



ORIGINAL BREVE

## Monitorización del tratamiento en el asma bronquial mediante determinación de fracción exhalada de óxido nítrico, eosinófilos y leucotrieno B<sub>4</sub> en esputo inducido de población infantil



G. Vizmanos-Lamotte<sup>a,\*</sup>, M.J. Cruz<sup>b,f</sup>, S. Gómez-Ollés<sup>b,f</sup>, X. Muñoz<sup>b,c,f</sup>,  
I. de Mir Mesa<sup>d</sup> y A. Moreno-Galdó<sup>d,e</sup>

<sup>a</sup> Servei de Pediatria, Hospital Nostra Senyora de Meritxell, Escaldes-Engordany, Principat d'Andorra

<sup>b</sup> Servicio de Neumología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

<sup>c</sup> Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

<sup>d</sup> Unidad de Neumología Pediátrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

<sup>e</sup> Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

<sup>f</sup> CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), España

Recibido el 13 de febrero de 2014; aceptado el 17 de marzo de 2014

Disponible en Internet el 22 de mayo de 2014

### PALABRAS CLAVE

Asma;  
Niños;  
Eosinófilos en esputo;  
Fracción exhalada  
de óxido nítrico;  
Leucotrieno B<sub>4</sub>

**Resumen** Los eosinófilos en esputo inducido y la fracción exhalada de óxido nítrico (FE<sub>NO</sub>) constituyen marcadores de inflamación en el asma, producida por citocinas, cisteinil-leucotrienos y leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>).

El objetivo de este trabajo es determinar su utilidad en la monitorización del tratamiento del asma en niños.

Se realizó determinación de FE<sub>NO</sub>, eosinófilos y LTB<sub>4</sub> en esputo inducido a 10 niños (9-15 años) asmáticos y 4 meses después, tras iniciar o incrementar el tratamiento de base, se volvieron a repetir las mismas determinaciones. Se apreció una tendencia a la disminución de los valores de la FE<sub>NO</sub> (p=0,15), una mejoría de la función pulmonar (p=0,10) y una disminución significativa del porcentaje de eosinófilos (p=0,003) respecto a la determinación basal. No hubo diferencias en la concentración de LTB<sub>4</sub> (p=0,88).

El recuento de eosinófilos en esputo parece una determinación más precisa para el seguimiento de la inflamación en los niños asmáticos que la FE<sub>NO</sub>.

© 2014 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [gerardovizmanos@gmail.com](mailto:gerardovizmanos@gmail.com) (G. Vizmanos-Lamotte).

**KEYWORDS**

Asthma;  
 Children;  
 Sputum eosinophils;  
 Exhaled fractional  
 nitric oxide;  
 Leukotriene B<sub>4</sub>

## Determining asthma treatment in children by monitoring fractional exhaled nitric oxide, sputum eosinophils and leukotriene B<sub>4</sub>

**Abstract** Sputum eosinophils and exhaled fractional nitric oxide (FE<sub>NO</sub>) are markers of airway inflammation in asthma. Cytokines, cysteinyl-leukotrienes and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) are responsible for this inflammation.

The aim of this study is to determine the usefulness of these markers in monitoring asthma treatment in children.

FE<sub>NO</sub>, sputum eosinophils, and LTB<sub>4</sub> in induced sputum were performed in 10 children (9-15 years old). These determinations were repeated four months later, after the beginning or an increase in the treatment. FE<sub>NO</sub> values tended to decrease ( $P=.15$ ), pulmonary function tended to improve ( $P=.10$ ), and sputum eosinophils decreased ( $P=.003$ ) compared to the first determination. There were no differences in LTB<sub>4</sub> concentrations ( $P=.88$ ).

Sputum eosinophils seem to be more precise than FE<sub>NO</sub> in the monitoring of inflammation in asthmatic children.

