

Correspondencia

Dra. Elisa Margarita Uribe Echevarría
Centro de Microscopía Electrónica
Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Córdoba.
Ciudad Universitaria, X5000HRA Córdoba, Argentina
Teléfono +54 (351) 433 30 21
Fax +54 (351) 433 40 21

Fenotipos de inflamación en el asma bronquial

Autores Elisa Margarita Uribe Echevarría^{1*}, Cristina Maldonado¹, Dora Elsa Feliposs de Arab^{**}, Carola Coreano^{**}, Agustín Uribe Echevarría^{*}, Agustín Aoki¹

¹ Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

* Instituto de Fisiopatología Torácica del Hospital Italiano de Córdoba.

** Servicio de Alergia del Hospital Córdoba.

Resumen

Hasta la década de los 90 toda asma era exclusivamente asociada al protagonismo de los eosinófilos. Sin embargo frente a diferentes presentaciones clínicas y respuestas terapéuticas cabe interrogarse si la causa de dichas diferencias es el tipo de estímulo disparador, los mediadores químicos o la configuración citológica que en conjunto estén determinando fenotipos de asma bronquial.

Objetivo Demostrar la existencia de un fenotipo de asma con predominio neutrofílico, diferente del eosinofílico, con características clínico-funcionales definidas en asmáticos vírgenes de tratamiento con esteroides y humo del cigarrillo. Además intentaremos establecer un posible mecanismo fisiopatogénico.

Materiales y métodos 28 pacientes con asma estable; fueron sometidos a valoración de la función respiratoria y a la toma de una muestra de esputo inducido; se analizó su componente celular y LTE4 en el sobrenadante.

Resultados Se identificaron dos grupos según el predominio celular en el esputo inducido, un grupo de 16 pacientes con predominio de eosinófilos (PE) y otro de 12 pacientes con predominio de neutrófilos (PN). En el grupo PE el número de eosinófilos fue significativamente mayor que en PN ($0,28 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $0,09 \times 10^6/\text{ml}$, $p = 0,01$); en tanto que en el grupo PN, los neutrófilos fueron significativos respecto a PE ($0,32 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $0,06 \times 10^6/\text{ml}$, $p = 0,0002$). No hubo diferencias en la edad entre ambos grupos ($26,44 \pm 4,72$ en PE y $30,33 \pm 6,1$ años en PN, $p = 0,09$). Si bien no se encontró diferencia en el valor del FEV₁ entre PE y el PN ($2,95$ l/seg. vs. $2,95$ l/seg., $p = 0,9$), la labilidad del pico flujo espiratorio fue significativamente mayor en el grupo PE ($36,18$ L/min vs. $15,40$ L/min, $p = 0,008$). Los valores de LTE4 fueron más elevados en PN ($15,09$ ng/ml) con respecto al grupo PE ($5,01$ ng/ml) ($p = 0,05$).

Conclusiones Las evidencias obtenidas manifiestan la existencia de más de un fenotipo de inflamación en asmáticos vírgenes de tratamiento con esteroides inhalados y del hábito de fumar. Una población mostró predominio de eosinófilos y la otra de neutrófilos y diferencias clínico-funcionales. Los niveles más altos de LTE4 se encontraron en el grupo PN, sugiriendo que los leucotrienos estarían involucrados en dicho proceso inflamatorio. Estos hallazgos permitirían guiar estrategias terapéuticas específicas.

Palabras clave > Asma, fenotipos de inflamación, asma neutrofílica, esputo inducido.

Abstract

Background Until 1990 decade asthma was related to the protagonist of eosinophiles. However, different clinical presentations and therapeutics responses let to ask about the cause of such differences like kind of triggers, inflammation mediators or cytology influx, the combination of which determines the asthma phenotype.

Objective To demonstrate an asthma phenotype, with a predominance of neutrophils, different of eosinophilic asthma, with specific clinical and functional features in steroid-naive asthmatics and nonsmoker or current smoker patients. We will try to explain a possible pathogenic mechanism.

