

Evaluación de la inflamación de la vía aérea en pacientes pediátricos con asma bronquial severa

Assessment of airway inflammation in pediatric patients with severe bronchial asthma

Bethy Camargo¹, Carlos Kofman¹, Teresa Köhler¹, Alejandro Teper¹, Natalia Escobar¹, Mercedes Fernandez², Gabriela Marín³, Josefina Pascua⁴, Alejandro Salvado⁴, Glenda Ernst⁵,⁶

RESUMEN

Introducción. El asma es una enfermedad crónica inflamatoria de las vías aéreas, en la que pueden existir diferentes fenotipos. El objetivo de este estudio fue describir los perfiles celulares del esputo inducido y correlacionar la celularidad con el grado de control y marcadores de inflamación como fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO), recuento de eosinófilos en sangre periférica, función pulmonar, valor de IgE sérica total y sensibilización alérgica.

Materiales y métodos. Medición de parámetros inflamatorios de la vía aérea en 38 pacientes asmáticos entre 6 y 17 años en niveles de tratamiento 4 y 5 de las guías GINA.

Resultados. La edad de los niños incluidos fue de 11.8 años, 52.6% de sexo femenino, Z-score de IMC 0.74, % teórico de volumen espiratorio forzado en el primer segundo de 85% (41-120), respuesta broncodilatadora en un 8%, FeNO 28 ppb (1.4-118.6), IgE 767 IU/ml (21.2-3200), eosinófilos en sangre 700/mm³ (100-1900) y eosinófilos en esputo 2.9% (0-8); 89.4% eran atópicos y 76.3% tenían rinitis alérgica. Se encontraron los 4 perfiles celulares descritos en la literatura con predominio del eosinofílico (44.7%). Los eosinófilos en esputo se correlacionan con la FeNO, la IgE y el Z-score del índice de masa corporal. El 60.5% de los pacientes presentaban enfermedad mal controlada, los pacientes no controlados tuvieron mayor FeNO (35 ppb vs. 14.2 ppb) y eosinófilos en esputo (3.8% vs. 1.2%) que los bien controlados. El patrón eosinofílico se asoció a mal control (p=0.02), y el patrón paucigranulocítico a control de la enfermedad (p=0.03).

Conclusión. La celularidad del esputo inducido y otros marcadores de inflamación atópica permiten caracterizar los fenotipos de los pacientes con asma severa.

Palabras clave: asma severa, inflamación vía aérea, esputo inducido, eosinófilos, pediatría.

ABSTRACT

Introduction. Asthma is a chronic inflammatory airway disease, in which different phenotypes may exist. The aim of this study was to describe the cellular profiles of induced sputum and to correlate cellularity with the degree of control, and markers of inflammation such as exhaled nitric oxide fraction, peripheral blood eosinophil count, lung function, total serum IgE value and allergen sensitization.

Materials and methods. Measurement of airway inflammatory parameters in 38 asthmatic patients aged 6 to 17 years in treatment levels 4 and 5 of the GINA guidelines.

Results. The age of the included children was 11.8 years, 52.6% female, BMI Z-score 0.74, theoretical % FEV1 85% (41-120), and bronchodilator response in 8%, FeNO 28 ppb (1.4-118.6), IgE 767 IU/ml (21.2-3200), blood eosinophils 700/mm³ (100-1900) and sputum eosinophils 2.9% (0-8). The 89.4% were atopic and 76.3% had allergic rhinitis. The 4 cellular profiles described in the literature were found with a predominance of eosinophilic (44.7%). Eosinophils in sputum correlated with FeNO, IgE and Z-score BMI. Uncontrolled patients had higher FeNO (35 ppb vs 14.2 ppb) and sputum eosinophils (3.8% vs 1.2%) than well controlled patients. The eosinophilic pattern was associated with poor control (p: 0.02) and the paucigranulocytic pattern with disease control (p: 0.03).

Conclusion. Induced sputum cellularity and other markers of atopic inflammation allow characterizing the phenotypes of patients with severe asthma.

Keywords: severe asthma, airway inflammation, induced sputum, eosinophils, pediatrics.

