

Heterogeneidad en los fenotipos inflamatorios de los pacientes con EPOC: rol del recuento celular diferencial en esputo

Correspondencia:

Dra Glenda Ernst

e-mail: gernst@hbritanico.com.ar

Domicilio postal: Hospital Británico de Buenos Aires

Perdriel 74, 1° Piso. CP 1280AEB

Tel.: (5411) 43096400 ext 2808

Recibido: 14.10.2015

Aceptado: 21.01.2016

Autores: Bethy Camargo*, Fernando DiTullio, Martín Bosio, Reynaldo Smith, Eduardo Borsini, Romina Canzonieri, Alexis Muryan, Alejandro Lotti, Alejandro Salvado, Ernst Glenda

Hospital Británico de Buenos Aires

*Becaria del programa de entrenamiento en la técnica de esputo inducido del Hospital Británico

Resumen

El tabaquismo es la principal causa de la EPOC, sin embargo, factores como la edad de diagnóstico, la historia previa de asma, exacerbaciones, predisposición genética y otros influirían en el desarrollo de la enfermedad. Esto estaría relacionado con los fenotipos de pacientes con EPOC, los cuales tendrían diferentes respuestas a los corticoides inhalados (CI). Recientemente, ha sido propuesto que los eosinófilos serían potenciales biomarcadores predictores de buena respuesta a los CI. Con la hipótesis de que la presencia de eosinófilos en esputo podría constituir una estrategia para diferenciar fenotipos de pacientes con EPOC, evaluamos los perfiles celulares inflamatorios en muestras de esputo inducido en pacientes con EPOC no exacerbados.

Para esto, se reclutaron 20 pacientes con EPOC moderado a severo que concurren al gimnasio de rehabilitación respiratoria, los cuales fueron agrupados en eosinofílicos (n: 8, cuando presentaron más de 3% de eosinófilos en la muestra de esputo inducido) o no eosinofílicos (n: 9). Se descartaron 3 muestras por contaminación con células epiteliales. Si bien no se observaron diferencias significativas en los test de función pulmonar o de marcha de 6 minutos, los pacientes con eosinofilia presentaron ligeramente mayor reversibilidad luego del broncodilatador. Además, tuvieron mayor eosinofilia periférica, mayores valores de FeNO y mejor calidad de vida (medida por cuestionarios) que los pacientes no eosinofílicos. El esputo inducido es una técnica no invasiva, económica, que representaría una herramienta útil para conocer los diferentes fenotipos inflamatorios en pacientes con EPOC.

Palabras clave: esputo inducido, EPOC, eosinófilos, fenotipos, corticoides inhalados

Abstract

Heterogeneity of Inflammatory Phenotypes In Copd Patients: Role of Differential Cell Counting in Sputum

Smoking is the major cause of COPD; however factors such as age, previous history of asthma, exacerbations, and genetic predisposition could influence the development of the disease. This could be related with the phenotypes of COPD patients, who would have different responses to inhaled corticosteroids (ICs). Recently, it has been suggested that eosinophils are potential biomarkers that contribute to predict good response to ICs. To test the hypothesis that the presence of eosinophils in sputum could be useful to characterize different phenotypes of COPD patients, we assessed the inflammatory cell profiles in induced sputum samples from not exacerbated COPD patients.

20 patients with moderate to severe COPD, attending a pulmonary rehabilitation gym, were grouped into eosinophilic (8 patients who presented more than 3% eosinophils in the induced sputum sample) or neutrophilic (9 patients who had more than 60% neutrophils). Only 3 patients were excluded due to contamination of the sputum with epithelial cells.

Although there were no-significant differences in the pulmonary function tests or the 6-minute walk, the patients with eosinophilia showed higher responsiveness to bronchodilator therapy. Besides this group presented an increase of peripheral eosinophils, higher FeNO and better quality of life (measured by questionnaires) compared with the neutrophilic patients.

Induced sputum is an economic non-invasive technique and would be a useful tool to know different inflammatory phenotypes in COPD patients.

Key words: induced sputum, COPD, eosinophils, phenotypes, inhaled corticosteroids

Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) tiene alta morbi-mortalidad, por lo que constituye un verdadero desafío para médicos e investigadores. La Organización Mundial de la Salud ha revelado que en el año 2030 la EPOC sería la tercera causa de muerte en el mundo¹. La calidad de vida de estos pacientes se ve gravemente afectada, especialmente en estadios avanzados², esto se asocia con una elevada carga económica para el sistema sanitario. La Unión Europea ha dado a conocer que los costos directos totales de las enfermedades respiratorias serían aproximadamente del 6% del presupuesto total de salud y que la EPOC representaría el 56%³. En España, el costo directo total de la EPOC estimado durante el año 2012 fue de 4.169,81 millones de euros⁴.

