías respiratorias se encuentra dañado, existen mecanismos por los cuales es reparado. Sin embargo, el proceso de reparación en el asma se ve comprometido, resultando en la producción de una variedad de citocinas y factores de crecimiento. Como los son el factor de crecimiento epidérmico, GM-CSF, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) así como la movilización de distintas células del sistema inmune. Dando como resultado los cambios morfológicos en las vías respiratorias tan característicos del asma.

Fisiopatología del Asma

En estudios de tejidos de vías respiratorias de autopsias y caracterizaciones histológicas de pacientes que mueren por asma, se ha visto una extensa descamación del epitelio, hiperplasia de las células caliciformes y músculo liso, engrosamiento subepitelial con edema y acumulación abundante de moco, eosinófilos y proteínas derivadas de ellos, células mononucleares específicamente linfocitos dentro de la mucosa, submucosa y lumen de las vías generalmente obstruido (Bochner y col., 1994).

En la actualidad se cree que las manifestaciones clínicas del asma se deben al resultado de tres eventos fisiopatológicos básicos dentro de las vías respiratorias: obstrucción reversible, hiperreactividad bronquial e inflamación.

Los problemas básicos de la obstrucción del flujo y la hiperreactividad se deben probablemente a procesos patológicos coexistentes. El lumen de las vías respiratorias disminuye al engrosarse la pared del conducto respiratorio debido al edema, infiltración de leucocitos, contracción del músculo liso e hipertrofia. La producción aumentada o estimulada de moco de las células caliciformes de las vías respiratorias da como resultado la formación de tapones en los bronquios y la inhabilidad para su desalojo mucociliar; con todo esto al haber cambios pequeños en el diámetro del conducto resulta en un descenso marcado en el flujo del aire y un aumento de la resistencia de las vías respiratorias (Shimura y col., 1996).

El estrechamiento excesivo de las vías respiratorias es el evento fisiológico más relevante de esta enfermedad. Los mecanismos responsables de esta reactividad exagerada o “hiperreactividad” no se conocen, pero se han propuesto muchos mecanismos como son: consecuencias de la inflamación, infecciones virales, factores genéticos, ambientales o anomalías intrínsecas del músculo liso y de la función nerviosa autosómica (Solway y col., 1997).

La inflamación es una respuesta homeostática del cuerpo al haber un daño de tejido, esta respuesta pretende detener la destrucción del tejido, remover el organismo invasor si lo hay y restituir la función normal, vemos entonces que es una respuesta benéfica y normal. Pero puede haber condiciones alteradas donde la inflamación se vuelve crónica y causa daño. En el asma la inflamación puede deberse en parte a una consecuencia de la irritación crónica. En el tejido se puede ver la presencia continua de células inflamatorias como linfocitos, monocitos y

granulocitos, que liberan potentes enzimas destructivas y otros compuestos de acción farmacológica, recientemente se ha demostrado que células estructurales como fibroblastos, células epiteliales y endoteliales son capaces de liberar muchas de estas mismas citocinas y mediadores, que probablemente contribuyan a la respuesta de inflamación crónica.

Con este proceso de inflamación se da la alteración del equilibrio dinámico de fluidez de la microvasculatura bronquial, este equilibrio existe entre la presión hidrostática que empuja el fluido fuera del vaso capilar y la fuerza de oposición provocada por la presión osmótica coloidal de las proteínas plasmáticas; con la pérdida de este equilibrio se favorece el paso del plasma de las vénulas postcapilares y como el asma siempre va acompañada de inflamación se observa frecuentemente la exudación plasmática en las vías respiratorias, también se ha propuesto que contribuye directamente al proceso de la enfermedad; sugerido por el hecho de que algunas drogas efectivas contra el asma como corticosteroides, agonistas beta adrenérgicos, cromoglicato de sodio y metilxantinas son inhibidores muy efectivos de la exudación plasmática.

Diagnóstico y Control del Asma

En México son frecuentes los errores en el diagnóstico del asma. Existen muchos asmáticos no diagnosticados o con diagnóstico equivocado, esto suele ocurrir debido a que existen enfermedades que producen los mismos síntomas bronquiales característicos del asma, como bronquitis crónica, fibrosis quística, reflujo gastroesofágico y otras. El diagnóstico del asma es fácil cuando el paciente ha tenido episodios de síntomas importantes y frecuentes, pero en sujetos con síntomas esporádicos y leves puede ser menos obvio (Bacharier y col., 2007).

La espirometría es la prueba más efectiva para confirmar el diagnóstico de asma. Con ella es posible valorar objetivamente la función de las vías aéreas y el volumen pulmonar, mostrando el grado de obstrucción de los bronquios al medir el volumen de aire expulsado de bronquios y pulmones. También permite saber si aumenta la obstrucción ante un estímulo (hiperreactividad) o disminuye al aplicar un medicamento (reversibilidad). (CMA, 2005)

El asma es una enfermedad crónica, que puede controlarse pero no curarse. Su tratamiento puede compararse con el de otras enfermedades crónicas como la diabetes o hipertensión arterial, en las que aun cuando la glucemia o las mediciones de la tensión sean normales, el control médico, el tratamiento preventivo y medicamentoso deben mantenerse, por lo que su manejo es de por vida.

Como se puede ver en la tabla 1, el grado de control del asma, se relaciona con el paciente en tratamiento y lo clasifica en asma controlada, parcialmente controlada y no controlada. Los tres resultados se definen tomando en cuenta los síntomas diurnos, limitaciones de actividades, síntomas nocturnos o despertares, necesidad de uso de medicamentos de rescate, modificaciones en las pruebas de función pulmonar (PEF y VEF₁) y la existencia de exacerbaciones.

Tabla 1. Clasificación GINA del Asma

Clasificación	Síntomas Respiratorios	Función Pulmonar
Nivel 1 Asma intermitente	< Una vez por semana exacerbaciones breves y síntomas nocturnos <2 veces al mes.	FEV1 o PEF >80% de lo predicho
Nivel 2 Asma persistente leve	> Una vez por semana pero < una vez al día Las exacerbaciones pueden afectar el sueño	FEV1 o PEF >80% de lo predicho Variabilidad del 20 a 30%
Nivel 3 Asma persistente moderada	Diariamente Las exacerbaciones pueden afectar la actividad física y el sueño β2 agonista diario	FEV1 o PEF >60-80% de lo predicho Variabilidad del >30%
Nivel 4 Asma persistente severa	Diarios y Exacerbaciones frecuentes Síntomas nocturnos frecuentes Afectación del sueño y actividad física con uso de β2 agonista diario.	FEV1 o PEF <60% de lo predicho Variabilidad del >30%

FEV1 O PEF : Volumen Forzado en el 1° segundo o Pico de Flujo Espiratorio Fuente: Salas y col., 2009

En los últimos 15 años se ha visto un cambio dramático en el manejo del asma. Anteriormente la obstrucción del flujo aéreo era relacionada con espasmos del músculo liso de las vías respiratorias y era tratado con broncodilatadores, actualmente el asma es considerada una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias, controlada con el uso de medicamentos antiinflamatorios, principalmente corticosteroides inhalados. Por otro lado, el diagnóstico y manejo del asma todavía se basa en la historia clínica del paciente y en pruebas de función pulmonar que demuestran la variabilidad del flujo aéreo ya sea por tratamiento o espontáneo, sin evaluar aun el proceso inflamatorio característico de esta afección. Diversos estudios han demostrado, que al evaluar ciertos marcadores de inflamación presente en las vías respiratorias, es posible agrupar a pacientes con diferente grado de severidad y control, por otro lado monitorear la respuesta al tratamiento antiinflamatorio.