Fronteras en Medicina 2024;19(2):84-89. <https://DOI.org/10.31954/RFEM/202402/0084-0089>

INTRODUCCIÓN

El asma es la enfermedad crónica más frecuente en la infancia. Según la Organización Mundial de la Salud en la actualidad hay 235 millones de pacientes con asma en todo el mundo, aunque con amplias variaciones en las diferentes regiones¹. En la Argentina la prevalencia de asma en niños oscila entre 10-20%, con mayor frecuencia en los de 6 a 7 años²; el asma ocasiona más de 400 muertes (10% en pacientes de 5 a 39 años) y más de 15 000 hospitalizaciones anuales³.

Esta enfermedad se caracteriza por presentar inflamación persistente y obstrucción recurrente de la vía aérea. Sus manifestaciones clínicas son la tos recurrente

1. Centro Respiratorio, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"
2. Laboratorio de Hematología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"
3. Servicio de Alergia, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez".
4. Servicio de Neumología, Hospital Británico de Buenos Aires.
5. Departamento de Docencia e Investigación, Hospital Británico Buenos Aires.
6. Investigador Independiente CONICET

Correspondencia: Bethy Camargo. Hospital Militar Central, Bogotá Colombia. Tel.: +54 9 11 3700-1878. bethycamargo@gmail.com

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 28/03/2024 | Aceptado: 13/05/2024

y las crisis de dificultad respiratoria, sibilancias y tiraje intercostal luego de la exposición a diversos estímulos físicos o biológicos. En general, diferentes células y sus mediadores biológicos participan en el mecanismo que promueve el desarrollo de esta enfermedad⁴. En pediatría, habitualmente los linfocitos de estirpe Th2 liberan citoquinas proinflamatorias, las cuales a su vez determinan el aumento del número de eosinófilos que infiltran las paredes bronquiales. En este mecanismo predominantemente alérgico, la presencia de inmunoglobulina E (IgE) en sangre periférica se encuentra elevada. Sin embargo, en ciertas ocasiones predominan otras células tales como los neutrófilos. Se ha descrito que la presentación clínica y la respuesta a los tratamientos varía según el mecanismo fisiopatológico involucrado y, por lo tanto, más de un fenotipo es posible. Cuando la infiltración es predominantemente neutrofilica, el control de los síntomas con antiinflamatorios como los corticoides es menos probable⁵. Numerosos esfuerzos están siendo realizados para comprender los mecanismos moleculares e inflamatorios que participarían en los procesos que conducen al desarrollo del asma en pacientes con asma severa⁶. Actualmente, *asma severa* se define como la enfermedad que requiere tratamiento con altas dosis de corticoides inhalados más un segundo controlador (broncodilatadores de acción prolongada y/o montelukast) (y/o corticoides sistémicos) para evitar síntomas persistentes o exacerbaciones o que permanezca a pesar de esta terapia^{7,8}. En pediatría constituyen 2 a 5%⁹. Aunque se trata de un número reducido, es el que presenta mayor morbimortalidad, genera mayores gastos en el sistema de salud por ausentismo escolar de los pacientes y ausentismo laboral de los padres y condiciona mayor repercusión psicosocial en los enfermos y sus familias.

Para medir la inflamación de la vía aérea, las técnicas más seguras y validadas en pediatría son la evaluación de la celularidad del esputo inducido y el análisis de la fracción exhalada del óxido nítrico (FeNO).

Existe una correlación entre la celularidad en el esputo inducido y las células que infiltran las paredes bronquiales. Diferentes estudios han demostrado que el esputo inducido es un método seguro para ser realizado en niños mayores de 6 años y que contribuye a caracterizar el perfil inflamatorio de diversas enfermedades de las vías aéreas, principalmente el asma¹⁰⁻¹³. Se trata de una técnica no invasiva que posibilita a través del análisis citoquímico del esputo realizar la determinación de células y mediadores inflamatorios. La celularidad podría tener relevancia clínica para el diagnóstico, el seguimiento, la determinación de severidad y también para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas.

