

# Recuento diferencial celular en muestras de esputo inducido de pacientes asmáticos como mediadores inflamatorios de la vía aérea

## Differential cell count in induced sputum samples from asthmatic patients as inflammatory mediators of the airway

Glenda Ernst<sup>1,2</sup>, Bethy Camargo<sup>3</sup>, Josefina Pascua<sup>2</sup>, Fernando Ditullio<sup>2</sup>, Tamara Décima<sup>1</sup>, Martín Bosio<sup>2</sup>, Alejandro Salvado<sup>2</sup>

### RESUMEN

El recuento celular diferencial en muestras de esputo inducido con solución salina hipertónica es una herramienta que sumada a evidencia clínica permite fenotipificar los pacientes con enfermedades inflamatorias de la vía aérea. Esta técnica es mínimamente invasiva y se ha demostrado su seguridad. Sin embargo, requiere que las muestras obtenidas sean procesadas frescas en manos expertas. Este trabajo detalla las características de los tipos de inducción y de la técnica de procesamiento y recuento del esputo. Conocer el fenotipo de los pacientes permite optimizar la adecuación del tratamiento personalizado.

**Palabras clave:** esputo inducido, recuento diferencial.

### ABSTRACT

Differential cell count in sputum samples induced with hypertonic saline is a useful tool when added to clinical evidence, permitting the phenotyping of patients with inflammatory diseases of the airways. This technique is minimally invasive, and its safety has been demonstrated. However, it requires that the samples obtained be processed promptly in expert hands. This paper details the characteristics of the types of induction, and the technique of sputum processing and cell counting. Knowing the phenotype of patients allows us to optimize the adequacy of personalized treatment.

**Keywords:** induced sputum, differential count.

Fronteras en Medicina 2018;13(1):36-39

La inducción del esputo es una técnica mínimamente invasiva, reproducible, que ha sido validada y permite discriminar diferentes tipos de inflamación. Por esta razón constituye una potencial herramienta para el manejo y seguimiento de enfermedades inflamatorias de la vía aérea<sup>1-3</sup>.

Esta técnica facilita la expectoración de las secreciones bronquiales mediante una serie de nebulizaciones con solución salina hipertónica, lo que incrementaría la osmolaridad y permeabilidad vascular en la mucosa estimulando la producción de moco de las glándulas submucosas. El procedimiento es simple y seguro,

aunque es necesario realizarlo en centros que cuenten con personal especializado y la infraestructura requerida para el inmediato procesamiento de las muestras. Se ha descrito su utilización tanto en niños mayores de 5 años como en adultos, obteniendo muestras representativas en un rango variable entre el 68 y el 100%. En general, este procedimiento es bien tolerado, aunque se pueden presentar ocasionales efectos adversos que incluyen tos, broncoespasmos, vómitos y ansiedad. También se han realizado estudios en pacientes con asma severa y pacientes con EPOC en exacerbaciones agudas que demuestran su seguridad<sup>4,5</sup>.

### PROTOCOLO DE INDUCCIÓN

La técnica de inducción del esputo fue descrita inicialmente en 1992, y desde entonces se han comunicado algunas modificaciones. Brevemente, se debe realizar la medición del flujo espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) pre- y posadministración de broncodilatador (200 µg de salbutamol con aerosol presurizado con aerocámara pediátrica bivalvulada) para conocer la función pulmonar basal del paciente. Esto permite determinar tanto la concentración de solución salina hi-

1. Departamento de Docencia, Hospital Británico.
2. Servicio de Neumonología, Hospital Británico.
3. Servicio de Neumonología, Hospital Gutiérrez.

Correspondencia: Dra. Glenda Ernst. Departamento de Docencia, Hospital Británico. Perdriel 74, C1280AEB CABA, Rep. Argentina. GErnst@hbritanico.com.ar