Methods 28 patients with stable asthma were assessed with functional respiratory test and recovery an induced sputum samples and measuring cellular component and LTE4 in the supernatant.

Results In induced sputum, two groups were identified with a predominant cell profile. One of them, (16 patients) with predominant eosinophiles (PE) and the other (12 patients), with predominant neutrophils (PN). The PE group had significantly more eosinophiles than PN ($0,28 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $0,09 \times 10^6/\text{ml}$, $p = 0,01$). In the PN group, neutrophils were statistically significant higher than in PE group ($0,32 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $0,06 \times 10^6/\text{ml}$, $p = 0,0002$). There were not differences in both of the two groups patients age ($26,44 \pm 4,72$ in PE and $30,33 \pm 6,1$ years in PN, $p = 0,09$). Although there was not difference in FEV₁ within PE and PN (2.95 l/seg. vs. 2.95 L/seg. $p = 0,9$), peak expiratory flow lability was significantly higher than in PE group (36,18 L/min Vs 15,40 L/min, $p = 0,008$). The LTE4 values were higher in PN (15,09 ng/ml) than in PE group (5,01 ng/ml) ($p = 0,05$).

Conclusions These results show the presence of more than one inflammatory phenotype in steroid-naive and nonsmoker patients. One population with a predominance of eosinophiles and the other with neutrophils. Both of them have different clinical and functional characteristics. The higher level of LTE4 in the PN group, suggest that leukotriene is involved in such inflammatory mechanisms. This evidence will allow to guide specific therapeutics strategies.

Key words > Asthma, inflammation phenotype, neutrophilic asthma, induced sputum

Introducción

La demostración de una inflamación eosinofílica característica en la vía aérea de los asmáticos llevó durante la década de los 90 a la apreciación que toda asma es expresada por una citología con predominio de eosinófilos. También, fue definida con fines farmacológicos como inflamación eosinofílica, al extremo que todo medicamento con efecto antiinflamatorio en el asma fue valorado según el descenso de los eosinófilos¹.

Frente a diferentes presentaciones clínicas y respuestas terapéuticas en grupos de asmáticos con aparente igual severidad, surgen algunos interrogantes acerca de la causa de dichas diferencias y si la misma estaría relacionada con el tipo de estímulo disparador, de los mediadores químicos y la configuración citológica, que en conjunto estén determinando fenotipos del asma bronquial.

Una serie de evidencias demostró que en la exacerbación del asma, asma ocupacional y asma severa, la célula predominante es el neutrófilo^{2,3, 4,5}. Si bien Gibson y col.⁶ demostraron un importante rol del neutrófilo en la inflamación de la vía aérea en asma no severa, sus estudios no excluyeron pacientes fumadores y/o bajo tratamientos con esteroides inhalados, situaciones que pueden, *per se*, elevar el número de neutrófilos en el esputo⁷.

Conocer las causas de la heterogeneidad del asma y sus posibles implicancias en el manejo de las mismas es el verdadero desafío.

Nuestro objetivo es demostrar la existencia de un fenotipo de asma con predominio neutrofílico, diferente del eosinofílico, con características clínico-funcionales definidas en asmáticos sin exposición a esteroides ni humo del cigarrillo. Además intentaremos establecer un posible mecanismo fisiopatogénico.

Población y métodos

Población en estudio

Se seleccionaron para este estudio, pacientes masculinos y femeninos no embarazadas con edades entre 21 y 40 años y asma estable. Los pacientes fueron reclutados del consultorio externo del Servicio de Neumonología del Hospital Italiano de Córdoba y del Servicio de Alergia del Hospital Córdoba. El proyecto fue aprobado por los Comité de Ética del Hospital Italiano y de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. A todos los pacientes se les explicó previamente los objetivos, riesgos y potenciales beneficios del estudio y expresaron su consentimiento informado por escrito.

