

Métodos de estudio de la inflamación de la vía aérea

CARLOS MARTÍN DE VICENTE

Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d'Hebron. Barcelona. España.
carl_zaragoza@yahoo.es

El estudio de la inflamación de las vías respiratorias está adquiriendo en los últimos años una gran relevancia en la valoración de diversas enfermedades pulmonares crónicas como el asma bronquial. Es aquí donde su utilidad se hace más evidente y donde está más extendido su uso, tanto para el diagnóstico como para el control y monitorización de la enfermedad.

El método de referencia para valorar esta inflamación bronquial ha sido y sigue siendo el de toma de biopsias bronquiales y lavado broncoalveolar por fibrobroncoscopia, método invasivo, cruento y poco aplicable lógicamente a nuestra práctica diaria habitual. Esto hace que se estén desarrollando aparatos y técnicas no invasivas, que intentarán acercarnos lo más posible a los mecanismos inflamatorios que intervienen en la enfermedad pulmonar y así ayudarnos al manejo y seguimiento de, sobre todo, el paciente asmático.

Puntos clave

- Para el estudio y la monitorización de la inflamación de las vías respiratorias es importante disponer de pruebas no invasoras como la determinación de la fracción exhalada de óxido nítrico (FENO), el estudio de aire exhalado condensado y/o la inducción de esputo.
- Estas pruebas se emplean básicamente ante el enfermo con asma, pero pueden ser también de utilidad en la fibrosis quística o discinesia ciliar.
- La medición de la FENO nos permite determinar de una manera sencilla, no invasiva y rápida el grado de inflamación bronquial y tiene una buena sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de asma.
- La recogida de aire exhalado condensado permite determinar y medir marcadores de inflamación de una forma más rápida que en la inducción de esputo.
- El esputo inducido, aunque es una técnica laboriosa, es útil para el diagnóstico de asma, definir su gravedad, identificar el inicio y desarrollo de la crisis aguda de asma y valorar la respuesta al tratamiento con corticoides inhalados.

FRACCIÓN EXHALADA DE ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (ON) se sintetiza en distintas células del organismo, incluidas las del aparato respiratorio, y sus principales funciones son broncodilatadoras, vasodilatadoras, antimicrobianas y de mantenimiento de la inflamación bronquial (aumenta las células Th2, la inmunoglobulina E y los eosinófilos), por lo tanto, la medición de la fracción exhalada de óxido nítrico (FENO) se utilizará principalmente en el diagnóstico y control del asmático alérgico.

Técnicas de medición

Existen 2 sistemas diferentes de medición¹ de la FENO: mediante equipos con sensores de quimioluminiscencia y mediante equipos portátiles con sensores electroquímicos, de



Figura 1. Comparación entre los aparatos de quimioluminiscencia (A: NIOX[®] Aerocrine; B: ECO MEDICS Mod.CLD88sp) y los portátiles con detector electroquímico (C: NIOX-MINO; D: NO-VARIO Analyser).

menor tamaño (fig. 1). Es posible medirla *on line* (recogida directa del aire espirado) u *off line* (se almacena el aire espirado y posteriormente se analiza).

– *Medición on line*. El paciente realizará una inspiración profunda hasta la capacidad pulmonar total y exhalando de forma mantenida en la boquilla del aparato, ayudado por animaciones de incentivación, a un flujo constante de unos 50 ml/s y contra una resistencia bucal de entre 5-20 cmH₂O para conseguir cerrar el velo del paladar y así evitarnos la contaminación de la muestra por el ON nasal (ONn). El tiempo mínimo de exhalación ha de ser de 3 s en pacientes menores de 12 años y de igual o más de 6 s en mayores de 12 años. Cada paciente hará de 3 a 6 maniobras y el valor final de la FENO será el promedio de éstas. La técnica para los aparatos portátiles cambia en que sólo es necesaria una determinación, el paciente se guiará por indicadores auditivos y lumínicos y el resultado aparecerá de forma digital en una pequeña pantalla.