Técnicas como el lavado bronquial y biopsia bronquial han proporcionado información importante sobre el proceso inflamatorio presente en las vías respiratorias de los asmáticos. Datos de LBA de pacientes asmáticos sugieren un incremento en el número de eosinófilos, macrófagos, y monocitos en comparación con los controles sanos. Por otro lado el examen histológico de muestras de tejido bronquial, muestra la infiltración de una variedad de células inflamatorias pero principalmente eosinófilos. Si bien estas técnicas no solo ayudan a definir la población celular presentes en las vías respiratorias, sino también la presencia de mediadores inflamatorios y citoquinas, tienen la desventaja de ser métodos invasivos con efectos adversos y molestias para el paciente por lo tanto no son apropiados para observar la respuesta al tratamiento, son más bien utilizados para fines de investigación.

En los últimos años se ha despertado un gran interés en la posibilidad de monitorear la severidad del asma y la respuesta al tratamiento antiinflamatorio, mediante técnicas no invasivas. Dos técnicas que han recibido cada vez más atención son el análisis de esputo inducido (EI) y la evaluación de marcadores en aire exhalado. En 1992, Pin y col describieron un método para obtener especímenes de esputo, incluso en individuos que no presentaban expectoración de manera espontánea, basada en la inhalación de solución salina hipertónica. El esputo inducido es una muestra de secreción de origen bronquial, compuesto de células que se encuentran inmersas en un complejo de glicoproteínas, donde además se encuentran retenidas diversas sustancias. Esta técnica ha sido adoptada por varios centros de investigación, debido a que brinda un respaldo científico a las investigaciones empíricas de las enfermedades inflamatorias bronquiales entre ellas el asma.

En pacientes con asma difícil de controlar, el análisis del esputo inducido, representa una herramienta útil, para determinar la respuesta al tratamiento y seguir el curso de la enfermedad. La presencia de eosinófilos en muestras de esputo inducido, aun cuando existe un tratamiento con corticosteroides inhalados, sugiere la exposición a algún alérgeno ocupacional, la administración del corticosteroide inadecuado e incluso incumplimiento del tratamiento. Por otra parte la presencia de neutrófilos, es indicativo de un mal diagnóstico o resistencia a los corticosteroides. En cambio si el paciente ya está en tratamiento, estos hallazgos plantearían la posibilidad de reducir la dosis del medicamento o adicionar algún otro, como pudiera ser un agonistas β_2 de larga duración (Parameswaran y Hargreave, 2001). Los agonistas β_2 de larga duración, mejoran significativamente los síntomas y la función pulmonar, pero no reducen la eosinofilia en el esputo, e incluso pueden enmascararla. Sin embargo, cuando el paciente tiene un recuento celular normal y persisten los síntomas, los agonistas β_2 de larga duración ayudarían a controlar la enfermedad.

Espuito Inducido

Desde que se introdujo el análisis de esputo inducido en niños asmáticos en 1992, se han reportado más de 20 estudios que demuestran, el éxito y seguridad de esta técnica en niños asmáticos. El esputo puede ser inducido en niños, utilizando solución salina hipertónica, suministrada a través de un nebulizador ultrasónico (Pin y col.,1992). Se ha observado que la inhalación de solución salina hipertónica pudiera causar estrechamiento de las vías respiratorias, esto puede evitarse utilizando β_2 -agonista, antes de la inhalación de solución salina, sin alterar el número de células presentes en el esputo inducido (Cianchetti y col.,1999). La tasa de éxito en la inducción al esputo, en niños es de 68-100%. Diversos factores relacionados con el paciente, el método utilizado y la habilidad del técnico encargado de la recolección de la muestra, contribuyen al éxito de esta metodología (Gibson y col., 2000).

El esputo es una mezcla de secreciones del árbol traqueo-bronquial, saliva y solución salina hipertónica. La saliva es un contaminante que puede influir en la interpretación de los resultados. Esto puede ser minimizado, seleccionando la porción viscosa de la muestra, para su futuro análisis. Un componente importante en el análisis de las muestras, es el uso de

ditiotriterol (DTT), un agente reductor que ayuda disolver el moco, liberando así las células y mediadores presentes en este (Uribe y col., 2003).

En 1997 Efthimiadis y col, evaluaron el efecto del DTT en células y marcadores de inflamación (ECP, IL-5, IL-8 y fibrinógeno), presentes en especímenes de esputo inducido procedentes de 20 pacientes asmáticos. Las muestras tratadas con DTT presentaban menos células viables en comparación con las muestras tratadas con PBS (mediana 66 vs 74%, $P=0.003$). Por lo contrario, las células tratadas con DTT presentaron mayor número de células totales, y de niveles de ECP (mediana ECP 1340 vs 584 mg/L, $p < 0.001$). Mientras que no se observaron diferencias significativas entre los niveles de IL-5 e IL-8. Llegando a la conclusión que el DTT facilita la dispersión de las células atrapadas en el complejo de glicoproteínas que conforman el moco. Además que el tratamiento del esputo con DTT al 0.1% durante 15 minutos, seguido de PBS, no afecta negativamente el recuento de células o niveles de proteína catiónica del eosinófilos, fibrinógeno e IL-5.

Recuento Celular en Esputo inducido

En el 2003 Uribe y col, evaluaron el porcentaje de células en muestras de esputo inducido, de tres distintos grupos; asmáticos, fumadores y controles sanos, lograron demostrar la reproducibilidad y seguridad de la técnica del esputo inducido, en diferentes grupos de pacientes. Así como el predominio de eosinófilos en pacientes asmáticos en comparación a los voluntarios sanos y fumadores (10.6% vs. 0.37% y 1.25%, respectivamente $p < 0.0001$). Por otro lado en el 2004, Rytia y col, determinaron el porcentaje de células en esputo y sangre, de 60 niños asmáticos y 17 controles sanos, teniendo un éxito de inducción al esputo del 82%. Además, comparado con los controles, los pacientes asmáticos presentan un mayor número de eosinófilos tanto en sangre como en esputo, como lo podemos observar en la tabla 2. Así como la correlación entre la eosinofilia tanto en sangre como esputo y la hiperreactividad bronquial ($r = -0.42$, $P = 0.002$ en sangre, $r = -0.58$, $P = 0.002$ en esputo).

Tabla 2. Mediciones en sangre y esputo al inicio del estudio

	Niños asmáticos (n=60)	Niños sanos (n= 17)
Eosinófilos en sangre ($\times 10^9/l$)	0.26 (0.13-1.38)	0.18(0.03-0.36)
Esputo		
Linfocitos (%)	0.3 (0-2.5)	0.0(0-1.3)
Eosinófilos (%)	1.1 (0-39)	0.0 (0-0.4)
Neutrófilos (%)	19.2 (0-87)	26.0 (12-88)
Macrófagos (%)	73.6 (11-98)	72.3(12-86)
Células epiteliales (%)	0.0 (0-4.0)	0.3 (0-3.3)

Fuente: Rytia y col., 2004.

