

Diagrama A-D GOLD 2011 bajo el microscopio. Respondiendo a la fisiopatogénia de la EPOC con implicancias en el manejo de la enfermedad

Correspondencia:

Loli Uribe Echevarría
uribe@cmebcm.uncor.edu

Recibido: 20.05.2016

Aceptado: 18.11.2016

Autores: Uribe Echevarría Loli¹, García González Jorge¹, Nevado Alberto¹, Álvarez Ruth², Maldonado Cristina³

¹Servicio de Neumonología. Sanatorio Allende - Nueva Córdoba

²Centro de deshabitación Tabáquica Nuevo Hospital San Roque - Córdoba

³Centro de Microscopía Electrónica. FCM-UNC

Resumen

El objetivo de este trabajo fue analizar el fenotipo celular en esputo de los pacientes con diagnóstico de EPOC clasificados según el diagrama A-D.

Se reclutaron paciente ambos géneros, edad ≥ 60 años, ex fumadores de por lo menos 10 pack/año, con diagnóstico de EPOC en situación estable. Se los clasifico según GOLD 2011 en categorías clínicas A, B, C, D y se les analizó el patrón inflamatorio bronquial por medio de citología de esputo.

Se estudiaron 85 pacientes con diagnóstico de EPOC distribuidos en categoría A (19), B (29), C (19) y D (18); la edad de estos últimos fue significativamente mayor que las del resto de los pacientes. El patrón predominante celular en esputo fue Eosinofílico (43), Neutrofílico (17), Mixto (9) y Paucigranulocítico (16). La distribución del patrón celular predominante en relación a cada grupo clínico de EPOC fue estadísticamente significativo $p \leq 0,001$. El fenotipo celular Neutrofílico en el grupo A; eosinofílico y mixto en los grupos B y C y en el grupo D, aun presentes los eosinófilos predominó el patrón Neutrofílico.

Concluimos que este estudio identificó patrones celulares inflamatorios que caracterizan cada grupo del diagrama A-D de la EPOC lo cual puede contribuir a explicar su carácter heterogéneo, personalizar el tratamiento y especialmente apunta a identificar tempranamente el paciente en riesgo de iniciar y perpetuar la enfermedad.

Introducción

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es compleja y heterogénea y la severidad de la limitación del flujo aéreo medido por espirometría, no refleja toda la complejidad de la enfermedad¹ como por ejemplo los pacientes con escasos síntomas y los muy sintomáticos, los que exacerbaban y los que no lo hacen con frecuencia. En consecuencia, las recomendaciones de GOLD 2011² sugiere evaluar a los pacientes con EPOC con el grado de obstrucción al flujo de la vía aérea e incluir variables clínicas como grado de disnea y la frecuencia de exacerbaciones anuales. Según los resultados de esta evaluación, se identifican

cuatro grupos de pacientes (o categorías) según A-B-C y D.

Los grupos A y B se definen en función del riesgo ($FEV_1 \geq 50\%$ predictivo y no más de una exacerbación por año), por lo que un paciente debe cumplir estos dos requisitos para ser clasificados en uno de estos dos grupos. Los grupos C y D, admiten varias combinaciones posibles. Por ejemplo, un paciente puede ser clasificada en el grupo C, por la presencia de escasos síntomas (por definición) y, o bien $FEV_1 \leq 50\%$ pred, o dos o más exacerbaciones / año o más de una hospitalización por año (según GOLD 2013)³, o ambos, lo mismo ocurre con los pacientes en el grupo D. Sin embargo no refleja totalmente las distintas dimensiones de la EPOC, inclusive con

esta propuesta de evaluación combinada. Dada la heterogeneidad de la EPOC es emergente focalizar el manejo de la enfermedad en forma personalizada y recurriendo a biomarcadores confiables para identificar al paciente más apropiado para la mejor elección terapéutica⁴.

Es por ello que, reconociendo a la EPOC una enfermedad inflamatoria como sustrato fisiopatológico, se propuso analizar el fenotipo celular en esputo inducido de los pacientes clasificados según el diagrama A-D de GOLD 2011.