La medición del óxido nítrico en el aire exhalado estima la inflamación bronquial eosinofílica. Varios estudios han demostrado que los valores de FeNO en pacientes con asma guardan relación con otras caracterís-

ticas de la enfermedad, tales como la hiperreactividad bronquial inespecífica, la intensidad de los síntomas y el número de eosinófilos en el esputo^{14,15}.

Los recuentos celulares en sangre periférica no son confiables para la caracterización de la inflamación de las vías respiratorias en niños asmáticos severos que reciben altas dosis de corticoides inhalados, dado que su número no correlaciona con la infiltración de eosinófilos en las paredes bronquiales o los eosinófilos presentes en el esputo¹⁶.

La identificación de fenotipos inflamatorios en el asma tiene un particular interés en los casos de pacientes con asma severa. En estos niños y niñas existe riesgo de suby y sobretratamiento, por lo que resulta muy útil disponer de pruebas que permitan evaluar el estado inflamatorio para intentar determinar en qué casos aumentar o agregar medicación y en cuáles cambiar la estrategia terapéutica. De esta manera, conocer el perfil inflamatorio en un niño asmático constituye una valiosa herramienta para prescribir un tratamiento dirigido e individualizado.

En Argentina, hasta el momento solo se han realizado estudios de celularidad en esputo inducido en pacientes adultos con asma severa y moderada, los cuales demostraron que el recuento celular diferencial constituye una herramienta valiosa en el manejo de los pacientes¹⁷⁻²¹. Estudios pediátricos no se han llevado a cabo hasta la fecha. El objetivo de este estudio fue describir la presencia de distintos perfiles inflamatorios a partir del recuento celular en el esputo inducido, y correlacionar la celularidad con el grado de control de la enfermedad y otros marcadores de inflamación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio prospectivo, transversal y analítico que se desarrolló durante los meses de julio de 2018 a mayo de 2019 en el Centro Respiratorio del Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez” en colaboración con la coordinación de Docencia y el Servicio de Neumonología del Hospital Británico de Buenos Aires, así como también el Laboratorio de Hematología y el Servicio de Alergia del Hospital “Ricardo Gutiérrez”.

Población

Criterios de inclusión

- Niños de ambos sexos de 6 a 17 años con diagnóstico de asma severa atendidos en el Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez”.
- Buena adherencia a la medicación prescrita (según relato de los padres) y técnica de administración correcta de la medicación inhalada.
- Espirometría aceptable y reproducible con valores de volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF₁) mayor a 60%.

Crterios de exclusión

- Exacerbaciones infecciosas en los últimos 30 días.
- Utilización de corticoides sistémicos en las últimas 4 semanas.
- Enfermedades sistémicas o pulmonares tales como inmunodeficiencias, bronquiectasias, fibrosis quística, tuberculosis (en los 12 meses previos).
- Reflujo gastroesofágico confirmado.
- Cardiopatía congénita o adquirida, trastornos neurológicos, enfermedades musculoesqueléticas y HIV.

Consentimiento informado

Se obtuvo la aprobación del protocolo por parte del Comité de Ética e Investigación del Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez”. Se informó a los padres y al paciente del procedimiento a realizar; se obtuvo el consentimiento y/o asentimiento por parte de los padres y paciente según correspondiera de acuerdo a la edad.

Recolección de datos clínicos

Los datos se consignaron en una base de datos (EpiInfo).

Se tuvieron en cuenta los antecedentes relevantes de la historia clínica para poder categorizar al paciente, datos clínicos como edad de diagnóstico, comorbilidades atópicas como rinitis y dermatitis, peso, talla, índice de masa corporal y se administró el score de ACT (*asthma control test*).

Procedimientos

Se tomó una muestra de 1.5 ml de sangre venosa que se envió al laboratorio central del hospital Gutiérrez para realización de hemograma y determinación de IgE total.

Se realizó la medición de la FeNO. Se empleó un analizador de quimioluminiscencia Ecomedics CLD 88 Analyzer (Duernten, Suiza) mediante la técnica *tidal breathing on line* (50 ml/s) y respiración simple. Se informó como resultado el promedio de dos maniobras técnicamente aceptables cuyos valores no difieren más de un 10% entre sí.