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

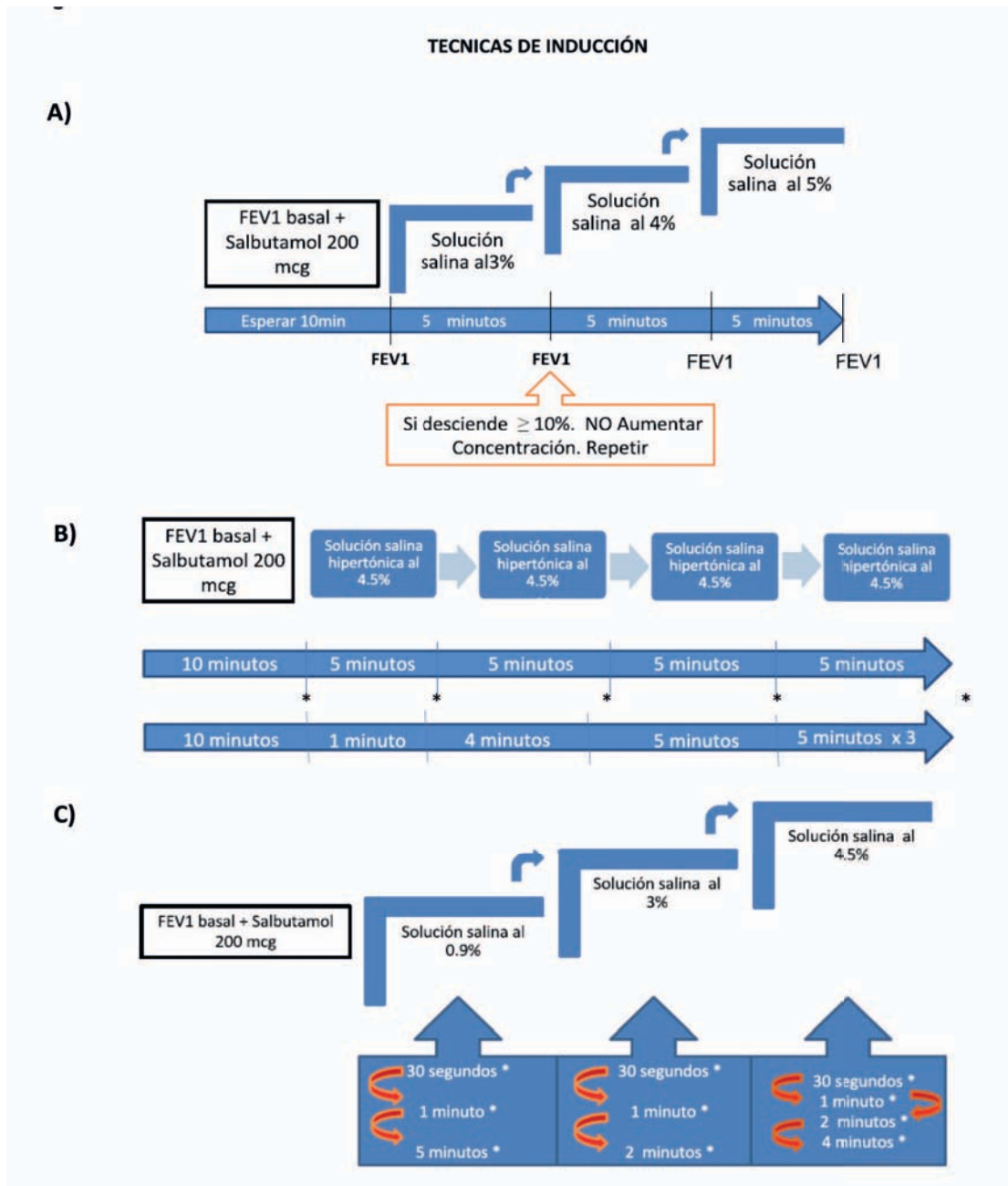
Recibido: 16/11/2017 | Aceptado: 19/12/2017

**Tabla 1.** Definición de fenotipos inflamatorios de acuerdo al recuento celular diferencial en muestras de esputo.

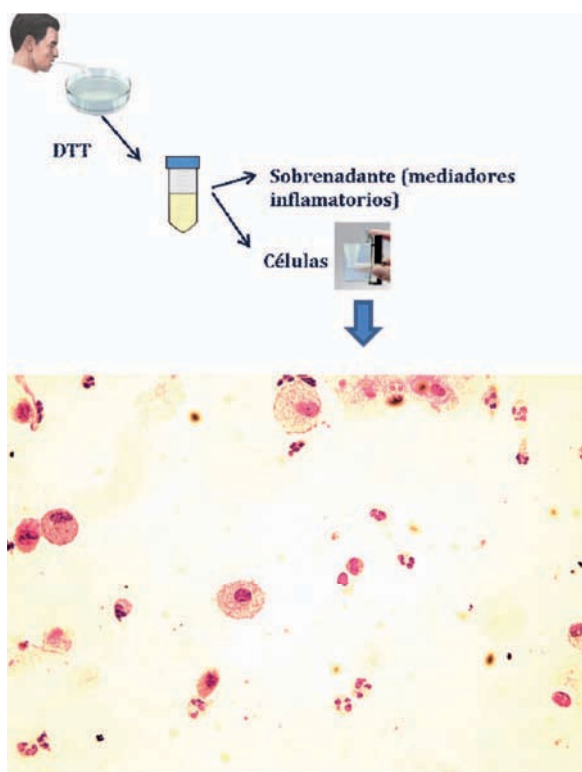
	Esputo eosinofílico	Esputo neutrofílico
Eosinofílico	>2.5	≤ 54
Neutrofílico	≤ 2.5	> 54
Mixto	>2.5	> 54
Paucigranulocítico	≤ 2.5	≤ 54