El principal factor de riesgo relacionado con el desarrollo de esta enfermedad es el cigarrillo⁵, sin embargo, se ha descrito que existirían otros factores que influyen en su evolución. Dentro de estos, se encuentran la edad, historia previa de asma bronquial, predisposición genética e infecciones respiratorias⁶⁻⁹. En adición a esto, factores del medio ambiente u ocupacionales, tales como la exposición a biomasa o a inhalación de determinadas sustancias, podrían incrementar el riesgo de padecer EPOC^{10, 11}.

La EPOC se caracteriza por limitación persistente del flujo aéreo, que progresa asociado a la inflamación de la vía aérea generada por la exposición a noxas o gases. La severidad de la enfermedad en cada paciente está dada por las exacerbaciones y comorbilidades¹². La inflamación crónica puede causar remodelación de la vía aérea e incluso destrucción del parénquima pulmonar que altere su funcionalidad¹³. Las exacerbaciones usualmente requieren visitas no programadas que en ocasiones incluyen internación del paciente ya sea por

el empeoramiento de los síntomas respiratorios, infecciones o eventos cardiovasculares, etc. En estos pacientes, las exacerbaciones conducen a un empeoramiento de la calidad de vida, un incremento de la severidad de la enfermedad, acompañado de una reducción de la expectativa de vida¹⁴.

En virtud de heterogeneidad de la presentación clínica de la EPOC, se ha propuesto la estratificación de los pacientes de acuerdo a marcadores clínicos y biológicos. Estos incluirían la potencial respuesta farmacológica a los corticoides inhalados y la presencia de eosinofilia en las vías respiratorias. Algunos autores sugieren que los niveles de eosinofilia periférica podrían ser utilizados como biomarcadores que contribuyan a determinar su respuesta¹⁵.

Se ha demostrado previamente que más del 30% de los pacientes con EPOC presentarían eosinofilia periférica¹⁶. Más aún, se ha descrito un incremento de la eosinofilia durante las exacerbaciones en pacientes con EPOC moderado o leve, lo que mostró valores en esputo mayores al 3% y en sangre periférica mayores al 2%¹⁷. De esta manera, la eosinofilia podría constituir un bio-marcador predictor de las exacerbaciones, así como la identificación de potenciales respondedores al tratamiento con corticoides inhalados^{18, 19}. Si bien los eosinófilos en esputo parecerían ser mejores predictores que los eosinófilos periféricos, la técnica de esputo inducido no es una práctica habitual ya que requiere personal altamente entrenado, infraestructura especial y procesamiento inmediato. Además, se ha propuesto como bio-marcador subrogante de la inflamación eosinofílica durante las exacerbaciones en EPOC, la determinación de la fracción de óxido nítrico en aire exhalado (FeNO)^{20, 21}. Se ha sugerido que los valores de corte de FeNO para pacientes con asma serían mayor de 50 ppb, síndrome de overlap Asma-EPOC entre 25 y 50 ppb y para los pacientes con EPOC menor de 25 ppb²². A partir

de estos valores, según la Sociedad Americana de Tórax (ATS-2011), los pacientes con EPOC y FeNO menor de 25 ppb no tendrían una fuerte recomendación para recibir corticoides inhalados, mientras que los pacientes con FeNO entre 25 y 50 deberían ser manejados a criterio del neumonólogo y finalmente los pacientes con FeNO mayor a 50 tendrían indicación de corticoides inhalados^{23, 24}.

Dado que la medición del FeNO no es una práctica habitual en la mayoría de los centros de salud por falta de disponibilidad, por su elevado costo y su cuestionada especificidad; nosotros hipotetizamos que la presencia de eosinófilos en esputo podría constituir la mejor estrategia para diferenciar los fenotipos de pacientes con EPOC.

El objetivo es evaluar el rol del recuento celular diferencial en el esputo inducido para evaluar la presencia de diferentes fenotipos de pacientes con EPOC estables.

Materiales y métodos

Diseño: Estudio prospectivo en pacientes con EPOC moderado a severo GOLD D (definido por espirometría y exacerbaciones) que concurren al gimnasio de Rehabilitación Respiratoria del Hospital Británico de Buenos Aires.