Materiales y métodos

Este es un estudio observacional, prospectivo y transversal que para desarrollar el objetivo propuesto se reclutaron paciente del Servicio de Neumonología del Sanatorio Allende (Nueva Córdoba) y del Centro de Deshabitación Tabáquica del Nuevo Hospital San Roque de Córdoba. Fue aprobado por el Comité de Ética del Sanatorio Allende y los pacientes adhirieron voluntariamente al consentimiento informado y escrito. Los pacientes ingresados presentaban criterios de EPOC según recomendaciones GOLD 2011²; de ambos géneros, edad ≥ 60 años, fumadores de por lo menos 10 pack/año. Los pacientes no debían ser fumadores actuales y haber dejado de fumar al menos 6 semanas antes del ingreso al protocolo para evitar resultados erróneos de porcentajes de células inflamatorias en el esputo inducido especialmente los neutrófilos. No debían haber presentado exacerbaciones de la EPOC definido como un episodio agudo caracterizado por un empeoramiento de los síntomas respiratorios del paciente que trasciende las variaciones normales diarias y precisa un cambio en la medicación². No debían haber sido tratados con esteroides sistémicos o inhalados en las seis semanas antes del ingreso, esto último a excepción de aquellos con EPOC exacerbadores frecuentes por razones éticas. No debían estar cursando enfermedades infecciosas ni haberla presentado durante las seis semanas previas al enrolamiento; tampoco tener criterios de asma bronquial en su infancia y/o adolescencia, enfermedades cardiovasculares (insuficiencia cardíaca) diferente a la isquémica, neoplasias, enfermedades del colágeno, ingesta de medicamentos neumotóxicos conocidos, exposiciones laborales de riesgo pulmonar, cualquier enfermedad respiratoria crónica diferente a

EPOC, reflujo gastro-esofágico, obesidad (IMC ≥ 30) ni imposibilidad física- mental que impida la colaboración en el estudio.

Diseño del estudio

En la primera visita, todos los pacientes con criterio de inclusión, fueron sometidos a una historia clínica minuciosa. Las variables consignadas fueron edad, género, parámetros espirométricos según normativas ATS/ERS⁵ realizadas con el espirómetro Cosmed Quark Spiro Series System 3700 (Cosmed SRL Italy 2015[®]) con estandarización diaria según especificaciones técnicas; índice de fumar paquete/año. Según presentaran las variables de síntomas, FEV₁, grado de disnea de MRC, historia de exacerbaciones y se los clasificó en EPOC A-B-C y D según corresponda².

En una segunda visita, luego del enrolamiento, se les tomó una muestra de esputo inducido independientemente de conocer la clasificación del grado clínico de EPOC, para no influir en los resultados.

Obtención y Procesamiento del Esputo Inducido (EI)

Las muestras de EI se obtuvieron siguiendo el protocolo habitual previamente descrito⁶. A los pacientes se les midió el Flujo Espiratorio Pico (FEP) y se administró 200 mg de salbutamol en aerosol MDI por vía inhalatoria. Luego de 15 minutos se les midió nuevamente el FEP y se nebulizaron con soluciones salinas en concentraciones crecientes de 3%, 4% y 5% utilizando un nebulizador ultrasónico Ultraneb 2000 De Villbis. Después de cada nebulización se midió el FEP. Si el FEP cae a $< 10\%$ se continuo con las concentraciones crecientes. Si la caída del FEP era entre 10 y 20% no se incrementó la concentración de salina hipertónica sino se prolongó el tiempo de inhalación en la misma concentración. La técnica se suspendía cuando los pacientes manifestaban síntomas de disconformidad respiratoria y el FEP caía al 20% o más del valor basal.

Del esputo obtenido, se seleccionó el material viscoso, separando la saliva. Se agregaron 4 ml de Ditiotreitól (DTT) por mg de esputo, agitándose durante 15 segundos y luego por 10 minutos en baño maría a 37 °C. Luego de un filtrado con gasa de 48 μm de espesor, se le agregó un volumen de PBS (*Phosphate Buffer saline*) igual al utilizado de DTT. La viabilidad celular se determinó mediante azul de tripán, continuándose el

protocolo cuando la misma superó el 50%. Las células obtenidas fueron contadas en cámara de Neubauer, centrifugadas y re suspendidas en PBS a una concentración de 1×10^6 células/ml. La suspensión se utilizó para preparar portaobjetos (citospin) con cito centrifuga (Giumelli) a 450 rpm por 4 minutos.