En 2006, Jayaram y col, publicaron un estudio en el cual durante dos años el tratamiento de 117 adultos asmáticos, fue administrado mediante dos estrategias; la estrategia clínica (EC) y la estrategia por esputo (EE). En el grupo dirigido mediante por la estrategia clínica el medicamento era administrado según los síntomas clínicos y parámetros tradicionales como espirometría e historial clínico, mientras que en el segundo grupo el tratamiento con corticosteroides era ajustado para mantener un porcentaje de eosinófilos menor a 2% en muestras de esputo inducido. Observaron que de 126 exacerbaciones asmáticas 79(62.7%) de ellas provenían de personas controladas mediante la EC y solo 47(37.3%) de ellas provenían de pacientes evaluados mediante EE. Otro hallazgo importante fue el tiempo que transcurría en ocurrir la primera exacerbación, el cual fue más largo en los pacientes tratados mediante EE (213 días). Concluyen que al monitorear el número de células presentes en esputo, influye en la calidad de vida de los pacientes con asma moderada a severa.

Por otro lado, en el 2002 Green y col, realizaron un estudio en donde se reclutaron 74 pacientes con asma moderada a severa, asignados aleatoriamente en dos grupos, el manejo y control del asma del primer grupo se llevó a cabo siguiendo los lineamientos de British Thoracic Society (BTS), mientras que el segundo grupo se basó en la reducción de eosinófilos presentes en muestras de esputo. Encontrando que el grupo gestionado mediante el recuento celular, presentaron significativamente menos exacerbaciones asmáticas, que los pacientes tratados

mediantes las directrices internacionales (35 vs 109), así como menos ingresos hospitalarios (1 vs 6 p=0.047), como se puede observar en la figura 5. Concluyendo que un tratamiento dirigido a la normalización en el número de eosinófilos en muestras de esputo, reduce las exacerbaciones asmáticas e ingresos hospitalarios.

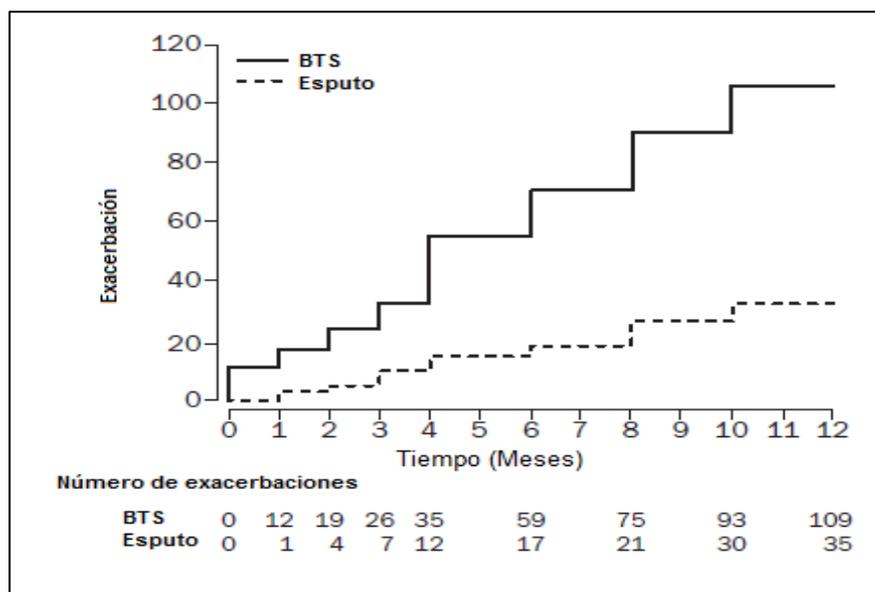


Figura 5. Exacerbaciones del Grupo Gestionado Mediante Esputo y BTS Fuente: Green y col., 2002.

Marcadores de Inflamación en Esputo Inducido y Sangre

En comparación con los controles o individuos sanos, los pacientes asmáticos muestran un incremento en el número de células presentes en muestras de esputo, principalmente eosinófilos, células metacromáticas y neutrófilos. Como se observa en la tabla 3, el sobrenadante del esputo puede ser procesado para medir marcadores moleculares que reflejan determinados aspectos de la inflamación de las vías respiratorias, incluyendo reclutamiento y activación de eosinófilos (ECP), activación de mastocitos (triptasa, histamina), producción de citocinas (IL-5) y permeabilidad microvascular (albumina, fibrinógeno) (Pavord y col., 1997).

Tabla 3. Principales Marcadores de Fase Liquida en el Esputo

Marcador	Expresa
EPC	Activación eosinofílica
EDN	Activación eosinofílica
MBP	Activación eosinofílica
Triptasa	Activación eosinofílica
Albumina	Permeabilidad Vascular
Fibrinógeno	Permeabilidad Vascular

Fuente: Pizzichini y col., 1996.

Proteína Catiónica del Eosinófilo

La ECP es una potente molécula citotóxica con capacidad de aniquilar diferentes poblaciones celulares, también le son atribuidas otras funciones asociadas a alteraciones en el funcionamiento de diferentes sistemas de órganos y numerosos tejidos en el organismo (Venge y col., 1999). Como se muestra en la tabla 4, la ECP presenta distintos efectos no citotóxicos in vitro, entre ellos puede incluirse la inhibición de la proliferación de la respuesta de células T frente a los antígenos, la interferencia con la síntesis de inmunoglobulinas por células B y la liberación de histaminas y triptasa por los mastocitos. Se ha observado que en células epiteliales, la ECP incrementa la expresión de varios receptores y ligandos como la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) (Yamaguchi K y col., 2004). Estas evidencias permiten afirmar que los eosinófilos pudieran ejercer un efecto inmunomodulador en el organismo a través de la secreción de ECP.

En progenitores eosinofílicos obtenidos a partir de médula ósea humana, la ECP se encuentra uniformemente distribuida en gránulos primarios grandes, redondos, caracterizándose por ser organelos densamente homogéneos (Venge y col., 1999). Existen diversos estímulos que inducen la secreción de ECP; el entrecruzamiento de eosinófilos con

IgE, proteínas de la cascada del complemento como C5a y C3a y PAF. Existe evidencia experimental que demuestra la acción reguladora de diferentes citocinas sobre la desgranulación eosinofílica tales como la IL-3, IL-5 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Lampinen y col., 1999) .

Tabla 4. Propiedades Funcionales de la ECP

EFFECTOS CITITOXICOS	EFFECTOS NO CITOTOXICOS
Aniquilamiento de parásitos y células tumorales	Inhibición de la proliferación de linfocitos T
Neurotoxicidad	Liberación de histamina por los basófilos
Daño respiratorio epitelial	Alteración de la producción de proteoglicanos por los fibroblastos
Actividad antibacteriana	Estimulación de la secreción de los mucus en las vías aéreas
Actividad antiviral	Inducción de moléculas de adhesión y factores de crecimiento en las células epiteliales

Fuente: Álvarez y col., 2005.