Pacientes: Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado que contó con la evaluación y el aval del comité de revisión institucional del Hospital Británico. A los pacientes reclutados, se les realizó una prueba de esputo inducido para evaluar el perfil celular inflamatorio. Solo se incluyeron pacientes que no hubieran exacerbado en las cuatros semanas. Se incluyeron pacientes mayores de 40 años del servicio de Neumonología del Hospital Británico, que firmaron el consentimiento informado y que tuvieron diagnóstico de EPOC conforme los criterios de las últimas guías GOLD 2015, que fueron ex tabaquistas o tabaquistas de al menos 10 paquetes/año, que tuvieron una relación FEV1/FVC ≤ 0.7 y FEV1 menor del 70%. Se excluyeron pacientes que presentaron síntomas de exacerbación de EPOC o eventos cardiovasculares en las 4 semanas previas a la incorporación al estudio y pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa, enfermedades neoplásicas, vasculitis, con compromiso pulmonar, enfermedades renales crónicas, cirrosis hepáticas, enfermedades sistémicas no controladas (diabetes, hiper/ hipotiroidismo, enfermedad cardiovascular

activa), bronquiectasias con infección aguda en las últimas 4 semanas o fibrosis quística y pacientes con diagnóstico de neumonía.

Cuando el paciente fue incluido en el estudio, realizó el cuestionario (CAT), la determinación del FeNO, espirometría (con la suspensión del tratamiento inhalatorio 24 hs previas al estudio) y finalmente se indujo el esputo. Se solicitó una muestra de sangre para hemograma y determinación de la proteína alfa-uno antripsina que se realizó en la misma semana del resto de las determinaciones.

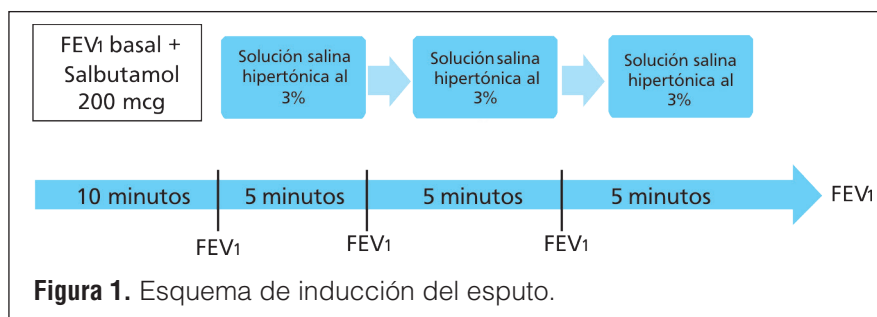
Inducción del esputo: Se procedió de acuerdo al protocolo previamente establecido²⁵. Brevemente, se obtuvieron los plugs de moco, obtenidos con una pinza a partir de muestras frescas, se resuspendieron en DTT al 0.1% durante 20 minutos en agitación, se realizó una citocentrifugación a 300 RPM durante 5 minutos, las muestras se fijaron y se realizó una coloración de May Grunwald-Giemsa. Se realizaron hasta 3 nebulizaciones con solución salina hipertónica durante 5 minutos, controlando que el FEV1 no descendiera más del 20% según lo indicado en el esquema mostrado en la Figura 1. Se utilizó solución salina hipertónica que varió su concentración en un rango de 0.9 a 3.0%, según al valor del FEV1 de cada paciente. Las muestras se procesaron con dithiotreitol (DTT) al 0.1% y se centrifugaron para realizar el recuento diferencial. Se descartaron las muestras que presentaron más del 5% de células epiteliales²⁶.

Se consideró como criterio para clasificar los pacientes de acuerdo a la celularidad

Determinación de los niveles de FeNO: Se midieron los niveles de óxido nítrico en aire exhalado mediante la utilización del equipo NIOX MINO (Aerocrine).

Determinación de los niveles de la proteína alfa-uno: Se dosaron muestras de una gota de sangre seca en papel por nefelometría cinética con un valor de corte correspondiente a 100 mg/dL de 1.8 mg/dL.

Test de función pulmonar: Todos los pacientes fueron sometidos a test de función pulmonar (TFP) que incluyó espirometrías y la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) realizados de acuerdo a las recomendaciones de la ATS/ERS. Para las mediciones de TFP, se utilizó un equipo de volumen constante (Platinum Elite DL, Medical Graphics Corporation). Los valores normales predichos fueron referidos a los de Crapo.



Estos fueron realizados el mismo mes en que se tomó la muestra de esputo inducido^{27,28}.