Medición off line. Empleada en niños no colaboradores. Se recoge el aire exhalado en una bolsa reservorio inerte para el ON y posteriormente se analiza dentro de las siguientes 12 h. Se coloca la mascarilla cubriendo nariz y boca dejando que el paciente respire de una forma regular y estable, seguidamente se abre una válvula que permita la entrada del aire exhalado en el reservorio durante 15-45 s y el aire recogido se conectará posteriormente al equipo analizador de FENO².

Valores de referencia

Los valores de normalidad en los equipos de quimioluminiscencia para los niños mayores de 4 años³ y adultos sanos son entre 5 y 20 partes por billón (ppb) (tabla 1). Para los equipos portátiles electroquímicos los valores son ligeramente superiores, de entre 20 y 35 ppb (FENO \geq 35 ppb: valor patológico).

Diferentes factores reflejados en la tabla 2 pueden afectar en los valores de la medición de la FENO⁴.

Utilidades

La más importante es en el asma atópica por la inflamación eosinofílica de la vía aérea de estos pacientes. Es útil para el diagnóstico de la enfermedad, pues aporta una alta sensibilidad y especificidad. En la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA) del año 2009 se considera que los valores elevados de la FENO (> 30 ppb) en el paciente con sintomatología de asma y espirometría forzada normal u obstructiva, con prueba broncodilatadora negativa, sea ya diagnóstico de la enfermedad. También es útil en el control y seguimiento de la enfermedad y del tratamiento antias-

Tabla 2. Factores que influyen en la medición de la fracción exhalada de óxido nítrico

Aumentan

«Contaminación» del aire exhalado por el ON de las fosas nasales
ON ambiental en concentraciones muy superiores al endógeno
Broncodilatación previa
Flujo espiratorio bajo (inferior a 45-50 ml/s)
Infección de vías respiratorias altas y bajas
Rinitis alérgica
Atopia

Disminuyen

Espirometría forzada en los minutos previos a la prueba
Broncoconstricción
Hábito tabáquico
Ejercicio físico previo
Corticoides sistémicos o inhalados
Antileucotrienos

Tabla 1. Valores de referencia según Buchwald

Edad (años)	N	Media geométrica (ppb)	Límite superior individual 95%	N	Media geométrica (ppb)	Límite superior individual 95%	N	Media geométrica (ppb)	Límite superior individual 95%
Con valores extremos fuera de rango	Sin valores extremos fuera de rango	Sin valores extremos fuera de rango ni atópicos ^a							
4	29	7,1	15,7	29	7,1	15,7	27	7	15
5	35	7,9	16,6	35	7,9	16,6	33	8	17,1
6	49	8,2	19,3	48	8	17,1	42	7,5	15,5
7-9	107	8,1	18,4	106	8	17,2	89	7,8	17,1
10-13	105	11,2	28,2	98	10,1	19,2	85	9,8	18
14-17	80	13,7	39,2	73	11,9	24,2	56	11,6	22,4
Total	405	9,7	25,2	389	9	19,4	332	8,8	18,5

Medias geométricas y límite superior 95% de los valores de referencia de FENO según la edad, para todos los pacientes (n = 405). Tuvieron valores superiores extremos de FENO 16 niños ($> 34,9$ ppb). También se muestran los valores de referencia para aquellos sin valores extremos (n = 389), y para aquellos sin valores extremos, atopia o infección viral (57).

^aRespuesta positiva a rinitis/conjuntivitis o síntomas febriles.

mático. Se ha comprobado que es un marcador precoz de la pérdida de control de la enfermedad y del inicio de la crisis asmática. La FENO es muy sensible al tratamiento con corticoides⁵, disminuyendo los valores a los pocos días de iniciar el tratamiento inhalado, con un efecto máximo a las 2-4 semanas de su inicio.