© 2014 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

La «inflamometría» incluye diferentes técnicas que permiten determinar y monitorizar la inflamación en el asma bronquial, para mejorar su control<sup>1</sup>. Los eosinófilos en esputo inducido (SPEos) constituyen uno de estos marcadores, útiles en el manejo y monitorización de la enfermedad. Por otro lado, la determinación de la fracción exhalada de óxido nítrico (FE<sub>NO</sub>), nos permite establecer indirectamente el grado de inflamación eosinofílica<sup>2-4</sup>, aunque trabajos recientes cuestionan la correlación entre FE<sub>NO</sub> y SPEos<sup>5</sup>.

La inflamación en el asma está producida por citocinas y leucotrienos que producen los cambios de la vía aérea<sup>6-9</sup>, habiéndose demostrado una relación entre leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) y eosinófilos, y una disminución de la concentración de LTB<sub>4</sub> en el esputo inducido de pacientes con tratamiento corticosteroideo inhalado, tanto en el asma eosinofílico como no eosinofílico<sup>10</sup>.

Existen pocos estudios en niños que determinen la utilidad de la FE<sub>NO</sub> junto a los SPEos para la monitorización de la inflamación en el tratamiento del asma bronquial con glucocorticoides inhalados (GCI)<sup>11,12</sup>. En cuanto al LTB<sub>4</sub>, no existen trabajos en los que se haya determinado en esputo inducido de niños asmáticos.

El objetivo de este trabajo es determinar la utilidad de la medición de la FE<sub>NO</sub>, SPEos y LTB<sub>4</sub> en esputo inducido en la monitorización del tratamiento combinado con GCI y agonistas β<sub>2</sub> de acción larga inhalados del asma bronquial en niños.

## Material y métodos

### Diseño y población

Estudio prospectivo de intervención de una muestra de 10 niños con asma atópica, de 9 a 15 años de edad, seleccionados por orden cronológico, y según la disponibilidad del laboratorio, en un período de 6 meses, en consultas de

neumología pediátrica. Se les realizó determinación basal de FE<sub>NO</sub>, SPEos y LTB<sub>4</sub> en esputo inducido y 4 meses después de iniciar o incrementar el tratamiento de base se les volvió a repetir las mismas determinaciones. Se obtuvo consentimiento informado de los padres para la participación en el estudio de cada paciente y para cada inducción de esputo. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.

### Criterios de inclusión

Niños de 9 a 15 años de edad con asma atópica de 0 a 2 años de evolución, independientemente de su gravedad. Se estableció el diagnóstico de asma si el paciente presentaba clínica compatible y una prueba broncodilatadora positiva (aumento del FEV<sub>1</sub> ≥ 12% y ≥ 200 ml respecto al valor inicial)<sup>13</sup> y de atopia si presentaba test cutáneos positivos y/o IgE específica elevada (sistema ImmunoCAP®-Phadia) a neuroalérgenos habituales.

### Criterios de exclusión

Niños afectados de otras enfermedades respiratorias crónicas, o asmáticos con una infección de vías respiratorias o una exacerbación aguda en el último mes, definida como dificultad respiratoria y necesidad de corticoides orales.

### Fracción exhalada de óxido nítrico

Se determinó la FE<sub>NO</sub> mediante un analizador de quimioluminiscencia (modelo NIOX®; Aerocrine, Suecia), siguiendo las recomendaciones de la *American Thoracic Society* (ATS) y de la *European Respiratory Society* (ERS)<sup>14</sup>.

### Esputo inducido

La inducción de esputo se realizó mediante nebulización de suero salino hipertónico a dosis crecientes según método descrito por Pizzichini et al.<sup>15</sup> y Vizmanos Lamotte et al.<sup>16</sup>. El procesado de la muestra de esputo inducido se realizó

**Tabla 1** Valores individuales de FE<sub>NO</sub> y de eosinófilos en esputo inducido en las determinaciones basal y de seguimiento