**Tabla 2.** Recuento celular diferencial en muestras de esputo según la severidad clínica del asma.

	Leve	Moderado	Severo	Exacerbación
Células × 10 <sup>6</sup> /ml	2.2±2.4	1.6±1.7	1.4±1.4	5±4
% Eosinófilos	4.9±4.8	8.4±13.5	12.6±21.1	0.7±1
% Neutrófilos	35.7±23	47.2±24.1	44.8±29.8	80.8±13.2
% Macrófagos	48.8±20.9	37.±23	38.4±29.6	13.6±9.3
% Linfocitos	1.28±2.5	1.14±2.9	0.32±0.8	0
% Células epiteliales	0.8±0.2	2.1±0	0.28±0	1.63±0



**Figura 1.** Diferentes esquemas de inducción del esputo. (\*: medición del FEV1).



**Figura 2.** Procesamiento de las muestras de esputo. Este procedimiento permite obtener la fracción celular para realizar el recuento diferencial y una fracción soluble o sobrenadante que debe ser conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la posterior determinación de mediadores inflamatorios. Se observa la foto del esputo fijado y teñido con May-Grunwald-Giemsa (400x). DTT: ditiotreitolo.

pertónica que se utilizará como el tiempo de nebulización. La concentración de solución salina puede variar en el rango de 0,9 a 7%, el nebulizador debe ser ultrasónico con pieza bucal y un flujo de salida (*output*) aproximado de 1 litro/minuto<sup>6</sup>.

En la **Figura 1** se detallan los tres esquemas validados. El protocolo más utilizado en pediatría se basa en tres nebulizaciones con solución salina hipertónica en concentraciones crecientes con iguales intervalos de tiempo (**Figura 1 A**). Un segundo esquema se detalla en la **Figura 1 B**; este consiste en nebulizaciones con igual concentración salina (4,5%) administrados durante intervalos crecientes de tiempo. Sin embargo, algunos autores utilizan una variante del mismo realizando nebulizaciones a igual concentración durante iguales intervalos de tiempo. Finalmente, en los pacientes con obstrucción severa y/o exacerbación aguda, se recomienda utilizar diferentes concentraciones de solución salina (comenzando al 0,9%) durante diferentes intervalos de tiempo (**Figura 1 C**). En todos los casos se debe medir el FEV1 al finalizar cada nebulización.

Los criterios para suspender el procedimiento son: descenso del FEV1 más del 20% del valor inicial; si el paciente consigue realizar una adecuada expectoración durante la nebulización, si presenta algún efecto adverso, o luego de 20 minutos de nebulizaciones sin conseguir una expectoración<sup>7-9</sup>.

## PROCESAMIENTO

Una vez obtenidas las muestras en un frasco estéril, estas deben ser procesadas bajo protocolos previamente estandarizados y avalados. Tal como se observa en la **Figura 2**, los *plugs* de moco deben ser separados inmediatamente, o en su defecto en un lapso no mayor de 2 horas luego de ser obtenida la muestra. Estos *plugs* se procesan con ditiotreitolo (0,1%) en agitación y posteriormente se centrifugan en una citocentrífuga a baja velocidad. Luego, las células fijadas en un portaobjetos deben ser coloreadas para realizar el recuento diferencial y determinar el perfil celular (**Tabla 1**). Se deben contar 400 células por dos observadores independientes. Aquellas muestras que presenten más del 5% de células epiteliales deben considerarse como contaminadas con saliva y por lo tanto no son representativas (**Figura 2**).

De acuerdo con el objetivo de la búsqueda, se pueden realizar diferentes tinciones, tales como negro Sudán para macrófagos cargados de lípidos, May-Grunwald-Giemsa para el recuento diferencial celular y azul de Prusia o reacción de Perl para macrófagos que contienen hemosiderina.