Las otras utilidades de la FENO son para apoyar el diagnóstico en la fibrosis quística y la discinesia ciliar primaria. En ambas, los valores de FENO están disminuidos debido a la escasa síntesis bronquial de la enzima que produce ON, la óxido nítrico sintetasa 2 o inducible (NOS2), y a la elevada cantidad de nitratos de sus secreciones. La tabla 3 muestra cómo interpretar la FENO en función del resultado obtenido y del tipo de paciente a valorar.

Óxido nítrico nasal

El óxido nítrico nasal (ONn) se sintetiza en grandes cantidades en las células epiteliales de los senos paranasales (3.000 ppb) y tiene funciones de defensa y de estímulo de la actividad ciliar. La técnica de medición de ONn consiste en recoger aire de un orificio nasal mediante una pieza blanda tipo

oliva con un orificio central. El equipo de medición aspirará el aire nasal mientras se cierra el velo del paladar (espiración lenta por la boca contra una resistencia). Los valores normales de ONn en sujetos sanos pueden variar de 200 a 2.000 ppb. La utilidad clínica será para el diagnóstico de la discinesia ciliar primaria⁶, ya que se asocia a valores muy bajos, por debajo de 200 ppb; para ver la respuesta al tratamiento quirúrgico en la poliposis nasosinusal y para ver la respuesta al tratamiento en la rinitis alérgica.

AIRE EXHALADO CONDENSADO

La recogida de aire exhalado condensado (AEC)⁷ analiza los mediadores inflamatorios no volátiles de las vías respiratorias⁸, en concreto del líquido de recubrimiento extracelular broncoalveolar. Son principalmente el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), prostaglandinas, óxidos de nitrógeno (NO₂ y NO₃), leucotrienos (cisleucotrienos y LTB₄), 8-isoprostano y citocinas, los cuales están elevados en pacientes asmáticos.

Tabla 3. Interpretación de los resultados de la fracción exhalada de óxido nítrico

FENO (ppb)	Rango	Inflamación de la vía aérea	Interpretación	
			Sin CI	Tratado con CI
< 5	Bajo	Improbable	Considerar DCP, FQ	
5-25	Normal	Improbable	Considerar:	Si está sintomático: revisar el diagnóstico
			Sibilancias recurrentes	Si está asintomático:
			Alteraciones VRA	Buena adherencia al tratamiento
			RGE	Reducir la dosis o suspender si hay poca dosis
25-35	Intermedio	Presente, pero moderada	Considerar iniciar CI o infección viral	Si está sintomático:
				Infección
				Exposición a alérgenos
				Poca adherencia al tratamiento
				Mala técnica inhalatoria
				Añadir LABA o LTRA
				Aumentar la dosis de CI
				Si está asintomático:
				No cambiar la dosis de CI si está estable
35	Alto	Significativa	Asma será lo más probable y respondedor a los CI	Si está sintomático: ver valores intermedios
				Más:
				Exacerbación intermitente o recaída
				Resistencia a CI
				Si está asintomático: no modificar la dosis de CI si está estable

Cl: corticoides inhalados; DCP: discinesia ciliar primaria; DPI: dispositivo en polvo seco; FENO: fracción exhalada de óxido nítrico; FQ: fibrosis quística; LABA: agonistas β_2 de acción prolongada; LTRA: antileucotrienos; MDI: inhalador a dosis presurizadas; VRA: vías respiratorias altas.

Técnica

El vapor de agua del aire espirado va a ser enfriado a 0 °C con hielo o a -20 °C mediante un circuito refrigerado, lo que hace que se condense y pueda ser recogido (fig. 2). El paciente ha de respirar durante 10-15 min a volumen corriente en un dispositivo que consta de una boquilla con una válvula unidireccional que separa el aire inspirado del espirado. Este aire al enfriarse se condensa en pequeñas gotitas que llegan a formar de 1 a 3 ml de líquido a analizar en el laboratorio. El procedimiento se tolera muy bien, sin describirse hasta la fecha efectos adversos⁹.

