



**Universidad**  
Zaragoza

---

# ANÁLISIS DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS EN ASMA GRAVE NO CONTROLADA

---

Título en inglés: PLASMA BIOMARKERS ANALYSIS IN SEVERE ASTHMA.

*Trabajo de Final de Máster*

**Autora:**

Laura Martín Biel

**Directores:**

Jose María Marín Trigo

David Sanz Rubio

# ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Definición.....	3
2.2 Epidemiología.....	3
2.3 Factores de riesgo.....	5
2.4 Fisiopatología.....	7
2.5 Diagnóstico.....	11
2.6 Tratamiento.....	14
2.7 Asma grave no controlado.....	17
2.7.1 Fenotipos.....	18
2.7.2 Tratamiento del asma grave.....	19
2.7.3 Biomarcadores en el asma: características de sangre y esputo.....	24
2.7.4 Nuevas técnicas moleculares: exosomas.....	27
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	32
3.1 Hipótesis.....	32
3.2 Objetivos.....	32
3.2.1 Objetivo principal.....	32
3.2.2 Objetivos secundarios.....	32
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
4.1 Cuestionario sobre clínica: Asthma Control Test (ACT). ....	33
4.2 Prueba de esputo inducido. ....	34
4.3 Espirometría basal y tras la prueba broncodilatadora.....	36
4.4 Analítica de sangre.....	36
4.5 Aislamiento de exosomas.....	37
4.6 Caracterización de exosomas.....	37
4.7 Cuantificación de exosomas: NTA.....	38

5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
5.1	Análisis de la población .....	39
5.1.1	Análisis de variables demográficas.....	39
5.1.2	Análisis de función pulmonar .....	41
5.1.3	Análisis de variables analíticas .....	42
5.2	Coherencia del fenotipado en plasma vs esputo inducido .....	45
5.3	Correlación de variables analíticas, funcionales y clínicas .....	48
5.4	Aislamiento de exosomas de plasma. Caracterización. ....	50
5.5	Cuantificación de exosomas de plasma .....	52
6.	CONCLUSIONES .....	55
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	56

## ABREVIATURAS

HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet  
GEMA: Guía Española para Manejo del Asma  
FEV1: volumen espiratorio máximo en el primer segundo  
FVC: capacidad vital forzada  
PEF: flujo espiratorio máximo  
FENO: fracción exhalada de óxido nítrico  
EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica  
AMPc: adenosín monofosfato cíclico  
LABA: Long Acting Beta Agonist  
SABA: Long Acting Muscarinic Antagonist  
ACT: Asthma Control Test  
ACQ: Asthma Control Questionnaire  
NK: Natural Killer  
GINA: Global Initiative for Asthma  
GOT: Transaminasa glutámico-oxalacética  
GPT: Transaminasa glutámico pirúvica  
PCR: Proteína C Reactiva  
NTA: Nanoparticle Tracking Analysis  
PBS: tampón fosfato salino  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
AGNC: Asma Grave No Controlada  
IMC: Índice de Masa Corporal  
DE: Desviación Estándar  
HCM: Hemoglobina Corpuscular Media

## 1. RESUMEN

El asma es una patología respiratoria de elevada prevalencia, con un origen multifactorial y cuyo desconocimiento en cuanto a sus procesos fisiopatológicos implican un difícil control de la enfermedad. Dentro de la patología asmática existe un grupo denominado asma grave no controlada que supone un importante reto en cuanto al manejo de los síntomas y prevención de la pérdida de función pulmonar. Hemos llevado a cabo un estudio de cohortes observacional a partir de una muestra constituida por pacientes con diagnóstico de asma grave no controlada de la consulta de Asma Grave del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) y un grupo control. El objetivo fue el estudio de variables analíticas tanto en sangre como en esputo inducido, variables de función pulmonar y variables clínicas, y demostrar si existían diferencias entre los grupos de estudio, así como entre los orígenes de muestra. Además, se llevó a cabo el estudio cuantitativo y morfológico de los exosomas, vesículas extracelulares que pueden tener un papel importante en el transporte de información intercelular. Los resultados obtenidos mostraron inconsistencia en el uso de algunas variables estudiadas para la clasificación y consiguiente manejo del asma grave no controlado. Esto se observó en variables analíticas que se han utilizado clásicamente en el asma como la IgE plasmática, parámetro que presentó un valor medio elevado de 114,2 en el grupo de asma no T2 frente al 49,4 y 52,4 del grupo control y asma T2 respectivamente. El perfil de eosinofilia en el grupo asma T2 fue predominantemente de eosinofilia tanto en plasma como en esputo en el 61% de los casos, sin embargo, hasta el 4% de los controles se observó este mismo perfil. Lo más llamativo en estos resultados es que en el grupo de asma T2 el 28% presentó eosinofilia en esputo que no se asociaba a eosinofilia en plasma. Por ello resulta importante y necesario continuar con la búsqueda de nuevos biomarcadores que nos permitan acercarnos a una Medicina más personalizada.

## ABSTRACT

Asthma is a high prevalence respiratory pathology, with multifactorial origin and which pathophysiologic processes are not exactly understood, it implies a bad control of the illness. There is a group of patients called severe uncontrolled asthma which supposes a challenge for the symptoms management and loss of lung function prevention. We have developed an observational cohort study with patients diagnosed with severe asthma in the Severe Asthma Unit of Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) and a control group. The objective was to analyze analytical variables in plasma and induced sputum, lung function variables and clinical variables, and to evaluate differences between the study groups, as well as sampling origins. Moreover, it was carried out a quantification and morphologic study of exosomes, a subtype of extracellular vesicles which can take an important role in intracellular information transport. The results showed inconsistency in the use of these variables in the classification and management of severe asthma. This is observed in typical analytic variables used in asthma like plasmatic IgE, which value in asthma no T2 group was elevated with a 114,2 versus 49,4 and 52,4 in control group and asthma T2 respectively. The eosinophilia profile in asthma T2 group was in the 61% with eosinophilia in plasma and sputum, however, up to 4% of controls showed the same profile. The most interesting was that asthma T2 group had 28% sputum eosinophilia only not associated with plasma eosinophilia. Thus, it is necessary to continue searching new biomarkers in order to approach a more personalized medicine.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Definición

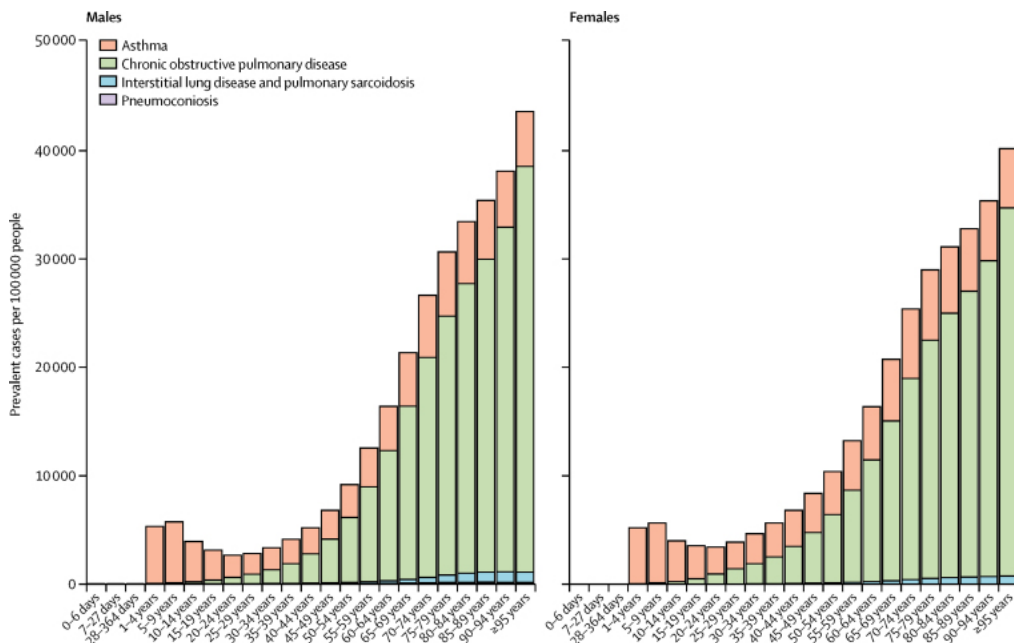
Según GEMA 5.2, “el asma es un síndrome que incluye diversos fenotipos clínicos que comparten manifestaciones clínicas similares, pero de etiologías probablemente diferentes. Clásicamente, se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, donde participan distintas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos, que cursa con hiperrespuesta bronquial y una obstrucción variable al flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente. Al ser una enfermedad crónica, incluida en las diferentes estrategias de cronicidad vigentes, el objetivo de su abordaje es alcanzar y mantener el control de la patología y la prevención del riesgo futuro, especialmente de las exacerbaciones, que pueden poner en riesgo la vida del paciente y generar una carga para la sociedad” (1).

### 2.2 Epidemiología

La prevalencia del asma se encuentra en aumento en las últimas décadas. Así lo reflejó el Global Burden of Disease report publicado en 2015 que informaba que el asma se trataba de la patología respiratoria crónica más frecuente con una prevalencia estimada de 358 millones de casos, con un aumento en la prevalencia desde 1990 hasta 2015 de un 12,6%. Se prevé que estas cifras puedan verse aumentadas hasta 100 millones de nuevos casos para 2025 (2). En España se estima que existen 3 millones de personas con asma, de los cuales el 10,6% son adolescentes (1).

El *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*, que ya ha finalizado la fase 3 de estudio, recoge encuestas realizadas a 1.200.000 niños procedentes de 98 países de diferente grado de desarrollo y 233 centros de diferente nivel socioeconómico. A nivel mundial, la prevalencia de asma entre los 13 y 14 años es del 14,1%, y del 11,7% entre los 6 y 7 años. Parece haber una prevalencia mayor en zonas costeras y en varones cuando hablamos de niños, especialmente entre los 6 y 7 años (3).

Como se puede observar en la Figura 1, el asma es la enfermedad respiratoria crónica de mayor prevalencia hasta los 40 años, cuando la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica comienza a ganar mayor protagonismo tanto en hombres como en mujeres.



**Figura 1.** Prevalencia mundial específica por edad y sexo de enfermedades respiratorias crónicas por categoría de enfermedad en 2017 (4).

El incremento de la prevalencia implica un empeoramiento de la calidad de vida, un aumento de los costes socioeconómicos relacionados con el absentismo laboral y escolar, mayor consumo de recursos sanitarios y aumento de la mortalidad (5).

La Organización Mundial de la Salud estima que 250.000 muertes al año pueden atribuirse al asma (6,7). Una de las causas de estas cifras de mortalidad es el mal manejo de la enfermedad, registrándose en Reino Unido 195 muertes de pacientes asmáticos en 2014 de los cuales se identificaron deficiencias en el manejo de la enfermedad en dos terceras partes de los casos (6).

Cuando hablamos de asma grave no controlada, la prevalencia entre los pacientes asmáticos se encuentra en torno al 5%. En niños a nivel mundial es del 6,9% oscilando desde un 3,8% en Asia, zonas del Pacífico y Noreste de Europa, hasta un 11,3% en Norteamérica (8).

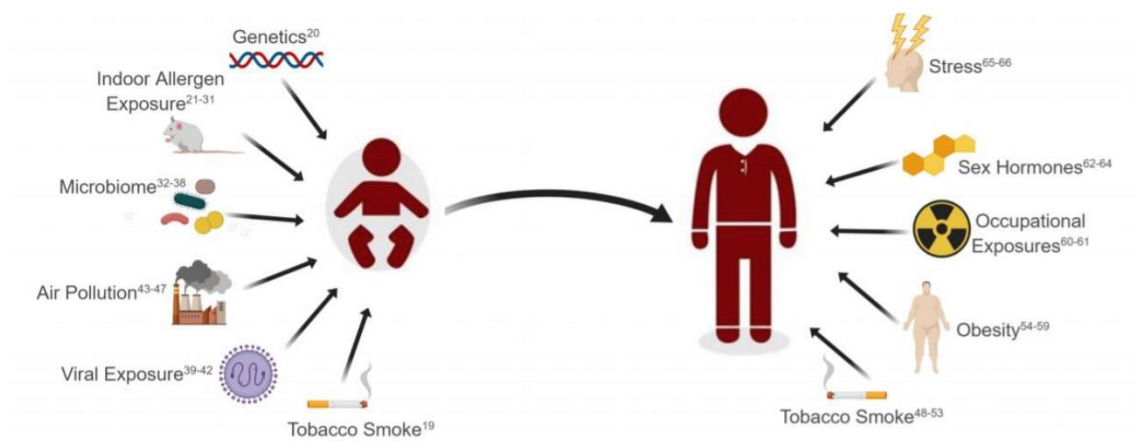


## 2.3 Factores de riesgo

A pesar del desarrollo de diversos fármacos activos frente al asma, el aumento continuo de nuevos casos a lo largo del tiempo hace pensar que aún hoy en día se desconocen las causas de esta enfermedad.

Los factores de riesgo que han demostrado mayor relación con el desarrollo de asma son la genética, la exposición a alérgenos siendo el riesgo especialmente alto cuando la sensibilización al alérgeno tiene lugar en los 5 primeros años de vida, la contaminación ambiental (ozono, óxido de nitrógeno), y la exposición a virus respiratorios (9).

La mayoría de los factores relacionados con el paciente son perinatales, como el consumo de tabaco de la madre durante el embarazo, la dieta materna y del lactante, lactancia o prematuridad. Otros factores de riesgo relacionados con el propio paciente son la obesidad, hiperrespuesta bronquial o atopia, aunque demostrados con un nivel de evidencia menor que los previamente citados. Por su parte, los factores ambientales, como la contaminación ambiental, el tabaco, infecciones respiratorias, aeroalérgenos y alérgenos laborales, son más variables y pueden afectar al paciente a cualquier edad (1,9). Estos factores se reflejan en la Figura 2.



**Figura 2.** Factores de riesgo para desarrollo de asma (9).

La genética está adquiriendo cada vez mayor importancia conforme avanza la investigación de los factores de riesgo para desarrollo del asma. Estudios poblacionales describen que el riesgo individual para sufrir asma en ausencia de antecedentes familiares es del 5%, mientras que el riesgo puede aumentar hasta el 50% en caso de

tener dos padres asmáticos, o incluso al 75% en caso de gemelos monocigóticos (10). Igualmente, el estudio de la genética tiene un papel importante en la expresión fenotípica de la enfermedad, la respuesta a factores desencadenantes de agudizaciones y respuesta a fármacos biológicos en caso de asma grave. Esto se puede explicar porque las modificaciones epigenéticas permiten regular la expresión de citoquinas y la transcripción de factores encargados de la diferenciación de células T (1). Además, los mecanismos epigenéticos pueden influir en el desarrollo de asma en la infancia por la regulación de los niveles de IgE y otros genes relacionados con el asma como *ALOX15*, *CAPN14* y *POSTN* (11).

La exposición a alérgenos en el domicilio es de relativa importancia ya que la detección precoz de este factor de riesgo puede suponer una vía de prevención para el desarrollo de asma mediante una actuación precoz durante la infancia, especialmente en los casos de exposición frente a ácaros del polvo doméstico, ratones, cucarachas, caspa de animales y hongos (9).

La obesidad también se ha postulado, no solo como factor de riesgo para desarrollar asma de aparición tardía, sino también como factor para mal control de la enfermedad, especialmente en individuos no alérgicos y con un efecto más notorio en mujeres (1). Esta relación entre el asma y la obesidad es especialmente mayor en presencia de resistencia a la insulina. El hecho de que el asma se presente con mayor frecuencia en mujeres adultas obesas frente a hombres se podría explicar por mecanismos hormonales, ya que las diferencias significativas en la prevalencia entre hombre y mujeres aparecen en el inicio de la pubertad (9).

Los virus respiratorios pueden actuar de forma independiente o conjunta a la atopia. El Virus Respiratorio Sincitial y el Rinovirus Humano son los virus más comúnmente relacionados con la aparición de sibilancias en la infancia, suponiendo este último especial predilección para asma atópica comparable a la sensibilización de alérgenos (9).

La exposición al tabaco ha demostrado ser factor de riesgo cuando esta se produce en edades tempranas e incluso en el periodo prenatal, así como por tabaquismo activo del paciente, aumentando la morbimortalidad con respecto a los no fumadores (9).

La contaminación ambiental cuenta cada vez con mayor evidencia en cuanto a su importancia como factor de riesgo para el desarrollo de asma, así como factor desencadenante de agudizaciones (12,13). Entre los gases que se encuentran implicados, destaca el ozono y el dióxido de nitrógeno. La genética vuelve a tener un papel importante en el efecto de estos contaminantes sobre la vía aérea del individuo, presentando una mayor susceptibilidad aquellos que tengan polimorfismos en la enzima glutatión-S-transferasa que supone un mecanismo de defensa antioxidante. El cambio climático ha supuesto un aumento en la duración de las épocas de polinización, con el consiguiente efecto en los casos de asma alérgica (12).

También los eventos estresantes parecen tener un efecto deletéreo en el desarrollo y manejo de la enfermedad (9). Existe una forma de la enfermedad conocida como asma ocupacional, relacionada con la exposición laboral a sustancias químicas de alto peso molecular y de bajo peso molecular, pudiendo activar los mecanismos inmunológicos del asma vía IgE o no-IgE respectivamente. En los casos de exposición aguda a altas dosis de tóxicos produciría lesiones compatibles con asma, pero no mediada por mecanismos inmunológicos. Estos casos suponen un manejo relativamente sencillo mediante el cese de la exposición, aunque en ocasiones no se consiga la resolución completa.

Existen hipótesis que respaldan el desarrollo del microbioma del individuo como mecanismo de protección frente a la aparición de atopia y asma, fundamentado en un contacto con mayor diversidad de microorganismos desde edades tempranas. Esto explicaría el hecho de que la prevalencia de la enfermedad sea menor en medios rurales (9).