Para identificar las células del EI, los citospin se tiñeron con May Grünwald-Giemsa y se realizó un recuento diferencial, incluyendo neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células epiteliales bronquiales. El porcentaje fue calculado sobre la base de un mínimo de 200 células no bronquiales escamosas. Se clasificó el fenotipo celular dependiendo del porcentaje de célula predominante en el recuento diferencial del citospin. Los patrones celulares se clasificaron en: Eosinofílico (E) ($\geq 3\%$ de eosinófilos); Neutrofílico (N) ($\geq 65\%$ de neutrófilos); mixto (M) (eosinofílico $\geq 3\%$ de eosinófilos + neutrófilo $\geq 65\%$) y Paucigranulocítico (P) (no eosinofílico $< 3\%$ no neutrofílico $< 65\%$)⁷.

Análisis estadístico

El tamaño de la muestra no debió ser menor a 15 en cada grupo. Ésta se calculó para lograr una potencia de 80%, con un error alfa de 0,05, para detectar una diferencia del 15% en el recuento de porcentaje absoluto de eosinófilos en los diferentes subgrupos de pacientes. Los resultados se expresaran como media \pm desviación estándar para variables numéricas y frecuencias absolutas para variables categorías. Las diferencias entre grupos se examinaron utilizando la prueba de Kruskal Wallis para variables con distribución

para normal. Luego de usar el test de Kruskal-Wallis se utiliza comparaciones múltiples en base al estadístico T basado en los rangos. Se utiliza tabla de contingencia para las variables categóricas. Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico Infostat (Facultad de Ciencias Agropecuarias - Universidad Nacional de Córdoba). Se considera un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

Se estudiaron 85 paciente que reunieron los criterios de selección y por medio de las variables espirométricas y clínicas se los clasificó en EPOC A (19), B (29), C (19) y D (18). Las características demográficas de los pacientes se resumen en la tabla 1 cabe resaltar que la edad de los pacientes del grupo clínico D fue significativamente mayor que las del resto de los pacientes. Según el patrón predominante celular en esputo se obtuvieron E (43), N (17), M (9) y P (16), **gráfico 1**. Cuando cotejamos el fenotipo celular de esputo con el estadio clínico de EPOC la distribución fue estadísticamente significativa identificando perfiles clínicos con un tipo celular característico, **gráfico 2**. Igualmente, cada paciente identificado con una esfera de color según el fenotipo celular fue ubicado en el diagrama A-D de EPOC **gráfico 3**. Interesantemente resultó una distribución de patrón celular predominante en cada grupo como neutrofílico en el grupo A; eosinofílico y

TABLA 1. Características de los pacientes

Variables	EPOC A	EPOC B	EPOC C	EPOC D	P
n	19 (22%)	29 (34%)	19 (22%)	18 (21%)	NS
Edad (años)	64 (4)	65 (6)	61 (4)	70 (8)	0.01 D vs A-C
Genero F	8	11	6	5	NS
P/Y	49 (27)	47 (15)	36 (18)	49 (16)	0.04 C vs A,B,D
CVF, %	68 (7)	70 (7)	78 (10)	64 (10)	NS
FEV1, %	58 (21)	62 (8)	46 (6)	41 (5)	0.01 C,D vs A,B
FEV1/CVF	69 (5)	51 (3)	46 (4)	47 (8)	NS
Cambio BD%	5 (2)	7 (1)	10 (3)	2 (4)	NS
Eosinófilos%	1.5 (1.3)	14 (11)	6 (2)	6 (4)	0.05 A vs D; B vs C
Neutrófilos%	49 (39)	50 (27)	45 (33)	62 (30)	NS
Macrófagos%	38 (36)	25 (19)	24 (20)	16 (11)	0.04 D vs A-C
C. epiteliales%	1.6 (1.9)	1.4 (2)	0.9 (1)	0.7 (0.8)	NS

Los datos están presentados con medias \pm SD. Las variables categóricas están presentadas como frecuencias relativas. Distribución según clasificación EPOC GOLD 2011

Fenotipos celulares en EPOC

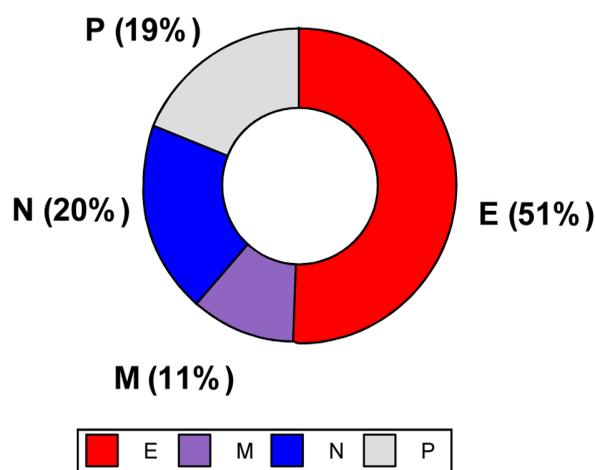


Gráfico 1. Fenotipos celulares en muestras de esputo de pacientes con EPOC. E: eosinofílica ($\geq 3\%$ eosinófilos), N: neutrófilica ($\geq 65\%$ neutrófilos), M: mixto (eosinofílico y el neutrófilico), P: Paucigranulocítica (ni eosinofílica ni neutrófilica).