Casos	Tratamiento previo	Tratamiento instaurado	Clasificación asma	FE <sub>NO</sub> (ppb) (basal)	FE <sub>NO</sub> (ppb) (seguimiento)	Eosinófilos en esputo (%) (basal)	Eosinófilos en esputo (%) (seguimiento)
1	0	Flut 400 μg/día Salm 200 μg/día	3	40	26	22	2
2	Flut 200 μg/día Mont 5 mg	Flut 750 μg/día Salm 150 μg/día	3	50	11	29	No muestra
3	0	0	2	16	4	0	0
4	0	Bud 320 μg/día Form 9 μg/día	3	10	5	6	5
5	0	Bud 320 μg/día Form 9 μg/día	3	30	7	27	No muestra
6	Bud 320 μg/día Form 9 μg/día	Bud 640 μg/día Form 18 μg/día	4	40	19	7	0
7	Bud 320 μg/día Form 9 μg/día	Bud 640 μg/día Form 18 μg/día	4	24	18	4	1
8	Bud 320 μg/día Form 9 μg/día Mont 5 mg	Bud 640 μg/día Form 18 μg/día	3	93	45	9	0
9	0	Bud 320 μg/día Form 9 μg/día	3	204	188	25	3
10	0	Bud 320 μg/día Form 9 μg/día	4	50	56	10	0

Bud: budesónida; Flut: fluticasona; Form: formoterol; Salm: salmeterol; Mont: montelukast.

Clasificación asma (GEMA 2009): 1: episódica ocasional; 2: episódica frecuente; 3: persistente moderada; 4: persistente grave.

según el mismo método<sup>15,16</sup>. A partir del sedimento celular se determinó la viabilidad celular y se realizó recuento total y diferencial de células previa tinción con May Grünwald-Giemsa. Se consideró eosinofilia en el esputo inducido un valor de eosinófilos en esputo  $\geq 2,5\%$ <sup>17</sup>.

A partir del sobrenadante, se determinó la concentración de LTB<sub>4</sub> mediante ensayo inmunoenzimático competitivo (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EE.UU.), con sensibilidad de 13 pg/ml<sup>18</sup>.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa estadístico SPSS® versión 15.0. Al tratarse de una muestra pequeña se aplicó la prueba no paramétrica de la *U* de Mann-Whitney. Se consideraron significativos valores de  $p < 0,05$ . Los resultados se expresaron como mediana y rango intercuartílico.

### Resultados

Se han estudiado 10 niños con asma atópica: 6 sin tratamiento y 4 con GCI (dosis media equivalente de budesónida: 320 μg) asociados o no a agonistas beta de acción larga y montelukast.

En la [tabla 1](#) se muestran los valores de la FE<sub>NO</sub> y de los SPEos (basal y seguimiento) en cada caso. No se obtuvo 2.ª muestra de esputo en 2 casos, y en uno no se inició tratamiento por tratarse de un paciente con buen control de su asma. En la [tabla 2](#) se muestra la comparación entre

los valores espirométricos, FE<sub>NO</sub> y celularidad, y LTB<sub>4</sub> en el esputo inducido entre la visita basal y la de seguimiento realizada a los 4 meses. En ningún paciente existió exacerbación de su asma. En la determinación basal se objetivó un número elevado de los SPEos en todos excepto en un caso ([tabla 1](#)). La FE<sub>NO</sub> no fue elevada en todos los casos e incluso en algunos con eosinofilia en esputo, la FE<sub>NO</sub> fue normal ([tabla 1](#)). En el seguimiento se apreció una tendencia a la disminución de los valores de la FE<sub>NO</sub> ( $p = 0,15$ ) y una mejoría de la función pulmonar ( $p = 0,10$ ) respecto a la determinación basal. El porcentaje de eosinófilos en esputo disminuyó de forma significativa ( $p = 0,003$ ), sin que se observaran diferencias en el resto de poblaciones celulares, ni en el recuento celular total ( $p = 0,07$ ), ni en la concentración de LTB<sub>4</sub> ( $p = 0,88$ ) en esputo inducido ([tabla 2](#)).