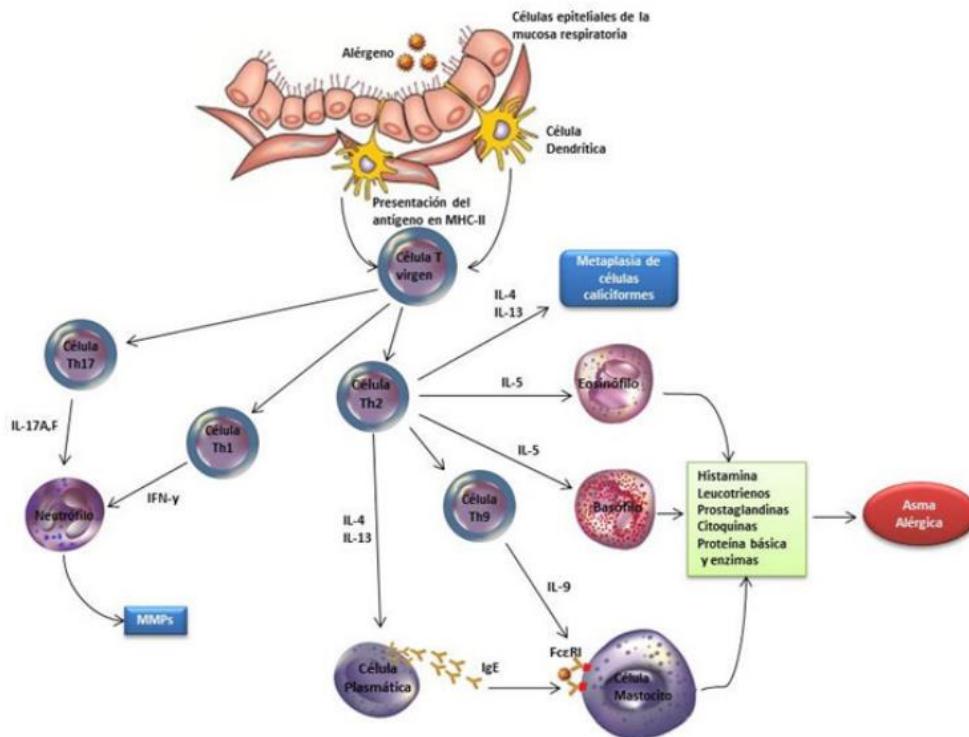
## 2.4 Fisiopatología

El asma se trata de una enfermedad inflamatoria de la vía aérea que, consecuentemente provoca clínica debida a la obstrucción, siendo más evidente a nivel de los bronquiolos de mediano y pequeño calibre. Las consecuencias finales de todos los mecanismos nocivos que se activan son la remodelación y obstrucción de la vía aérea, la hiperreactividad bronquial y la variabilidad de la obstrucción y de la clínica por la reversibilidad (1).

A nivel celular y molecular, el proceso puede iniciarse por vía inmunológica o no inmunológica. El mecanismo inmunológico puede o no estar mediado por IgE. El epitelio bronquial entra en contacto con sustancias que son detectadas como antígenos. Las células presentadoras de antígenos presentarán el antígeno a los linfocitos Th2 de tal forma que, una vez que estos se activan, inician la liberación de citoquinas propias de una respuesta T2 como son IL-4, IL-5 e IL-13, activan moléculas de adhesión y linfocitos B. Estos linfocitos B son los que van a producir IgE específica. Una vez que la IgE se une a mastocitos, basófilos y eosinófilos se produce la sensibilización del individuo (14). En el caso del mecanismo no inmunológico, las células epiteliales producen directamente citoquinas y las células endoteliales y fibroblastos producen neuropéptidos por estímulos irritativos sobre las fibras nerviosas. En el caso de paciente con un fenotipo asma no T2, la respuesta inflamatoria no se debe a la liberación de las citoquinas previamente mencionadas, sino que intervienen otras como IL-17 e IFN- $\gamma$  (15).

La mayoría de las células inflamatorias implicadas en el asma se encuentran aumentadas en la vía aérea. Los mastocitos liberan mediadores inflamatorios (histamina, leucotrienos, prostaglandina) cuando se activan, los cuales provocan inflamación y broncoconstricción. Los eosinófilos están activados y su apoptosis está inhibida, y se encargan de liberar enzimas inflamatorias que lesionan el epitelio, la cantidad de eosinófilos en la vía aérea se relaciona con la gravedad de la enfermedad. Los neutrófilos pueden estar aumentados en algunos casos de asma grave, pero pueden resultar inespecíficos ya que pueden encontrarse aumentados en fumadores o paciente en tratamiento con glucocorticoides (1,16).

Todos estos mecanismos celulares y moleculares mencionados previamente se ven reflejados en la Figura 3, donde se muestra la presentación antigénica a nivel de la vía aérea y, posteriormente todas las células activadas, así como citoquinas y sustancias liberadas durante el proceso.



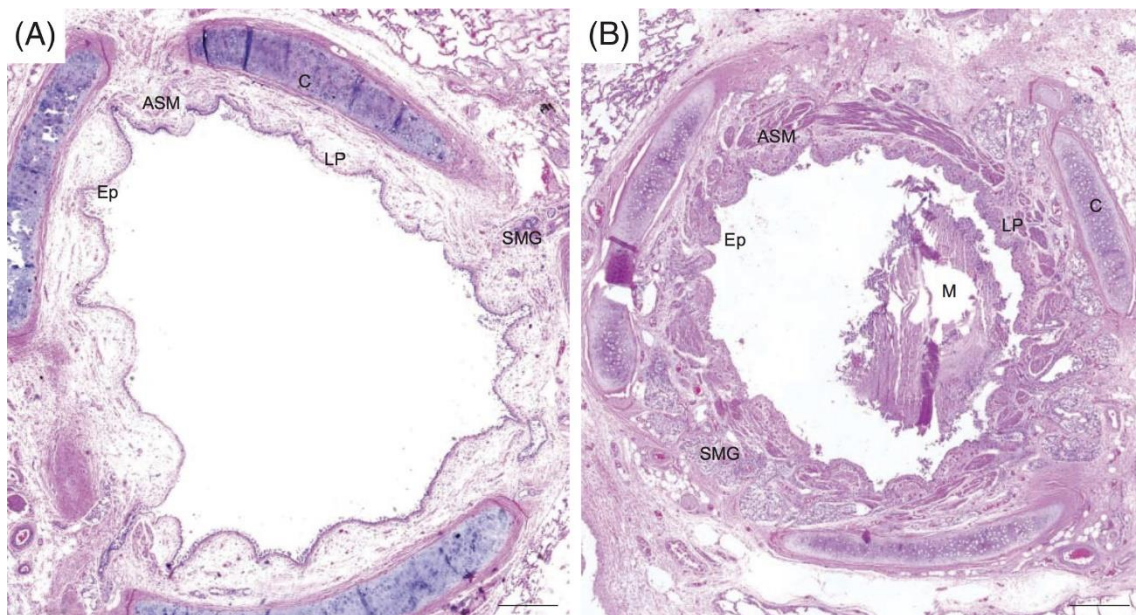
**Figura 3.** Cascada de la inflamación desencadenada en el asma alérgica (16).

A nivel estructural se pueden apreciar diferentes alteraciones de la vía aérea que suponen otro de los conceptos característicos del asma, la remodelación de las vías respiratorias (1,14,17):

- Lesión del epitelio bronquial con pérdida de células ciliadas y secretoras. Se trata de un epitelio muy sensible a lesiones externas o citoquinas internas y, en ocasiones, el proceso de reparación puede ser anormal y empeorar la situación de obstrucción bronquial.
- Edema en la vía aérea debido a la extravasación microvascular como efecto de mediadores inflamatorios.
- Hiperplasia e hipertrofia del músculo liso bronquial.
- Hiperplasia de glándulas mucosas e hipersecreción que favorece la obstrucción.
- Los fibroblastos y miofibroblastos se encuentran estimulados por mediadores inflamatorios y de crecimiento, producen componentes del tejido conectivo que participan en el remodelado de la vía aérea.
- Engrosamiento de la membrana basal y fibrosis subepitelial.

- Las células endoteliales se encargan de reclutar células inflamatorias desde los vasos hasta la vía aérea, al expresar moléculas de adhesión.
- Proliferación y dilatación vascular.

Estas alteraciones anatomopatológicas se encuentran reflejadas en el ejemplo que se muestra en la Figura 4, donde se compara la vía aérea de un paciente sano frente a la de un paciente asmático.



**Figura 4.** A la izquierda (A) se observa imagen microscópica de un corte de vía aérea de gran calibre de un individuo sano, mientras que a la derecha (B) se trata de un paciente asmático. Se observa un engrosamiento del músculo liso bronquial (ASM), aumento de las glándulas submucosas (SMG) e inflamación de la lámina propia (LP). Presencia de moco (M) en la luz bronquial (18).

El resultado final de estas alteraciones va a ser la hiperrespuesta bronquial como circunstancia característica, aunque no única del asma. La hiperrespuesta bronquial se trata de una disminución del calibre de la vía aérea ante estímulos que resultarían inocuos en individuos sanos. Esta se debe a un exceso de contracción de la musculatura lisa bronquial, el desacoplamiento de la contracción de la vía aérea por inflamación bronquial y pérdida del umbral máximo de contracción, engrosamiento de la pared por el edema y los cambios estructurales, y mayor reactividad de nervios sensitivos por la

inflamación local, lo que conlleva una broncoconstricción excesiva ante mínimos estímulos (14).

## 2.5 Diagnóstico

El proceso diagnóstico se inicia con una sospecha clínica. Los síntomas guías del asma son los sibilantes, disnea, tos y opresión torácica, y su presencia es muy variable, aunque típicamente son de predominio nocturno o de madrugada y suelen estar asociados a factores desencadenantes como exposición al tabaco, alérgenos, infecciones víricas, ejercicio o cambios estacionales. Estos signos y síntomas resultan inespecíficos pero la presencia de atopia o historia familiar de asma podrían aumentar la probabilidad diagnóstica. En la exploración física esperaremos encontrar sibilantes a la auscultación y, en casos de atopia, dermatitis, rinitis o pólipos nasales (1).

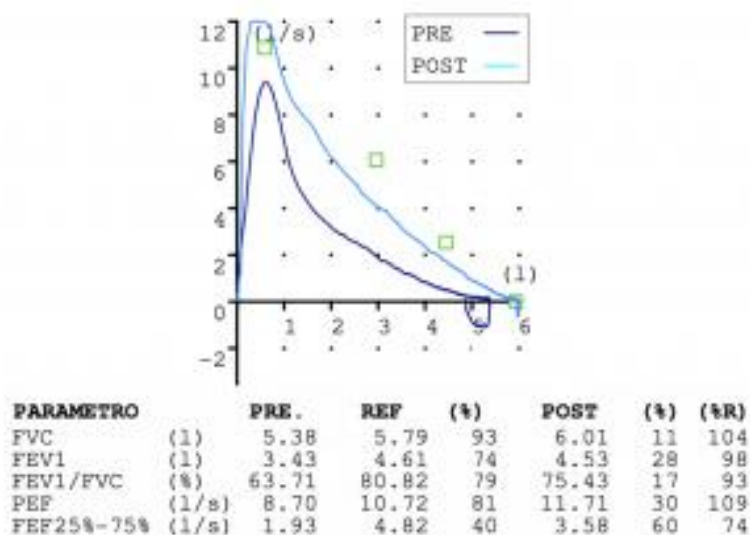
Cuando se cuenta con la sospecha clínica de asma se deben realizar pruebas de función pulmonar, con las que se pretende detectar aspectos característicos de la enfermedad (14):

- Obstrucción de la vía aérea con un  $FEV_1/FVC < 0,7$ .
- Reversibilidad de la vía aérea con una prueba broncodilatadora positiva, que se interpreta como un aumento de la  $FEV_1$  mayor o igual al 12% y 200ml cuando hablamos de valores absolutos, respecto al basal.
- Variabilidad mediante el manejo domiciliario del flujo espiratorio máximo (PEF).
- Hiperrespuesta bronquial con prueba de broncoconstricción.

La primera prueba que se debe realizar es la espirometría, y los parámetros que tienen mayor relevancia son el  $FEV_1$  (volumen espiratorio máximo en el primer segundo) y FVC (capacidad vital forzada), para hacer un cálculo del  $FEV_1/FVC$  que indicará presencia de patrón obstructivo con valores por debajo de 0,7. La variabilidad característica del asma implica la posibilidad de que el paciente no presente un patrón obstructivo en el momento de realizar la espirometría (1,14,19).

Junto a la espirometría basal se realiza espirometría tras la prueba broncodilatadora administrando inhaladores de acción rápida, habitualmente salbutamol.

Interpretaremos como prueba broncodilatadora positiva aquella en la que haya un aumento del FEV1 mayor o igual del 12% y 200 ml con respecto a los resultados basales, y será representativa de reversibilidad de la vía aérea, como es el caso del ejemplo presentado en la Figura 5. Otro método de demostrar la reversibilidad es mediante el flujo espiratorio máximo, que se considera positivo si la variación es mayor o igual al 20% (1).



**Figura 5.** Curva flujo-volumen de espirometría basal (azul oscuro) y tras broncodilatación. No presenta un patrón obstructivo dado que FEV1/FVC es mayor del 70%, sin embargo, se observa cierto grado de obstrucción por FEV1 <80%. La prueba broncodilatadora es positiva ya que la FEV1 aumenta en un 28% (>12%) y 1100 ml (>200ml) con respecto al basal (20).

Igualmente, el flujo espiratorio máximo puede demostrar la variabilidad, por lo que es útil para el diagnóstico, pero también para control en domicilio.

La prueba broncoconstrictora o de provocación bronquial pretende evidenciar la presencia de hiperrespuesta bronquial con fenómeno característico del asma. Tiene especial importancia en casos de clínica sospechosa de asma bronquial que presentan espirometrías normales (21). Esta prueba utiliza como estimulantes agentes directos (metacolina o histamina) que actúan directamente sobre la musculatura lisa de la vía aérea, o agentes indirectos (adenosina monofosfato, manitol o solución salina hipertónica), que estimulan la liberación de mediadores de células inflamatorias con efecto broncoconstrictor (1). La prueba de provocación bronquial se considera positiva cuando se produce una disminución de la FEV1 basal mayor o igual del 20%, salvo en el



caso del uso de histamina en el que el valor de referencia es 15%. La prueba es útil para descartar el diagnóstico de asma ya que tiene una elevada sensibilidad, pero escasa especificidad, por lo que no ayuda en la confirmación diagnóstica (22,23).

La determinación de la fracción exhalada de óxido nítrico (FENO) es una medida no invasiva que permite valorar la situación inflamatoria de la vía aérea, especialmente importante en casos de fenotipo alérgico T2. Se correlaciona con eosinofilia de las vías aéreas pero su asociación resulta imperfecta, por ello se prefiere la realización de la técnica de esputo inducido, ya que permite entender con mayor exactitud la situación inflamatoria de la vía aérea (24). Esta prueba se considera positiva cuando se obtiene un FENO > 40 ppb, salvo en pacientes en tratamiento con glucocorticoides donde el valor de referencia será más bajo, siendo útil para predecir respuesta al tratamiento, así como en pacientes fumadores (25). En caso de FENO positivo, pero en presencia de prueba broncoconstrictora negativa el diagnóstico irá orientado hacia el de bronquitis eosinofílica.

En la Figura 6 se puede ver de forma esquemática el algoritmo diagnóstico que propone la Guía Española para Manejo del Asma.

Hoy en día, sigue existiendo un infradiagnóstico del asma a pesar de que los métodos diagnósticos son fácilmente realizables, poco costosos y accesibles en la mayoría de los centros sanitarios. Por consiguiente, existe también un infratratamiento de la enfermedad a pesar de la existencia de múltiples opciones terapéuticas que han demostrado seguridad y eficacia (1).

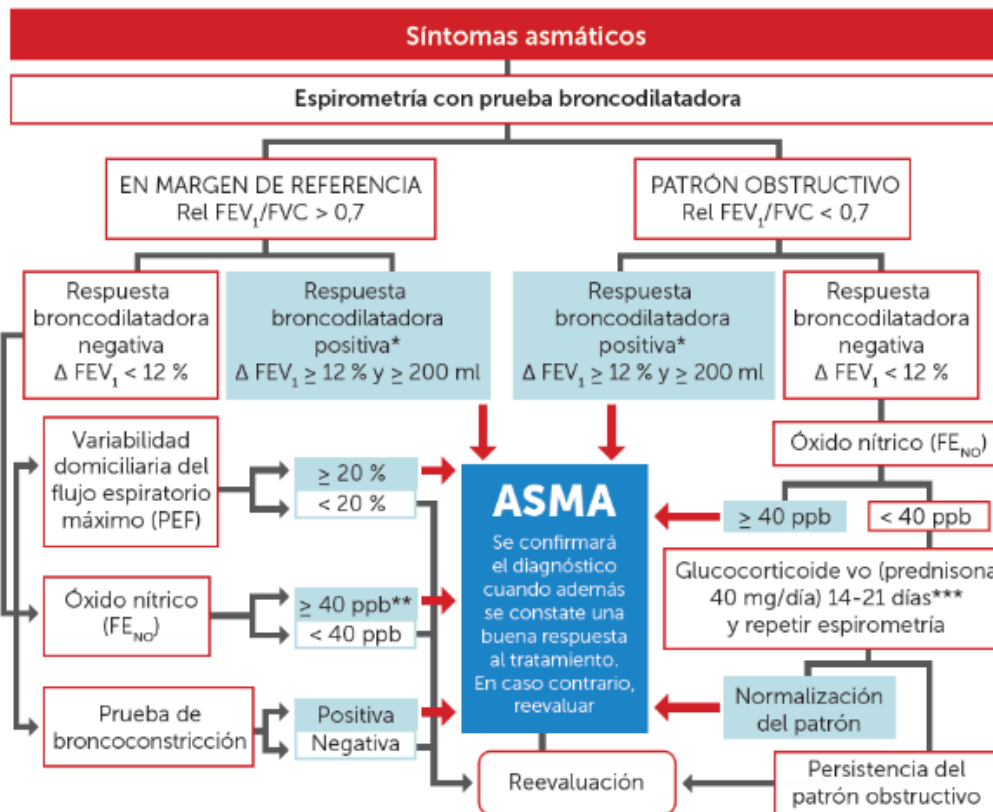


Figura 6. Algoritmo diagnóstico según GEMA 5.2 (1)

## 2.6 Tratamiento

Los objetivos fundamentales del tratamiento van a ser el adecuado control de los síntomas con el fin de evitar una progresión de la obstrucción en la vía aérea.

El plan de acción consiste en evaluar la situación clínica del paciente y hacer una modificación del tratamiento de acuerdo con un sistema escalonado en el que, según el grado de control sintomático se asciende o desciende, tal y como se muestra en la Figura 7. Para hacer un adecuado manejo de este esquema terapéutico es fundamental hacer un seguimiento del paciente, así como establecer medidas de supervisión y educación para el paciente (13), de tal forma que podamos determinar las necesidades terapéuticas mínimas de cada paciente para un adecuado control de la enfermedad (26).