Para la realización de la espirometría, se utilizó un espirometro CPFS/D USB (MedGraphics). Se realizó espirometría inicial con medición de la respuesta broncodilatadora con 200 mcg de salbutamol administrado con dispositivo dosis medida a través de aerocámara con válvula. La espirometría cumplió criterios de aceptabilidad y reproducibilidad de ATS/ERS.

La realización del esputo inducido se llevó a cabo utilizando un nebulizador ultrasónico y pieza bucal. Se realizaron de una a cuatro nebulizaciones con solución salina hipertónica (4,5%) durante 5 minutos cada una para estimular la producción de secreciones y la tos hasta conseguir la expectoración, con control de espirometría luego de cada una para evaluar el VEF₁. La in-

ducción se suspendió cuando el paciente presentó una adecuada expectoración, o luego de 4 nebulizaciones sin conseguir una expectoración, o ante el descenso del VEF₁ más de 20% con respecto al valor inicial o ante la presencia de algún evento adverso. Una vez obtenidas las muestras en un frasco estéril, estas fueron procesadas bajo protocolos previamente estandarizados y avalados²⁰: se realizó la disociación de los *plugs* con dietiotreitol (DTT) al 0.1% para realizar la citocentrifugación de las células (a 350 RPM durante 5 minutos). Se fijaron en etanol (96%), luego se realizó tinción con May-Grunwald-Giemsa con la posterior deshidratación y montaje para su recuento diferencial. Se contaron 200 células y se registró el perfil inflamatorio. A aquellas muestras que presentaron más del 5% de células epiteliales se las consideró como contaminadas con saliva y se descartaron. Según la celularidad se describen 4 perfiles: eosinofílico, si la presencia de eosinófilos es mayor o igual 2.5 % del total; neutrofílico, conteo de neutrófilos superior o igual a 54%; mixto, si hay presencia de eosinofilia y neutrofilia; y paucigranulocítico si las células predominantes son los macrófagos y no hay eosinofilia ni neutrofilia²¹.

En la misma semana el paciente fue evaluado en el servicio de alergia donde se realizó la prueba de sensibilización alérgica mediante *prick test* cutáneo que fue realizado siempre por el mismo operador. La *atopia* se definió mediante la positividad del *prick test* a uno o más de los 18 alérgenos incluidos: *Dermatophagoides* mezcla, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, cucaracha, epitelio de gato, epitelio de perro, *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp, *Cladosporium*, *Penicillium/Mucor*, gramíneas, sorgo, *Cynodon dactylon*, *Ambrosia*, quenopodiáceas, plátano, fresno (reactivos y lancetas de laboratorio DIATER S.R.L). Se utilizó solución salina como control negativo e histamina al 0.5% como control positivo. El diámetro de la roncha fue medido después de 15 a 20 minutos y se definió como reacción positiva a la roncha con diámetro mayor a 3 mm.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando el software Prism 8 (GraphPad, La Jolla, CA). Para la estadística descriptiva se informaron las medianas y rangos. Para comparar las diferencias entre dos grupos se utilizó el test de Mann Withney, las correlaciones se realizaron con test no paramétrico de Spearman. Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se evaluaron 48 pacientes, de los cuales fueron incluidos 38 (en 8 la inducción del esputo no fue efectiva y en 2 no se obtuvieron todos los datos de laboratorio). Las características de estos pacientes se describen en

Tabla 1. Características de los pacientes incluidos en el estudio

Parámetro	Valor
Edad años - mediana (rango)	11.8 (7.1-16.8)
Mujeres - %	52.6
Z-score IMC - mediana (rango)	0.74 (-1.9-2.6)
Obesidad - %	15.8
Positividad prick test aeroalérgenos - %	89.4
Rinitis alérgica - %	76.3
VEF ₁ basal - % teórico	84.5 (41-120)
Respuesta b2 - %	8 (-16-47)
TeNo - ppb	28 (1.4-118.6)
IgE sérica total - UI/ml	767 (21.2-3200)
Eosinófilos en sangre - cél/mm ³	700 (100-1900)
Eosinófilos en esputo - %	2.9 (0.8)
Control del asma (ACT)	
Controlado - %	2.6
Parcialmente controlado - %	36.8
No controlado - %	60.5