Los criterios de inclusión fueron: a) pacientes con asma leve, moderada y severa según los criterios de GINA 2002⁸; b) ausencia de infecciones respiratorias o exacerbación del asma en las últimas 6 semanas; c) ausencia de toda enfermedad sistémica o enfermedad cardiopulmonar diferente al asma; d) no tratados con esteroides orales o inhalados, ni con inhibidores de los receptores de los leucotrienos, sólo se utilizó terapia con broncodilatadores b_2 -adrenérgicos de acción corta cuando fue necesario. Todos los pacientes debían ser no fumadores, inclusive en el pasado.

Diseño del trabajo

En la primera visita se obtuvieron las características de los pacientes por medio de un cuestionario básico, se les practicaron las pruebas cutáneas para aeroalergenos y las pruebas de función respiratoria. El paciente sólo podía recurrir a un broncodilatador b_2 adrenérgico de acción corta a demanda. Se le entregó la planilla de registro diario de síntomas y Pico de Flujo Espiratorio (PFE). A los 15 días de la primera visita se tomó la muestra de esputo inducido.

Pruebas de función pulmonar

A los pacientes se les registró una espirometría basal y otra luego de una exposición a broncodilatadores con un espirómetro Compact Vitalograph, (UK). Se aceptó la mejor de tres maniobras cuyas mediciones de CVF y FEV₁ no variaran en más de 5%, según los criterios de la American Thoracic Society⁹. Las mismas se realizaron en la primera visita y se repitieron el día de la inducción del esputo antes y después de la toma de la muestra.

Los pacientes fueron instruidos para registrar su PFE y los síntomas de asma en una planilla diaria durante 15 días previos a la recolección de esputo. La variabilidad de PFE se determinó por la diferencia entre el valor mayor y el menor registrados en el día, dividido por el valor mayor multiplicado por 100 de acuerdo a Lim y col.¹⁰.

Técnica de Inducción de esputo

El método de inducción del esputo utilizado fue el publicado previamente por Uribe y Col.¹¹. Se realizó una espirometría previa y la medición basal

del PFE seguida de una inhalación de 200 mg de salbutamol, de 20 minutos después, utilizando un inhalador de dosificación medida. A continuación se practicaron nebulizaciones con soluciones salinas de concentraciones crecientes (3%, 4% y 5%) por períodos de 7 minutos cada una y separadas por intervalos de 5 minutos.

Previo al intento de expectoración, se solicitó a los pacientes eliminar las secreciones nasales y enjuagar boca y garganta con agua corriente. El paciente fue alentado a toser enérgicamente y expectorar las secreciones bronquiales en un frasco de recolección estéril. Antes y después de cada nebulización se midió el PFE. La técnica fue suspendida si el paciente manifestaba síntomas de disconformidad respiratoria o si el PFE era menor al 20% del valor basal.

El esputo recolectado fue procesado de inmediato. En caso de que ello no fuera factible la muestra se conservó a 4° C por un período no mayor a 2 horas.

Procesamiento del esputo

El esputo inducido fue analizado según técnica previamente publicada¹¹. Se seleccionó la fracción del esputo libre de saliva, la cual fue disuelta en dithiotreitol (DTT) en un volumen 4 veces mayor al peso de la fracción. La mezcla fue agitada en un vortex durante 15 segundos y transferida a un baño María, durante 10 minutos con agitación continua. Luego se agregó tampón fosfato salino (PBS), en igual volumen de DTT y filtrado con gasa de 48 mm de espesor. El filtrado fue centrifugado a 2400-rpm. Conservándose el sobrenadante en tubos de Eppendorf a -70° C.

Para el análisis citológico, el sedimento de células fue resuspendido en 0,5 ml de PBS y la viabilidad de las células determinada con la técnica de exclusión de Azul de Tripano. El recuento celular se realizó en una cámara de Neubauer. Fue considerada una calidad aceptable de la muestra cuando la viabilidad celular era igual o mayor del 60%.