Los niveles de ECP han sido determinados en numerosas y diferentes condiciones patológicas, que refleja una marcada activación eosinofílica tales como el asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), conjuntivitis, enfermedades inflamatorias intestinales, rinitis alérgica entre otras. La determinación de ECP en suero, es mucho más consistente que en el plasma debido a que en el recipiente en donde se toma la muestra se sigue liberando extracelularmente la ECP (Álvarez y col., 2005). Al trabajar con el suero debe existir una estricta estandarización del procesamiento y manipulación de muestras sanguíneas para evitar variaciones de los niveles de ECP. Se recomienda que las muestras de sangre sean tomadas en tubos en presencia de un gel separador y que la coagulación sea llevada a cabo por espacio de una hora a 22 °C antes de la centrifugación y posterior separación del suero.

En el 2009 Louis y col, estudiaron la relación entre la inflamación de las vías respiratorias y la gravedad de la enfermedad, en 74 pacientes asmáticos, con distintos grados de control de la enfermedad y 22 sujetos control. Él fue analizado para el recuento total y diferencial de células así como la determinación de albumina, proteína catiónica de eosinófilo, mieloperoxidasa y triptasa, marcadores que reflejan la activación de eosinófilos, neutrófilos y mastocitos. Observando un incremento en el número de eosinófilos y concentraciones de ECP, en los distintos grados de control de asma en comparación con los sujetos normales, como se puede ver en la figura 6.

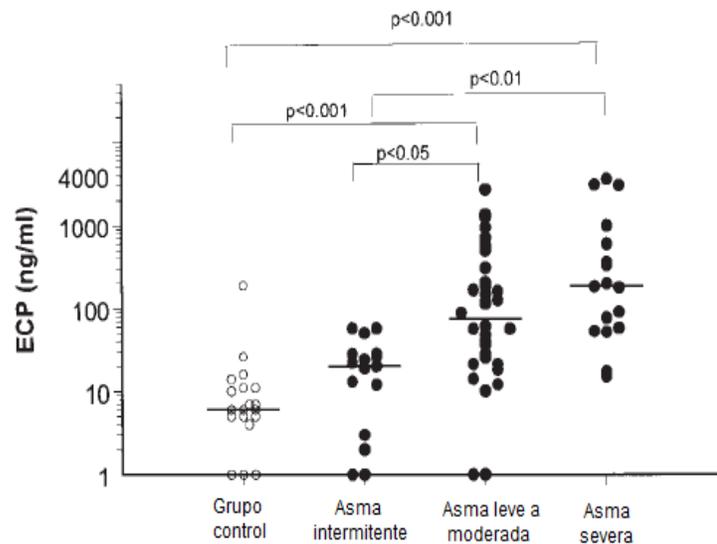


Figura 6. Niveles de ECP en muestras de esputo inducido, de sujetos asmáticos y controles sanos. Fuente: Louis y col., 2009.

Otros Marcadores de Inflamación en Esputo inducido y Sangre

Si bien la ECP es el marcador de inflamación más estudiado, existe la posibilidad de evaluar diversas biomoléculas implicadas en la patogénesis del asma. Como lo son la histamina, triptasa e IL-5. En 1999, Sulakvelidze y col., demostraron que la inhalación repetida de pequeñas dosis de alérgeno, causaba aumento de eosinófilos e IL-5, asociado con la

hiperreactividad de las vías respiratorias y deterioro en el control del asma. Por otro lado Louis y col., en el 2009, demostraron que en comparación con los sujetos sanos, las concentraciones de triptasa en muestras de esputo se encontraban significativamente elevadas solo en los pacientes con asma leve a moderada, ver tabla 5.

Tabla 5. Mediadores de Inflamación en Esputo Inducido

	Grupo control	Asmáticos			Valor de p †
		Intermitente	Leve a moderada	Severa	
ECP ng/ml	6 (0-187)	20 (0-57)	73 (0-2,640)	180 (17-3,500)	< 0.0001
Triptasa ng/ml	0 (0-6.7)	2.2 (0-8.7)	2.6 (0-100)	2 (0-18.5)	0.003
MPO ng/ml	305 (45-439)	215 (32-1,000)	195 (32-1,000)	500 (169-956)	0.4937
Albumina µg/ml	112 (22-187)	201 (19-576)	268 (15-2,639)	346 (26-1,438)	0.0006

Valores expresados en medianas

† Calculado por metodo Kruskal-Wallis

Fuente: Louis y col., 2009.

MATERIALES Y METODOS

Población de Estudio y Criterios de Selección

La selección de la población y la inducción al esputo se llevó a cabo en el Hospital de Ginecopediatría del Instituto mexicano del Seguro Social (IMSS) en Hermosillo Sonora, dentro del subproceso de atención denominado Clínica de Asma, donde son referidos los pacientes con este diagnóstico o se sospeche el mismo. Se realizó un listado exhaustivo de los escolares de 6 a 14 años con diagnóstico de asma, identificando aquellos que cumplían con los criterios de inclusión y de exclusión, se invitó a participar aquellos pacientes que deseaban colaborar voluntariamente en el estudio.

Los pacientes formaron parte del ensayo clínico "Terapia homeopática complementaria con TRAMEEL S[®]", en el cual cada paciente fue expuesto al tratamiento con TRAMEEL S[®] o placebo durante un periodo de tres meses y cuatro veces por semana independientemente de la terapia convencional la cual se modificó de acuerdo a los criterios establecidos por GINA en la revisión del 2006 y definidos en base al control de la enfermedad. Sin embargo en este trabajo solo se evaluaron los parámetros de inflamación presentes en muestras de esputo inducido y suero de 103 pacientes antes de recibir el tratamiento asignado.

Criterios de Inclusión

Escolares 6 a 14 años de edad, de ambos sexos y con diagnóstico de asma bronquial, poco o nada controlada. Antecedentes familiares positivos de atopía, Historia clínica de episodios de sibilancias en forma recurrente, antecedentes de estancia en urgencias o en hospitalización por este motivo y que manifiesten síntomas diurnos, nocturnos y relacionados al ejercicio y utilización de β_2 adrenérgicos, esteroides inhalados, modificadores de leucotrienos. Pruebas de fisiología pulmonar, relacionadas a la resistencia de la vía aérea compatibles con patrón

obstructivo reversible, utilizando espirómetro que cumpla con lo establecido por la sociedad americana de tórax y las de la Comunidad Económica Europea.

Pruebas clínicas de laboratorio que sugieran el origen alérgico de la enfermedad, como son conteo celular en moco nasal, sangre periférica, determinación de IgE hacia alérgenos aéreos comunes para diferenciar al paciente alérgico de no alérgico, examen general de orina, coproparascitoscópicos, rayos “x” y senos paranasales.

Criterios de Exclusión

Escolares de 6 a 14 años de edad con diagnóstico de asma de origen no alérgica o bien asma alérgica controlada completamente por un periodo de más de 3 meses, asma intermitente sin tratamiento, tabaquismo activo o pasivo positivos y con cualquier otro padecimiento crónico de tipo congénito o adquirido que sea capaz modificar la historia natural de la enfermedad, incapacidad para realizar las pruebas de función pulmonar o la obtención de esputo inducido.

Criterios de Eliminación

Abandono del tratamiento, cambio de domicilio a otra ciudad, deseo de salir del estudio. Uso de otras terapéuticas no consideradas por la GINA o terapia homeopática, reacciones adversas a la terapia convencional, muestra de esputo inadecuada (< 1ml).