Análisis de los datos: Los resultados se analizaron mediante test no paramétricos utilizando el software Graph-Pad PRISM-5 (Graph Pad, La Jolla, CA). Para la estadística descriptiva, se informaron las medias y el desvío estándar. Para comparar las diferencias entre dos grupos, se utilizó el test de Mann Withney y cuando se compararon los resultados de tres o más grupos, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis y el test de comparaciones múltiples de Dunn. Se consideró estadísticamente significativamente una $p < 0.05$.

Resultados

Población estudiada

Se reclutaron 20 pacientes, de los cuales 17 fueron hombres; un paciente fumador activo y el resto exfumadores (con más de un año sin fumar) con una carga tabáquica de 53.3 ± 7.3 paquetes/año. Los pacientes se agruparon de acuerdo al recuento celular diferencial en las muestras de esputo inducido tal como se observa en la Figura 2, tres muestras fueron excluidas por contaminación con células epiteliales. Si bien la mayoría de los pacientes fueron nebulizados con solución salina hipertónica al 3%, en cuatro de ellos se utilizó solución salina al 0.9% por presentar FEV1 menor de 1L.

Dado que el esputo inducido constituye una técnica mínimamente invasiva, reproducible, validada y segura en pacientes con enfermedad pulmonar crónica tanto estables como exacerbados; la misma se utilizó para evaluar la heterogeneidad en los perfiles celulares inflamatorios de 17 pacientes con EPOC^{29, 30}. Esto permitió organizar los pacientes en 2 grupos: eosinofílicos y no eosinofílicos (Tabla 1). En la Figura 3 se observan imágenes representativas de los patrones encontrados en nuestros pacientes.

Características de los diferentes fenotipos de pacientes con EPOC

El grupo de pacientes no eosinofílicos presentó en promedio mayor carga tabáquica que los pacientes eosinofílicos; sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (91.9 ± 22.4 vs 54.3 ± 11.7 paquetes/año; $p = 0.28$). Los dosajes de α 1-antitripsina mostraron que todos los pacientes estuvieron dentro de la normalidad.

Como antecedentes de relevancia, se observó que todos los pacientes eosinofílicos refirieron rinitis, mientras que en los pacientes no eosinofílicos, sólo dos de ellos (100.0% vs 22.2% respectivamente).

El tratamiento de mantenimiento para los pacientes incluyó corticoides inhalados (flutocasona o budesonide), broncodilatadores de rápida acción (SABAs y SAMAs), LABAs y broncodilatadores de ultrarápida acción ultra-LABAs: indicaterol) y antimuscarínicos (tiotropio y glicopirronio). Ambos grupos recibieron similares tratamientos dada la severidad de su enfermedad (Tabla 2). Dos pacientes del grupo eosinofílico, además, recibieron tratamiento con corticoides orales (meprednisona) y otros dos corticoides intranasales (furoato de mometasona).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de función pulmonar de ambos grupos de pacientes (eosinofílicos vs no eosinofílicos), aunque se observó un ligero incremento de la reversibilidad en el grupo de pacientes eosinofílicos (Tabla 3). Tampoco se observaron diferencias en la difusión (DLCO), ni en los metros recorridos en el test de marcha de 6 minutos. Sin embargo, la evaluación de los datos recogidos del test de impacto del CAT que mide el bienestar y calidad de vida desarrollado específicamente para pacientes con EPOC (COPD Assessment Test: CAT), mostró que los pacientes no eosinofílicos tienen peor calidad de vida respecto de los pacientes eosinofílicos (17.7 ± 3.8 vs 10.3 ± 0.66).

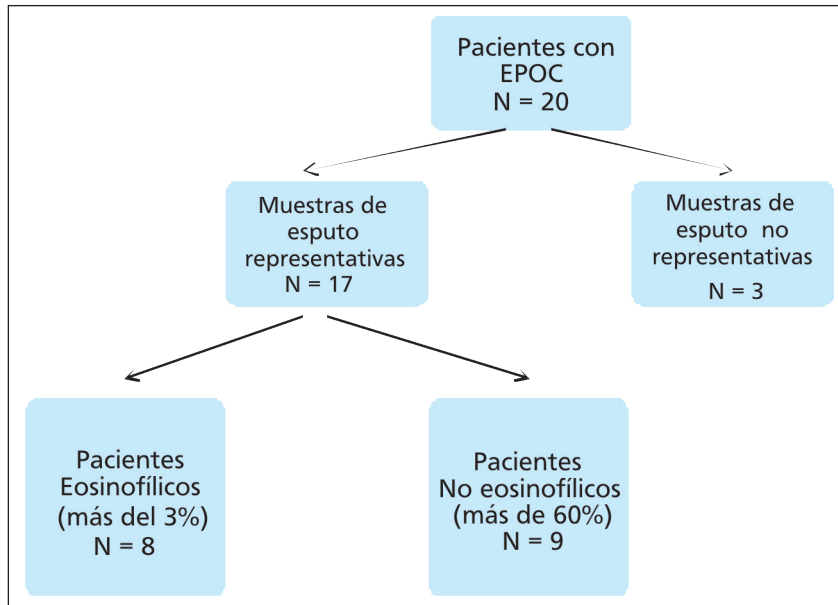


Figura 2. Algoritmo de pacientes en función del recuento celular diferencial.