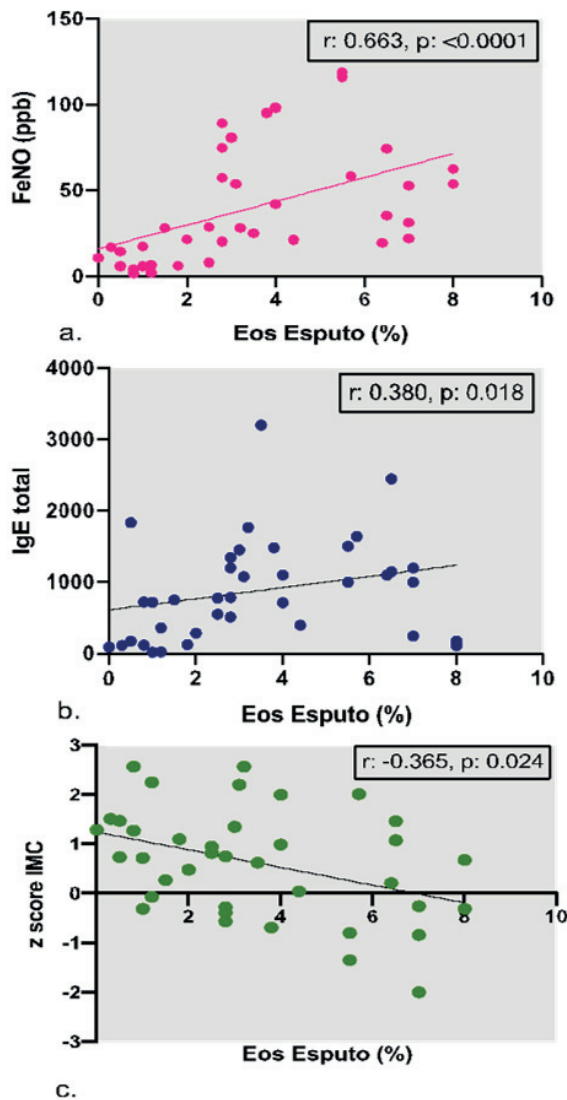


Figura 2. Correlación entre el porcentaje de eosinófilos en el esputo y A) FeNO, B) IgE total y C) Z-score de IMC. Eos: eosinófilos.

la **Tabla 1**. Los perfiles celulares encontrados en el esputo fueron eosinofílico (44.7%), paucigranulocítico

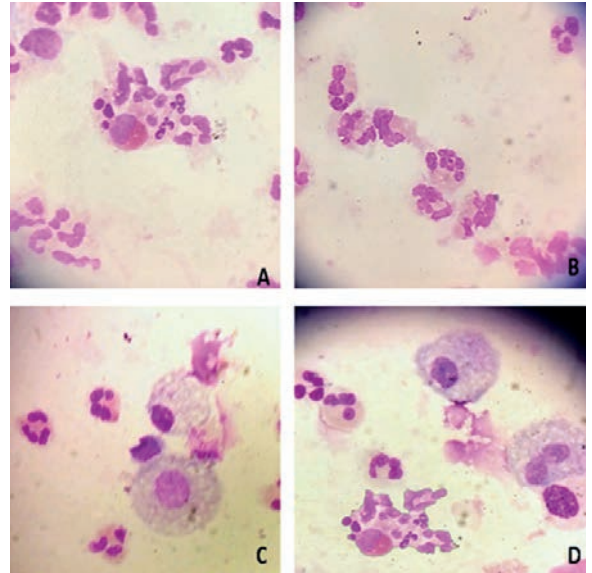


Figura 1. Patrones celulares en el esputo: A) Eosinofílico. B) Neutrofílico. C) Paucigranulocítico. D) Mixto.