## VALORES NORMALES DEL RECUENTO CELULAR DIFERENCIAL

Previamente, ha sido demostrado que el recuento celular diferencial en las muestras de esputo en niños no se modifica por la edad, el género o la exposición al tabaco (fumadores pasivos). Los macrófagos son las células predominantes (más del 70%), alrededor de un 20% de neutrófilos, 0,4% de eosinófilos y 1,2% de linfocitos<sup>10-11</sup>.

### Rol del esputo inducido en enfermedades pulmonares crónicas de la infancia - Asma

El asma es una enfermedad crónica caracterizada por la inflamación de la vía aérea. Si bien diferentes tipos celulares participan en este proceso, los eosinófilos han sido postulados como el principal efector. De hecho, se los ha utilizado como biomarcadores asociados a la respuesta de diferentes tratamientos. Rytila et al. han demostrado que el tratamiento con diferentes esquemas terapéuticos de budesonida redujo los niveles de eosinófilos en las muestras de esputo de niños de entre 5 y 10 años con asma moderada o persistente<sup>12</sup>. Más aún, los hallazgos de este estudio mostraron que la eosinofilia en esputo sería un biomarcador más sensible que la eosinofilia periférica. También se ha estudiado el esputo inducido en niños asmáticos no atópicos, revelando que estos tendrían un perfil predominante neutrofílico<sup>13</sup>.

La heterogeneidad en la presentación del esputo puede estar influenciada por la severidad clínica de los pacientes (**Tabla 2**).

Conocer el perfil celular del esputo en pacientes con asma o EPOC puede contribuir a orientar el manejo

clínico del tratamiento, ya que ha sido demostrado que los pacientes con perfil neutrofílico tendrían una pobre o nula respuesta a los corticoides.

Para concluir, el esputo inducido ha demostrado ser una técnica mínimamente invasiva y segura, que contribuye a estratificar los pacientes según el tipo de inflamación de la vía aérea y podría constituir una valiosa herramienta para orientar su manejo clínico.

## CONCLUSIONES

El esputo inducido constituye una valiosa y sencilla herramienta, mínimamente invasiva que posibilita el

aporte del análisis en una muestra que refleja el perfil inflamatorio de la vía aérea, contribuyendo con:

- Pruebas de diagnóstico (en particular de la infección de las vías respiratorias).
- Supervisión de la actividad de la enfermedad.
- Indicación del inicio y la resolución de una exacerbación pulmonar aguda.
- Prescripción del tratamiento dirigido e individualizado.
- Evaluación de la respuesta al tratamiento.
- Estratificación de los pacientes para los ensayos clínicos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hargreave FE, Pizzichini E, Pizzichini MM. Induced sputum examination. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:569-70.
2. Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, Djukanovic R, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:9s-18s.
3. Gonçalves J, Pizzichini E, Pizzichini MM, et al. Reliability of a rapid hematology stain for sputum cytology. *J Bras Pneumol* 2014;40:250-8.
4. Gibson PG. Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:S100-1.
5. Thomas PS, Gibson PG, Wang H, Shah S, Henry RL. The relationship of exhaled nitric oxide to airway inflammation and responsiveness in children. *J Asthma* 2005;42:291-5.
6. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25-9.
7. Gibson PG, Grootendor DC, Henry RL, et al. Sputum induction in children. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:44s-6s.
8. Chen DH, Zhong GY, Luo W, et al. Reference values of induced sputum cytology in healthy children in Guangzhou, southern China. *Pediatrics* 2013;131:e518-24.
9. Araújo L, Moreira A, Palmares C, et al. Induced sputum in children: success determinants, safety, and cell profiles. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21:216-21.
10. Covar RA, Spahn JD, Martin RJ, et al. Safety and application of induced sputum analysis in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:575-82.
11. Djukanovic R. Airway inflammation in asthma and its consequences: implications for treatment in children and adults. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:S539-48.
12. Ryttilä P, Pelkonen AS, Metso T, Nikander K, Haahntela T, Turpeinen M. Induced sputum in children with newly diagnosed mild asthma: the effect of 6 months of treatment with budesonide or disodium cromoglycate. *Allergy* 2004;59:839-44.
13. Drews AC, Pizzichini MM, Pizzichini E, et al. Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children. *Allergy* 2009;64:1597-601.