TABLA 1. Pacientes organizados por el perfil celular inflamatorio del esputo

	Grupo Eosinofílicos n = 8	Grupo No eosinofílicos n = 9	Valores de referencias sujetos sanos ²⁹	Valores de referencias EPOC ³⁰
Características demográficas				
Edad (años)	67.1 ± 2.6	72.7 ± 1.9		
N° de hombres	5	9		
N° de mujeres	3	0		
Índice de masa corporal (kg/m ²)	29.5 ± 3.5	27.2 ± 2.1		
Recuento diferencial				
Macrófagos (%)	21.8 ± 8.65	10.01 ± 2.85	66.0 ± 16.5	16.9 ± 14.4
Linfocitos (%)	0.24 ± 0.15	0.64 ± 0.4	3.0 ± 2.6	0.7 ± 0.8
Neutrófilos (%)	58.44 ± 11.13	86.18 ± 2.9	23.1 ± 14.8	78.9 ± 16.4
Eosinófilos (%)	17.23 ± 7.78	1.17 ± 0.26	0.008 ± 0.03	1.3 ± 2.6
Células epiteliales (%)	2.41 ± 0.83	1.72 ± 0.49	5.0 ± 0.5	2.1 ± 4.5

Mediadores inflamatorios: comparación de ambos grupos

Se observó que tanto los pacientes eosinofílicos como los no eosinofílicos presentaron más del 2% de eosinófilos en sangre periférica. Sin embargo, los valores fueron mayores en las muestras de los pacientes con eosinofilia en esputo comparados con los pacientes no eosinofílicos (635.4 ± 111.1 eos/mm³ que equivalen a $5.8 \pm 1.3\%$ vs 435.0 ± 35.5 eos/mm³ correspondientes a $4.0 \pm$

0.7%). Según el test de Mann Whitney, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p = 0.07$). También se observó que la cantidad de eosinófilos en esputo se correlacionó positivamente con la cantidad de eosinófilos en sangre (r de spearman = 0.52; $p = 0.1$).

Los pacientes eosinofílicos mostraron un ligero incremento en los niveles de FeNO respecto de los pacientes no eosinofílicos (43.5 ± 25.5 vs 21.3 ± 1.2 ppb; $p = 0.7$).

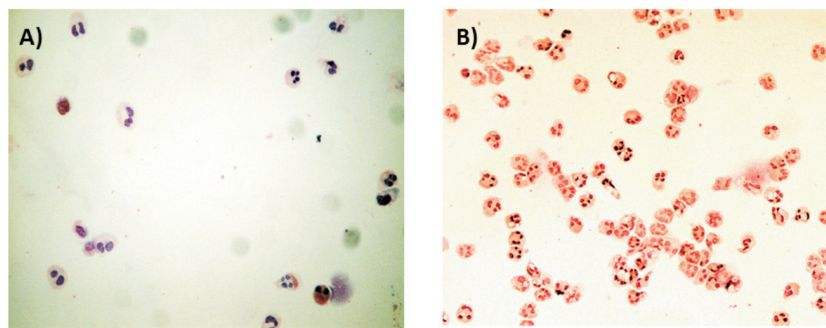


Figura 3. Celularidad en las muestras de esputo inducido. Se observa la foto del esputo fijado y teñido con May-Grunwald-Giemsa (400x). A) Muestra eosinofílica y B) Muestra neutrofílica.

TABLA 2. Tratamiento de mantenimiento en los pacientes con EPOC

	Grupo Eosinofílicos n = 8	Grupo No eosinofílicos n = 9
Tratamiento		
Corticoides inhalados	6	7
LABAs	3	7
Ultra-LABAs	0	1
Anti-muscarínico	4	3

Discusión

La EPOC es una enfermedad que puede presentar diferentes fenotipos. Esta heterogeneidad se pone en evidencia con las diferentes respuestas a los tratamientos farmacológicos²⁶. Si bien numerosos trabajos se han centrado en definir estos fenotipos, no existe un consenso validado que los agrupe y clasifique, sin embargo se identifican entre ellos la bronquitis, el enfisema, los exacerbadores frecuentes, la sobreposición asma-EPOC y la EPOC con bronquiectasias^{27, 28}. Comprender las distintas presentaciones clínicas asociadas al perfil inflamatorio particular de cada paciente podría contribuir a determinar estrategias personalizadas de tratamiento.