(26.4%), mixto (21%) y neutrofílico (7.9%) (**Figura 1**). Tal como se muestra en la **Figura 2**, la eosinofilia en esputo se correlacionó significativamente con la FeNO ($r=0.66$; $p<0.001$), la IgE sérica total ($r=0.380$; $p=0.018$) y con el Z-score del índice de masa corporal (IMC) ($r=-0.365$; $p=0.024$).

De acuerdo al valor del cuestionario de ACT, los pacientes fueron divididos en 2 grupos: controlado (puntaje >20) y no controlado (puntaje ≤ 19); solo 1 paciente tenía control total de la enfermedad (puntaje 25). En la **Figura 3** se puede observar que los pacientes no controlados tuvieron mayor FeNO (35 ppb *vs.* 14.2 ppb) y eosinófilos en esputo (3.8% *vs.* 1.2%) que los bien controlados, con diferencia significativa entre los grupos. El patrón eosinofílico se asoció a mal control ($p=0.02$) y el patrón paucigranulocítico a control de la enfermedad ($p=0.03$).

DISCUSIÓN

En este estudio encontramos que el mal control del asma es más frecuente en los pacientes con eosinofilia en esputo (60.9% del total de los no controlados), hallazgo que había sido descrito previamente por Lovvett en el 2007, quien evidenció que la inflamación eosinofílica estaba asociada a un patrón clínico más severo con alteración de la calidad de vida debido al asma²². Asimismo, Lee y cols.²³ mostraron que en el asma moderada a severa era más frecuente este tipo de inflamación, con lo cual se plantea la eosinofilia en esputo como un marcador de falta de control en pacientes severos. En un metaanálisis realizado por Petsky y cols.²⁴ se describe una reducción significativa en la aparición y gravedad de exacerbaciones al guiar el tratamiento por el recuento de eosinófilos en esputo; sin embargo, no hay datos sufi-

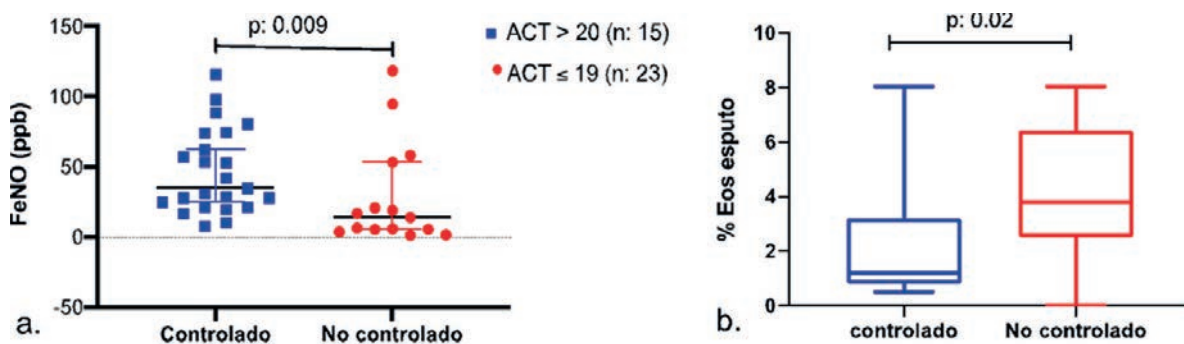


Figura 3. Niveles de FeNO (A) y del % de eosinófilos en esputo agrupados por control del asma.

cientes disponibles para adaptar esta estrategia en niños, dado que en el metaanálisis se incluyó solamente un estudio en pediatria.

Nosotros utilizamos el esputo inducido para evaluar los perfiles inflamatorios a partir de la celularidad porque este ha sido un método ampliamente utilizado y validado para realizarse en pediatria; tuvimos un rendimiento en la inducción y toma de la muestra del 83%, que se encuentra en el rango superior de lo descrito en la literatura, que está entre 60 y 80%. Un paciente presentó broncoespasmo que resolvió con la administración de salbutamol y otro dolor abdominal leve que no requirió medicación, confirmando la seguridad de la prueba^{10-13,25}.