La suspensión de células se diluyó con PBS hasta obtener una concentración final de 1×10^6 células/ml. Fueron depositadas alícuotas de 50 μ l del preparado en portaobjetos de vidrios y centrifugado en citocentrífuga Shandon II a 450 r.p.m. por 6 minutos obteniéndose una monocapa (citospin). El citospin fue secado al aire y coloreado con May Grünwald-Giemsa.

Identificación de las células

El preparado de citospin fue estudiado con microscopio de luz provisto con una lente de inmersión de 100X. El recuento diferencial de macrófagos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y células epiteliales bronquiales, fue calculado sobre la base de un mínimo de 200 células no epiteliales escamosas. El porcentaje de células epiteliales escamosas fue registrado independientemente.

Dosaje de Leucotrienos: Se midieron los LTE₄ empleando el método enzimático por inmunoanálisis con un antisuero policlonal de cisteinil-leucotrieno (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)¹².

Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva para las características clínicas y demográficas de los pacientes. Se utilizaron las medias y desviación estándar de cada variable. El criterio seguido para identificar los grupos de fenotipo fue la separación según la célula predominante considerando el valor absoluto y el porcentaje de eosinófilo y neutrófilos, sin un valor de corte para las células. Así surgen dos grupos: uno con predominio de eosinófilos (PE) y el otro con predominio de neutrófilos (PN) a los cuales se los analizó estadísticamente aplicando un modelo lineal generalizado empleando una distribución gamma, con función de enlace canónica. Se empleó la prueba de Kruskal Wallis para comparar cada variable entre ambos grupos de pacientes.

Los datos fueron procesados con el programa InfoStat 2003 desarrollado por el grupo InfoStat del Departamento de Estadística de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba- Argentina

RESULTADOS

Análisis de la celularidad del esputo

Se estudió un total de 28 pacientes con diagnóstico de asma leve, moderada y severa en situación clínica estable. Los datos demográficos y las características clínicas de ambos grupos se resumen en la tabla N° 1.

Del número total de pacientes se identificaron dos grupos según el predominio celular en el esputo inducido, un grupo de 16 pacientes con pre-

dominio de eosinófilos (PE) y otro de 12 pacientes con predominio de neutrófilos (PN). El grupo PE reveló un valor de eosinófilos de $0,28 \times 10^6/\text{ml}$ versus $0,09 \times 10^6/\text{ml}$ en el grupo PN ($p = 0.01$) (gráfico N° 1). El valor de neutrófilos fue mayor en el grupo PN que el grupo PE $0,32 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $0.06 \times 10^6/\text{ml}$ respectivamente ($p = 0.0002$). No hubo diferencias significativas en la edad de los pacientes entre ambos grupos, $26,44 \pm 4.72$ años en el grupo PE y $30,33 \pm 6.1$ años en el grupo PN ($p = 0,09$). El grado moderado (50%) de gravedad del asma predominó en el grupo PE mientras que el grado leve (50%) fue más frecuente en el grupo PN. No hubo diferencia estadísticamente significativa en el valor del FEV₁ entre el grupo Pe y el PN 2.95 l/seg y 2.95 L/seg ($p = 0,9$) respectivamente (gráfico N° 2). Sin embargo hubo diferencia significativa en la labilidad del PFE $36,18 \text{ L/min}$ en el grupo PE y $15,40$ en el grupo PN ($p = 0.008$) (gráfico N° 3).

Tabla N° 1: Características de los pacientes estudiados (N = 28)

| Características | pe | pn |
|--|------------------|------------------|
| N° pacientes (%) | 16 (57) | 12 (43) |
| Mujeres/varones | 8/8 | 9/3 |
| Edad (años) | $26,44 \pm 4.72$ | $30,33 \pm 6.17$ |
| Gravedad del asma n° (%) | | |
| leve | 4 (25) | 6 (50) |
| moderada | 8 (50) | 4 (17) |
| severa | 4 (25) | 2 (33) |
| Pruebas cutaneas aeroalergeno n° (%) | 16 (100) | 12 (100) |
| Cigarrillos (paquete/año) | 0 | 0 |
| Tratamiento esteroides | 0 | 0 |
| Tratamiento inhibidores receptores de leucotrienos | 0 | 0 |