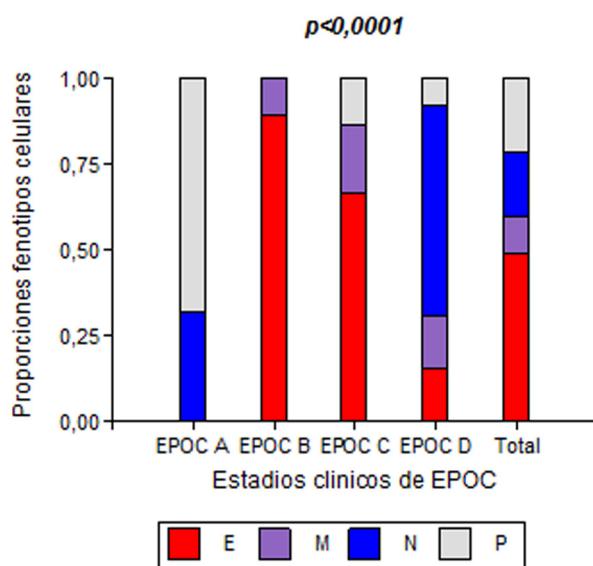


Gráfico 2. Distribución de proporciones de fenotipo celular según diferentes estadios clínicos de EPOC (Clasificación GOLD 2011). Se concluye que no fueron las mismas proporciones en los grupos, existe una relación entre el fenotipo celular y clasificación clínica $p < 0,0001$. En EPOC A se encuentran los fenotipos celulares N y P; en EPOC B, los fenotipos celulares E y M; en EPOC C fenotipos celulares E, M y P y en EPOC D todos los fenotipos celulares en distintas proporciones. Fenotipo Celular: E: eosinofílica ($\geq 3\%$), N: neutrófilica ($\geq 65\%$), M: mixto (eosinófilos y el neutrófilos), P: Paucigranulocítica (ni eosinofílica ni neutrófilica).

mixto en los grupos B y C y en el grupo D, aun presentes los eosinofílico predomino el patrón neutrófilico.

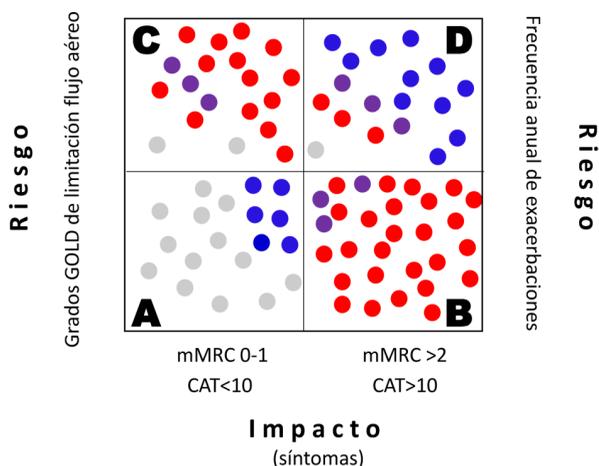


Gráfico 3. Distribución de los fenotipos celulares según la clasificación clínica de EPOC GOLD 11.

Cada esfera representa un paciente y cada color el fenotipo celular: ● Eosinofílico, ● Neutrófilico, ● Mixto, ● Paucigranulocítico.

Discusión

Analizamos características inflamométricas, para interpretar la complejidad de la EPOC más específicamente que con el análisis unidimensional del FEV_1 y aun con la combinación de variables clínicas como la disnea y frecuencia de exacerbaciones. Los resultados de este trabajo demostraron fenotipos celulares de inflamación predominantes en cada grupo de EPOC lo que pudiera significar un paso potencialmente importante en el avance hacia un enfoque más personalizado de la enfermedad.