Inducción al Esputo y Procesamiento

Se llevó a cabo, la inducción de esputo mediante el método descrito por Pin y cols., en 1992, y modificado por Pizzichini y col., en 1996, en escolares de ambos sexos, de entre 6 a 14 años de edad y con diagnóstico de asma. Los pacientes recibieron tratamiento previo con 200 µg de Salbutamol antes de comenzar con la inhalación de solución salina. En seguida se sometió a inhalaciones progresivas de solución salina, con concentraciones del 3%, 4% y 5% durante 7 minutos cada una, por un máximo de 21 minutos mediante un nebulizador electrónico. Después

de cada inhalación los sujetos fueron instruidos para soplar con fuerza por la nariz, enjuagarse la boca y deglutir el agua para disminuir el goteo posnasal y la contaminación por células escamosas, posteriormente se intentó la expectoración en un contenedor estéril.

El moco obtenido de esta manera fue separado de la saliva usando una cucharilla y posteriormente mediamos su volumen y agregábamos un volumen igual de ditiotriterol (sputolysin; Calbiochem Corp; la Jolla Cal, USA), dicha mezcla era agitada durante 15 minutos. La reacción era detenida por la adición de un volumen igual de solución salina amortiguadora de fosfato de Dubbeco (D-PBS) 1 x (Invitrogen, Burlington; Ontario; Canadá). La suspensión celular fue centrifugada a 800 g durante 4 minutos, se separó el sobrenadante y fue congelado a -80° C para su futuro análisis. El sedimento se utilizó para elaborar frotis (slides), los cuales fueron teñidos con tinción de Wright-Giemsa y eosina, para la cuenta de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfocitos y basófilos.

Muestra sanguínea

Además de la muestra de esputo a cada paciente se le extrajo una muestra de sangre por venopunción, utilizando del sistema Vacutainer[®], los especímenes fueron recolectados en tubos con separador de suero de la marca Vacutainer[®] SST[™].

Análisis de Esputo Inducido y Suero

Comprende la determinación de varios marcadores de inflamación: celularidad, ECP, Triptasa e histamina. El equipo que se utilizó para determinar triptasa y proteína catiónica del eosinófilo tanto en suero como en esputo fue: immunoCAP 100 Número de serie: 60-0002-00. Las concentraciones de histamina e IL-5, se determinaron mediante la técnica de ELISA de la casa comercial ALPCO.

Análisis estadístico

Se calculó la mediana de los datos obtenidos, para compararlos con los valores de referencia proporcionados por el fabricante. Además los datos obtenidos tanto en suero como en esputo

fueron correlacionados mediante la prueba de Spearman, utilizando el software Stata 11.1® Statistics Data Analysis. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La inducción al esputo fue exitosa en el 100% de los casos, sin embargo solo se obtuvieron 102 muestras aceptables para su análisis, de los 103 pacientes incluidos en este estudio. Los resultados obtenidos son expresados en medianas y rango intercuartílico.

En comparación con los valores de referencia se observó, que tanto en sangre como en esputo, los niveles de ECP e histamina en suero, se encontraban incrementados en el 45.6% y 62.1% de las muestras analizadas respectivamente. Mientras que en esputo el 94.1% de los pacientes presentaban niveles elevados de histamina, así como un incremento en los niveles de ECP en el 65.6% de las muestras.

Tabla 6. Mediciones en Suero y Esputo

Marcadores	Datos obtenidos	Valores de referencia	Mínimo	Máximo
Valores en suero				
ECP	16.05 (9.2,25-5)	0.0-18 µg/L	3.27	188
Triptasa	3.4 (2.0, 4.7)	0.0-11.4 µg/L	.05	19.8
IL-5	1.0 (0.43,1.2)	0.00- 5.0 ng/mL	.01	32.39
Histamina	2.1(0.74,7.9)	0.0-1.40 ng/mL	0	48
Valores en esputo				
ECP	128 (45.7, 220)	7.1-70.0 µg/L	4.9	250
Triptasa	0.79 (0.6, 0.9)	0.0-11.4 µg/L	.3	8.57
IL-5	1.0 (0.3,1.3)	Valor bajo escrutinio	0.1	13.65
Histamina	10.1 (3.0,17.6)	0.0-0.67 ng/mL	0	51.45

Solo el 0.97% de los pacientes presentaron concentraciones elevadas de triptasa en muestras de suero y expectoración, al igual que los niveles de IL-5 en suero.

En comparación con los valores de reportados por Rytä y col, en el 2004. En nuestro estudio el 100% de los pacientes presentaron un incremento significativo en el porcentaje de eosinófilos y linfocitos. Mientras el 87% de las muestras, presentaron gran cantidad de células epiteliales.

Tabla 7. Células Presentes en Espudo

	Niños asmáticos (n=102)
Células epiteliales (células / μ L)	8.0(4.9,12.3)
Leucocitos totales (células / μ L)	517.5(285.0, 1162.5)
Linfocitos (%)	20.0(13.0, 30)
Eosinófilos (%)	8.0 (4.0,16)
Neutrófilos (%)	50(38.0, 63)
Macrófagos (%)	11.5(8.0,18.0)
Basófilos (%)	1.0 (1.0, 2.0)

Se buscó la correlación entre los distintos parámetros, mediante la prueba de Spearman, observándose que los niveles de histamina tanto en sangre como en esputo, presentaban una correlación significativa ($p < 0.0002$, $r = -0.36$), al igual que el número de células epiteliales con los niveles de ECP en esputo ($p < 0.0005$, $r = -0.34$).