Recientemente las guías emitidas en conjunto por la iniciativa global del manejo de la enfermedad obstructiva crónica (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: GOLD) y la iniciativa global de asma (Global Initiative for Asthma: GINA); han definido al fenotipo de sobreposición asma-EPOC como ACOS^{29, 30}. Este síndrome, caracterizado por una limitación persistente del

flujo aéreo, tendría una prevalencia del 2% en la población general y del 20% en los pacientes con EPOC^{31, 32}.

Conocer los criterios para el diagnóstico de ACOS es fundamental ya que estos pacientes presentan mayor número de exacerbaciones y en ocasiones más severas que los pacientes con EPOC³³. Los pacientes con ACOS corresponden a un subgrupo de pacientes con EPOC que requieren tratamiento con corticoides inhalados asociados a broncodilatadores β -2 de larga duración (LABA)³⁴. ACOS incluye pacientes con EPOC que poseen reversibilidad parcial del flujo aéreo, con o sin antecedentes de rinitis o alergias, reducida DLCO y/o eosinofilia en el esputo o bien pacientes con asma que presenten obstrucción parcialmente reversible de la vía aérea, con o sin enfisema o DLCO <80%^{35, 36}.

El nuevo algoritmo para el diagnóstico de ACOS incluye criterios mayores y menores. Dentro de los criterios mayores, se encuentran una reversibilidad al broncodilatador mayor a 400 ml o al 15% del VEF1, historia de asma o eosinofilia en el esputo; y dentro de los menores se encuentra una reversibilidad al broncodilatador de más de 200 ml o al 12% del VEF1 en al menos dos ocasiones, IgE elevada o historia de atopía³⁷. Por consenso, los pacientes deben presentar dos criterios mayores o uno mayor y dos menores para ser diagnosticados como ACOS.

Los pacientes con ACOS presentan mayor morbi-mortalidad que los pacientes con asma o EPOC solo, incluso en poblaciones jóvenes³⁸⁻⁴⁰. La relevancia de su adecuado diagnóstico se basa en el hecho de que presentan una notable estabilidad o mejoría cuando reciben corticoides inhalados. La eosinofilia en esputo con un valor de corte mayor a 2.5% predice la respuesta a corticoides inhalados

TABLA 3. Test de función pulmonar y caminata de 6 minutos (los resultados se expresaron como media y error estándar). Se compararon los resultados utilizando el test de Mann Withney, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas

	Grupo Eosinofílicos n = 8	Grupo No eosinofílicos n = 9
Espirometría		
FVC (%)	68.1 ± 4.3	65.3 ± 3.3
FVC (L)	2.4 ± 0.3	2.54 ± 0.2
FEV1 (%)	46.6 ± 6.4	42.4 ± 3.5
FEV1 (L)	1.2 ± 0.15	1.3 ± 0.2
FEV1/FVC1	47.9 ± 4.0	50.1 ± 3.9
Reversibilidad FEV1 (%)	4.6 ± 1.6	2.1 ± 1.3
Reversibilidad FEV1 (mL)	105.7 ± 43.3	53.3 ± 32.4
Difusión de monóxido de carbono		
DLCO (ml/min/mmHG)	10.8 ± 1.5	11.4 ± 1.8
DLCO (%)	42.4 ± 6.9	41.7 ± 7.0
Test de caminata 6 minutos		
Metros recorridos	411.0 ± 39.1	378.6 ± 27.3
Saturación de oxígeno inicial (%)	93.9 ± 1.4	94.1 ± 0.5
Saturación de oxígeno final (%)	89.2 ± 3.1	88.6 ± 2.6
Desaturación puntos	4.6 ± 2.0	5.6 ± 2.3

con una sensibilidad de 82.4% y especificidad de 84.8%⁴¹. Más aún, se ha sugerido que la presencia de eosinófilos en esputo inducido podría ser un potencial predictor para el éxito del tratamiento⁴².

Si bien el tratamiento con corticoides inhalados ha demostrado beneficios en los pacientes con EPOC que presentan inflamación eosinofílica disminuyendo las exacerbaciones y mejorando su calidad de vida, en la práctica clínica habitual su utilización de acuerdo a la severidad del paciente puede resultar inapropiada. A pesar de que el número de pacientes reclutados hasta el momento es bajo, se encontró mayor estabilidad y mejoría de la calidad de vida (reflejada por el CAT) en el grupo de pacientes eosinofílicos que se encuentran con terapia de mantenimiento que incluye corticoides inhalados.