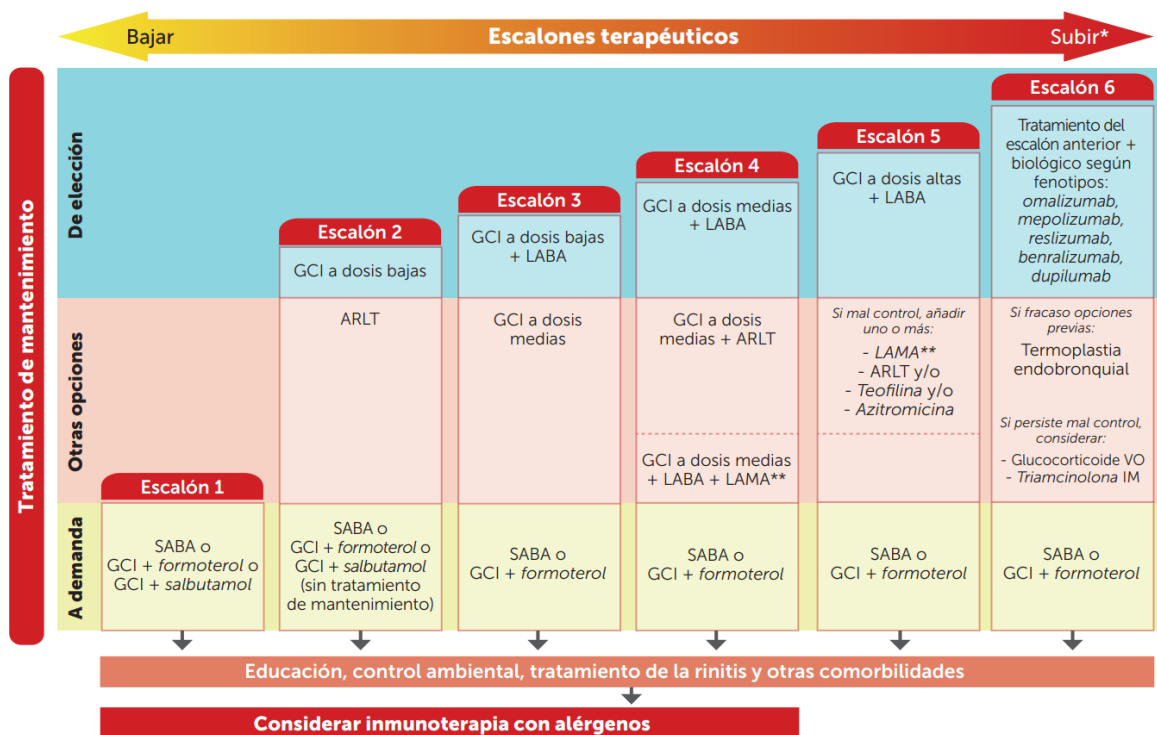
Las medidas farmacológicas se dividen en tratamiento de mantenimiento y tratamiento de rescate.

El tratamiento de mantenimiento es aquel que se administra de forma prolongada y continua. El tratamiento de rescate es aquel que se administra de forma rápida en casos de mal control de la clínica de forma aguda (1).

Los principios activos utilizados para el tratamiento del asma son:

- $\beta_2$  adrenérgicos tanto de acción corta para el tratamiento a demanda, como de acción larga para el tratamiento a demanda y de mantenimiento asociado a glucocorticoides inhalados. Su efecto broncodilatador se debe a liberación de catecolaminas endógenas (27).
- Glucocorticoides inhalados también de uso a demanda y como mantenimiento. Estos han demostrado mejorar el control de la enfermedad y reducir las exacerbaciones de esta y, el aumento de la dosis demuestra un aumento en la reducción de exacerbaciones graves y, por lo tanto, la necesidad de uso de corticoides sistémicos (13,28).
- Antagonistas de los receptores de leucotrienos. El uso de estos fármacos se justifica porque se ha demostrado que las células inflamatorias de la vía aérea producen leucotrienos, estos se encuentran aumentados en líquidos biológicos de pacientes asmáticos y participan en la broncoconstricción (29). No se consideran de elección en ningún escalón terapéutico, pero es una opción aceptable tanto para uso solo o combinado. Esto se debe a que ha demostrado disminuir las exacerbaciones, pero resulta inferior a los glucocorticoides inhalados o a la terapia combinada (30).
- Teofilina es un fármaco que históricamente se ha utilizado tanto para el tratamiento del asma como de la EPOC por su efecto broncodilatador mediante la inhibición no selectiva de la fosfodiesterasa, con aumento del AMPc intracelular y relajación del músculo liso bronquial. Sin embargo, se precisan niveles plasmáticos elevados para efectos clínicos moderados y, siendo un fármaco con un estrecho rango terapéutico, su seguridad en relación con el efecto ha sido muy cuestionada. Además, la aparición de evidencia que respalda el uso de terapia combinada inhalada de forma más segura ha relegado el uso de la teofilina un segundo plano (31).

- Azitromicina ha demostrado efecto inmunomodulador mediante la inhibición de mediadores inflamatorios como algunas interleucinas, y la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión, de modo que reduce la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales, reduciendo el efecto broncoconstrictor de la endotelina (32). Su uso para el tratamiento del asma se plantea en casos de asma mal controlado a pesar de corticoides inhalados a altas dosis combinados con LABA, y como tratamiento adyuvante (1).



**Figura 7.** Tratamiento de mantenimiento del asma (1)

En el tratamiento de mantenimiento, inicialmente se opta por tratamiento a demanda consistente en SABA inhalado con glucocorticoides inhalados asociados a formoterol o salbutamol (LABA o SABA). A partir del segundo escalón se considera de elección el uso de corticoides inhalados, inicialmente a dosis bajas, posteriormente asociados a LABA, y seguidamente aumentando progresivamente la dosis de glucocorticoides. En caso de un inadecuado control a pesar de tratamiento que combine glucocorticoides a altas dosis con LABA, el siguiente escalón plantea el uso de biológicos según el fenotipo del paciente (1).

El uso de corticoides inhalados asociados a LABA como tratamiento de mantenimiento de control se debe a que dicha combinación ha demostrado una reducción significativa de las exacerbaciones en comparación con los glucocorticoides únicamente, aunque esta reducción se observa especialmente en pacientes que ya hacen uso de glucocorticoides inhalados a altas dosis. Es por ello por lo que en el manejo escalonado de la enfermedad se propone la terapia combinada cuando no se consigue adecuado control con glucocorticoides inhalados a dosis bajas. La combinación de elección suele ser budesónida/formoterol por su velocidad de acción, seguridad y eficacia (33).

## 2.7 Asma grave no controlado

Entre un 3 % y un 10 % de los pacientes que padecen asma se incluyen dentro del grupo de pacientes con asma grave no controlado (34). Esta situación clínica se define por la persistencia de mal control de los síntomas a pesar del tratamiento con una combinación de glucocorticoides inhalados (GCI) con beta2 adrenérgicos de larga acción (LABA), a dosis elevadas en el último año, o bien glucocorticoides orales durante al menos 6 meses del mismo periodo.

La falta de control se objetiva por (35):

- ACT < 20 o ACQ > 1,5. Se tratan de escalas de valoración sintomática del asma, cuya mejoría en la puntuación ha demostrado tener una relación significativa con mejoría de la función pulmonar, la disminución del uso de medicación de rescate, exacerbaciones, mejoría de la calidad del sueño y de la productividad (36).
- $\geq 2$  exacerbaciones graves o haber recibido  $\geq 2$  ciclos de glucocorticoides orales (de  $\geq 3$  días cada uno) en el año previo.
- $\geq 1$  hospitalización por exacerbación grave en el año previo.
- Limitación crónica del flujo aéreo (relación FEV1/FVC < 0,7 o FEV1 < 80 % del predicho) después del uso de un tratamiento adecuado (siempre y cuando el mejor FEV1 sea superior al 80 %).

La presencia de asma grave no controlada de forma aislada es rara, siendo más habitual que se presente juntamente con otras comorbilidades como obesidad, rinosinusitis, poliposis nasal o tabaquismo activo (24).

Dentro de esta forma de presentación de la enfermedad existen diferentes fenotipos clínicos que clasifican a los pacientes según hallazgos clínicos y analíticos. La importancia de diferenciar en fenotipos radica en que las guías proponen un manejo terapéutico con diferentes fármacos biológicos en función del fenotipo del paciente, porque permitiría predecir la respuesta a cada una de las opciones de tratamiento (24).

### 2.7.1 Fenotipos

#### *2.7.1.1 Asma eosinofílica*

Es el fenotipo más frecuente paciente dentro del asma grave no controlado, estimando una prevalencia por encima del 80% (37). En este fenotipo de asma, la respuesta inflamatoria se desencadena por el efecto de las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 fundamentalmente (24).

Lo típico de este fenotipo de pacientes es presentar un aumento de los niveles de eosinófilos en sangre y esputo, aumento de la fracción de óxido nítrico exhalado y de los niveles de IgE séricos, siendo posible el uso del recuento de eosinófilos en sangre y la IgE para guiar el uso de agentes biológico en el tratamiento del asma grave (38).

- Alérgica. Cumplen los estereotipos de la enfermedad asmática, con inicio temprano de la clínica atópica e IgE elevada. El fármaco biológico que ha presentado buena respuesta en este grupo de pacientes, y que fue el primero en aprobarse para su uso en asma, es Omalizumab con acción anti-IgE (24).
- No alérgica. Los rasgos clínicos que caracterizan a este grupo es la presencia de poliposis nasal y sensibilidad a salicilatos, mientras que los niveles de IgE se encuentran en rango de la normalidad. Mepolizumab fue el primer biológico aceptado para este grupo de pacientes, con acción anti-IL5 (24).

Otros biológicos aceptados para el asma eosinofílica son Reslizumab por su efecto anti-IL-5 (39) Benralizumab actuando como bloqueante del receptor IL-5, y Dupilumab que bloquea el receptor IL-4/IL-13 (40).

#### *2.7.1.2 Asma no eosinofílica*

Este grupo se caracteriza por ausencia de la inflamación T2 y un predominio de neutrófilos en las vías respiratorias (41).

Además de no contar con fármacos biológicos para el control clínico de este fenotipo, este grupo es escasamente respondedor a los corticoides orales. Por ello la opción de tratamiento que se considera es el uso de azitromicina cada 3 meses por su efecto inmunomodulador (32).

La interleucina IL-17 actúa reclutando neutrófilos y tiene una importante correlación con el asma neutrofílico y la resistencia a corticoides. Por este motivo se ha intentado demostrar efecto del Brodalumab, como anticuerpo monoclonal frente a IL-17, sobre estos pacientes. Sin embargo, solo ha demostrado eficacia en un subgrupo con una gran reversibilidad a la obstrucción de la vía aérea (42).

### 2.7.2 Tratamiento del asma grave

#### *2.7.3.1 Fármacos biológicos*

Según lo expuesto en el apartado anterior, en los casos de asma grave no controlada se propone el uso de tratamiento dirigido según el fenotipo del paciente, asma T2 o no T2, así como de la presencia de marcadores inflamatorios (1).

Los fármacos biológicos han supuesto un cambio en el paradigma del manejo del asma, así como de otras enfermedades de naturaleza autoinmune, dando una opción terapéutica a pacientes que presentaban un mal control con los tratamientos hasta ahora existentes (43,44).

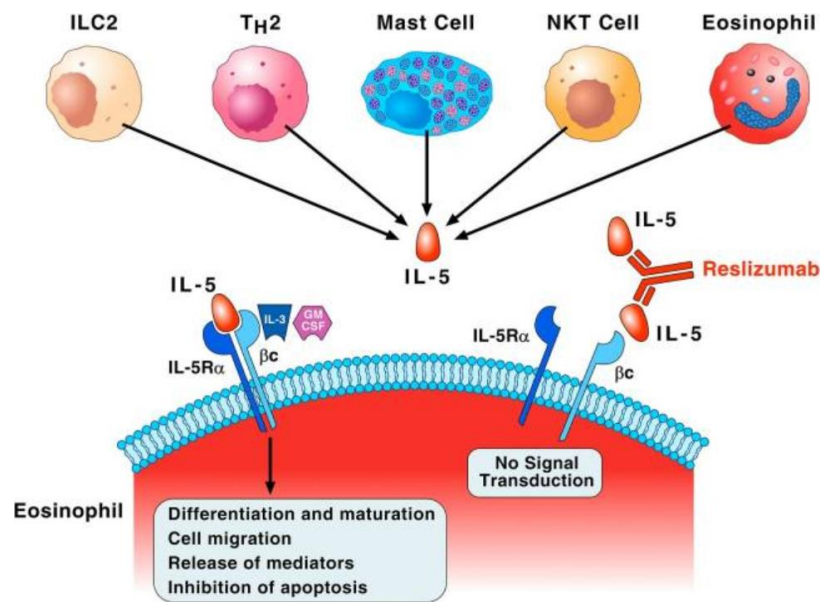
Los fármacos biológicos que han surgido dirigidos al tratamiento del asma se basan fundamentalmente en anticuerpos monoclonales frente a dianas selectivas.

- Omalizumab es un anticuerpo monoclonal que se une e inactiva la IgE, de tal forma que impide su unión al receptor Fc  $\epsilon$  RI en la superficie de los mastocitos

y basófilos. Su efecto final será el de reducir la respuesta inflamatoria específica inducida por activación celular por alérgenos (45). También ha demostrado regular el número de basófilos en sangre periférica, así como el número de eosinófilos en sangre periférica y en tejido bronquial de pacientes asmáticos, por lo que también podría ser una opción terapéutica para pacientes con asma resistente a corticoides que suelen presentar niveles elevados de eosinófilos (46). Fue aprobado en 2009 para el tratamiento del asma grave de perfil alérgico en pacientes mayores de 6 años (45).

- Benralizumab es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al citolítico dirigido por el receptor alfa de la IL-5 expresada en eosinófilos y basófilos. Tiene la capacidad de reclutar células NK contra dichas células para provocar su apoptosis por mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Ha sido aceptado como tratamiento de mantenimiento en pacientes con asma grave eosinofílica con recuentos de eosinófilos en sangre periférica por encima de 150 células/ $\mu$ l (47).
- Reslizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado neutralizante anti IL-5, de tal forma que inhibe la proliferación celular inducida por IL-5, como se observa en la Figura 8. La IL-5 es producida por células del sistema inmune innato, linfocitos Th2, mastocitos, células NK y los eosinófilos, y tiene el efecto de inducir la diferenciación y activación de los propios eosinófilos (48).





**Figura 8.** Mecanismo de acción de Reslizumab (48).

- Mepolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que, al igual que reslizumab, tiene efecto de bloquear IL-5. Por lo tanto, inhibe de forma selectiva la inflamación eosinofílica reduciendo el número de eosinófilos tanto en esputo como en sangre periférica (49).
- Dupilumab es un anticuerpo monoclonal completamente humano cuyo efecto es el de bloquear la IL-4 e IL-13 al unirse con la subunidad alfa del receptor de IL-4 el receptor alfa. Previamente a ser aceptado como tratamiento para el asma grave, fue aceptado para el tratamiento de la dermatitis atópica moderada-grave (38,50). Ha demostrado disminuir la tasa de exacerbaciones y se observaron mayores efectos cuanto mayor era el nivel basal de eosinófilos en sangre y la fracción de óxido nítrico exhalado. En cuanto al FEV1, se vio que con dupilumab mejoraba la función pulmonar y su efecto era rápido, observándose el aumento del FEV1 de forma significativa frente a placebo tras 2 semanas de tratamiento (38).
- Tezepelumab es un anticuerpo monoclonal humano que se une y bloquea específicamente a la linfopoyetina estromal tímica, una citoquina derivada de células epiteliales. La linfopoyetina estromal tímica está implicada en diversos procesos fisiopatológicos del asma y sus niveles se correlacionan con el nivel de obstrucción de la vía aérea, gravedad de la enfermedad y la resistencia a los glucocorticoides (51).

Como ya se ha mencionado previamente, la clasificación por fenotipos se basa en características observables o medibles, mientras que los endotipos hacen una subdivisión de los pacientes en función de mecanismos funcionales, lo que implica en ocasiones una caracterización según perfiles genómicos, transcriptómicos, epigenómicos, proteómicos o metabolómicos (52). Los biomarcadores son marcadores biológicos o indicadores medibles que vinculan un endotipo con un fenotipo. El biomarcador ideal debería ser aquel que puede identificar la enfermedad, así como el endotipo y fenotipo específico, que sea útil para el seguimiento de la enfermedad determinar el pronóstico (53). Hoy en día los biomarcadores con lo que se cuentan para el asma no permiten seleccionar endotipos de forma precisa, como es el caso de la eosinofilia en sangre que predice la respuesta al tratamiento de forma inespecífica en el asma grave (54). En el asma grave también se han propuesto los niveles de IgE en sangre como biomarcador de la inflamación Th2 (52). Ambos biomarcadores guardan relación con el asma T2, sin embargo, no se cuenta hoy en día con biomarcadores del endotipo no T2 (45).

En esta línea, diferentes estudios han intentado buscar parámetros y marcadores que permitan predecir la respuesta al tratamiento con biológicos.

La efectividad de benralizumab parece que puede predecirse mediante el FeNO y el recuento de eosinófilos en plasma, biomarcadores relacionados con el fenotipo eosinofílico (47,55).

En cuanto a Omalizumab, se ha intentado estudiar mediante 3 biomarcadores relacionados con la inflamación Th2 mediada, FeNO, eosinofilia en sangre y periostina sérica, para predecir la respuesta al tratamiento. Se observó una disminución de las exacerbaciones en pacientes con asma T2 frente a los no T2 pero no se estableció ningún biomarcador predictivo de la eficacia del tratamiento (56).

Castro et al. demostró, mediante un ensayo aleatorizado doble ciego y controlado con placebo, que el tratamiento con Reslizumab podía reducir la eosinofilia en sangre y esputo de forma significativa, así como el porcentaje de exacerbaciones y mejoró la FEV1 respecto al grupo placebo (39).

En el *LIBERTY ASTHMA QUEST*, un ensayo clínico fase 3 doble ciego, controlado por placebo para el estudio de la eficacia y seguridad de Dupilumab, demostró que niveles elevados de eosinófilos en sangre y esputo, elevada IgE sérica y FeNO aumentado, es decir, marcadores propios de inflamación Th2, son predictores de respuesta al tratamiento con dicho fármaco (57).