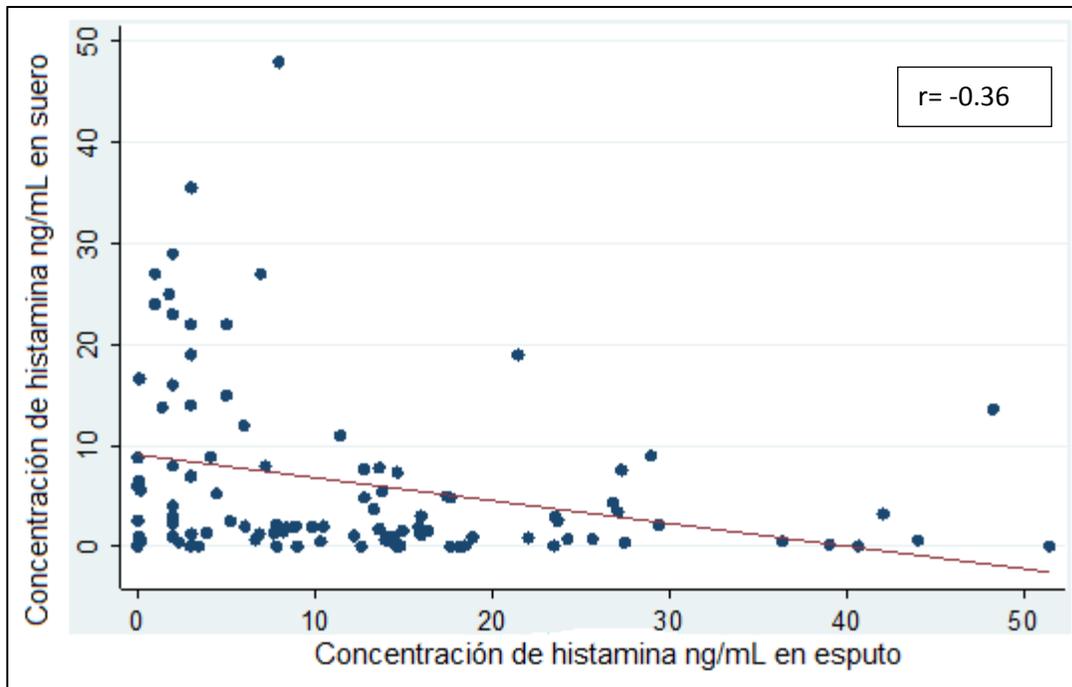


Figura 7. Correlación Entre los Niveles de Histamina en Suero y Esputo

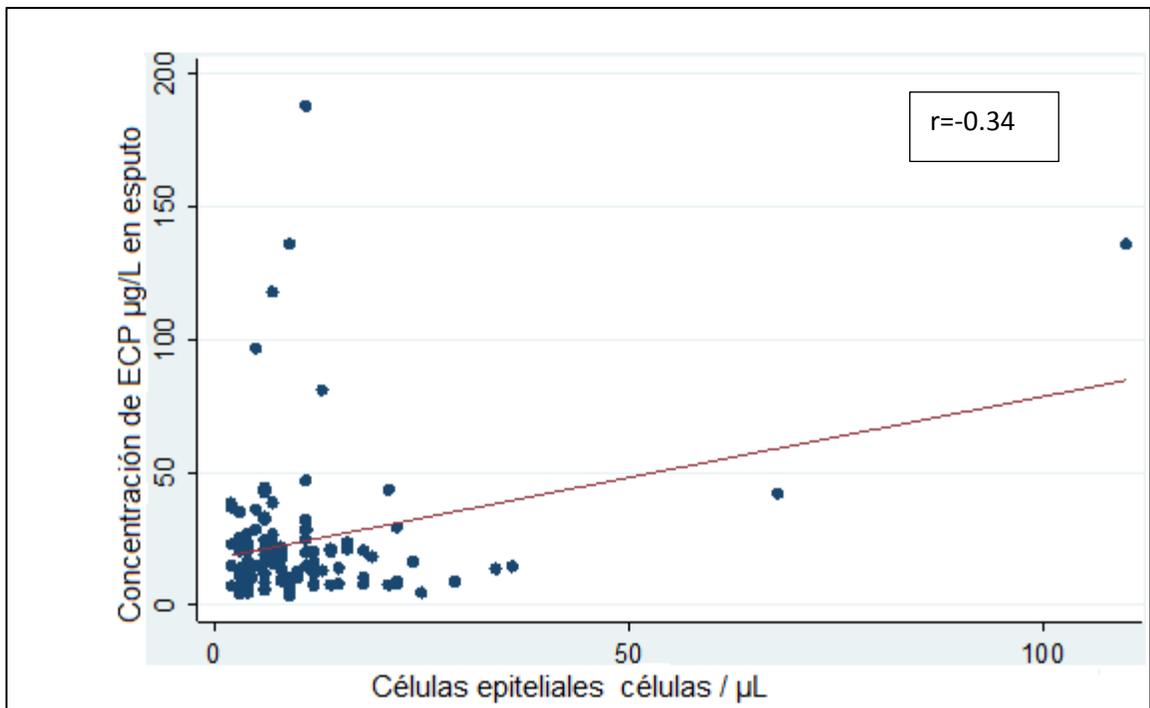


Figura 8. Correlación Entre Células Epiteliales y ECP en Expectoración

Discusiones

El esputo inducido es una técnica reproducible y válida para el estudio de la inflamación en vías aéreas, ofrece ventaja de ser poco invasiva, de modo que se puede utilizar en niños, pacientes graves o descompensados. En el presente estudio se logró inducir la expectoración 103 infantes de entre los 6 a 14 años de edad, con asma poco o nada controlada, mediante la técnica de esputo inducido, reportada por Pin y col en 1992. No obstante se descartó una muestra debido a la poca cantidad de moco que presentaba (< 1mL). Comparando diversos estudios se ha observado que la tasa de éxito de inducción al esputo en niños es, de 68-100% y que diversos factores relacionados con el paciente, la metodología utilizada y habilidad del técnico encargado de la recolección de la muestra, contribuyen al éxito de esta metodología. (Gibson y col., 2000)

Si bien los mecanismos de producción de esputo después del desafío con solución salina hipertónica aún no están establecidos, se ha observado reducción en la viscosidad del moco traqueobronquial, incremento en aclaramiento mucociliar, incremento en la producción de moco o aumento en el volumen en las secreciones de las vías respiratorias, lo que al parecer mejoraría la producción de esputo. (Umeno y col., 1990)

En nuestro estudio se identificó un número anormal de células presentes en esputo. Mostrando en particular un aumento de eosinófilos, linfocitos y células epiteliales. La presencia de estas células, refleja en si un proceso inflamatorio que ocurre en las vías respiratorias, ligado a la patogénesis del asma y los síntomas clínicos de ésta.

Al igual que otros estudios, (Pin y col., 1992; Pizzichini y col., 1996; Gibson y col., 2000) observamos un marcado incremento en el porcentaje de eosinófilos, en comparación con los valores normales reportados. La eosinofilia en esputo puede indicar al clínico de un asma poco o nada controlada, incumplimiento del tratamiento asignado, o la exposición a un alérgeno ocupacional. (Gibson y col., 2000) La evaluación del porcentaje de eosinófilos presentes en muestras de esputo inducido discrimina de mejor manera entre personas sanas y asmáticas, que la determinación de eosinófilos en sangre periférica. Estas observaciones tienen implicaciones en la identificación y seguimiento de la inflamación de las vías respiratorias. (Pizzichini y col., 1996)

Diversos estudios han observado que la terapia guiada por el monitoreo del porcentaje de eosinófilos en muestras de esputo inducido, reduce el riesgo de exacerbaciones en un 49%, así como un periodo más prolongado entre una exacerbación y otra. Estos beneficios se han observado en pacientes con asma moderada a severa. (Jayaram y col., 2006) Por lo cual los resultados de esta investigación pueden ser utilizados, para gestionar de una mejor manera el tratamiento farmacológico.

Además de la inflamación eosinofílica, la proporción de células epiteliales en esputo de niños asmático, fue mayor que lo reportado como valor normal. En el asma la pérdida del epitelio se produce cuando se rompen las conexiones entre las células basales y columnares. Lo cual puede ser inducido por las proteínas presentes en los gránulos de los eosinófilos. (Montefort y col., 1992)

En el presente estudio, se evaluaron diversas moléculas relacionadas con la inmunopatogénesis del asma, entre ellas se encuentran; Histamina, Triptasa, IL-5 y la proteína catiónica del eosinófilo. La gran mayoría de las muestras de suero y esputo, mostraron un incremento significativo en los niveles de ECP e histamina. Se sabe que la ECP tiene diversos efectos que contribuyen a la gravedad de la enfermedad, como la activación de fibroblastos, afectando la integridad del epitelio respiratorio. (Cantani, 2008)

La evaluación de eosinófilos y marcadores de activación como ECP, es relevante debido a que están involucrados en la patogénesis del asma. Se sabe bien que los eosinófilos se derivan de médula ósea y son transportados al sitio de inflamación, en el caso del asma la pared bronquial. Por lo cual no es de sorprenderse que los niveles de EPC en suero sean indicadores débiles y menos específicos de los eventos inflamatorios que suceden en las vías respiratorias. (Pizzichini y col., 1996)

Se ha propuesto que los niveles de ECP en suero y esputo pueden ser utilizados, para evaluar la respuesta del tratamiento en niños asmáticos. En 1997 Sorva y col., observaron que los niveles de ECP en expectoración disminuían con la administración del medicamento, mientras que los niveles en suero permanecían iguales. Los niveles de ECP son capaces de discriminar entre los distintos grados de severidad y control de la enfermedad (Louis y col., 2009).