Tabla N° 2: Análisis de los componentes del esputo inducido.

| Citospin | pe | pn |
|--|-------------------|--------------------|
| N° eosinófilos $\times 10^6/\text{ml}$ | 0.28 ± 0.22 * | 0.09 ± 0.08 |
| N° neutrófilos $\times 10^6/\text{ml}$ | 0.06 ± 0.07 | 0.32 ± 0.22 * |
| Eosinófilos % | 30 ± 22.8 * | 10.42 ± 9.6 |
| Neutrófilos % | 7.77 ± 7.54 | 36.29 ± 24.4 * |
| Sobrenadante | | |
| LTE4 ng/ml | 5.01 ± 3.26 | 15.09 ± 5.71 * |

* P < 0,05

Dosaje de LTE₄ en el sobrenadante del esputo inducido

Los valores hallados fueron significativamente más elevados en el grupo PN que en el grupo PE, 15,09 ng/ml versus 5,01 ng/ml respectivamente ($p = 0,05$) (gráfico N° 4).

Discusión

En este trabajo se caracterizaron dos grupos de pacientes asmáticos definidos por el predominio

del tipo celular y rasgos clínicos - funcionales que constituyen dos fenotipos diferentes.

El análisis del esputo inducido ha adquirido en la actualidad un rol relevante en la identificación y monitoreo de la inflamación de la vía aérea en asmáticos. La eosinofilia en el esputo representa una característica distintiva del asma; sin embargo no siempre se observa una correlación entre los parámetros del esputo y parámetros clínicos o funcionales¹³. De ello se infiere que la inflamación estaría determinada no sólo por la presencia de eosinófilos en el bronquio y que en la heterogeneidad del asma podrían estar además involucradas otras células y mediadores químicos en su fisiopatología.

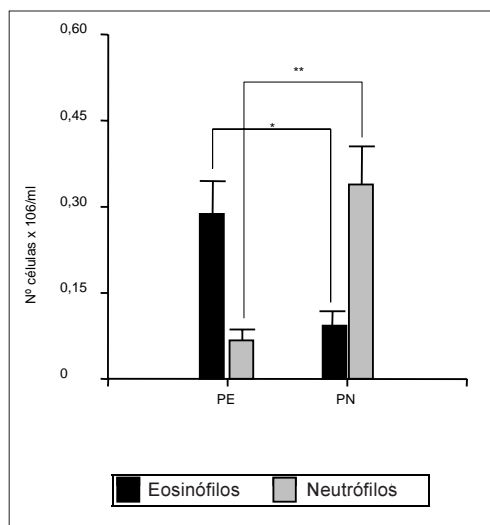


Gráfico N° 1: Representación de dos grupos de pacientes asmáticos según identificación celular. Recuento celular en preparado de citospin de muestra de esputo inducido. En el grupo PE la célula predominante es el eosinófilo con una media significativamente mayor en comparación con el valor de la media de los eosinófilos del grupo PN ($*p=0.001$). En el grupo PN la célula predominante es el neutrófilo, valor de la media significativamente mayor en comparación a la del grupo PE. ($**p=0.0002$).

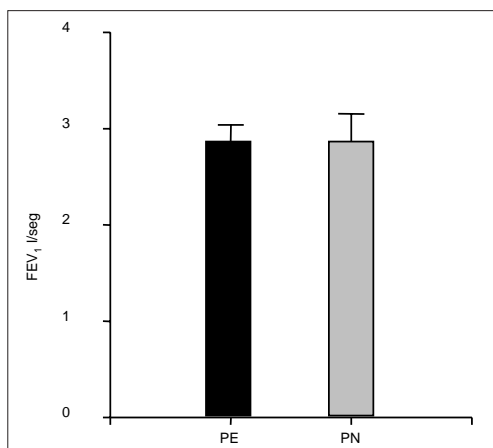


Gráfico N° 2: Representación del FEV₁ en ambos grupos de asmáticos PE y PN. La diferencia del valor de las medias entre ambos grupos no es significativa.