Estos resultados actuales permiten interpretar con mayor claridad algunas características clínicas, estabilidad temporal y resultados a largo plazo de los cuatro grupos de pacientes analizados en estudios previos de cohorte¹. Teniendo en cuenta los grupos con bajo riesgo de exacerbación como el A y B con la peculiaridad de tener un FEV_1 similar, sin embargo el grupo B ya presenta síntomas y tiene una tendencia a progresar en severidad de la enfermedad a diferencia de los pacientes del grupo A poco sintomáticos y que tienden a permanecer en el mismo grupo con los años. El predominio celular eosinofílico observado en el grupo B pudiera explicar estas diferencias siendo conocidos los efectos citotóxicos de los eosinófilos y las manifestaciones clínicas secundarias a la auto-agresión contra las propias células del epitelio bronquial^{8,9}. Estos hallazgos explicarían igualmente, porque los grupos B y C presentan mayor variación durante el seguimiento¹⁰ advirtiendo la

necesidad de identificar el patrón inflamatorio en etapa temprana de la enfermedad y considerar una propuesta terapéutica apropiada.

Los pacientes con EPOC de los grupos B y D son considerados por el estudio ECLIPSE¹⁰ los que presentan mayor tendencia a las comorbilidades por persistencia de inflamación sistémica. Es probable que en el caso del grupo B, los cuales reciben como tratamiento sólo broncodilatadores de acción prolongada, según recomendaciones de las guías (GOLD) se descuiden los efectos inflamatorios sistémicos generados por los eosinófilos y en el grupo D la combinación de los mediadores inflamatorios propios de eosinófilos y neutrófilos, sumado a la mayor cronología de la enfermedad, determine un mayor estado de vulnerabilidad a comorbilidades observados en estos grupos.

Resulta interesante analizar los grupos C y D, lo cual se considera impreciso clasificarlos solo por historia del número de exacerbaciones en el último año. En este trabajo los pacientes de ambos grupos mantenían, por razones éticas, el tratamiento convencional sugerido, sin embargo, aun así, solo una minoría del grupo C logró normalizar su estado inflamatorio (paucigranulocítico); podrían estos paciente considerarse aquellos que han progresado en severidad en el tiempo pero lograron estabilizarse con escasos síntomas. Los restantes del grupo C, los cuales aún persisten los eosinófilos quizá por una dosis insuficiente de esteroides inhalados (dosis propuestas para EPOC diferentes a las del asma) o insuficiente respuesta a los esteroides, son los que no sólo han progresado en severidad en el tiempo, sino que incrementan progresivamente el número de exacerbaciones en el año¹¹. En el caso de los pacientes del grupo D, en forma similar están los exacerbadores frecuentes, quizá aquellos que persisten con eosinófilos en la citología bronquial y los más severos en la limitación al flujo aéreo, coincidente con una mayor progresión de la enfermedad en años, sumado a los efectos deletéreos del neutrófilo. Nuestro grupo de trabajo está desarrollando investigaciones en relación a la biología, muerte celular y sus consecuencias, de eosinófilos y neutrófilos, ambos protagonistas indiscutibles en la EPOC. Es posible y a modo de hipótesis, que el eosinófilo participe en el detonante de la enfermedad y progresión en severidad de los síntomas ejerciendo una quimiotáxis del neutrófilo, perpetuando y agravando aún más la enfermedad en los últimos estadios.

Los estudios de cohorte demostraron que la mayoría de los pacientes asignados a los grupos A y D siguen perteneciendo a estos mismos grupos sin modificar la severidad de la enfermedad. Es probable que en el caso del grupo A, cuyo predominio celular es el de una bronquitis neutrofílica o paucigranulocítica, represente un patrón inflamatorio producto de la exposición crónica al humo del cigarrillo sin el factor predisponente para desencadenar inflamación eosinofílica, que como ya fue referido anteriormente, sería el responsable de síntomas y progresión de la enfermedad. En el caso del grupo D consideramos la edad un factor influyente, como muestran las características demográficas de nuestros pacientes y quizá ya estadios finales de la enfermedad.

Bartoli y col¹², recientemente han identificado y dado a conocer en una *Letter Researc* fenotipos inflamatorios celulares de acuerdo a GOLD 2011 inmediatamente después de concluir nuestros resultados, pero aun no publicados. Los diseños de ambos son similares, aunque los resultados no son coincidentes con los nuestros quizá por las diferencias demográficas de ambas poblacionales estudiadas y especialmente utilizan diferente corte de porcentajes para eosinófilos y neutrófilos para definir los fenotipos celulares eosinofílico y neutrofílico respectivamente según recomendaciones internacionalmente aceptables^{7,13}.