Aire exhalado condensado en asma

Estos pacientes presentan un AEC ácido y concentraciones elevadas de H₂O₂, isoprostanos, leucotrienos, productos de la peroxidación lipídica (malonildialdehído), nitritos y nitratos. De todos ellos, el pH es el marcador más estudiado y su valor se ve disminuido en el asma por la reacción de los nitritos para formar ácido nitroso, provocando una acidificación del medio. El pH se modifica también con la corticoterapia, por lo que es útil para la monitorización y la optimización del tratamiento de la enfermedad.

ESPUTO INDUCIDO

La inducción de esputo pretende recoger una muestra de las secreciones respiratorias de las vías aéreas inferiores y analizar la inflamación bronquial. Como en las anteriores técnicas, su utilidad y desarrollo ha sido fundamentalmente en el paciente asmático¹⁰, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento y monitorización del tratamiento corticoideo, ya que está demostrado que las células que se obtienen en la inducción del esputo de estos enfermos son las responsables de la inflamación bronquial a través de la secreción de citocinas y leucotrienos¹¹. En la muestra de esputo inducido se analizan células presentes en las vías aéreas inferiores (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y mastocitos), marcadores de inflamación como citocinas (IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13; IFN-γ), quemocinas, eicosanoídes y leucotrienos.

Técnica, metodología y procesado de la muestra

Para aumentar la secreción bronquial y facilitar al paciente la expectoración espontánea se utiliza la inhalación de suero salino hipertónico mediante un nebulizador ultrasónico. De esta manera se pretende obtener una muestra de esputo con células vivas para su posterior análisis. Antes y durante la prueba, se deberán realizar espirometrías forzadas para detectar el posible efecto indeseable broncoconstrictor del suero salino hipertónico. La administración de un β_2 -adrenérgico inhalado previo al suero disminuye ese riesgo y no altera en el recuento celular de la muestra. Los pacientes inhalan suero salino hipertónico a concentraciones crecientes (3, 4 y 5%) durante un total de 15 min, a razón de 5 min por cada concentración de suero salino hipertónico. Al paciente se le indica que tosa y expectore cada 5 min o siempre que le urja hacerlo durante la inhalación de suero salino hipertónico. Una vez conseguida la muestra de esputo se deberá procesar ésta en el laboratorio dentro de las siguientes 2 h, ya que a partir de este tiempo disminuye rápidamente la

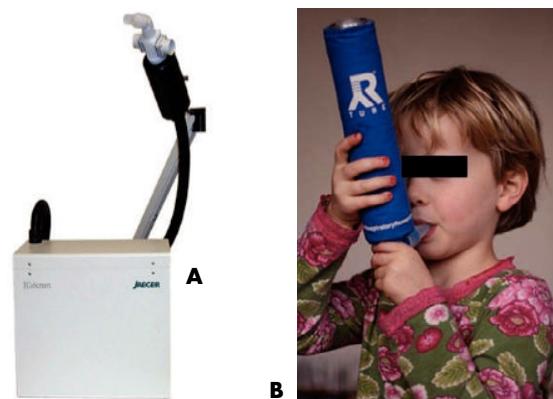


Figura 2. A) Condensadpr EcoScreen (Eric Jaeger GmbH, Hoechberg, Germany). B) Condensador RTube breath condensate collector (Respiratory Research Inc., Charlottesville, USA).

viabilidad celular. Para la selección de la muestra se pueden seleccionar las partes viscosas o tapones de moco del esputo, o directamente procesar todo el material expectorado (esputo y saliva)¹². La mayoría de estudios se realizan seleccionando los tapones mucosos, aunque en ambas técnicas se consiguen resultados válidos y reproducibles. De la muestra de esputo, el análisis principal es el recuento celular y, fundamentalmente con el cálculo del porcentaje de eosinófilos. El porcentaje de estas células en el esputo no es superior a 2,5% y su presencia en estas muestras se correlaciona con el porcentaje en el aspirado bronquial y en el lavado broncoalveolar. Otros marcadores solubles en el sobrenadante del esputo de pacientes asmáticos en estudio son las citocinas, mediadores derivados del eosinófilo, neutrófilos y mastocitos, moléculas de adhesión, derivados del óxido nítrico, etc.