En el *NAVIGATOR* (51), un ensayo clínico fase 3 multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, se corroboraron los resultados obtenidos en el *PATHWAY* (fase 2b) (58), demostró que Tezepelumab redujo las exacerbaciones anuales en pacientes con asma grave además de reducir los niveles de FeNO, IgE y eosinófilos en sangre y esputo. Lo más interesante de este fármaco es el hecho de demostrar efecto incluso en pacientes con recuentos de eosinófilos en sangre basales bajos (<150). Esto se podría deber a que la citoquina que bloquea este fármaco (linfopoyetina estromal tímica) actúa como mediador en las respuestas Th2 y Th17 así como comunicador ascendente entre las células estructurales de las vías respiratorias y las células inmunitarias en respuesta a estímulos, lo cual podría sugerir mecanismo alérgicos y no alérgicos a través de los cuales tezepelumab podría normalizar la inflamación local independientemente del recuento de eosinófilos.

En el caso de Mepolizumab, numerosos estudios se han centrado en la importancia del recuento de eosinófilos en sangre, a diferencia del recuento en esputo, ya que sirve como biomarcador de la farmacodinámica del biológico. Además, el recuento de eosinófilo en sangre permite identificar a los pacientes que podrían beneficiarse del uso de mepolizumab para conseguir una disminución de las exacerbaciones en pacientes con asma grave mal controlado (59). REDES se trata de un estudio multicéntrico observacional de cohortes que contó con un tamaño muestral de pacientes con asma grave mal controlado, con un seguimiento 12 meses antes y 12 meses después al inicio del tratamiento con mepolizumab. Dentro de lo esperable, el tratamiento con dicho anticuerpo monoclonal redujo el recuento de eosinófilos en sangre en un 82,4%. A nivel clínico, mepolizumab demostró disminución significativa de las exacerbaciones, mejoría de la función pulmonar y disminución de la necesidad del uso de corticoides orales. Sin embargo, la disminución de las exacerbaciones no resultaba proporcional a la disminución en el recuento de eosinófilos en plasma (60).

## 2.7.3 Biomarcadores en el asma: características de sangre y esputo

### 2.7.3.1 Sangre

El recuento de eosinófilos en sangre no parece ser útil para el diagnóstico del asma dado que resulta inespecífico (19), pero parece un buen marcador para el pronóstico y predicción de la respuesta al tratamiento en el caso del asma T2 (61). Presenta una buena correlación con el recuento de eosinófilos en esputo y parece ser un buen biomarcador para predecir la eficacia de mepolizumab, reslizumab, benralizumab y dupilumab (62–65). En el caso de omalizumab, niveles elevados de eosinófilos en sangre también se asocian a mayor respuesta en estudios *in vitro*, aunque no se haya podido confirmar en estudio *in vivo* (66).

El recuento de neutrófilos tampoco resulta eficaz para el diagnóstico de asma por la baja especificidad que implica, al igual que el recuento de eosinófilos, pero puede tener utilidad para diferenciar entre pacientes con antecedentes de tabaquismo y asma de inicio tardío de aquellos con asma crónica (67).

La IgE participa en las reacciones de hipersensibilidad tipo 1 y, por lo tanto, está implicada en la fisiopatología del asma alérgica y en la respuesta inflamatoria T2. Se correlaciona con el riesgo de padecer asma (68), así como atopia, e hiperrespuesta de la vía aérea, aunque no hay evidencia de su utilidad para el diagnóstico. Tampoco predice la respuesta a omalizumab a pesar de ser la diana terapéutica de dicho fármaco y en función de la cual se titula la dosis (69).

La proteína catiónica del eosinófilo es una sustancia liberada en la degranulación del eosinófilo que se encuentra aumentada en sangre de pacientes asmáticos, especialmente durante una exacerbación (67). Niveles más elevados en plasma se asocian con una mayor respuesta al tratamiento con corticoides inhalados (70).

La periostina es una proteína de la matriz extracelular secretada por células epiteliales de las vías respiratorias en respuesta a IL-13 que se encarga de regular las interacciones epiteliales-mesenquimatosas, con asociación con el asma eosinofílica T2 (71). Es un parámetro medible en plasma, presentando estabilidad sobre la progresión de la enfermedad que la respalda como buen biomarcador en el asma T2 (53). También

presenta niveles aumentados en las vías respiratorias, pero con mala correlación con los niveles en plasma (67). Se encuentra implicado en el crecimiento óseo, por ello se ha observado que en niños de 2 años los niveles séricos son de 2 a 3 veces mayores que en adultos. Además, en esa misma población se demostró que los niveles de periostina a los 2 años eran predictivos de asma a los 6 años (72).

Las lipoxinas son sustancias con efecto antiinflamatorio y que intervienen en la quimiotaxis. En el asma grave sus niveles séricos se encuentran disminuidos y se asocia al grado de obstrucción de la vía aérea (67). Estos hallazgos todavía no tienen una clara explicación a nivel fisiopatológico, pero se cree que podría estar relacionado con el uso de corticoides sistémicos o el estrés oxidativo (73).

La glucoproteína de cartílago humano 39 (YKL-40) es una proteína similar a la quitinasa detectable en suero y en las vías aéreas, se asocia con el grosor de la membrana basal subepitelial y sus niveles se correlacionan con el asma grave y la obstrucción irreversible de las vías respiratorias (74). Su expresión se encuentra aumentada en las exacerbaciones asmáticas, aunque todavía se precisa más evidencia que aclare el papel de este posible biomarcador (67).

Otros marcadores relacionados con la inflamación como son la Proteína C Reactiva (PCR), la IL-6 o la Metaloproteinasa de Matriz-9 (MMP-9) también se encuentran aumentadas en pacientes asmáticos con respecto a pacientes sanos, aunque dichos aumentos pueden reflejar inflamación de forma inespecífica a nivel sistémico (67). Es por ello por lo que, la mayor limitación de los biomarcadores en sangre periférica es que pueden no representar mecanismos fisiológicos en las vías aéreas (71,75).

#### *2.7.3.2 Esputo*

Las muestras de esputo inducido se obtienen mediante la inhalación de suero salino a concentraciones crecientes. Es una prueba no invasiva sencilla que permite analizar el patrón celular de las vías respiratorias en pacientes asmáticos (53).

Con el recuento celular podemos analizar la situación inflamatoria a nivel de las vías aéreas. En relación con esto, se han identificado cuatro fenotipos inflamatorios:

- Eosinofílico, caracterizado por más o igual a un 3% de eosinófilos en esputo (1).

- Neutrófilico, con más o igual a un 40% de neutrófilos en esputo, siendo este biomarcador predictivo de presentar asma no T2 (76).
- Granulocítica mixta, cuando el esputo cumple criterio tanto de fenotipo eosinofílico como neutrófilico.
- Paucigranulocítica, cuando ambas celularidades no presentan características inflamatorias.

Estos puntos de corte para definir eosinofilia y neutrofilia en esputo varían según diferentes cohortes de pacientes asmáticos. Las presentadas corresponden a las cohortes de *Airways Disease Endotyping for Customize Therapeutics (ADEPT)* y *Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcomes (UBIOPRED)* (77), mientras que otras cohortes como el programa de Investigación del Asma Severa (SARP) define eosinofilia como más del 2% de eosinófilos en esputo, y neutrofilia como más del 40% de neutrófilos en esputo (67). Los criterios de Simpson et al. comparten el porcentaje de eosinófilos para determinar eosinofilia en esputo, sin embargo, consideran la neutrofilia cuando el porcentaje de neutrófilos supera el 61% (78).

El recuento de eosinófilos presenta modificaciones a lo largo de la historia de la enfermedad, pudiendo ser un reflejo del control clínico de la misma (79). Se ha visto que, en pacientes con eosinofilia en esputo, el uso de Mepolizumab y Reslizumab mejoraba la calidad de vida y disminuía las exacerbaciones, y el uso de Dupilumab mejoró la función pulmonar y el control de la enfermedad (39,80,81). Además, la presencia de altos niveles de células linfoides innatas en esputo se correlaciona con el asma grave, con eosinofilia en esputo, pero recuento de eosinófilos normal en sangre, por lo que dichas células podrían suponer un nuevo biomarcador (82,83).

El recuento de neutrófilos aumentado se asocia con la gravedad del asma y una mala respuesta al tratamiento con glucocorticoides, siendo una buena opción en esos casos asociar un macrólido al tratamiento consiguiendo una reducción de las exacerbaciones y mejoría en la calidad de vida (84).

Otros biomarcadores que se pueden encontrar en esputo son mediadores como la mieloperoxidasa de neutrófilos que permite diferenciar el síndrome de superposición

asma-EPOC del asma, la peroxidasa de eosinófilos que se correlaciona con la eosinofilia en esputo, y el inductor débil de la apoptosis similar al factor de necrosis tumoral cuyos niveles se correlacionan con la gravedad y mal control de la enfermedad (53).

El esputo inducido se trata de una prueba poco reproducible, que precisa de personal especializado en su realización, con necesidad de material para el procesamiento de las muestras y, por lo tanto, presenta limitaciones (53).

Sin embargo, los parámetros predictores de la respuesta a los biológicos, especialmente los anti-IL-5/IL-5R $\alpha$  que son los más utilizados por estar indicados en el asma eosinofílica (mepolizumab, benralizumab, reslizumab), todavía no están del todo establecidos, lo que se refleja en la presencia de numerosos estudios que intentan establecer tanto variables predictoras clínicas como analíticas y funcionales (64,85–88).

#### 2.7.4 Nuevas técnicas moleculares: exosomas

A pesar de los avances que existen en cuanto al desarrollo de nuevos fármacos para el manejo del asma, todavía no se conocen con exactitud los mecanismos fisiopatológicos que explican la aparición de esta enfermedad.

Según GEMA, tras el diagnóstico de asma grave no controlado se debe hacer un diagnóstico del fenotipo del paciente. El fenotipo se basa en la presencia de eosinofilia en sangre o en esputo para diferenciar entre pacientes T2 o no T2, así como la presencia de clínica y aumento de la IgE para determinar si coincide o no con un fenotipo alérgico (1).

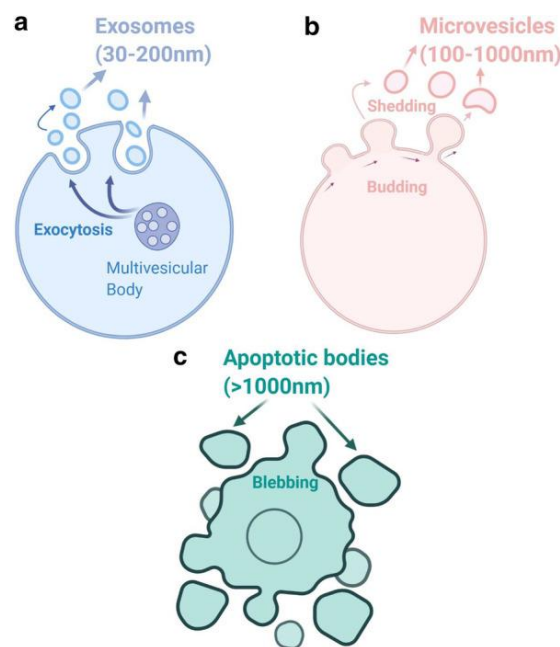
El uso de estos biomarcadores para hacer una clasificación fenotípica e incluso dirigir y predecir la respuesta al tratamiento con fármacos biológicos es todavía una cuestión sin resolver. Se ha pensado que los biológicos hasta ahora desarrollados tenían un efecto beneficioso en aquellos pacientes con un perfil de asma T2 pero, la importante heterogeneidad de la enfermedad presenta casos que no responden adecuadamente a estas terapias. Esto se observa incluso en pacientes con elevados recuentos de eosinófilos en sangre, que hasta ahora se había considerado un buen biomarcador de respuesta al tratamiento biológico. Por ello surge la necesidad de desarrollar nuevos

biomarcadores para mejorar aún más la respuesta a productos biológicos específicos (15).

La necesidad de buscar dichos biomarcadores en pacientes no respondedores, que se ajusten de una forma más precisa e individualizada a sus características y así, hacer un manejo más preciso de la enfermedad, ha supuesto un importante desarrollo de técnicas de investigación molecular (53).

En esta línea están surgiendo estudios que hablan de la importancia de las vesículas extracelulares en la fisiopatología de multitud de enfermedades entre las que se encuentran las respiratorias como el asma, EPOC o la Fibrosis Pulmonar Idiopática (89), así como de patologías cardiovasculares, metabólicas e inflamatorias.

Tal y como se puede observar en la Figura 9, las vesículas extracelulares se pueden dividir en cuerpos apoptóticos generados por la muerte celular programada, microvesículas con un tamaño entre 100 y 1000 nm generadas por la evaginación de la membrana plasmática, y exosomas con un tamaño de 30 a 200 nm de origen endocítico (90).

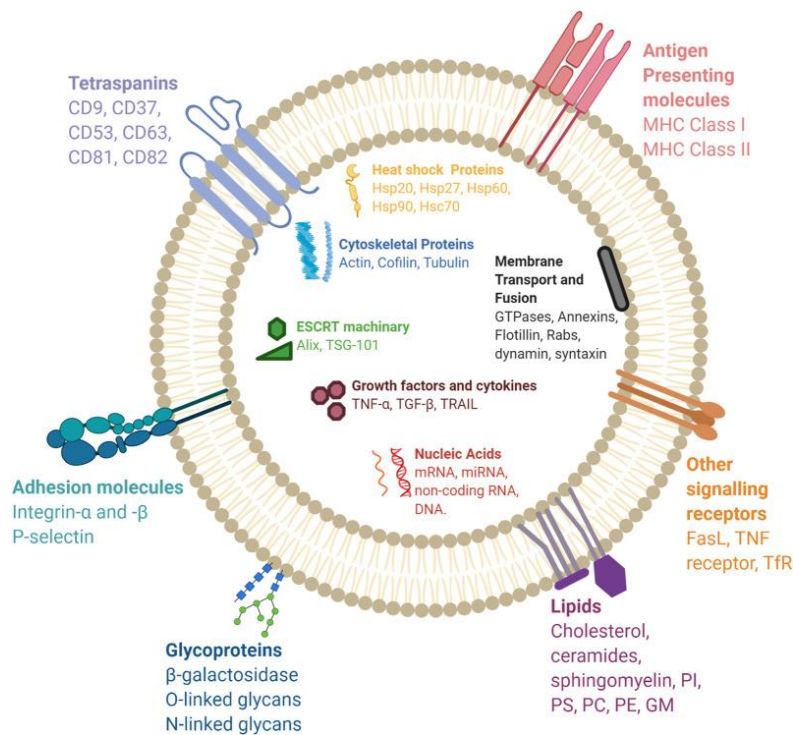


**Figura 9.** Tipos de vesículas extracelulares (90).

Inicialmente se pensó que los exosomas únicamente se encargaban de la excreción de productos de desecho celulares, pero actualmente se sabe que participan en la



comunicación intercelular mediante la transferencia de proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos (90,91). Se postula que, además de permitir conocer el mecanismo molecular de ciertas patologías, los exosomas pueden tener un papel terapéutico como transportadoras de fármacos, ya que se caracterizan por una baja inmunogenicidad que les aporta buena biocompatibilidad, y su estructura lipídica que protege la carga genética de la degradación (89,90) Todas las características de la estructura de los exosomas quedan reflejadas en la Figura 10.



**Figura 10.** Estructura y contenido del exosoma (90)

Concretamente en el asma, se ha demostrado la implicación de las vesículas extracelulares en múltiples procesos inmunitarios e inflamatorios, entre los que destacan la capacidad para presentar antígenos liberados por las células dendríticas y los linfocitos B, y desencadenar la angiogénesis subepitelial tras su liberación por parte de las células del epitelio bronquial (92).

Como se ha mencionado previamente, uno de los productos que típicamente transportan los exosomas son los ácidos nucleicos como el DNA, RNA mensajero y especies de RNA no codificantes, siendo los microRNA una de las especies más abundantes en los exosomas (90). Los microRNA son pequeñas moléculas de RNA no codificantes que se encuentran muy conservadas a lo largo de la evolución, las cuales

han demostrado participar en múltiples procesos fisiológicos como la exocitosis, la hematopoyesis y la angiogénesis, así como en la comunicación intercelular mediada por los exosomas (93,94).

La amplia utilidad y funciones que desempeñan los exosomas ha hecho que se desarrollen multitud de estudios con el objetivo de usarlos para el diagnóstico y pronóstico de diferentes enfermedades, como es el asma. De hecho, ya se han obtenido resultados prometedores que permiten diferenciar perfiles específicos de microRNA en asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica. En el caso del asma, se observa un aumento de los niveles séricos de varios miRNA libres, incluidos miR-16, miR-21, miR-125b, miR-126, miR-145, miR-146a, miR-148a, miR-221, miR-223, miR-338, miR-485-3p (94).

Suojalehto et al. encontraron regulación negativa de miR-18a, miR-126, let-7e, miR-155, miR-224 y regulación positiva de miR-498, miR-187, miR-874, miR-143, miR-886-3p en biopsias nasales en pacientes asmáticos sin diferencias entre fenotipo alérgico y no alérgico (95). Alexandrova et al. analizaron la expresión de microRNA en células del músculo liso bronquial para evaluar su disregulación permanente en pacientes asmáticos, comparando la expresión de 905 microRNA frente a las de controles sanos tras la realización de una resección pulmonar. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de 40 microRNA de los cuales, 9 estaban regulados al alza y 31 a la baja (96). Por otro lado, miR-140-3p, miR-708 y miR-142-3p juegan un papel relevante en la hiperplasia e hipertrofia de las células del músculo liso bronquial (94).

También en plasma de pacientes asmáticos infratratados frente a controles se detectan niveles más elevados de miRNA-125b correlacionados con la gravedad de la enfermedad, y en pacientes alérgicos asmáticos frente a controles sanos también se han detectado niveles más elevados de miRNA-126 (97).

A nivel del epitelio bronquial de pacientes asmáticos se ha observado que existe una regulación positiva de miR-19a y una regulación negativa de miR-181-5p (94). Siguiendo en la línea del estudio del epitelio bronquial, se ha caracterizado la secreción de microRNA en vesículas extracelulares de células epiteliales bronquiales sanas que fueron tratadas con IL-13 para que el epitelio adquiriese características similares al de uno asmático. Se observó el papel de miR-34a, miR-92b y miR-210 en el desarrollo temprano

de la respuesta Th2 en las vías aéreas en el asma (37). Igualmente, al exponer células musculares lisas de las vías aéreas humanas a citoquinas que imitan las condiciones del asma, se ha visto que hay un aumento de la expresión de miR-145, de modo que un bloqueo mediante anti-miR consigue disminuir la proliferación y migración de células de músculo liso (94).