Analizando las fortalezas, aunque no es el primer estudio que identifica fenotipos celulares en esputo en relación a los grupos A-D de la EPOC GOLD 2011; si lo es en reconocer al eosinófilo, como célula protagónica en la fisiopatogénea detonante de los síntomas y el progreso de la enfermedad.

Como debilidad consideramos hubiese sido de mayor interés analizar los grupos C y D sin tratamiento antiinflamatorio para analizar naturalmente el patrón inflamatorio. Este detalle ya está contemplado y apoyado desde la recomendación ética en los futuros proyectos de investigación de nuestro grupo de trabajo. Cabe destacar que, aunque no es una debilidad del diseño de este proyecto, sin embargo, los resultados obtenidos generan nuevas preguntas de investigación e hipótesis de trabajo insinuando incluir pacientes a temprana edad.

Concluimos que este estudio identificó patrones celulares inflamatorios que caracterizan cada grupo del diagrama A-D de la clasificación de EPOC

lo cual puede contribuir a la interpretación fisiopatológica de la heterogeneidad de la enfermedad, personalizar el tratamiento y especialmente incita a evaluar en forma temprana el fenotipo celular inflamatorio del paciente fumador en riesgo de iniciar y perpetuar la enfermedad. Al respecto sugerimos la utilización de la citología bronquial de muestras de esputo inducido como método diagnóstico confiable y seguro accesible a cualquier centro neumonológico especializado.

Una vez más enfatizamos en la necesidad y la utilidad de herramientas diagnósticas no invasivas y seguras, como la citología de esputo, además de lo propuesto por las guías, en la optimización del manejo personalizado de la EPOC.

Conflicto de interés: Los autores del trabajo declaran no tener conflictos de intereses relacionados con esta publicación.

Bibliografía

1. Alvar Agusti, Suzanne Hurd, Paul Jones, Leonardo M. Fabri, Fernando Martínez, Claus Vogelmeier, Jørgen Vestbo and Robert Rodriguez-Roisin. FAQs about the GOLD 2011 assessment proposal of COPD: a comparative analysis of four different cohorts. *Eur Respir J* 2013; 42: 1391-1401.
2. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic pulmonary disease, 2011. <http://www.goldcopd.org/Guidelines/guidelines-resources.html>
3. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2013_Feb20.pdf Date last updated: February 20, 2013.
4. Roberto Benzo, Kristin Vickers, Paul J. Novotny, Sharon Tucker, Johanna Hault, Pamela Neuenfeldt, John Connett, Kate Lorig, and Charlene McEvoy "Health Coaching and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rehospitalization. A Randomized Study", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 194, N° 6 (2016), pp. 672-680.
5. Miller MR, Crapo R, Hankinson J, et al. General considerations for lung function testing. *Eur Respir J* 2005; 26: 153-161.
6. Uribe Echevarría EM, Maldonado C, Uribe Echevarría A, Aoki A, Neutrophil predominance in asthmatic induced sputum. Therapeutic implication and the role of Clara cells 16-kD protein. *Medicina (Buenos Aires)* 2011; 71: 343-349.
7. Dasgupta A, Neighbour H, Nair P. Targeted therapy of bronchitis in obstructive airway diseases *Pharmacol Ther*. 2013; 140(3): 213-222.
8. Czarnetzki BM, Pawelzik B The role of eosinophils in inflammatory reactions. *Fortschr Med*. 1983 5; 101(47-48): 2167-2174.
9. Shimizu S1, Kouzaki H, Ogawa T, Takezawa K, Tojima I, Shimizu T. Eosinophil-epithelial cell interactions stimulate the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines involved in airway tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy*. 2014 Mar-Apr; 28(2): 103-109.
10. Agusti A, Edwards L, Celli B, et al. Characteristics, stability and outcomes of the GOLD 2011 COPD groups in the ECLIPSE cohort. *Eur Respir J* 2013; 42: 637-647.
11. Pauwelsa R, Calverleyb P, Buistc AS, Rennardd S, Fukuchie Y, Stahlfg E, Löfdahlf CG. COPD exacerbations: the importance of a standard definition. *Respiratory Medicine* 2004 98, 99-107.
12. Bartoli ML, Costa F, Malagrino L, et al. Sputum inflammatory cells in COPD patients classified according to GOLD 2011 guidelines. *Eur Respir J*. 2016; 47(3): 978-80.
13. Nair P. Update on clinical inflammometry for the management of airway diseases. *Can Respir J*. Mar-Apr 2013; 20(2): 117-120.