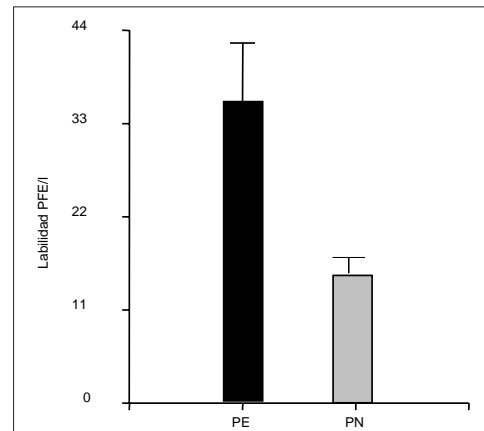


Gráfico N° 3: Labilidad del PFE/1 en ambos grupos de asmáticos PE y PN. La diferencia entre los valores de las medias de ambos grupos es significativa ($p=0.008$).

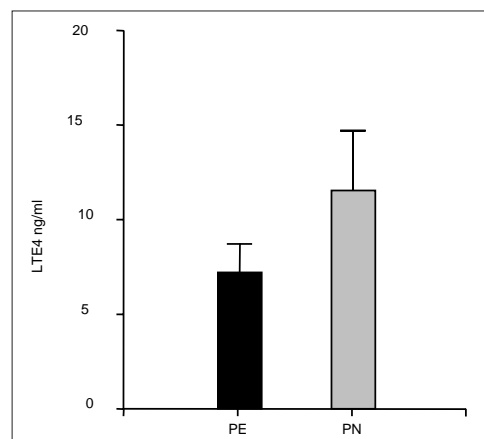


Gráfico N° 4: Niveles de LTE₄ en el grupo de asmáticos PE y PN. Medido con la técnica de ELISA en el sobrenadante de muestras de esputo inducido. El valor de la media de LTE₄ en el grupo PN es significativamente mayor en comparación al grupo PE ($p=0.05$).

En este estudio hemos puesto de manifiesto dos poblaciones de asmáticos, una con predominio de eosinófilos y la otra en la que predomina el neutrófilo. Es de resaltar que nos referimos al término de inflamación de la vía aérea con predominio de eosinófilos o neutrófilos y no a una inflamación eosinofílica o no eosinofílica como ha sido definida con anterioridad por otros autores¹⁴. La terminología propuesta es avalada por los significativamente diferentes rasgos clínicos-funcionales.

En trabajos previos se vinculó al neutrófilo como participante del asma severa^{15,16} y crónica¹⁷, y en la exacerbación del asma o en el asma por exposición laboral a agentes de bajo peso molecular¹⁸. En este trabajo hemos identificado el predominio de los neutrófilos en el esputo de una población de pacientes con asma estable, cuyo FEV₁ no difería del grupo de asmáticos con predominio de eosinófilos pero que significativamente presentaban una menor labilidad del PEF en relación a estos últimos. En este sentido, Virchow y col.,1992, mostraron que el nivel de proteína catiónica del eosinófilo estaba estrechamente relacionada parámetros de la función pulmonar¹⁹, lo que podría explicar la mayor hiperreactividad bronquial, en el grupo PE con respecto al grupo de asmáticos PN.

Green y col.⁷ también observaron neutrófilos en el esputo inducido de asmáticos adultos, sin embargo dentro de la población estudiada un número considerable de asmáticos eran fumadores que aunque no recientes, cabe el interrogante de la influencia de la exposición al humo de cigarrillo en la génesis de la inflamación por neutrófilos; hallazgos corroborados en nuestro trabajo previo donde sujetos sanos fumadores leves asintomáticos y con espirometría normal presentaban un significativo número de neutrófilos en relación al grupo control¹¹.