Estos son solo algunos de los hallazgos que se han descrito hasta el momento en cuanto al estudio del microRNA en el asma, así como en otras enfermedades. Como ya hemos dicho, esto refleja el importante potencial de estas moléculas para el manejo clínico del asma, sin embargo, es necesaria más evidencia que permita el uso de estos como posibles biomarcadores. Sue clásicamente se han asociado con el fenotipo del paciente asmático no reflejan de manera exacta el endotipo del paciente como se manifiesta en su relación con los valores obtenidos en muestras de la vía aérea. Es necesario explorar nuevas vías de estudio como los exosomas que aporten nuevas herramientas para la detección de biomarcadores.

## 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 3.1 Hipótesis

Los marcadores sanguíneos que clásicamente se han asociado con el fenotipo del paciente asmático no reflejan de manera exacta el endotipo del paciente como se manifiesta en su relación con los valores obtenidos en muestras de la vía aérea. Es necesario explorar nuevas vías de estudio como los exosomas que aporten nuevas herramientas para la detección de biomarcadores.

### 3.2 Objetivos

#### 3.2.1 Objetivo principal

Evaluar la relación de los marcadores de asma clásicos en sangre y esputo inducido en sujetos control, pacientes con asma grave y fenotipo T2 y pacientes con asma grave y fenotipo no T2. Además, se explorará el uso de los exosomas como nueva fuente de biomarcadores en plasma.

#### 3.2.2 Objetivos secundarios

1. Reclutar una población de sujetos control y pacientes con asma grave.
2. Obtener muestras sanguíneas y de esputo inducido que cumplan los parámetros de calidad establecidos en la GEMA.
3. Analizar las diferencias en parámetros en plasma entre controles sanos, pacientes con asma grave fenotipo T2 y no T2.
4. Evaluar la relación intra-sujeto entre los parámetros sanguíneos y del esputo inducido.
5. Obtener exosomas de plasma circulante de sujetos control y pacientes con asma grave y realizar su caracterización morfológica.
6. Cuantificar los exosomas obtenidos de las muestras de plasma.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

Este es un estudio de cohortes observacional para encontrar posibles nuevos biomarcadores en plasma y evaluar los marcadores clásicos en aquellos pacientes en los que estaba indicado el uso de fármacos biológicos según las guías vigentes para el manejo del asma, GINA y GEMA 5.2. Los pacientes se encontraban dentro de la población que hace uso de la Consulta de Asma Grave del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS). Aquellos que iniciaron tratamiento biológico cumplían criterios de Asma Grave Mal Controlado y, por lo tanto, eran candidatos al uso de estos fármacos.

La muestra está constituida por 60 individuos de los cuales 27 eran controles sanos y 33 eran pacientes con diagnóstico de asma grave no controlada. Este grupo de pacientes fue seleccionado dentro de aquellos usuarios de la Consulta de Asma Grave del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS).

En la primera visita se realizaron:

### 4.1 Cuestionario sobre clínica: Asthma Control Test (ACT).

Como se muestra en la Figura 11, este cuestionario consta de 5 preguntas las cuales son respondidas por el paciente asignando una puntuación del 1 que implicaría un peor control sintomático, al 5 que supondría un mejor control. Una vez contestadas todas las preguntas se suma la puntuación total de tal forma que por debajo de 19 puntos se considera que la enfermedad no está adecuadamente controlada.

**PACIENTES:** 1. Contesten cada pregunta y escriban el número de la respuesta en el cuadro que aparece a la derecha de la pregunta.  
 2. Sumen sus respuestas y escriban la puntuación total en el cuadro del TOTAL que se muestra abajo.  
 3. Hablen con su doctor sobre sus resultados.

1. En las últimas 4 semanas, ¿cuánto tiempo le ha impedido su asma hacer todo lo que quería en el trabajo, en la escuela o en la casa?					<b>PUNTUACIÓN</b>					
Siempre	1	La mayoría del tiempo	2	Algo del tiempo	3	Un poco del tiempo	4	Nunca	5	<input type="text"/>
2. Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia le ha faltado el aire?										
Más de una vez al día	1	Una vez al día	2	De 3 a 6 veces por semana	3	Una o dos veces por semana	4	Nunca	5	<input type="text"/>
3. Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia sus síntomas del asma (respiración sibilante o un silbido en el pecho, tos, falta de aire, opresión en el pecho o dolor) lo/la despertaron durante la noche o más temprano de lo usual en la mañana?										
4 o más noches por semana	1	De 2 a 3 noches por semana	2	Una vez por semana	3	Una o dos veces	4	Nunca	5	<input type="text"/>
4. Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia ha usado su inhalador de rescate o medicamento en nebulizador (como albuterol)?										
3 o más veces al día	1	1 ó 2 veces al día	2	2 ó 3 veces por semana	3	Una vez por semana o menos	4	Nunca	5	<input type="text"/>
5. ¿Cómo evaluaría el control de su asma durante las últimas 4 semanas?										
No controlada en absoluto	1	Mal controlada	2	Algo controlada	3	Bien controlada	4	Completamente controlada	5	<input type="text"/>
<b>TOTAL</b>										
<input type="text"/>										

**Si obtuvo 19 puntos o menos, es probable que su asma no esté bajo control. Asegúrese de hablar con su doctor sobre sus resultados.**

Figura 11. Asthma Control Test (ACT (98)).

#### 4.2 Prueba de esputo inducido.

El objetivo de esta prueba es movilizar secreciones de las vías aéreas bajas que sean más representativas de la situación inflamatoria de las vías aéreas de pequeño calibre.

La técnica es relativamente sencilla pero precisa su realización en un medio controlado por el riesgo de hiperrespuesta bronquial, especialmente en pacientes asmáticos. Igualmente es recomendable realizar todos los pasos del procedimiento en una cabina con presión negativa y con aislamiento aéreo para evitar el riesgo de aerosoles, especialmente en el contexto actual de pandemia por SARS-COV2.

En primer lugar, se realiza una espirometría basal y posteriormente, tras administrar broncodilatadores de acción rápida (salbutamol o bromuro de ipratropio), se realiza espirometría tras la broncodilatación.

Una vez realizados estas técnicas se procede a inducir el esputo. El primer paso consiste en nebulizar una solución de suero salino hipertónico al 3 o 5% durante 10 a 20 minutos (53). Suele intentarse con una concentración del 3% y si no es suficiente para inducir el esputo, se intenta con suero al 5%. El suero salino hipertónico en la vía aérea produce un efecto osmótico atrayendo líquido intersticial hacia la luz bronquial aumentando las secreciones, así como irritación de la vía aérea que induce el reflejo de la tos (99). Tras la nebulización, el paciente se incorpora y tiene que toser inclinándose hacia delante para facilitar la expectoración, recogiendo los esputos en un frasco. Se deberá comprobar la presencia de tapones de moco para asegurarnos que disponemos de muestra para realizar el recuento celular. El esputo expectorado se centrifuga, tiñe y se analiza mediante la cuantificación del recuento celular (53).

El paciente deberá realizar nuevamente una espirometría previa a abandonar la consulta para asegurarnos de que la técnica no ha provocado un cuadro de hiperrespuesta bronquial con broncoespasmo.

El esputo inducido ha cobrado importancia por sus implicaciones a la hora de clasificar y manejar el asma en función de los hallazgos obtenidos. En el caso de esta patología, la celularidad que mayor relevancia tiene es el recuento de neutrófilos y el recuento de eosinófilos. Un recuento de eosinófilos en esputo elevado se presenta en respuesta a la provocación con alérgenos y disminuyen en respuesta al tratamiento con corticoides. Los recuentos de eosinófilos y neutrófilos en esputo tienen cierto grado de correlación con la sintomatología, la función pulmonar y la hiperreactividad de la vía aérea.

La eosinofilia en esputo siempre se ha entendido como una característica del asma, aunque hasta un cuarto de los adultos con asma no tratado y la mitad de los tratados con corticoides inhalados presentan un recuento celular en esputo normal. La inflamación neutrofílica es frecuente en adultos con asma persistente a pesar de tratamiento con corticoides inhalados, especialmente en las exacerbaciones.

Dado que el asma característicamente tiene un comportamiento variable con obstrucción reversible del flujo aéreo, es esperable que el fenotipo inflamatorio del esputo cambie según el curso de la enfermedad, la respuesta al tratamiento o las exacerbaciones. Es por ello por lo que se propone el uso de endotipos que reflejen mecanismos fisiopatológicos en lugar de fenotipos que se clasifican en función de características observables. Estos endotipos se pueden identificar mediante parámetros clínicos, fisiopatológicos, genéticos, epidemiológicos, y de respuesta al tratamiento. La estabilidad de los fenotipos del esputo también será un criterio importante para la endotipificación del asma (100).

#### 4.3 Espirometría basal y tras la prueba broncodilatadora.

Los datos obtenidos de la espirometría nos permiten comparar el patrón obstructivo esperable en los individuos con diagnóstico de asma, frente a los controles sanos. Igualmente tiene relevancia a la hora de hacer un seguimiento al repetir la prueba en una segunda visita tras el inicio del tratamiento con fármacos biológicos, y así analizar el posible efecto de estos sobre la función pulmonar. Hay que destacar nuevamente que, al tratarse de una enfermedad variable, es posible encontrar tanto espirometrías basales sin patrón obstructivo, así como pruebas broncodilatadoras negativas en casos de pacientes asmáticos.

#### 4.4 Analítica de sangre.

En la analítica de sangre se incluye:

- Perfil bioquímico básico con glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol total, albúmina, GOT, GPT. Además, se incluyen parámetros que puedan tener relevancia en el asma como IgE y PCR.
- Hemograma con recuentos celulares en plasma, así como los porcentajes del recuento total de cada tipo celular, hematíes, hemoglobina, hematocrito y plaquetas, entre otros.



#### 4.5 Aislamiento de exosomas

Existen varios métodos para el aislamiento de exosomas (91). En nuestro trabajo hemos llevado a cabo el aislamiento de exosomas mediante el uso del kit comercial miRCURY exosome isolation kit (Qiagen) basado en la precipitación de los exosomas mediante el uso de un polímero que altera su solubilidad.

Inicialmente se debe descongelar una muestra de plasma de 600 µl a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga a 10.000 g durante 5 minutos con el objetivo de que los restos celulares de mayor tamaño en plasma precipiten. Se extraen 600 µl de sobrenadante a los que se le añaden 200 U de trombina, y se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga nuevamente a 10.000 g durante 5 minutos y se extraen 500 µl de sobrenadante, al cual se añaden 200 µl de la solución de precipitación A que contiene el kit, de tal forma que se forme una nebulosa mediante pipeteo, empezando por el fondo del tubo y ascendiendo cuidadosamente con la pipeta hasta que todo el contenido tenga un aspecto homogéneo. Se mezcla con un agitador vórtex durante 5 segundos y se deja incubar durante 1 hora a 4 grados centígrados. Finalmente se realizan dos centrifugaciones a 500 g y temperatura ambiente durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y volviendo a suspender el pellet en 270 µl de PBS.

#### 4.6 Caracterización de exosomas

Una vez aislados los exosomas, se hizo una caracterización de estos para confirmar su presencia.

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización morfológica mediante la visualización directa de los exosomas en microscopio electrónico. Para preparar las muestras, estas se diluyeron en 1:50 en PBS y se utilizó acetato de uranilo sobre capa de carbono activado para su fijación y tinción negativa. La visualización en el microscopio electrónico se llevó a cabo en el Instituto Universitario de Nanociencia de Aragón (INA) con la ayuda de un técnico especializado mediante el uso del microscopio con filamento de LaB<sub>6</sub> Tecnai T20

(FEI Company). El voltaje de trabajo fue de 200 KV y se utilizó una cámara CCD 2K x 2K Veleta (Olympus).

#### 4.7 Cuantificación de exosomas: NTA

La cuantificación se realizó mediante análisis de seguimiento de partículas conocido como NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) que consiste en el cálculo de la distribución de las partículas en función de sus propiedades de dispersión de la luz y movimiento browniano, de tal forma que se puede conocer su concentración y analizar su trayectoria.

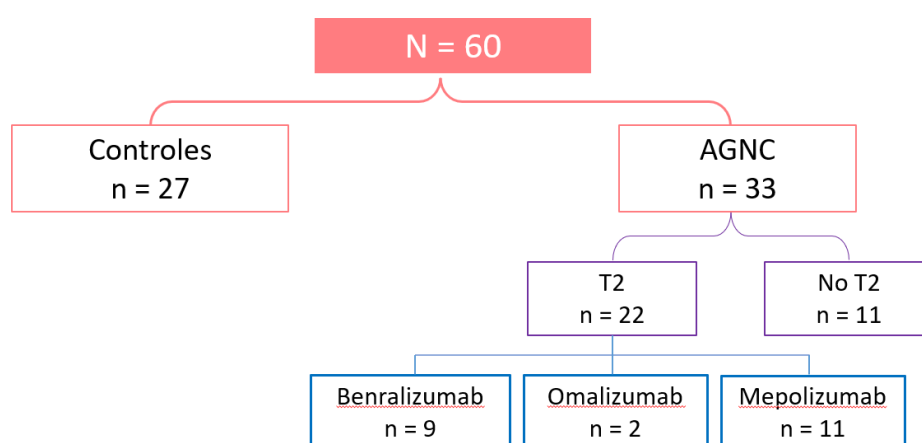
Para ello, se diluyeron las muestras 1:1000 en solución de PBS y EDTA para evitar la agregación. Posteriormente, se introdujeron las diluciones en una cámara de lectura basada en incidencia de un láser sobre la muestra inyectada en la cámara, de tal forma que se puedan observar las partículas mediante microscopía de 20 aumentos por la dispersión de la luz que generan. Las mediciones se realizaron a 25 °C y con una velocidad de flujo de 50  $\mu\text{l/s}$ , fueron captadas por la cámara sCMOS y analizadas por el software *NanoSight NTA 3.4 Build 3.4.003*, con un umbral de detección de 3 que permitió diferenciar entre el ruido de fondo y los exosomas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Análisis de la población

#### 5.1.1 Análisis de variables demográficas

La muestra ha contado con un total de 60 individuos, de los cuales 27 han sido controles sanos y 33 tenían diagnóstico de asma grave no controlado. De los pacientes asmáticos, 22 tenían un fenotipo T2 y 11 no T2. Dentro de los pacientes con asma T2, 9 recibieron tratamiento con Benralizumab, 2 con Omalizumab y 11 con Mepolizumab, como se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Esquema descriptivo de la muestra.

Dentro de la muestra había 44 mujeres (73,33%) y 16 hombres. Si se analiza la distribución por sexo en los grupos en los que se divide la muestra, observamos que el 60% de las mujeres presentaban diagnóstico de asma y, concretamente en los grupos de asma T2 y no-T2, las mujeres suponían el 86,36% y 63,6% respectivamente. En otros estudios como EXTRA (56), en cada subgrupo de pacientes determinado por valores altos o bajos de FeNO, eosinófilos y periostina, el porcentaje de mujeres oscilaba alrededor del 60%(56). En un ensayo clínico de fase 2 multicéntrico que contaba con 550 pacientes aleatorizados con diagnóstico de asma grave, 361 eran mujeres lo que equivale al 65,6% de la muestra (58).

La edad media de la muestra fue de 51,41 años, cifra similar a los 56,5 años registrados en el estudio REDES con pacientes con asma grave (60).

El IMC medio del total de la muestra fue de 26,33, mientras que en REDES el IMC medio fue de 28,6 con una desviación estándar de 5,5 (60). En pacientes con diagnóstico de asma T2 el IMC medio fue de 28,2, y en el de asma no-T2 de 25,4.

La evaluación de estas variables antropométricas muestra que nuestra población, a pesar de tener una limitación en cuanto a su tamaño, es representativa de lo descrito en otros estudios que incluyen poblaciones más grandes.

**Tabla 1.** Análisis descriptivo de variables poblacionales de la muestra según grupo de estudio. (\*:  $p < 0.05$  vs grupo control).

Variables poblacionales		Controles (n =27)	Asma T2 (n = 22)	Asma No T2 (n = 11)
Total de muestra		27	22	11
Sexo	Mujer	19	19	6
	Hombre	8	3	5
Edad (años)		47	58	48
Peso (Kg)		68	75,1	70
Altura (cm)		161,3	161,9	165,5
IMC		24,9	28,2	25,4
Tabaquismo	Activo	4	0	0
	Exfumador	4	11	4
	Nunca	19	11	7
Espirometría	FEV1 basal (%)	107,7	82,7 (*)	93,7
	FEV1 postPBD (%)	106,6	83,1 (*)	101,1
ACT		24,3	13,8 (*)	16,9 (*)

Tras el estudio descriptivo de la muestra, se propuso el análisis de variables en plasma, variables de función pulmonar y variables en esputo, para valorar si las diferencias de estos entre los 3 grupos de la muestra presentaban diferencias estadísticamente

significativas. Para ello se utilizó el test no paramétrico para datos independientes de más de 2 grupos, Kruskal-Wallis.

### 5.1.2 Análisis de función pulmonar

Como se describe en la Tabla 1, se observó que el valor de FEV1 en el grupo control fue mayor que en ambos grupos de asma, siendo del 107,7% de media en controles y 82,7% y 93,7% en los grupos de asma T2 y no T2 respectivamente. Estudios observacionales que incluían muestras de pacientes con perfil de asma T2 mal controlada presentaban FEV1 basal del 76% (DE 21%) (101).

Un estudio de registro histórico que incluyó datos de pacientes con asma grave mal controlada de 11 países para clasificarlos según su fenotipo, incluyó datos de FEV1 basal y tras la prueba broncodilatadora distinguiendo entre pacientes con fenotipo de asma T2 y no T2. La población con asma T2 presentaba una FEV1 basal del 72,9% (DE 24,1%) y una FEV1 tras prueba broncodilatadora del 76,1% (DE 22,1%). Sin embargo, en el grupo de asma no T2 la FEV1 era de 77,1% (DE 23,2%) y FEV1 tras prueba broncodilatadora del 89,3% (DE 18,2%) (102). Llama la atención que, aunque los valores de función pulmonar en el caso de este estudio distan de los obtenidos en nuestro caso, se puede observar que en ambos casos existe una mayor mejoría de la FEV1 tras la prueba broncodilatadora en los pacientes con asma no T2.

Los pacientes con asma T2 presentaban cifras de FEV1 que indicaban peor función pulmonar, tanto en espirometría basal como tras prueba broncodilatadora, que los pertenecientes al grupo de asma no T2. Sin embargo, al analizar la diferencia de variables de función pulmonar, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes asmáticos T2, no siendo así con los no T2.

Igualmente, los valores en el ACT parecían indicar que los pacientes con asma T2 tenían un peor control sintomático, dado que los controles presentaban mayor puntuación que aquellos con diagnóstico de asma grave, siendo estas cifras de 13,8 y 16,9 en ambos grupos de asma grave. En el estudio REDES incluyeron pacientes con cifras de ACT medias de 14,2, es decir, muy similares a las medias que presentaba nuestra muestra (60).