Hay estudios sobre la asociación entre el nivel de control del asma y marcadores de inflamación de las vías respiratorias como la FeNO, con datos contradictorios en adultos y niños donde los pacientes tienen diferentes características clínicas e inflamatorias^{26,27}. Nosotros encontramos que los pacientes con mal control de la enfermedad tenían valores de óxido nítrico y eosinófilos en esputo mayores que los pacientes con enfermedad controlada según el ACT, con diferencia significativa.

Hemos hallado correlación significativa entre la FeNO y la eosinofilia en esputo. Sin embargo, autores como Fleming describen que la relación es variable, sobre todo en pacientes con asma severa, lo cual podría deberse a la toma de varias muestras de esputo y a las variaciones de óxido nítrico con el medio ambiente, la dieta o el ejercicio. Actualmente no se ha demostrado que la FeNO refleje en forma constante la eosinofilia, tampoco se ha definido un valor exacto de equivalencia al 2.5% de eosinófilos, pero su medición es útil para identificar pacientes con eosinofilia de una manera más sencilla. Se necesitan más estudios para asegurar que puede reemplazar al esputo inducido¹⁴.

Según el análisis del recuento celular en esputo, los pacientes se clasificaron en 4 fenotipos: asma eosinofílica, neutrofílica, mixta y paucigranulocítica. El asma pauci-

granulocítica se asoció a control de la enfermedad, aunque también se encontró en pacientes no controlados, pero en menor proporción. Este es un fenotipo poco estudiado que puede ser subestimado cuando solo se tiene en cuenta el recuento celular diferencial, y se lo ha descrito como un fenotipo común en asma controlada en adultos y niños^{28,29}.

La eosinofilia en esputo se correlacionó negativamente con el Z-score de IMC. No hay estudios al respecto, pero la mayoría de publicaciones relacionan la severidad con la obesidad, no con el normo peso ni el bajo peso.

En el recuento total de eosinófilos en sangre periférica hay diferencias entre los pacientes controlados y lo no controlados, tampoco hay asociación con la presencia de eosinófilos en esputo ni con la FeNO. Dado que los niveles de eosinófilos en sangre se pueden aumentar en otras condiciones alérgicas como la dermatitis atópica y rinosinusitis, el conteo de eosinófilos en sangre debe usarse con precaución como predictor de inflamación de la vía aérea en niños.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es el tamaño de la muestra. Sin embargo, consideramos a partir de nuestros hallazgos que la celularidad del esputo inducido y otros marcadores de inflamación atópica permiten caracterizar los fenotipos inflamatorios de los pacientes con asma severa. La eosinofilia en esputo se correlaciona con la FeNO, el valor de IgE sérica, y en forma negativa con el Z-score de IMC. Se describen los 4 perfiles inflamatorios en nuestro estudio, donde el patrón paucigranulocítico se asocia a control de enfermedad y el eosinofílico, a mal control.