Actualmente, aquellos pacientes con EPOC con más de dos exacerbaciones por año tienen indicación de recibir tratamiento con corticoides inhalados, aunque la dosis a utilizar no está claramente definida. Sin embargo, debe considerarse que la sobre-utilización de corticoides inhalados podría tener más riesgos que beneficios a largo plazo y generar además un innecesario incremento en los costos del sistema de salud. La necesidad

de encontrar bio-marcadores que faciliten la identificación de estos pacientes continúa siendo un desafío. Si bien los hallazgos de este trabajo constituyen resultados preliminares de un estudio descriptivo que intenta comprender el rol de los eosinófilos para diferenciar los pacientes con EPOC, nosotros hipotetizamos que la eosinofilia en esputo podría ser una herramienta a utilizar como criterio para la indicación de corticoides inhalados. Cada paciente debe ser evaluado en forma individual para optimizar su tratamiento.

Conflictos de interés: Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses relacionados con el tema de esta publicación.

Bibliografía

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. [homepage on the Internet] Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. En: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2014_Jun11.pdf.
2. Rutten-van Molken MP, Oostenbrink JB, Tashkin DP et al. Does quality of life of COPD patients as measured by the generic EuroQol five-dimension questionnaire differentiate between COPD severity stages? *Chest* 2006; 130(4): 1117-1128.

3. European Respiratory Society/European Lung Foundation. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. European Lung Foundation. European Lung White Book. Lausanne: European Respiratory Society; 2003, pp.34-43.
4. Masa JF, Sobradillo V, Villasante C et al. Costes de la EPOC en España. Estimación a partir de un estudio epidemiológico poblacional. *Arch Bronconeumol* 2004; 40: 72-79.
5. Gould NS, Min E, Gauthier S, Chu HW, Martin R, Day BJ. Aging Adversely Affects the Cigarette Smoke-induced Glutathione Adaptive Response in the Lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(9): 1114-22.
6. Barrecheuren M, Esquinas C, Miravittles M. The asthma COPD overlap syndrome (ACOS). Opportunities and challenges. *Curr Opin Pulm Med* 2015; 21: 74-79.
7. Soler-Cataluña JJ, Cosío B, Izquierdo JL et al. Consensus document on the overlap phenotype COPD-asthma in COPD. *Arch Bronconeumol* 2012; 48(9): 331-7.
8. Weiss ST. What genes tell us about the pathogenesis of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181(11): 1170-1173.
9. Matkovic Z, Tudoric N, Miravittles M. Impact of chronic bronchial infection in the lung and beyond. *Eur Respir Mon* 2013; 60: 46-57.
10. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 2002; 156(8): 738-746.
11. Torres-Duque C, Maldonado D, Pérez-Padilla R, Ezzati M, Viegi G. Biomass Fuels and Respiratory Diseases. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5(5): 577-90.
12. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2007. En: <http://www.goldcopd.org/Guidelines/guidelines-global-strategy-for-diagnosis-management-2007.html>, 2014.
13. Kersul AL, Iglesias A, Rios A et al. Molecular mechanisms of inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol* 2011; 47: 176-83.
14. Dal Negro RW, Bonadiman L, Turco P. Prevalence of different comorbidities in COPD patients by gender and GOLD stage. *Multidiscip Respir Med* 2015 5; 10(1): 24.
15. Lopez-Campos JL, Agustí A. Heterogeneity of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: a two-axes classification proposal. *Lancet Respir Med* 2015; S2213-2600(15)00242-8.
16. Magnussen H, Disse B, Rodriguez-Roisin R et al. Withdrawal of inhaled glucocorticoids and exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 2014; 371: 1285-94.
17. Liesker JJW, Bathoorn E, Postma DS, Vonk JM, Timens W, Kerstjens HAM. Sputum inflammation predicts exacerbations after cessation of inhaled corticosteroids in COPD. *Respir Med* 2011; 105(12): 1853-1860.
18. Pascoe S, Locantore N, Dransfield MT, Barnes NC, Pavord ID. Blood eosinophil counts, exacerbations, and response to the addition of inhaled fluticasone furoate to vilanterol in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a secondary analysis of data from two parallel randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* 2015; 3(6): 435-442.
19. Siva R, Green RH, Brightling CE et al. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. *Eur Respir J* 2007; 29(5): 906-913.
20. Antus B, Barta I, Horvath I, Csiszer E. Relationship between exhaled nitric oxide and treatment response in COPD patients with exacerbations. *Respirology* 2010; 15(3): 472-477.
21. Soter S, Barta I, Antus B. Predicting Sputum Eosinophilia in Exacerbations of COPD Using Exhaled Nitric Oxide. *Inflammation* 2013; 36(5): 1178-1185.
22. Louie S, Zeki AA, Schivo M et al. The asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome: pharmacotherapeutic considerations. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2013; 6(2): 197-219.
23. Bjermer L, Alving K, Diamant Z et al. Current evidence and future research needs for FeNO measurement in respiratory diseases. *Respir Med* 2014; 108(6): 830-841.
24. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(5): 602-615.
25. Hargreave FE, Pizzichini E, Pizzichini M. Induced sputum examination. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(4): 569-70.
26. European Respiratory Task Force Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J* 2002; 20(37): 1s-55s.
27. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319-338.
28. Macintyre N, Crapo RO, Viegi G et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2005; 26: 720-735.
29. Veras TN, Pizzichini E, Steidle LJ et al. Cellular composition of induced sputum in healthy adults. *J Bras Pneumol* 2011; 37(3): 348-53.
30. Singh D, Fox SM, Tal-Singer R et al. Altered gene expression in blood and sputum in COPD frequent exacerbators in the ECLIPSE cohort. *PLoS One* 2014; 9(9): e107381.
31. Miravittles M, Soler-Cataluña JJ, Calle M, Soriano JB. Treatment of COPD by clinical phenotypes: putting old evidence into clinical practice. *Eur Respir J* 2013 6-1; 41(6): 1252-6.
32. Blasi F, Chalmers JD, Aliberti S. COPD and Bronchiectasis: Phenotype, Endotype or Co-morbidity? *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 2014; 11(6): 603-604.
33. Allen-Ramey FC, Gupta S, DiBonaventura MD. Patient characteristics, treatment patterns, and health outcomes among COPD phenotypes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012; 7: 779-87.
34. Miravittles M, Soler-Cataluña JJ, Calle M et al. Spanish Guideline for COPD (GesEPOC). Update 2014. *Arch Bronconeumol* 2014; 50(1): 1-16.
35. GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Vancouver USA: Global Initiative for Asthma 2014; 1-134.
36. Gibson PG, McDonald VM. Asthma-COPD overlap 2015: now we are six. *Thorax* 2015; 70 (7): 683-691.
37. Pleasants RA, Ohar JA, Croft JB et al. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma-patient characteristics and health impairment. *COPD* 2014; 11(3): 256-266.
38. de Marco R, Pesce G, Marcon A et al. The coexistence of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): prevalence and risk factors in young, middle-aged and elderly people from the general population. *PLoS ONE* 2013; 8: e62985.
39. Gibson PG, Simpson JL. The overlap syndrome of asthma and COPD: what are its features and how important is it?