Las diferencias en cuanto a la puntuación en el ACT fueron significativas entre controles y asma T2, y entre controles y asma no T2, no existiendo diferencia entre ambos grupos de pacientes asmáticos. Esto implicaría que no existen diferencias entre ambos tipos de asma grave en cuanto a control sintomático.

### 5.1.3 Análisis de variables analíticas

Debemos destacar que, dado el pequeño tamaño muestral con el que hemos trabajado, especialmente en el grupo de asma no T2, valores muy extremos generaban variaciones importantes de la media. Por ello, se consideró más adecuado trabajar con medianas. Los principales datos analíticos analizados se recogen en la Tabla 2.

Observamos que IgE tanto si nos referimos a media como a mediana, los valores fueron mayores en el grupo con asma no T2, lo cual resultaba llamativo ya que los niveles elevados de IgE, tal y como se entiende la clasificación hoy en día del asma, correspondería a un perfil T2 alérgico típicamente eosinofílico (38,41,103). Sin embargo, las diferencias no eran estadísticamente significativas al comparar entre los tres grupos.

Los valores de PCR se encontraban más elevados en el grupo de pacientes T2 con respecto a los otros dos grupos, sin embargo, las diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas.

Tanto IgE como PCR son parámetros analíticos que podrían relacionarse con el asma bronquial, de hecho, los valores de IgE se incluyen entre los criterios para clasificar la enfermedad en alérgica o no alérgica. Sin embargo, resultan en parte inespecíficos dado que hay múltiples procesos que pueden aumentarlo, sin que ello suponga ninguna implicación sobre la patología asmática. Por su parte, la IgE puede estar aumentada en cualquier proceso alérgico, así como neoplasias, parasitosis o incluso vasculitis. Del mismo modo, la PCR puede encontrarse elevada en patologías infecciosas, así como procesos inflamatorios.

**Tabla 2.** Análisis de valores medios de parámetros analíticos estudiados en sangre periférica.

(\*:  $p < 0.05$  vs grupo control; &  $p < 0.05$  vs grupo asma T2).

VARIABLES PLASMÁTICAS	CONTROLES (n = 27)	ASMA T2 (n = 22)	ASMA NO T2 (n = 11)
Glucosa (mg/dL)	83,7	90,3	95,18
Urea (mg/dL)	35,68	32,2	33,4
Creatinina (mg/dL)	0,79	0,76	0,76
Ácido úrico (mg/dL)	4,8	4,7	5,07
Colesterol total (mg/dL)	204,88	225,6	204,3
Albúmina (g/dL)	4,49	4,22	4,3
GOT (U/L)	25,56	23,05	27
GPT (U/L)	24,76	25,4	53
IgE (U/ml)	49,38	52,4	114,2
PCR (mg/dL)	0,5	0,8	0,38
Leucocitos ( $\times 10^3$ /mL)	6,37	7,8	7,08
Neutrófilos ( $\times 10^3$ /mL)	3,5	8,38 (*)	6,51 (*)
Eosinófilos ( $\times 10^3$ /mL)	0,1	0,68 (*)	0,09 (&)
Basófilos ( $\times 10^3$ /mL)	0,04	0,09	0,09
Monocitos ( $\times 10^3$ /mL)	0,51	0,9	0,55
Linfocitos ( $\times 10^3$ /mL)	2,07	4,04	2,62
Neutrófilos (%)	52,04	53,95	53,06
Eosinófilos (%)	3,91	6,54	1,22
Basófilos (%)	0,75	1,13	0,53
Monocitos (%)	8,35	7,37	7,88
Linfocitos (%)	34,98	30,4	37,31
Hematíes ( $10^6$ /mL)	4,68	4,74	4,74
Hemoglobina (g/dL)	13,9	14,1	14,37
Hematocrito (%)	41,38	42,44	42,64
Volumen corpuscular medio (fL)	88,51	85,75	89,94
Hemoglobina corpuscular media (pg)	29,83	29,73	20,34 (*) (&)
Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dL)	33,7	33,22	33,68
Anchura de distribución eritrocitaria (%)	13,67	14,28	13,2
Plaquetas ( $10^3$ /mL)	231,8	262,8	242,72
Volumen plaquetario medio (fL)	9,54	9,3	9,62

Ambos grupos de pacientes asmáticos presentaban valores en plasma de leucocitos y concretamente neutrófilos más elevados que en el grupo control, especialmente el grupo con asma T2. Esta diferencia solo mostró significación estadística en el caso del grupo control frente a ambos grupos de pacientes asmáticos, no siendo así para la diferencia entre grupos de asma. Las diferencias entre el grupo control y el de asma no T2 era esperable porque este perfil de pacientes presenta típicamente un predominio neutrofílico, aunque no sería esperable encontrar estas diferencias entre controles y pacientes T2.

El único grupo que ha presentado valores medios de eosinófilos en plasma elevados fue el de asma T2. Las diferencias eran estadísticamente significativas con respecto a los controles y paciente no T2, aunque no entre controles y pacientes no T2. Estos resultados sí que justifican el hecho de que el asma con respuesta T2 presenta niveles de eosinófilos en plasma mayores que los controles y asmáticos no T2 en los que existe un predominio de neutrófilos (38,41).

La hemoglobina corpuscular media presentaba unos niveles disminuidos en el grupo de asma no T2 con respecto a controles y asma T2, siendo las diferencias estadísticamente significativas. La hemoglobina corpuscular media es el parámetro que mide la cantidad de hemoglobina presente en los eritrocitos y que se obtiene de dividir la cantidad total de hemoglobina entre el número de eritrocitos de la muestra. Los valores normales oscilan entre el 26 y 34 pg. Su uso parece ser útil a la hora de clasificar la anemia microcítica ferropénica de la relacionada con déficit de vitamina B12, ya que cuanto menores sean los niveles de hemoglobina corpuscular media frente al recuento de plaquetas, más probable es que la anemia se deba a un déficit combinado (104). Esto se debe a que los niveles de hemoglobina corpuscular media se encuentran disminuidos en anemias hipocrómicas o con volumen corpuscular bajo como es el caso de la ferropenia, normales en anemias normocrómicas, y aumentados en anemias hiperocrómicas como es el caso de la anemia megaloblástica por déficit de folatos y vitamina B12. No existen estudios ni evidencia en relación con el uso de este parámetro como biomarcador en el asma, únicamente se ha estudiado la posible asociación de niveles bajos de hemoglobina materna con un mayor riesgo de desarrollo de asma en la descendencia (105). A pesar de ello, en nuestro caso es interesante tener en cuenta los



niveles bajos de hemoglobina corpuscular media en el grupo de asma no T2 por la posibilidad de que estos individuos tengan mayor asociación con la presencia de anemia respecto a los otros dos grupos, aunque este valor descendido no se haya relacionado con una disminución de la hemoglobina, la concentración de hemoglobina corpuscular media

El recuento celular total en esputo únicamente presentaba diferencias estadísticamente significativas entre controles y asmáticos T2.

El porcentaje de eosinófilos en esputo solo demostró diferencias entre controles y asmáticos T2, lo que concuerda con el hecho de que el asma T2 se relaciona con el aumento de los niveles de eosinófilos tanto en plasma como en esputo. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo asma T2 respecto al de asma no T2, lejos de lo esperable por lo mencionado anteriormente, ya que en el asma T2 esperaremos un predominio de eosinófilos, y en el asma no T2 un predominio de neutrófilos.

En el caso de los neutrófilos en esputo, al analizar las diferencias entre grupos de forma independiente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los 3 casos. Estos hallazgos también se alejan de los criterios hasta ahora establecidos para clasificar a los pacientes asmáticos utilizando biomarcadores a nivel de esputo.

## 5.2 Coherencia del fenotipado en plasma vs esputo inducido

Para considerar la presencia de eosinofilia en plasma el valor de referencia que se ha tenido en cuenta es un recuento de eosinófilos plasmáticos mayor o igual de 300, mientras que en esputo se ha considerado eosinofilia en presencia de mayor o igual de un 3% de eosinófilos en esputo (1).

La Tabla 3 muestra la distribución de perfiles eosinofílicos en plasma y esputo inducido de los tres grupos evaluados. Analizando las muestras de esputo y plasma de los controles, se observó que lo más frecuente (67% de los controles) era la ausencia de eosinofilia en sangre ni en esputo, aunque el 25% de los controles presentaban eosinofilia únicamente en esputo y el 4% únicamente en plasma. Incluso un 4% presentó

eosinofilia tanto en plasma como en esputo. La eosinofilia en plasma puede estar relacionada con otras patologías no relacionadas con el asma, aunque en este caso se trataban de individuos completamente sanos.

**Tabla 3.** Análisis descriptivo de la muestra según el perfil eosinofílico en plasma y esputo.

(+: presencia de eosinofilia; -: ausencia de eosinofilia).

Plasma/Esputo Eosinófilos	Controles	Asma T2	Asma No T2
-/-	67%	/	86%
+/-	4%	5%	/
-/+	25%	28%	14%
+/+	4%	61%	/

En los pacientes asmáticos T2, el 61% presentaba eosinofilia tanto en plasma como en esputo, siendo el perfil más frecuente. Sin embargo, dentro de este grupo, el 28% de pacientes presentaban eosinofilia en esputo únicamente y el 5% solo en plasma.

En el grupo de pacientes asmáticos no T2, el perfil más frecuente en el 86% de los casos fue ausencia de eosinofilia en ambos tipos de muestras, y el 14% restante presentaba eosinofilia únicamente en esputo.

Al referirnos previamente a los fenotipos inflamatorios en esputo, se definía un fenotipo neutrofílico como la presencia de más de un 40% de neutrófilos en esputo para clasificar a pacientes asmáticos. Sin embargo, la neutrofilia en esputo se define como la presencia mayor o igual el 76% de neutrófilos con respecto a la celularidad total detectada, aunque algunos autores ponen el límite en el 65% en al menos 2 muestras de esputo (106). En nuestro caso hemos tenido en cuenta los criterios de Simpson et al. para la clasificación de los 4 fenotipos inflamatorios del asma (78), por el cual se considera neutrofilia en esputo a un 61% o más de neutrófilos en esputo.

Siguiendo este criterio se describe la distribución en los tres grupos en la Tabla 4. En nuestra muestra observamos que el 66% de los individuos controles no presentaban neutrofilia ni en sangre ni en esputo, aunque aquellos que presentaron neutrofilia fue solo en esputo, correspondiendo al 34% de los controles. Estos hallazgos en individuos sanos se pueden deber al tratamiento con corticoides, tabaquismo o cambios en la

microbiota (106). En el caso de nuestra muestra, más del 70% de los controles no tenían historia de tabaquismo a lo largo de su vida y, únicamente el 14,8% eran fumadores activos, por lo que los datos que obtenemos de neutrofilia en esputo de los controles no se pueden explicar por este hecho.

**Tabla 4.** Análisis descriptivo de la muestra según el perfil neutrofílico en plasma y esputo, usando como criterio de neutrofilia en esputo el 61% (78)

(+: presencia de neutrofilia; -: ausencia de neutrofilia).

Plasma/Esputo Neutrófilos	Controles	Asma T2	Asma No T2
-/-	66%	73%	67%
+/-	/	9%	/
-/+	34%	13%	33%
+/+	/	5%	/

En el grupo asma T2 vemos que lo más frecuente, en el 73% de los casos, es la ausencia de neutrofilia tanto en plasma como en esputo, lo que sería esperable con relación a este fenotipo de pacientes. Sin embargo, existe un 13% de casos con neutrofilia en esputo y un 9% en plasma, presentando únicamente el 5% neutrofilia tanto en plasma como en esputo.

En el grupo de asma no T2, en el que lo más esperable sería encontrar pacientes con un fenotipo neutrofílico, vemos que el 67% no presentaban neutrofilia ni en sangre ni en esputo, una cifra muy similar a la que presentaban los pacientes del grupo asma T2, por lo que parece ser un biomarcador limitado a la hora de diferenciar entre ambos grupos. Únicamente el 33% presentaba neutrofilia, pero solo en esputo. Ningún paciente con asma no T2 presentó neutrofilia en plasma.

Si por el contrario utilizamos como criterio de neutrofilia en esputo la presencia de más del 40% de neutrófilos, los datos recogidos cambian de manera importante (Tabla 5). En el grupo control aumenta el porcentaje de individuos con neutrofilia solo en esputo hasta el 55% a expensas de una disminución del porcentaje de individuos sin neutrofilia en ninguno de las muestras biológicas. Ocurre de forma parecida en el grupo de asma T2 donde, además de aumentar los pacientes con neutrofilia en esputo hasta el 45%,

también se produce un aumento leve del porcentaje de pacientes con neutrofilia tanto en sangre como en esputo, hasta el 9%. De la misma forma, vemos que en el grupo de asma no T2 se invierten los porcentajes, aumentando el correspondiente a la presencia de neutrofilia solo en esputo hasta el 56%, disminuyendo hasta el 44% aquel que se refiere a la ausencia de neutrofilia. Que

**Tabla 5.** Análisis descriptivo de la muestra según el perfil neutrofílico en plasma y esputo, usando como criterio de neutrofilia en esputo el 40%.

(+: presencia de neutrofilia; -: ausencia de neutrofilia).

Plasma/Esputo Neutrófilos	Controles	Asma T2	Asma No T2
-/-	45%	41%	44%
+/-	/	5%	/
-/+	55%	45%	56%
+/+	/	9%	/

Estos resultados, además de hacernos pensar que probablemente el recuento de neutrófilos tanto en sangre como en esputo sea un biomarcador poco eficiente a la hora de clasificar a los pacientes en diferentes fenotipos que guíen la estrategia terapéutica, desvelan la ausencia de un consenso en cuanto a los puntos de corte utilizados para este biomarcador. Todo ello abala la necesidad de estudios de nuevos biomarcadores más eficientes y menos variables, así como unos criterios más estandarizados que optimicen su utilidad.

### 5.3 Correlación de variables analíticas, funcionales y clínicas

Al hacer correlación estadística entre las variables de estudio propuestas aplicando el coeficiente de Spearman las variables que presentaron una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) fueron las expuestas en la Tabla 6. La mayoría de las correlaciones fueron de grado débil ( $< 0,7$ ).

La IgE plasmática se correlacionó con el porcentaje de macrófagos en esputo, así como con el porcentaje de neutrófilos en esputo, pero en el segundo caso la asociación fue

negativa, lo cual podría deberse a que los niveles de IgE elevados son una característica propia del asma T2, en la cual es típica la eosinofilia, mientras que los neutrófilos tanto en sangre como en esputo son más característicos de un perfil no T2. Sin embargo, también se ha observado correlación positiva entre los eosinófilos en plasma, típicos del asma T2, con los neutrófilos en esputo típicos del asma no T2.

**Tabla 6.** Datos de correlación entre variables analizadas con coeficiente de Spearman.

<b>Variable</b>	<b>Variable correlacionada</b>	<b>Grado de correlación</b>	<b>p</b>
<b>IgE plasmática</b>	<i>Macrófagos en esputo (%)</i>	0,448	0,008
	<i>Neutrófilos en esputo (%)</i>	-0,372	0,03
<b>Eosinófilos plasmáticos</b>	<i>Células epiteliales en esputo (%)</i>	-0,284	0,04
	<i>Neutrófilos en esputo (%)</i>	0,275	0,038
<b>Células no viables en esputo (%)</b>	<i>Células epiteliales bronquiales en esputo (%)</i>	0,378	0,015
	<i>Glucosa en plasma</i>	0,309	0,036
<b>Células epiteliales en esputo (%)</b>	<i>Linfocitos en esputo (%)</i>	-0,376	0,008
<b>Células epiteliales bronquiales en esputo (%)</b>	<i>Linfocitos en esputo (%)</i>	0,473	<0,001
<b>Macrófagos en esputo (%)</b>	<i>Neutrófilos en esputo (%)</i>	-0,816	<0,001
<b>Glucosa en plasma</b>	<i>GPT</i>	0,340	0,011

El porcentaje de células no viables en esputo presenta una correlación positiva con el porcentaje de células bronquiales en esputo y con la glucemia en plasma.

Los linfocitos en esputo se correlacionan positivamente con el porcentaje de células bronquiales en esputo, y negativamente con el porcentaje de células epiteliales en esputo. El porcentaje de células epiteliales elevado se relaciona con contaminación de

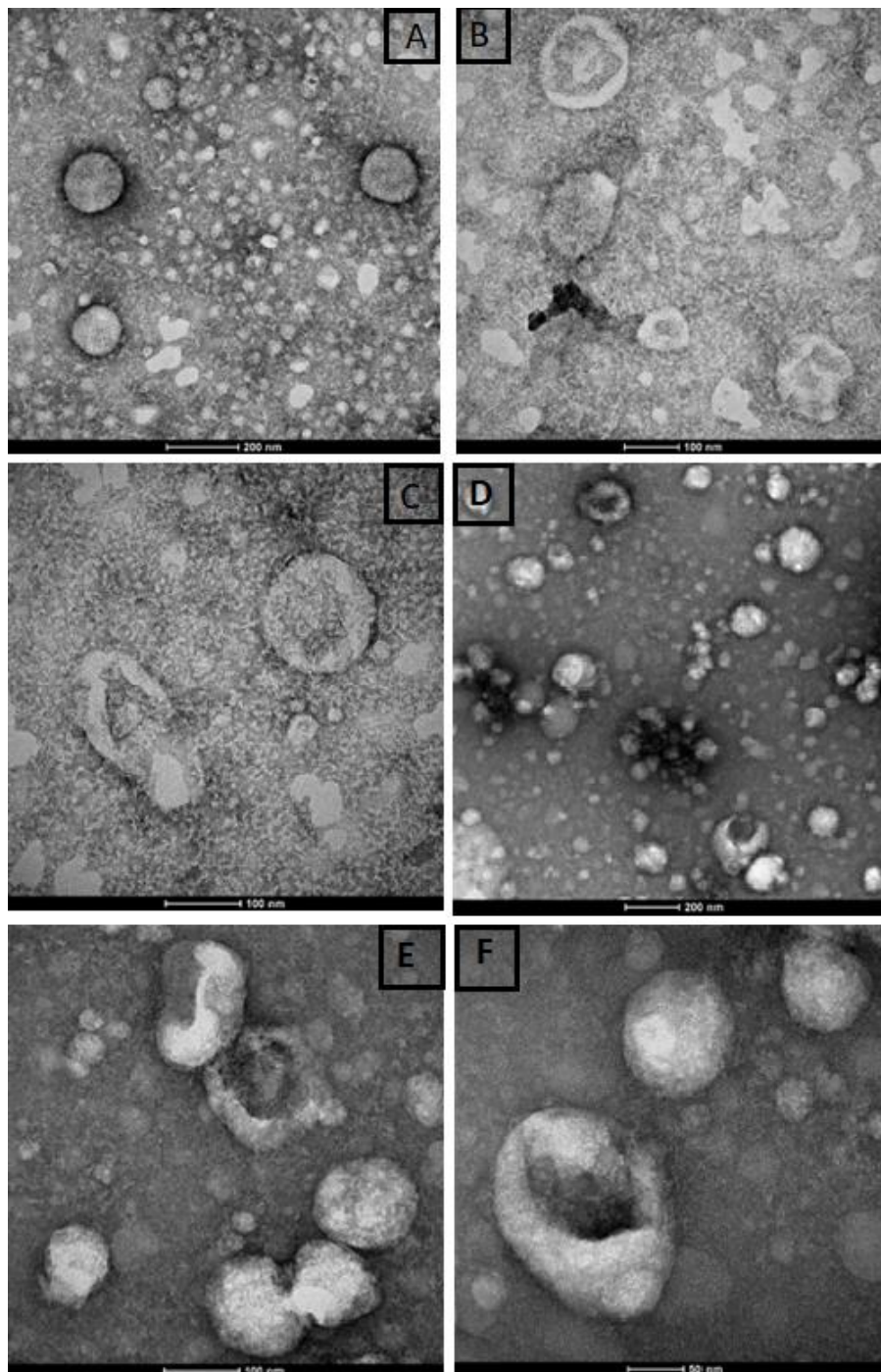
la muestra; no podemos relacionar un aumento del porcentaje de linfocitos en esputo por una disminución de la contaminación de la muestra ya que, en ese caso, deberían aumentar todas las demás celularidades. Los linfocitos en esputo se suelen relacionar con patología pulmonar inflamatoria como sarcoidosis o granulomatosis, o sistémica como síndrome de Crohn o síndrome de Sjögren primario; el porcentaje de células bronquiales en esputo se ha relacionado con la inflamación neutrofílica de las vías respiratorias y al asma de perfil más grave (107). El hecho de que tanto porcentaje de linfocitos como células bronquiales pueda relacionarse con una respuesta inflamatoria podría justificar que la correlación de ambas celularidades sea positiva.