Por otro lado, y a pesar de ser un dato controvertido, el tratamiento con corticoides orales o inhalados puede aumentar el número de neutrófilos en el esputo¹. En este trabajo se han tomado criterios de selección muy estrictos al excluir a pacientes asmáticos fumadores recientes, ex fumadores o fumadores pasivos, y los que a su vez nunca recibieron tratamiento antiasmático específico, de esta manera se aseguró una población sin factores de confusión.

Recientemente Douwes J y col.²⁰ observaron que la mayoría de los estudios de asma no eosinofílica

están asociados con un aumento de neutrófilos y del nivel de IL-8, sugiriendo que un mecanismo no alérgico estaría involucrado en la inflamación neutrofílica del asma. Curiosamente este perfil inflamatorio parece ser muy similar a aquél descrito en el asma ocupacional no eosinofílica y es consistente con la activación de mecanismos inmunes innatos, mediando los procesos inflamatorios en el asma no eosinofílica. Sin embargo en nuestro trabajo, ambos grupos de pacientes eran alérgicos, lo que permite concluir que la neutrofilia no es privativa del asma no atópico, surgiendo así otro probable mecanismo fisiopatogénico.

Los pacientes con PN presentaron valores significativamente más elevados de LTE₄ en el esputo inducido que en el grupo PE. Estos hallazgos sugieren que en el probable mecanismo mediador de la inflamación de la vía aérea con predominio de neutrófilos estaría involucrada la vía de leucotrienos. Es bien conocido el efecto quimiotáctico de los neutrófilos dependiente de LTB₄¹. En un estudio reciente se ha demostrado que los inhibidores de los leucotrienos administrados por vía oral aumenta la apoptosis de los neutrófilos en sangre periférica de pacientes con bronquitis crónica²⁴, vinculándose así nuevamente a los leucotrienos con el aumento de neutrófilos.

Además, Rodríguez Roisín y col.²¹ le atribuyeron al factor activador de plaquetas o PAF (platelet activating factor) precursor de leucotrienos, una participación directa en la fisiopatología del asma. La exposición de asmáticos a PAF por vía inhalatoria, provoca una respuesta inflamatoria similar al asma. En el esputo de éstos pacientes se observó un predominio de neutrófilos a partir de la tercera hora de la provocación y un aumento de la excreción de leucotrienos en orina²².

Con estos elementos disponibles es factible argumentar nuevos mecanismos fisiopatogénicos en el asma bronquial. Ellos permitirían guiar estrategias terapéuticas para el control de la enfermedad, ya que, es conocido que los corticoides son capaces de reducir la concentración de eosinófilos por apoptosis, aunque no tienen efectos sobre la población de neutrófilos²³.

Este trabajo presenta resultados parciales de un proyecto que pretende demostrar respuestas terapéuticas de ambos fenotipos de inflamación como también descubrir marcadores de pronóstico del asma bronquial. Si bien el número de la

muestra es aun reducido para extraer conclusiones definitivas, se destaca la importancia de los resultados obtenidos hasta el presente dada la estricta selección de pacientes y la dificultad que ésta plantea para reunir un número mayor; especialmente en esta etapa del desarrollo de la ciencia en que el asma se somete a tratamientos antiinflamatorios inmediatos, especialmente con esteroides inhalados.

También se enfatiza nuevamente la utilidad del esputo inducido para identificar y caracterizar mejor la inflamación al proveer resultados relevantes en la caracterización farmacológica de esta patología.

Se concluye que las evidencias obtenidas manifiestan la existencia de más de un fenotipo de inflamación en una población de asmáticos sin exposición a la acción de esteroides inhalados y del hábito de fumar. Una población con predominio de eosinófilos y otra con predominio de neutrófilos y niveles más altos de LTE₄, sugieren que los leucotrienos estarían involucrados en dicho proceso inflamatorio.