### Discusión

En este trabajo se han estudiado las características celulares del esputo inducido en niños asmáticos atópicos de forma seriada. Después de instaurar o aumentar el tratamiento corticoideo inhalado, el único parámetro que mejoró fue la eosinofilia en esputo. Al no tratarse de un estudio en el que se compararan los diferentes parámetros para el manejo de los pacientes asmáticos (grado de control de la enfermedad versus FE<sub>NO</sub> versus SPEos), no podemos concluir qué determinación es más útil para conseguir un mejor control de la enfermedad asmática en niños. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se observó un descenso significativo de los eosinófilos, siendo este descenso más acusado y significativo que el cambio en el resto de parámetros estudiados. En los

**Tabla 2** Comparación entre los valores de la espirometría, FE<sub>NO</sub> y celularidad y LTB<sub>4</sub> en esputo inducido en los pacientes en las determinaciones basal y de seguimiento. Valores expresados como mediana y rango intercuartílico

	Basal	Seguimiento	Valor de p
FEV <sub>1</sub> (L)	2,38 (1,58-2,89)	2,74 (2,14-3,07)	0,26
FVC (L)	3,36 (2,10-4,03)	3,55 (2,55-4,16)	0,41
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	72 (60-83)	81 (74-86)	0,10
FE <sub>NO</sub> (ppb)	40 (22-61)	19 (7-48)	0,15
Eosinófilos en esputo (%)	9,5 (5,5-25,5)	0,5 (0-2,8)	0,003
Neutrófilos en esputo (%)	48 (31,3-71,8)	46 (28-61,5)	0,66
Linfocitos en esputo (%)	0,5 (0-4,3)	1,5 (0,3-3,5)	0,71
Macrófagos en esputo (%)	36,5 (8-51,8)	50,5 (34,8-69)	0,14
Células totales en esputo ( $\times 10^6$ cèl/ml)	0,60 (0,40-2,54)	0,20 (0,07-0,83)	0,07
LTB <sub>4</sub> en esputo (pg/ml)	2.279 (570-25.127)	2.094 (946-5.972)	0,88

FE<sub>NO</sub>: fracción exhalada de óxido nítrico; FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; LTB<sub>4</sub>: leucotrieno B<sub>4</sub>.

casos 9 y 10 existió una mejoría clínica, a pesar de la invariabilidad de los valores elevados de la FE<sub>NO</sub>. En conjunto, con la limitación del tamaño muestral, se apreció una tendencia a la disminución (mejoría) de los valores de la FE<sub>NO</sub>, y a la mejoría de la función pulmonar sin alcanzar significación estadística, aunque el descenso en la FE<sub>NO</sub> en algún caso fue mínimo o incluso se produjo un aumento.

La utilización conjunta de la determinación de la FE<sub>NO</sub> y los SPEos en niños con asma no ha sido muy estudiada, principalmente por el papel cuasi experimental de los SPEos. Paro-Heitor et al.<sup>11</sup> concluyeron que las determinaciones seriadas de la FE<sub>NO</sub> reflejan la acción antiinflamatoria del tratamiento con GCI en el asma. Por su parte, Li et al.<sup>12</sup> concluyeron que la monitorización de la inflamación en el asma mediante determinación tanto de la FE<sub>NO</sub> como de los SPEos es útil para la modificación del tratamiento. Green et al.<sup>19</sup> demuestran que la monitorización de los SPEos es superior a la FE<sub>NO</sub> en la predicción de una exacerbación.

En este estudio no se observaron diferencias en las concentraciones de LTB<sub>4</sub> entre las 2 determinaciones, lo que contrasta con los resultados obtenidos por Basyigit et al.<sup>10</sup> en adultos asmáticos. Nuestros resultados no indican que la concentración de LTB<sub>4</sub> sea un parámetro muy sensible para la monitorización de la respuesta al tratamiento del asma atópico infantil.

Una limitación de nuestro estudio es el escaso número de pacientes, debido a lo laboriosa que resulta la técnica de la inducción de esputo en niños y a la dependencia de un laboratorio en el que poder procesar la muestra. Otro aspecto que no se tuvo en cuenta fue la utilización de cuestionarios de control del asma, lo que hubiera aportado una información muy útil.