Esputo inducido en asma

Existen numerosas referencias y trabajos sobre la inducción de esputo en niños sanos y asmáticos¹³. Con esta técnica está comprobado el aumento de eosinófilos en las muestras de esputo de niños asmáticos alérgicos en fase estable. Mediante el esputo inducido podemos diferenciar al paciente asmático según su gravedad¹⁴, ya que los persistentes tienen un porcentaje más elevado de eosinófilos en comparación con los episódicos ocasionales; identificar el inicio y desarrollo de la crisis aguda de asma con el aumento importante de los eosinófilos¹⁵; valorar la respuesta al tratamiento con glucocorticoides inhalados y como ayuda en el diagnóstico de la enfermedad.

OTROS MARCADORES DE INFLAMACIÓN

Los otros marcadores de inflamación bronquial son las proteínas derivadas del eosinófilo (peroxidasa del eosinófilo, proteína catiónica eosinofílica, proteína X o neurotoxina derivada del eosinófilo y proteína básica) con capacidad predictora del desarrollo de asma y útil para la evaluación del tipo y gravedad de la enfermedad, así como en la moni-

torización del tratamiento antiinflamatorio y el monóxido de carbono (CO) exhalado, que en pacientes asmáticos están elevados por la degradación del hem por la enzima hem oxigenasa inducible (HO-1), que se activa en situaciones de inflamación.

INFORMACIÓN AL PACIENTE DE LAS PRUEBAS (TABLA 4)

Información al paciente para la prueba de medición de FENO

- Antes de la realización de la prueba el paciente debería no haber tomado ningún broncodilatador, ni haber hecho ejercicio intenso, ni presentar infección de vías respiratorias altas y/o bajas. Es aconsejable realizarla previamente a la espirometría forzada.
- Se informará del motivo de realización de la prueba y con qué finalidad.
- Se les explicará que la prueba no presenta ningún tipo de efecto adverso.
- Se describirá el método que se empleará y se comprobará que técnicamente el paciente es capaz de realizar la prueba, con suficiente flujo y tiempo espiratorio en el caso de niños colaboradores y viendo, en los no colaboradores, que pueden respirar sin llorar a volumen corriente en la mascarilla.
- Posteriormente a la prueba no es necesario ninguna actitud o tratamiento específico.
- El resultado de la prueba es inmediato, salvo en el método *offline* que puede ser antes de las 12 h.

Información al paciente para la prueba de medición de ONn

- Antes de la realización de la prueba el paciente no debería presentar infección de vías respiratorias altas.
- Se informará del motivo de realización de la prueba y con qué finalidad.
- Se explicará que la prueba no presenta ningún tipo de efecto adverso.
- Se describirá el método que se empleará y se comprobará que técnicamente el paciente es capaz de realizar la prueba,

realizando una espiración lenta por la boca contra una resistencia mientras una sonda colocada en la nariz aspira y recoge el ONn de las fosas nasales.

- Posteriormente a la prueba no es necesaria ninguna actitud o tratamiento específico.
- El resultado de la prueba es inmediato.

Información al paciente para la prueba de recogida del AEC

- No precisa de preparación previa .
- Se informará del motivo de realización de la prueba y con qué finalidad.
- Se explicará que la prueba no presenta ningún tipo de efecto adverso.
- Se describirá el método que se empleará y se comprobará que técnicamente el paciente es capaz de realizar la prueba, respirando a volumen corriente en la boquilla del aparato condensador durante 10-15 min.
- Posteriormente a la prueba no es necesaria ninguna actitud o tratamiento específico.
- El resultado de la prueba no es inmediato porque precisa de su análisis en el laboratorio.