- Thorax 2009; 64: 728-735.
40. Akamatsu K, Matsunaga K, Sugiura H et al. Improvement of Airflow Limitation by Fluticasone Propionate/Salmeterol in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: What is the Specific Marker? *Front Pharmacol* 2011; 2(36): 1-6.
 41. Hardin M, Silverman EK, Barr RG et al. The clinical features of the overlap between COPD and asthma. *Respir Res* 2011; 12: 127.
 42. Bujarski S, Parulekar AD, Sharafkhaneh A, Hanania NA. The asthma COPD overlap syndrome (ACOS). *Curr Allergy Asthma Rep* 2015; 15(3): 509.
 43. Barrecheguren M, Esquinas C, Miravittles M. The asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome (ACOS): opportunities and challenges. *Curr Opin Pulm Med* 2015; 21(1): 74-9.
 44. Yamauchi Y, Yasunaga H, Matsui H. Comparison of in-hospital mortality in patients with COPD, asthma and asthma-COPD overlap exacerbations. *Respirology* 2015; 20(6): 940-946.
 45. Kim MA, Noh CS, Chang YJ et al. Asthma and COPD overlap syndrome is associated with increased risk of hospitalisation. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19(7): 864-869.
 46. Kitaguchi Y, Komatsu Y, Fujimoto K, Hanaoka M, Kubo K. Sputum eosinophilia can predict responsiveness to inhaled corticosteroid treatment in patients with overlap syndrome of COPD and asthma. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012; 7: 283-289.
 47. de Marco R, Marcon A, Rossi A. Asthma, COPD and overlap syndrome: a longitudinal study in young European adults. *Eur Respir J* 2015; 46(3): 671-679.