En este estudio, el 94.1% de las muestras de esputo presentaban niveles de histamina fuera de lo normal. Si bien la histamina está implicada con broncoespasmos y otros síntomas

clínicos en el asma, hasta la fecha no existen estudios que demuestren su importancia como biomarcador para la respuesta al tratamiento o seguimiento de la enfermedad.

Todos los mastocitos contienen triptasa, que sin embargo, esta no se encuentra en ningún otro tipo de célula. Por lo tanto la presencia de triptasa en los líquidos biológicos humanos es un marcador de la activación de los mastocitos. En este estudio no se encontraron alteraciones significativas en los niveles de triptasa en muestras de esputo y suero.

La triptasa solo fue detectada en 18% de las muestras sin presentar un valor clínico significativo, al igual que el estudio realizado en el 2000 por Alvares y col., en el cual la triptasa solo se encontró en el 24% de las muestras analizadas. Por otro lado se observó que en comparación con los controles sanos, las concentraciones de triptasa en esputo, se entraban significativamente elevadas solo personas con asma leve a moderada (Louis y col., 2009).

Se ha encontrado que los niveles de IL-5 se encuentran elevados en las vías respiratorias de personas asmáticas, esta citocina juega un papel importante en la movilización, diferenciación y mantenimiento de eosinófilos. En el 2000, Shaid El-Radhi y col, detectaron IL-5 en el suero de 20 niños asmáticos, pero no en los controles sanos. Además observaron una significativa reducción en los niveles de IL-5 en respuesta al tratamiento con Prednisolona. No obstante en nuestros resultados solo el 0.97% presentaban alteraciones en los niveles de IL-5.

Un punto importante en nuestro estudio, fue determinar la correlación entre los distintos marcadores de inflamación, para observar si había una correlación significativa entre los parámetros medidos en suero y esputo. Si existiera una correlación entre los marcadores utilizados, la respuesta del tratamiento pudiera observarse utilizando tanto muestras de esputo como suero.

1996 Pizzichini y col., demostraron una fuerte correlación entre eosinófilos y ECP en muestras de esputo de adultos asmáticos. Sin embargo en este estudio no se observó correlación entre los niveles de ECP tanto en suero como en esputo y los eosinófilos en esputo..

Hasta la fecha no existe evidencia de la correlación entre los niveles de histamina, triptasa e IL-5, en muestras de suero y esputo. En este estudio solo se observó una correlación significativa para los niveles de histamina. Si bien la histamina tiene implicaciones en la patogénesis del asma, hasta la fecha no existen estudios que indiquen su utilidad como marcador a la respuesta del tratamiento. Otra de las correlaciones más significativas observadas en nuestra investigación fue la encontrada entre los niveles de ECP y células

epiteliales en expectoración. Algo similar observado por Gibson y col, en el 2003, lo cual indica el daño permanente que sucede en las vías respiratorias de los pacientes asmáticos.

CONCLUSIONES

Se analizaron 102 muestras de esputo, determinando los niveles de histamina, triptasa, ECP e IL-5, así como el porcentaje de células en cada uno de los especímenes, por otro lado se logró analizar 103 muestras de suero de los mismos sujetos a estudio, determinando los mismos marcadores de inflamación que en esputo. Observamos que los pacientes presentaban niveles elevados de histamina (esputo 94.1%; suero 62.1%) en comparación con los valores de referencia, al igual que los niveles de ECP (esputo 45.6%; suero 65.6 %). Por otro lado en la gran mayoría de las muestras de esputo se observaba una prevalencia significativa de eosinófilos, linfocitos y células epiteliales.

Si bien en este estudio no se obtuvo alguna correlación entre los niveles de ECP y la eosinofilia en esputo, la literatura sugiere lo contrario.

BIBLIOGRAFÍA

- Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Helms PJ, Hunt J, Liu A, Papadopoulos N, Platts-Mills T, Pohunek P, Simons F, Valovirta E, Wahn U, Wildhaber J. 2008. Diagnóstico y tratamiento del asma en los niños y adolescentes: informe del consenso del PRACTALL. Official journal of the European academy of allergology and clinical immunology, (63):5-34.
- Bakker R, Schoonus S, Smit M, Timmerman H, Leurs R. 2001. Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. Mol Pharmacol, 60:1133–42.
- Barnes P. 2008. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nature reviews immunology, (8):183-192.
- Barrios R, Kheradmand F, Batts L, Corry D. 2005. Asthma: pathology and pathophysiology. Archives of pathology & laboratory medicine, (130):447-451.
- Belda J. 2001. El esputo inducido como procedimiento diagnóstico y de seguimiento en enfermedades respiratorias. Archivos de Bronconeumología, (37):271-273.
- Bradding P, Walls A, Holgate S. 2006. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. The journal of allergy and clinical immunology, 117:1277-84.
- Buc M, Dzurilla M, Vrlik M, Bucova M. 2009. Immunopathogenesis of bronchial asthma. Archivum immunologiae et therapieae experimentalis, (57):331–344.
- Cantani A. 2008. Pediatric allergy, asthma and immunology. New York. Springer berlin Heidelberg.
- Carrillo T, Martinez J, Cumplido. 2006. Diferentes tipos de respuesta inflamatoria en el asma. Archivos de Bronconeumología, (42):13-9.
- Cianchetti S, Bacci E, Ruocco L. 1999. Salbutamol pretreatment does not change eosinophil percentage and eosinophilic cationic protein concentration in hypertonic saline-induced sputum in asthmatic subjects. Clinical and experimental allergy, (29):712-718.
- Cicutto L, Downey G. 2004. Biological markers in diagnosing, monitoring, and treating asthma. Advanced critical care, (15):97-11.

Efthimiadis A, Pizzichini M, Pizzichini E, Dolovich J, Hargreave F. 1997. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. *European respiratory journal* (10):1336-1340.

Faoud I. 2011. Inflammatory response in the pathogenesis of asthma. *The journal of the American osteopathic association*, (111) : 11-17.

Gibson P, Henry R, Thomas P. 2000. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *European respiratory journal*, (16):1008-1015.

Green R, Brightling C, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw A, Pavord I. 2002. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomized controlled trial. *The lancet respiratory medicine*, (360):1715-1721.

Holgate S. 2010. A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis. *Allergy asthma immunology research*, (2):165-171.

Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson D, Durham S. 1999. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today*, (20):528-533

Jayaram L, Pizzichini M, Cook R, Boulet L, Lemiere C, Pizzichini E, Cartier A, Hussack P, Goldsmith C, Laviolett M. 2006. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *European respiratory journal*, (27):483-449.