Información al paciente para la prueba de la inducción de esputo

- Antes de la realización de la prueba el paciente no debería presentar infección de vías respiratorias altas y/o bajas ni presentar crisis asmática o bronquitis aguda.
- Se informará del motivo de realización de la prueba y con qué finalidad (tabla 4).
- Se les explicará que la prueba puede presentar como efecto adverso un broncoespasmo por la inhalación de suero salino hipertónico por lo que, como medida de precaución, se administrará previamente salbutamol inhalado.
- Se describirá el método que se empleará y se comprobará, mediante espirometría forzada y auscultación respiratoria tras las inhalaciones a diferentes concentraciones de suero salino hipertónico, que no aparece el broncoespasmo. La técnica espirométrica ha de ser correcta.
- Posteriormente a la prueba no es necesario ninguna actitud o tratamiento específico.
- El resultado de la prueba no es inmediato porque precisa de su análisis en el laboratorio.

Tabla 4. Resumen de información al paciente

	FENO	ONn	AEC	El
Requisitos previos	Sí	Sí	No	Sí
Medicación previa	No	No	No	Sí
Efectos adversos	No	No	No	Sí
Laborioso	No	No	No	Sí
Actitud posterior	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Resultado	Inmediato	Inmediato	No inmediato	No inmediato

FENO: fracción exhalada de óxido nítrico; AEC: aire exhalado condensado; El: esputo inducido.

BIBLIOGRAFÍA



● Importante ●● Muy importante

■ Metanálisis

1. ●● ATS/ERS Recommendations for Standardized Procedures for the online and offline measurement of exhaled respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. 2005. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:912-30.
2. De Mir I, Moreno A, Cobos N, Gartner S, Martín C, Liñán S. Óxido nítrico exhalado en niños menores de 4 años con bronquitis de repetición. *Arch Bronconeumol.* 2009;45:442-8.
3. Buchvald F, Baraldi E, Carraro S, Gaston B, De Jongste J, Pijnenburg MW, et al. Measurements of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115: 1130-6.
4. ● Cobos N, G. Pérez-Yarza E, Sardón O, Reverté C, Gartner S, Korta J. Óxido nítrico exhalado en niños: un indicador no invasivo de la inflamación de las vías aéreas. *Arch Bronconeumol.* 2008;44:41-51.
5. Cobos N, Reverté C, Gartner S, Liñán S, Quintó L. Óxido nítrico exhalado y nasal en niños normales y asmáticos. *An Esp Pediatr.* 1998;49:241-7.
6. Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, Csiszér E, Cole PJ, Kharitonov SA, et al. Comparison of exhaled and nasal nitric oxide and exhaled carbon monoxide levels in bronchiectatic patients with and without primary ciliary dyskinesia. *Thorax.* 2003;58:68-72.

7. ●● Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al; ATS/ERS Task Force on exhaled breath condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005;26:523-48.
8. Rosias PP, Dompeling E, Hendriks HJ, Heijnen JW, Donckerwolcke RA, Jöbsis Q. Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004;15:4-19.
9. Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M, Castillo D, Foss B, Dunning M, et al. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:663-9.
10. ●● Pin I, Gibson P, Kolendowicz R, Grgis-Gabardo A, Denburg J, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax.* 1992;47:25-9.
11. Bettoli J, Sele J, Henket M, Louis E, Malaise M, Bartsch P, et al. Cytokine production from sputum cells after allergenic challenge in IgE-mediated asthma. *Allergy.* 2002;57:1145-50.
12. Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridization. *Eur Respir J.* 2002;37 (Suppl):19s-23s.
13. Cai Y, Carty K, Henry RL, Gibson PG. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J.* 1998;11:848-53.
14. Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax.* 2003;58:116-21.
15. Twaddell SH, Gibson PG, Carty KL, Woolley KL, Henry RL. Assessment of airway inflammation in children with acute asthma using induced sputum. *Eur Respir J.* 1996;9:2104-8.