Los macrófagos en esputo presentan una correlación negativa con los neutrófilos en esputo, lo que puede deberse a que el aumento de una de las dos celularidades suponga niveles disminuidos de la otra y viceversa. Esta asociación de variables es la única que presentaba un grado de correlación fuerte. Típicamente los pacientes con EPOC presentan un perfil en esputo con aumento de neutrófilos y macrófagos conjuntamente, mientras que en estos pacientes es posible un perfil eosinofílico en esputo que se relaciona con mayor frecuencia de exacerbaciones y mayor respuesta al tratamiento con corticoides, perfil que en pacientes diagnosticados de EPOC se conoce como síndrome de Overlap, el cual comparte características del asma (108). Comparando nuestro resultado con lo establecido hasta el momento, una correlación negativa entre macrófagos y neutrófilos en esputo podría ser una característica diferencial entre asma y EPOC. La glucosa plasmática mostraba una correlación positiva con los niveles de GPT.

#### 5.4 Aislamiento de exosomas de plasma. Caracterización.

El aislamiento de exosomas se llevó a cabo en el plasma de sujetos control y pacientes con asma T2 y no T2. En la Figura 13 se muestran imágenes representativas obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de los exosomas observados para los sujetos sanos (A y B), pacientes con asma T2 (C y D) y pacientes con asma no T2 (E y F). Estas imágenes permitieron aportar información sobre la morfología y el tamaño de los exosomas. No se determinaron variaciones cualitativas entre los diferentes grupos de sujetos. Sin embargo, como se puede observar, sí que se pudieron visualizar los

exosomas, vesículas de entre 50 y 200 nm. El tamaño fue variable dentro del rango esperado. A menor aumento mostraron una morfología esférica aparentemente regular (Figura 13, A y D), pero a mayor aumento se apreciaron invaginaciones en su membrana que le aportan una forma irregular, concretamente una forma conocida como forma de “copa” y que se debe a la deshidratación intensa que sufren las muestras durante el proceso de preparación (Figura 13, F).



**Figura 13.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de exosomas de plasma.

## 5.5 Cuantificación de exosomas de plasma

Los resultados obtenidos mediante el método de cuantificación anteriormente mencionado y explicado se exponen en la Tabla 7. En este caso se aportan datos sobre la concentración y el tamaño de los exosomas cuantificados en 6 individuos controles y 6 pacientes asmáticos de nuestra muestra.

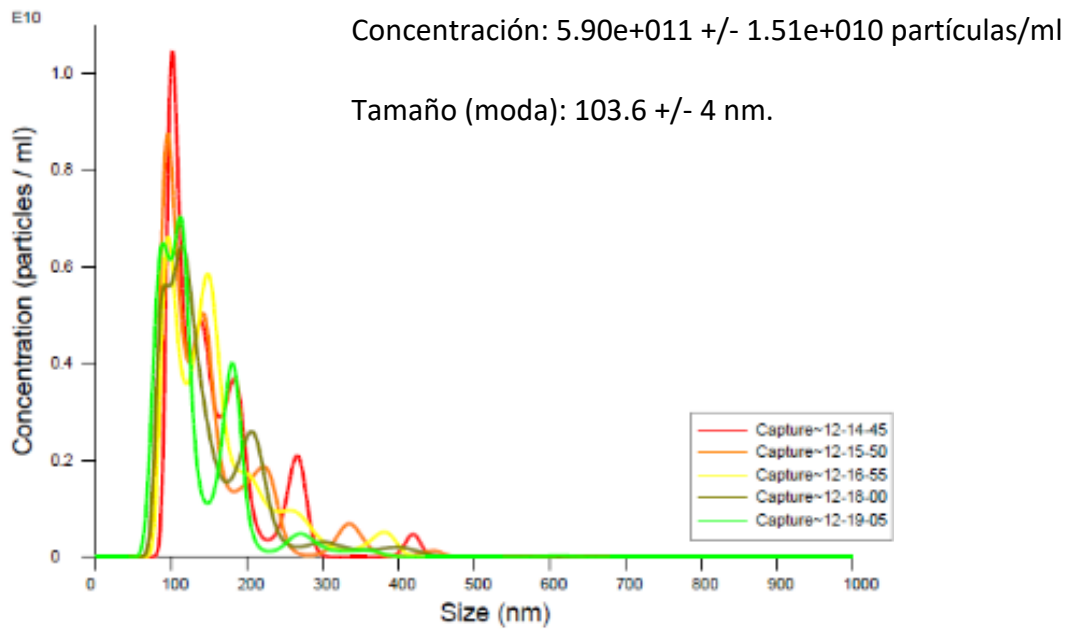
**Tabla 7.** Concentración y tamaño de exosomas de la muestra.

Concentración (*10 <sup>11</sup> )		Tamaño (Moda en nm)		
Control	Asma	Control	Asma	
8,41	8,39	100,3	93,3	
5,96	5,9	103,6	99,7	
7,85	8,22	99,8	100,1	
8,16	6,82	98,2	95,4	
7,43	7,16	99,3	94,5	
7,88	8,17	102,5	99,8	
7,615	7,44	100,61	97,13	<b>MEDIA</b>

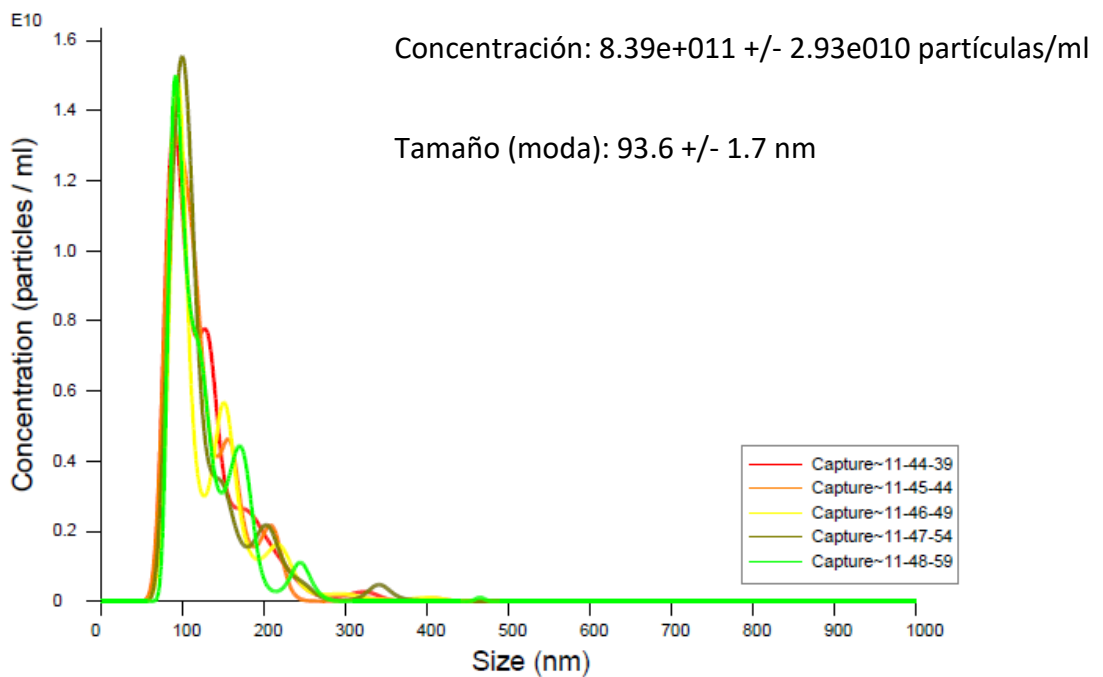
Observamos que, con los datos recogidos en los individuos seleccionados de cada grupo, los valores medios en cuanto a concentración media y moda del tamaño apenas mostraban diferencias entre el grupo control y el de asma. Para valorar la distribución del tamaño de los exosomas se utilizó la moda dado que los valores extremos alteraban de forma importante los valores medios.

Al valorar dichas variables en gráficas que relacionaban concentración y tamaño de exosomas en plasma, en el caso de individuos controles (Figura 14), podíamos ver que la mayor concentración de exosomas presentaba un tamaño alrededor de 100 nm. En la Figura 15 se valoraban las mismas variables pero en pacientes asmáticos y se observó que el tamaño de los exosomas, así como su concentración era muy similar a la que presentaban los controles.





**Figura 14.** Relación entre concentración y tamaño de exosomas en plasma de individuos controles.



**Figura 15.** Relación entre concentración y tamaño de exosomas en plasma de pacientes asmáticos.

Estos hallazgos sugieren que no existen diferencias en cuanto a concentración y tamaño de los exosomas en plasma entre controles y pacientes asmáticos. Por ello se considera necesario llevar a cabo un estudio que analice la composición de los exosomas en ambos grupos, y así poder esclarecer el papel de dichas estructuras en la fisiopatología del asma.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos y presentados en este trabajo nos permitieron obtener las siguientes conclusiones:

1. La Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) mostró niveles bajos en el grupo de asma no T2 con diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros dos grupos, lo que podría relacionarse con anemia en el asma no T2.
2. Los pacientes con asma grave T2 mostraron generalizadamente un perfil eosinofílico. Sin embargo, este perfil no se mantenía constante entre plasma y esputo inducido, lo que indica la necesidad de nuevos parámetros biomarcadores que permitan definir con mayor robustez un endotipo.
3. La correlación de neutrofilia en sangre y esputo presenta limitaciones similares a las que observamos en la eosinofilia pero, además se aprecia una necesidad de unificar y establecer un criterio que determine un punto de corte para definir la neutrofilia en esputo, de tal forma que su uso para la clasificación de los pacientes resulte más sensible y específico.
4. El análisis cuantitativo de exosomas procedentes de plasma de sujetos control y pacientes con asma T2 no mostró diferencias en cuanto a su tamaño y concentración. Es necesario llevar a cabo estudios que evalúen la carga de estas vesículas extracelulares para elucidar si tienen un rol importante en la fisiopatología del asma.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. GUÍA ESPAÑOLA PARA EL MANEJO DEL ASMA. [cited 2022 Oct 9]; Available from: [www.gemasma.com](http://www.gemasma.com)
2. [Evolution of Asthma Prevalence and Sociodemographic and Health Factors Associated in Madrid Region (1996-2013)] - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 28]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28537246/>
3. Mallol J, Crane J, von Mutius E, Odhiambo J, Keil U, Stewart A. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: a global synthesis. *Allergol Immunopathol (Madr)* [Internet]. 2013 Mar [cited 2022 Oct 9];41(2):73–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22771150/>
4. Soriano JB, Kendrick PJ, Paulson KR, Gupta V, Abrams EM, Adedoyin RA, et al. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 Oct 9];8(6):585–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32526187/>
5. López Pereira P, María Gandarillas Grande A, Díez Gañán L, Ordobás Gavín M, Patricia López Pereira C. ORIGINAL EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA DE ASMA Y FACTORES SOCIODEMOGRÁFICOS Y DE SALUD ASOCIADOS EN POBLACIÓN DE 18 A 64 AÑOS DE LA COMUNIDAD DE MADRID (1996-2013) ABSTRACT Evolution of Asthma Prevalence and Sociodemographic and Health Factors Associated in Madrid Region (1996-2013). *Rev Esp Salud Pública* [Internet]. 2017 [cited 2022 Oct 9];91:1–14. Available from: [www.msc.es/resp](http://www.msc.es/resp)
6. Soriano JB, Abajobir AA, Abate KH, Abera SF, Agrawal A, Ahmed MB, et al. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived

- with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Oct 7];5(9):691–706. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28822787/>
7. Prevalence of asthma and its management: A review - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30504949/>
  8. Haktanir Abul M, Phipatanakul W. Severe asthma in children: Evaluation and management. *Allergol Int* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2022 Oct 9];68(2):150–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30648539/>
  9. Kuruvilla ME, Vanijcharoenkarn K, Shih JA, Lee FEH. Epidemiology and risk factors for asthma. *Respir Med* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Oct 9];149:16–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30885424/>
  10. Thomsen SF. Genetics of asthma: an introduction for the clinician. *Eur Clin Respir J* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Oct 10];2(1):24643. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26557257/>
  11. Yang I v., Pedersen BS, Liu A, O'Connor GT, Teach SJ, Kattan M, et al. DNA methylation and childhood asthma in the inner city. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015 [cited 2022 Oct 9];136(1):69–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25769910/>
  12. Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease.
  13. Castillo JR, Peters SP, Busse WW. Asthma Exacerbations: Pathogenesis, Prevention, and Treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Oct 11];5(4):918. Available from: </pmc/articles/PMC5950727/>
  14. Definición de asma.

15. Hammad H, Lambrecht BN. The basic immunology of asthma. *Cell* [Internet]. 2021 Mar 18 [cited 2022 Oct 13];184(6):1469–85. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867421001665/fulltext>
16. Pazmiño FA, Navarrete-Jiménez ML. Immunologic mechanisms involved in the pathology of allergic asthma. *Rev Fac Med*. 2014;62:265–77.
17. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LFF, Elliot J, Lindeman JHN, Ferreira DS, et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* [Internet]. 2008 Jul [cited 2022 Oct 10];32(1):61–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18321931/>
18. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LFF, Elliot J, Lindeman JHN, Ferreira DS, et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* [Internet]. 2008 Jul [cited 2022 Oct 9];32(1):61–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18321931/>
19. 2022 GINA Main Report - Global Initiative for Asthma - GINA [Internet]. [cited 2022 Oct 9]. Available from: <https://ginasthma.org/gina-reports/>
20. FORMACIÓN MÉDICA ACREDITADA. Conceptos clínicos básicos en el manejo del asma bronquial (2) [Internet]. [cited 2022 Oct 9]. Available from: <https://corporativa.amyts.es/noticias/noticia/?slug=formacion-medica-acreditada-conceptos-clinicos-basicos-en-el-manejo-del-asma-bronquial-2>
21. Perpiñá Tordera M, García Río F, Álvarez Gutierrez FJ, Cisneros Serrano C, Compte Borrero L, Entrenas Costa LM, et al. Guidelines for the study of nonspecific bronchial hyperresponsiveness in asthma. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2022 Oct 10];49(10):432–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23896599/>

22. Feng M, Yang X, He Y. Effects of bronchial provocation test and bronchial dilation test for the diagnosis of lung diseases. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* [Internet]. 2019 Dec 4 [cited 2022 Oct 9];47(1):1452–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31007079/>
23. Seo HJ, Lee PH, Kim BG, Lee SH, Park JS, Lee J, et al. Methacholine bronchial provocation test in patients with asthma: serial measurements and clinical significance. *Korean J Intern Med* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 Oct 9];33(4):807–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29334723/>
24. Jones TL, Neville DM, Chauhan AJ. Diagnosis and treatment of severe asthma: a phenotype-based approach. *Clin Med (Lond)* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Oct 9];18(Suppl 2):s36–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29700091/>
25. Miranda L, Guerrero J. [Measurement of exhaled nitric oxide fraction in lung diseases]. *Rev Med Chil* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 Oct 9];149(8):1173–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35319704/>
26. Bateman ED, Jacques L, Goldfrad C, Atienza T, Mihaescu T, Duggan M. Asthma control can be maintained when fluticasone propionate/salmeterol in a single inhaler is stepped down. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2006 Mar [cited 2022 Oct 11];117(3):563–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16522454/>
27. Oscanoa T. Seguridad de los beta 2 agonistas ( $\beta$  2 A) en asma bronquial. 2014;
28. Pauwels RA, Lofdahl CG, Postma DS, Tattersfield AE, O’Bvrne P, Barnes PI, et al. Effect of inhaled formoterol and budesonid on exacerbations of asthma. *Pneumologie* [Internet]. 1998 [cited 2022 Oct 11];52(3):140–1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9358137/>