Lampinen M, Rak S, Venge P. 1999. The role of interleukin-5, interleukin-8 and RANTES in the chemotactic attraction of eosinophils to the allergic lung. *Clinical & experimental allergy*, (29): 314-322.

Louis R, Lau L, Bron A, Roldaan A, Radermecker M, Djukanovic R. 2000. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *American journal of respiratory and critical care medicine*, (161): 9-16.

Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. 2004. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy*, (59): 469-478.

Mendoza A, Romero J, Peña H, Vargas M. 2000. Prevalencia de asma en niños escolares de la ciudad mexicana de Hermosillo. *Gaceta médica de México*, (137): 397-401.

Montefort S, Herbert C, Robinson C. 1992. The bronchial epithelium as a target for inflammatory attack in asthma. *Clin Exp Allergy*, (22):511–520.

[NAEPP]. National Asthma Education and Prevention Program. 2007. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. U.S. Department of Health and Human Services.

Niimi A, Amitani R, Suzuki K, Tanaka E, Murayama T, Kuze F. 1998. Serum eosinophil cationic protein as a marker of eosinophilic inflammation in asthma. *Clinical and experimental allergy*, (28): 233-240.

Parameswaran K, Hargreave F. 2001. The use of sputum cell counts to evaluate asthma medications. *The journal of clinical pharmacology*, (52):121-128.

Pavord I, Pizzichini M, Pizzichini E, Hargreave F. 1997. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax*, (52):498-501.

Perpiña M. 2004. Hiperrespuesta bronquial en el asma. Patogenia y medición. *Archivos de Bronconeumología*,(40):8-13.

Pin I, Gibson P, Kolendowicz R, Denburg J, Hargreave F, Dolovich J. 1992. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. (47):25-29.

Pizzichini E, Pizzichini M, Efthimiadis A, Evans S, Morris M, Squillace D, Gleich J, Dolovich J. 1996. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *American journal of respiratory and critical care medicine*,(154):308-317.

Possa S, Lieck E, Prado C, Martins M. 2013. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Frontiers in experimental pharmacology and drug discovery*, (4):1-9.

Ramos D. 2007. Asma. *Archivos de Bronconeumología*, (43):3-14.

Runge MS, Patterson C. 2006. Principles of molecular medicine. 2nd ed. Totowa, New Jersey. Humana press inc.

Rytilä P, Pelkonen A, Metso T, Nikander K, Haahtela T, Turpeinen M. 2004. Induced sputum in children with newly diagnosed mild asthma: the effect of 6 months of treatment with budesonide or disodium cromoglycate. *Allergy*, (59): 839-844.

- Sahid El-Radhi A, Hogg C, Bungre J, Bush A, Corrigan C. 2000. Effect of oral glucocorticoid treatment on serum inflammatory markers in acute asthma. *Arch Dis Child*, 83:158–162
- Shimura S, Andoh Y, Haraguchi M, Shirato K. 1996. Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma. *Eur Respir J*. (9): 1395-1401.
- Sierra J, Rio B, Baeza M. 1999. Asma. *Salud pública de México*, (41):64-70.
- Solway J, Fredberg J. 1997. Perhaps airway smooth muscle dysfunction contributes to asthmatic bronchial hyperresponsiveness after all. *Am J Respir Cell mol biol* (17): 144-146.
- Sulakvelidze I, Inman M, Rerecich T, O'Byrne P. 1999. Increases in airway eosinophils and interleukin-5 with minimal bronchoconstriction during repeated low-dose allergen challenge in atopic asthmatics. *European respiratory journal*, (11):821-827.
- The National Institute of Health 2002. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NIH Publication, 02-3659. (NIH, 2002)
- Trivedi N, Caughey G. 2010. Mast cell peptidases, chameleons of innate immunity and host defense. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, (42): 257-267.
- Umeno E, McDonald D, Nadel J. 1990. Hypertonic saline increases vascular permeability in the rat trachea by producing neurogenic inflammation. *J Clin Invest*, (85): 1905-1908
- Umibe T, Kita Y, Nakao A, Nakajima H, Fukuda T, Yoshida S. 2000. Clonal expansion of T cells infiltrating in the airways of non-atopic asthmatics. *Clin Exp Immunol*, (119):390-397.
- Uribe E, Pérez P, Bonaterra M, Maldonado C, Uribe A, Aoki A. 2003. Seguridad, reproducibilidad y validación de la técnica del esputo. *Archivos de alergia e inmunología clínica*, (34): 41-46.
- Venge P, Bystrom M, Carlson M, Hakansson L, Karawacjzyk M, Peterson C. 1999. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of the ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clinical and experimental allergy*, (29):1172-1186.
- Verstraelen S, Bloemen K, Nelissen I, Witters H, Schoeters G. 2008. Cell types involved in allergic asthma and their use in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicology in vitro*, (22): 1419-1431.

Yamaguchi K, Ueki S, Oyamada H, Kamada Y, Hamada K, Kanda A, Chiba T, Kayaba H, Chichara J. 2004. Role of adhesion molecules in eosinophil activation: A comparative study on the effect of adhesion molecules on eosinophil survival. *Allergology international*, (53):185-190.

ANEXO

Reactivos para la Determinación de Triptasa

- Anti-Triptasa conjugada Marca ImmunoCAP Fabricante: Phadia Lote: A3CC8
- Triptasa curva de control Marca: ImmunoCAP Fabricante: Phadia Lote: AYUAR
- Triptasa calibradores Marca: ImmunoCAP Fabricante: Phadia Lote: DMW8
- Anti- Triptasa Marca: ImmunoCAP Fabricante: Phadia Lote: A1CBH

Fundamento de la Técnica para la Determinación de Triptasa

El anticuerpo Anti-Triptasa unido covalentemente a la matriz solida del ImmunoCAP, reacciona con la triptasa presente en la muestra del paciente. Luego se lava y se añaden anticuerpos para triptasa marcados con enzima formando un complejo. Posterior a la incubación, los anticuerpos marcados con enzima que no se unen se lavan, y el complejo unido es incubado con un agente que desarrolla color. Después de detener la reacción, se mide la fluorescencia de la elución. La fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de Triptasa contenida en la muestra del paciente.

Reactivos para la Determinación de Proteína Catiónica del Eosinófilo

- Anti-ECP conjugada Marca InmmunoCAP Fabricante: Phadia Lote:969B8
- ECP curva control Marca InmmunoCAP Fabricante: Phadia Lote: AVVBD
- ECP calibradores Marca InmmunoCAP Fabricante: Phadia Lote: D5EP
- Anti-ECP Marca InmmunoCAP Fabricante: Phadia Lote:778BH

Fundamento de la Técnica para la Determinación de Proteína Catiónica del Eosinófilo

El anticuerpo Anti-ECP unido covalentemente a la matriz solida del ImmunoCAP, reacciona con la ECP presente en la muestra del paciente. Luego se lava y se añaden anticuerpos para ECP marcados con enzima formando un complejo. Posterior a la incubación, los anticuerpos marcados con enzima que no se unen se lavan, y el complejo unido es incubado con un agente que desarrolla color. Después de detener la reacción, se mide la fluorescencia de la elución. La fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de ECP contenida en la muestra del paciente.