La determinación de los SPEos se encuentra prácticamente limitada al campo de la investigación, aunque de nuestro estudio como del de Fleming et al.<sup>20</sup> se desprende que en casos concretos, como en el asma de difícil control, puede ser más precisa que la FE<sub>NO</sub>.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Bush A, Eber E. The value of FeNO measurement in asthma management: The motion for Yes, it's NO-or, the wrong end of the Stick! *Paediatr Respir Rev.* 2008;9:127-31.
- Cobos Barroso N, Pérez-Yarza EG, Sardón Prado O, Reverté Bover C, Gartner S, Korta Murua J. Óxido nítrico exhalado en niños: un indicador no invasivo de la inflamación de las vías aéreas. *Arch Bronconeumol.* 2008;44:41-51.
- Sivan Y, Gadish T, Fireman E, Soferman R. The Use of exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma in school children. *J Pediatr.* 2009;155:211-6.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest.* 2006;130:1541-6.
- BoehmerA.L. Paediatric asthma: Everything that seemed to be certain no longer is. *Paediatr Respir Rev.* 2010;11:185-90.
- Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2008;118:3546-56.
- Holgate S, Peters-Golden M, Panettieri R, Henderson WJ. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:518-34.
- Miyahara N, Ohnishi H, Miyahara S, Takeda K, Matsubara S, Matsuda H, et al. Leukotriene B<sub>4</sub> release from mast cells in IgE-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40:672-82.
- Vizmanos-Lamotte G, Moreno-Galdó A, Muñoz X, Gómez-Ollés S, Gartner S, Cruz MJ. Induced sputum cell count and cytokine profile in atopic and non-atopic children with asthma. *Pediatr Pulmonol.* 2013;48:1062-9.
- Basyigit I, Yildiz F, Ozkara SK, Boyaci H, Ilgazli A. Inhaled corticosteroid effects both eosinophilic and non-eosinophilic inflammation in asthmatic patients. *Mediators Inflamm.* 2004;13:285-91.
- Paro-Heitor ML, Bussamra MH, Saraiva-Romanholo BM, Martins MA, Okay TS, Rodrigues JC. Exhaled nitric oxide for monitoring childhood asthma inflammation compared to sputum analysis, serum interleukins and pulmonary function. *Pediatr Pulmonol.* 2008;43:134-41.
- Li AM, Tsang TW, Lam HS, Sung RY, Chang AB. Predictors for failed dose reduction of inhaled corticosteroids in childhood asthma. *Respirology.* 2008;13:400-7.
- Gema 2009. Guía española para el manejo del asma. Madrid: Luzán 5, SA; 2009.
- American Thoracic Society, European Respiratory Journal. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory

- nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:912–30.
15. Pizzichini E, Pizzichini M, Efthimiadis A, Evans S, Morris M, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: Reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit care Med.* 1996;154:308–17.
  16. Vizmanos Lamotte G, Moreno Galdó A, Cruz Carmona MJ, Muñoz Gall X, Gómez Olles S, de Mir Messa I, et al. Inducción de esputo en niños: desarrollo técnico. *An Pediatr (Barc).* 2010;72:199–204.
  17. Gibson PG, Grootendor DC, Henry RL, Pin I, Ryttila PH, Wark P, et al. Sputum induction in children. *Eur Respir J Suppl.* 2002;37:44s–6s.
  18. Kostikas K, Gaga M, Papatheodorou G, Karamanis T, Orphanidou D, Loukides S. Leukotriene B4 in exhaled breath condensate and sputum supernatant in patients with COPD and asthma. *Chest.* 2005;127:1553–9.
  19. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: A randomised controlled trial. *Lancet.* 2002;360:1715–21.
  20. Fleming L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Use of sputum eosinophil counts to guide management in children with severe asthma. *Thorax.* 2012;67:193–8.