29. Mendoza Amatlter A, Gorena Antezana S, -Alergólogo P, del Niño H, Aliaga O, Paz - Bolivia L, et al. Antileucotrienos y asma Antileukotrienes and asthma. *Rev Soc Bol Ped*. 2007;46(2):113–20.
30. Zhang HP, Jia CE, Lv Y, Gibson PG, Wang G. Montelukast for prevention and treatment of asthma exacerbations in adults: Systematic review and meta-analysis. *Allergy Asthma Proc* [Internet]. 2014 [cited 2022 Oct 11];35(4):278–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24992547/>
31. Toledo-Pons N, Cosío BG. Is There room for Theophylline in COPD? *Arch Bronconeumol*. 2017 Oct 1;53(10):539–40.
32. Ortega Páez E, Ortega Páez E. Evidencias en el uso de la vitamina D, la azitromicina y los corticoides para la hiperreactividad bronquial. *Pediatría Atención Primaria* [Internet]. 2017 [cited 2022 Oct 11];19(26):63–8. Available from: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1139-76322017000300008&lng=es&nrm=iso&tIng=es](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322017000300008&lng=es&nrm=iso&tIng=es)
33. Balanag VM, Yunus F, Yang PC, Jorup C. Efficacy and safety of budesonide/formoterol compared with salbutamol in the treatment of acute asthma. *Pulm Pharmacol Ther* [Internet]. 2006 Apr [cited 2022 Oct 11];19(2):139–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16009588/>
34. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health* [Internet]. 2012 [cited 2022 Oct 9];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22429515/>
35. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*



- [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2022 Oct 10];43(2):343–73. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24337046/>
36. van Dijk BCP, Svedsater H, Hedding A, Nelsen L, Balradj JS, Alleman C. Relationship between the Asthma Control Test (ACT) and other outcomes: a targeted literature review. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2020 Apr 3 [cited 2022 Oct 9];20(1). Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32245451/>
37. Heaney LG, Perez de Llano L, Al-Ahmad M, Backer V, Busby J, Canonica GW, et al. Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma: An Expert Consensus Framework to Characterize Phenotypes in a Global Real-Life Severe Asthma Cohort. *Chest* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Oct 9];160(3):814–30. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33887242/>
38. Castro M, Corren J, Pavord ID, Maspero J, Wenzel S, Rabe KF, et al. Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2018 Jun 28 [cited 2022 Oct 13];378(26):2486–96. Available from:  
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1804092>
39. Castro M, Mathur S, Hargreave F, Boulet LP, Xie F, Young J, et al. Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2011 Nov 15 [cited 2022 Oct 11];184(10):1125–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21852542/>
40. Laviolette M, Gossage DL, Gauvreau G, Leigh R, Olivenstein R, Katial R, et al. Effects of benralizumab on airway eosinophils in asthmatic patients with sputum eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2022 Oct 11];132(5). Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23866823/>

41. Jones TL, Neville DM, Chauhan AJ. Diagnosis and treatment of severe asthma: a phenotype-based approach. *Clin Med (Lond)* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Oct 11];18(Suppl 2):s36–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29700091/>
42. Busse WW, Holgate S, Kerwin E, Chon Y, Feng J, Lin J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2022 Oct 9];188(11):1294–302. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24200404/>
43. Tan R, Liew MF, Lim HF, Leung BP, Wong WSF. Promises and challenges of biologics for severe asthma. *Biochem Pharmacol*. 2020 Sep 1;179:114012.
44. Quirce S, Bobolea I, Domínguez-Ortega J, Barranco P. Futuras terapias biológicas en el asma. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2022 Oct 11];50(8):355–61. Available from: <https://www.archbronconeumol.org/en-futuras-terapias-biologicas-el-asma-articulo-S0300289614000751>
45. Loureiro CC, Amaral L, Ferreira JA, Lima R, Pardal C, Fernandes I, et al. Omalizumab for Severe Asthma: Beyond Allergic Asthma. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018 [cited 2022 Oct 11];2018. Available from: </pmc/articles/PMC6166383/>
46. Kupryś-Lipińska I, Molińska K, Kuna P. The effect of omalizumab on eosinophilic inflammation of the respiratory tract in patients with allergic asthma. *Pneumonol Alergol Pol* [Internet]. 2016 [cited 2022 Oct 11];84(4):232–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27435350/>
47. Cheng SL. Molecular targets for biological therapies of severe asthma: Focus on benralizumab and tezepelumab. *Life* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 Oct 11];11(8). Available from: </pmc/articles/PMC8399988/>

48. Varricchi G, Senna G, Loffredo S, Bagnasco D, Ferrando M, Canonica GW. Reslizumab and Eosinophilic Asthma: One Step Closer to Precision Medicine? *Front Immunol* [Internet]. 2017 Mar 10 [cited 2022 Oct 11];8(MAR):242. Available from: [/pmc/articles/PMC5344894/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3481111/)
49. Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2014 Sep 25 [cited 2022 Oct 11];371(13):1198–207. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1403290>
50. Blauvelt A, de Bruin-Weller M, Gooderham M, Cather JC, Weisman J, Pariser D, et al. Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* [Internet]. 2017 Jun 10 [cited 2022 Oct 13];389(10086):2287–303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28478972/>
51. Menzies-Gow A, Corren J, Bourdin A, Chupp G, Israel E, Wechsler ME, et al. Tezepelumab in Adults and Adolescents with Severe, Uncontrolled Asthma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2021 May 13 [cited 2022 Oct 13];384(19):1800–9. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2034975>
52. Schoettler N, Strek ME. Recent Advances in Severe Asthma: From Phenotypes to Personalized Medicine. *Chest* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Oct 11];157(3):516. Available from: [/pmc/articles/PMC7609962/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3201111/)
53. Kunc P, Fabry J, Lucanska M, Pecova R. Biomarkers of Bronchial Asthma. *Physiol Res* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Oct 13];69(Suppl 1):S29. Available from: [/pmc/articles/PMC8604059/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3201111/)

54. Agache I, Eguiluz-Gracia I, Cojanu C, Laculiceanu A, del Giacco S, Zemelka-Wiacek M, et al. Advances and highlights in asthma in 2021. *Allergy* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 Oct 11];76(11):3390–407. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/all.15054>
55. Watanabe H, Shirai T, Hirai K, Akamatsu T, Nakayasu H, Tamura K, et al. Blood eosinophil count and FeNO to predict benralizumab effectiveness in real-life severe asthma patients. *J Asthma* [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 10];59(9):1796–804. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34348060/>
56. Hanania NA, Wenzel S, Roseñ K, Hsieh HJ, Mosesova S, Choy DF, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2013 Apr 15 [cited 2022 Oct 11];187(8):804–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23471469/>
57. Busse WW, Maspero JF, Rabe KF, Papi A, Wenzel SE, Ford LB, et al. Liberty Asthma QUEST: Phase 3 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study to Evaluate Dupilumab Efficacy/Safety in Patients with Uncontrolled, Moderate-to-Severe Asthma. *Adv Ther* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Oct 13];35(5):737–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29725983/>
58. Corren J, Parnes JR, Wang L, Mo M, Roseti SL, Griffiths JM, et al. Tezepelumab in Adults with Uncontrolled Asthma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2017 Sep 7 [cited 2022 Oct 13];377(10):936–46. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1704064>
59. Yancey SW, Keene ON, Albers FC, Ortega H, Bates S, Bleecker ER, et al. Biomarkers for severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Oct 10];140(6):1509–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29221581/>

60. Domingo Ribas C, Carrillo Díaz T, Blanco Aparicio M, Martínez Moragón E, Banas Conejero D, Sánchez Herrero MG, et al. REal world Effectiveness and Safety of Mepolizumab in a Multicentric Spanish Cohort of Asthma Patients Stratified by Eosinophils: The REDES Study. *Drugs* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2022 Oct 10];81(15):1763–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34586602/>
61. Eguiluz-Gracia I, Tay TR, Hew M, Escribese MM, Barber D, O’Hehir RE, et al. Recent developments and highlights in biomarkers in allergic diseases and asthma. *Allergy* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Oct 13];73(12):2290–305. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30289997/>
62. Ortega HG, Yancey SW, Mayer B, Gunsoy NB, Keene ON, Bleecker ER, et al. Severe eosinophilic asthma treated with mepolizumab stratified by baseline eosinophil thresholds: a secondary analysis of the DREAM and MENSA studies. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2022 Oct 13];4(7):549–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27177493/>
63. Bjermer L, Lemiére C, Maspero J, Weiss S, Zangrilli J, Germinaro M. Reslizumab for Inadequately Controlled Asthma With Elevated Blood Eosinophil Levels: A Randomized Phase 3 Study. *Chest* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2022 Oct 13];150(4):789–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27056586/>
64. Castro M, Corren J, Pavord ID, Maspero J, Wenzel S, Rabe KF, et al. Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Jun 28 [cited 2022 Oct 10];378(26):2486–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29782217/>
65. Bleecker ER, FitzGerald JM, Chanez P, Papi A, Weinstein SF, Barker P, et al. Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting  $\beta_2$ -agonists (SIROCCO): a randomised,

- multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* [Internet]. 2016 Oct 29 [cited 2022 Oct 13];388(10056):2115–27. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27609408/>
66. Humbert M, Taillé C, Mala L, le Gros V, Just J, Molimard M, et al. Omalizumab effectiveness in patients with severe allergic asthma according to blood eosinophil count: the STELLAIR study. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Oct 13];51(5):1702523. Available from:  
<https://erj.ersjournals.com/content/51/5/1702523>
67. Tiotiu A. Biomarkers in asthma: state of the art. *Asthma Research and Practice* 2018 4:1 [Internet]. 2018 Dec 21 [cited 2022 Oct 13];4(1):1–10. Available from:  
<https://asthmarp.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40733-018-0047-4>
68. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of Asthma with Serum IgE Levels and Skin-Test Reactivity to Allergens. *Journal of the American Medical Association* [Internet]. 2010 Jan 14 [cited 2022 Oct 13];320(5):271–7. Available from:  
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198902023200502>
69. Bousquet J, Rabe K, Humbert M, Chung KF, Berger W, Fox H, et al. Predicting and evaluating response to omalizumab in patients with severe allergic asthma. *Respir Med* [Internet]. 2007 Jul [cited 2022 Oct 13];101(7):1483–92. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17339107/>
70. Spahn JD, Covar RA, Jain N, Gleason M, Shimamoto R, Szeffler SJ, et al. Effect of montelukast on peripheral airflow obstruction in children with asthma. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2022 Oct 13];96(4):541–9. Available from: <http://www.annallergy.org/article/S108112061063548X/fulltext>

71. Grayson MH, Feldman S, Prince BT, Patel PJ, Matsui EC, Apter AJ. Advances in asthma in 2017: Mechanisms, biologics, and genetics. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Oct 13];142(5):1423–36. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30213625/>
72. Anderson HM, Lemanske RF, Arron JR, Holweg CTJ, Rajamanickam V, Gangnon RE, et al. Relationships among aeroallergen sensitization, peripheral blood eosinophils, and periostin in pediatric asthma development. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2022 Oct 13];139(3):790–6. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27484037/>
73. Fitzpatrick AM. Biomarkers of asthma and allergic airway diseases. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2022 Oct 13];115(5):335–40. Available from: <http://www.annallergy.org/article/S108112061500589X/fulltext>
74. Gomez JL, Yan X, Holm CT, Grant N, Liu Q, Cohn L, et al. Characterisation of asthma subgroups associated with circulating YKL-40 levels. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Oct 13];50(4):1700800. Available from:  
<https://erj.ersjournals.com/content/50/4/1700800>
75. Grayson MH, Feldman S, Prince BT, Patel PJ, Matsui EC, Apter AJ. Advances in asthma in 2017: Mechanisms, biologics, and genetics. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Oct 13];142(5):1423–36. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30213625/>
76. Medrek SK, Parulekar AD, Hanania NA. Predictive Biomarkers for Asthma Therapy. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Oct 14];17(10). Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28929293/>

77. Loza MJ, Djukanovic R, Chung KF, Horowitz D, Ma K, Branigan P, et al. Validated and longitudinally stable asthma phenotypes based on cluster analysis of the ADEPT study. *Respir Res* [Internet]. 2016 Dec 15 [cited 2022 Oct 14];17(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27978840/>
78. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology* [Internet]. 2006 Jan [cited 2022 Nov 15];11(1):54–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16423202/>
79. Demarche SF, Schleich FN, Paulus VA, Henket MA, van Hees TJ, Louis RE. Asthma Control and Sputum Eosinophils: A Longitudinal Study in Daily Practice. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Oct 14];5(5):1335-1343.e5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28389300/>
80. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Jun 27 [cited 2022 Oct 14];368(26):2455–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23688323/>
81. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Mar 5 [cited 2022 Oct 14];360(10):973–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19264686/>
82. Cowan DC, Taylor DR, Peterson LE, Cowan JO, Palmay R, Williamson A, et al. Biomarker-based asthma phenotypes of corticosteroid response. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 Oct 14];135(4):877-883.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25488689/>



83. Smith SG, Chen R, Kjarsgaard M, Huang C, Oliveria JP, O’Byrne PM, et al. Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Oct 14];137(1):75-86.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26194544/>
84. Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* [Internet]. 2017 Aug 12 [cited 2022 Oct 14];390(10095):659–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28687413/>
85. Kavanagh JE, d’Ancona G, Elstad M, Green L, Fernandes M, Thomson L, et al. Real-World Effectiveness and the Characteristics of a “Super-Responder” to Mepolizumab in Severe Eosinophilic Asthma. *Chest* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Oct 10];158(2):491–500. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32275980/>
86. Albers FC, Liciskai C, Chanez P, Bratton DJ, Bradford ES, Yancey SW, et al. Baseline blood eosinophil count as a predictor of treatment response to the licensed dose of mepolizumab in severe eosinophilic asthma. *Respir Med* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Oct 10];159. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31751853/>
87. Bleecker ER, Wechsler ME, Mark FitzGerald J, Menzies-Gow A, Wu Y, Hirsch I, et al. Baseline patient factors impact on the clinical efficacy of benralizumab for severe asthma. *Eur Respir J* [Internet]. 2018 [cited 2022 Oct 10];52(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30139780/>
88. Dunican EM, Elicker BM, Gierada DS, Nagle SK, Schiebler ML, Newell JD, et al. Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. *J Clin*

- Invest [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2022 Oct 10];128(3):997–1009. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29400693/>
89. Pastor L, Vera E, Marin JM, Sanz-Rubio D. Extracellular Vesicles from Airway Secretions: New Insights in Lung Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jan 2 [cited 2022 Oct 10];22(2):1–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33430153/>
90. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Oct 14];19(1):47. Available from: </pmc/articles/PMC8063428/>
91. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 Oct 18];8(7). Available from: </pmc/articles/PMC6678302/>
92. Cañas JA, Sastre B, Rodrigo-Muñoz JM, del Pozo V. Exosomes: A new approach to asthma pathology. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 Oct 10];495:139–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30978325/>
93. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* [Internet]. 2019 Feb 15 [cited 2022 Oct 14];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30815248/>
94. Specjalski K, Jassem E. MicroRNAs: Potential Biomarkers and Targets of Therapy in Allergic Diseases? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 Oct 17];67(4):213. Available from: </pmc/articles/PMC6597590/>
95. Suojalehto H, Lindström I, Majuri ML, Mitts C, Karjalainen J, Wolff H, et al. Altered microRNA expression of nasal mucosa in long-term asthma and allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Oct 17];163(3):168–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24513959/>

96. Alexandrova E, Miglino N, Hashim A, Nassa G, Stellato C, Tamm M, et al. Small RNA profiling reveals deregulated phosphatase and tensin homolog (PTEN)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway in bronchial smooth muscle cells from asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Oct 17];137(1):58–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26148798/>
97. Zhao M, Juanjuan L, Weijia F, Jing X, Qihua H, Hua Z, et al. Expression Levels of MicroRNA-125b in Serum Exosomes of Patients with Asthma of Different Severity and its Diagnostic Significance. *Curr Drug Metab* [Internet]. 2019 Oct 21 [cited 2022 Oct 10];20(10):781–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31631818/>
98. ACT, la prueba de control del asma - pdf Docer.com.ar [Internet]. [cited 2022 Oct 10]. Available from: <https://docer.com.ar/doc/nsec5xn>
99. Moreno-Pérez D, Andrés Martín A, Altet Gómez N, Baquero-Artigao F, Escribano Montaner A, Gómez-Pastrana Durán D, et al. Diagnóstico de la tuberculosis en la edad pediátrica. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) y la Sociedad Española de Neumología Pediátrica (SENP). *An Pediatr (Engl Ed)* [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2022 Oct 9];73(3):143.e1-143.e14. Available from: <https://www.analesdepediatria.org/es-diagnostico-tuberculosis-edad-pediatrica-documento-articulo-S1695403310000846>
100. Davies AR, Hancox RJ. Induced sputum in asthma: diagnostic and therapeutic implications. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2013 Jan [cited 2022 Oct 10];19(1):60–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23143199/>
101. Abdo M, Watz H, Veith V, Kirsten AM, Biller H, Pedersen F, et al. Small airway dysfunction as predictor and marker for clinical response to biological therapy in severe eosinophilic asthma: a longitudinal observational study. *Respir Res* [Internet]. 2020 Dec

- 1 [cited 2022 Nov 10];21(1). Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33087134/>
102. Heaney LG, Perez de Llano L, Al-Ahmad M, Backer V, Busby J, Canonica GW, et al. Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma: An Expert Consensus Framework to Characterize Phenotypes in a Global Real-Life Severe Asthma Cohort. *Chest* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Oct 10];160(3):814–30. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33887242/>
103. Lommatzsch M, Virchow CJ. Severe Asthma: Definition, Diagnosis and Treatment. *Dtsch Arztebl Int* [Internet]. 2014 Mar [cited 2022 Nov 12];111(50):847. Available from:  
</pmc/articles/PMC4357024/>
104. Beyan C, Kaptan K, Beyan E, Turan M. The platelet count/mean corpuscular hemoglobin ratio distinguishes combined iron and vitamin B12 deficiency from uncomplicated iron deficiency. *Int J Hematol* [Internet]. 2005 [cited 2022 Nov 22];81(4):301–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15914358/>
105. Triche EW, Lundsberg LS, Wickner PG, Belanger K, Leaderer BP, Bracken MB. Association of maternal anemia with increased wheeze and asthma in children. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2022 Nov 12];106(2):131-139.e1. Available from:  
<http://www.annallergy.org/article/S1081120610010586/fulltext>
106. Luis A, Pérez De Llano A. Asma neutrofílica. *Revista de asma* [Internet]. 2017 Dec 29 [cited 2022 Nov 14];2(2):172–8. Available from:  
<https://separcontenidos.es/revista3/index.php/revista/article/view/119/152>
107. Qin L, Gibson PG, Simpson JL, Baines KJ, McDonald VM, Wood LG, et al. Dysregulation of sputum columnar epithelial cells and products in distinct asthma phenotypes. *Clinical*

& Experimental Allergy [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Nov 18];49(11):1418–28.

Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cea.13452>

108. Barnes PJ. Inflammatory endotypes in COPD. Allergy [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022

Nov 18];74(7):1249–56. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/all.13760>