Bibliografía

- O'Donnell RA, Frew AJ. Is there more than one inflammatory phenotype in asthma? *Thorax*. 2002; 57(7): 566-568.
- Wenzel SE, Szefer SJ, Leung DY, et al. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:737-743.
- Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, et al. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1185-1190.
- Fahy JV. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:843-852.
- Sur S, Crotty TB, Kephart GM, et al. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis* 1993;148:713-719.
- Gibson PG., Jodie L. Simpson BS, Saltos N. Heterogeneity of Airway Inflammation in Persistent Asthma. Evidence of Neutrophilic Inflammation and Increased Sputum Interleukin-8 *Chest*. 2001;119:1329-1336.
- Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2002;57(10):875-879.
- Global strategies for asthma management and prevention, National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. NIH Publication No 02-3659. 2002. www.ginasthma.com. Last updated: continuous. Last viewed: November 4 2002
- American Thoracic Society (statement). 1987. Standardization of spirometry- 1987. Update. *Am. Rev. Respir. Dis* 136: 1285-1298
- Lim S, Jatakanon A, John M, Gilbey T, O'connor BJ, Chung KF, Barnes PJ. Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation. Assessment by various inflammatory markers in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 ;159(1):22-30.
- Uribe Echevarría E. M., Pérez P., Bonaterra M., Maldonado C., Uribe Echevarría A., Aoki A. Seguridad, reproducibilidad y validación de la técnica del esputo inducido. 2003 *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica*, 2003;34:2:41-46
- Pizzichini E. Pizzichini M. M. M., Kidney J. C., Efthimiadis A., Hussack P., Popov T., Cox G., Dolovich J., O'Byrne P., Hargreave F. E.: Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subset and soluble markers compared. *Eur. Respir. J.* 1998; 11: 828-834.
- Rosi E, Scano G. Association of sputum parameters with clinical and functional measurements in asthma. *Thorax*. 2000 ;55(3):235-238.
- Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J*. 2000;16(1):150-158.
- Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(5 Pt 1):1532-159.
- Hamilton LM, Torres-Lozano C, Puddicombe SM, Richter A, Kimber I, Dearman RJ, Vrugt B, Aalbers R, Holgate ST, Djukanovic R, Wilson SJ, Davies DE., The role of the epidermal growth factor receptor in sustaining neutrophil inflammation in severe asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(2):233-240.
- Little SA, MacLeod KJ, Chalmers GW, Love JG, McSharry C, Thomson NC. Association of forced expiratory volume with disease duration and sputum neutrophils in chronic asthma. *Am J Med*. 2002 15;112(6):498-500.
- Lemière C, Chabouillez S, Malo JL, cartier A. changes in sputum cell counts after exposure to occupational agents: what do they mean? *J allergy Clin Immunol* 2001; 107:1063-1068.
- Virchow JC Jr, Holscher U, Virchow C Sr. Sputum ECP levels correlate with parameters of airflow obstruction *Am Rev Respir Dis*. 1992 ;146(3):604-606.
- Douwes J, Gibson PG, Pekkanen J and Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002; 57:643-648.
- Rodriguez Roisin R.: Acute severe asthma: pathophysiology and pathobiology of gas exchange abnormalities. *Eur. Respir. J*. 1997; 10:1359-1371.
- Gabrijelcic J, Acuna A, Profita M, Paterno A, Chung KF, Vignola AM, Rodriguez-Roisin R. Neutrophil airway influx by platelet-activating factor in asthma: role of adhesion molecules and LTB₄ expression *Eur Respir J*. 2003; 22(2):290-297.
- Doerschuk C. M: Neutrophil rheology and transit through capillaries and sinusoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1693-1695.
- Lee E., Lindo T., Jackson N., Meng-Choong L., Reynolds P., Hill A., Haswell M., Jackson S., Kilfeather S.: Reversal of human neutrophil survival by Leukotriene B₄ receptor blockade and 5-Lipoxygenase and 5-Lipoxygenase activating protein inhibitors. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 1999; 160: 2079-2085.