AGRADECIMIENTOS

A la Asociación Argentina de Medicina Respiratoria por la beca de investigación otorgada para la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cooper PJ, Figueiredo CA, Rodriguez A, et al. Understanding and controlling asthma in Latin America: A review of recent research informed by the SCAALA programme. *Clin Transl Allergy* 2023;13:e12232.
2. Balanzat AM, Urrutigoity J. Consenso de Asma bronquial. 2007. 1ª parte. *Arch Argent Pediatr* 2008;106:61-8.
3. Argentina. Ministerio de Salud. Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos. Dirección de Estadísticas e Información de Salud. Estadísticas Vitales: Información básica año 2013. Disponible en: <http://www.bvs.org.ar/pdf/anuario13.pdf>; (consultado el 12/08/2023).
4. de Freitas Dantas Gomes EL, Costa D. Evaluation of functional, autonomic and inflammatory outcomes in children with asthma. *World J Clin Cases* 2015;3:301-9.
5. Wenzel SE. Severe Adult Asthmas: Integrating Clinical Features, Biology, and Therapeutics to Improve Outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2021;203:809-21.
6. Guida G, Bagnasco D, Carriero V, et al. Critical evaluation of asthma biomarkers in clinical practice. *Front Med (Lausanne)* 2022;9:969243.
7. Fainardi V, Caffarelli C, Deolmi M, et al. Asthma (ERA) Study Group. Maintenance Therapy for Children and Adolescents with Asthma: Guidelines and Recommendations from the Emilia-Romagna Asthma (ERA) Study Group. *J Clin Med* 2023;12:5467.
8. Latorre M, Pistelli R, Carpagnano GE, et al. Symptom versus exacerbation control: an evolution in GINA guidelines? *Ther Adv Respir Dis* 2023;17:17534666231159261.
9. Giovannini-Chami L, Albertini M, Scheinmann P, et al. New insights into the treatment of severe asthma in children. *Paediatr Respir Rev* 2014;S1526-0542.
10. Li AM, Tsang TW, Chan DF, Sung RY, Fok TF. Induced Sputum in Childhood asthma. *Hong Kong Med J* 2005;11:289-94.
11. Araujo L, Moreira A, Palmares C, Beltrao M, Fonseca J, Delgado L. Induced Sputum in Children: Success determinants, Safety, and Cell Profiles. *J Allergol Clin Immunol* 2011;21:216-21.
12. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *Eur Respir J* 2000;16:1008-15.
13. 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.
14. Plaza Moral V, Alobid I, Álvarez Rodríguez C, et al. GEMA 5.3. Spanish Guideline on the Management of Asthma. *Open Respir Arch* 2023;5:100277.
15. Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Longitudinal relationship between sputum eosinophils and exhaled nitric oxide in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:400-2.
16. Schleich FN, Seidel L, Sele J, et al. Exhaled nitric oxide thresholds associated with a sputum eosinophil count $\geq 3\%$ in a cohort of unselected patients with asthma. *Thorax* 2010;65:1039-44.
17. Ullmann N, Bossley CJ, Fleming L, Silvestri M, Bush A, Saglani S. Blood eosinophil counts rarely reflect airway eosinophilia in children with severe asthma. *Allergy* 2013;68:402-6.
18. Ernst G, Auteri S, Caro F, et al. Significant increase of IL-8 sputum levels in treatment resistant severe asthma respect to difficult to treat severe asthma patients. *Journal of Genetic Syndrome and Gene Therapy* 02/2014.
19. Ernst G, Caro F, Fernandez M, et al. Relationship between exhaled FeNO and eosinophils sputum counts in different phenotypes of asthma patients. *Chest* 10/2014; 146(4_MeetingAbstracts):19^a.
20. Ernst G, Auteri S, Caro F. Levels of IL-8 and IL17-A in Sputum Samples From Severe Asthma Patients. *Chest* 10/2013; 144(4_MeetingAbstracts):82^a.
21. Hargreave FE, Pizzichini E, Pizzichini M. Induced sputum examination. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:569-70.
22. Demarche S, Schleich F, Henket M, Paulus V, Van Hees T, Louis R. Detailed analysis of sputum and systemic inflammation in asthma phenotypes: are paucigranulocytic asthmatics really non-inflammatory? *BMC Pulm Med* 2016;16:46.
23. Lovett CJ, Whitehead BF, Gibson PG. Eosinophilic airway inflammation and the prognosis of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2007;37:1594-601.
24. Lee YJ, Kim KW, Choi BS, Sohn MH, Kim KE. Clinical Phenotypes of Nasal Polyps and Comorbid Asthma Based on Cluster Analysis of Disease History. *Acta Paediatr* 2013;102:53-7.
25. Petsky H, Li A, Chang AB. Tailored interventions based on sputum eosinophils versus clinical symptoms for asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;2017:CD005603.
26. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997;52:498-501.
27. Waibel V, Ulmer H, Horak E. Assessing asthma control: symptom scores, GINA levels of asthma control, lung function, and exhaled nitric oxide. *Pediatr Pulmonol* 2012;47:113-8.
28. Volbeda F, Broekema M, Lodewijk ME, et al. Clinical control of asthma associates with measures of airway inflammation. *Thorax* 2013;68:19-24.
29. Tilba O, Panettieri R jr. Paucigranulocytic asthma: The uncoupling of airway obstruction from inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:1287-94.