

Correspondencia

Elsa Margarita Uribe Echevarría
Domicilio Postal: Pabellón biología celular. Primer piso.
Haya de la Torre esq. E. Barros. Ciudad Universitaria,
Universidad Nacional de Córdoba
Correo electrónico: Uribe@cmefcm.uncor.edu
Tel. y fax: 54-351-4333021

Recibido: 06.05.2011
Aceptado: 26.08.2011

Evidencias de la utilidad del esputo inducido en el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades respiratorias ocupacionales

Autor: Elisa Margarita Uribe Echevarría

Sanatorio Allende. Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

Las exposiciones ocupacionales causan del 10 al 15% de asma de nueva aparición en adultos y representan una considerable carga para la salud pública y gastos económicos. El diagnóstico de asma ocupacional (AO) es difícil debido a la confirmación del origen profesional de la enfermedad; tiene un impacto importante en la carrera del empleado y muchas personas involuntariamente deben dejar su puesto de trabajo. Para evitar consecuencias graves, es necesario desarrollar nuevos métodos que podrían revelar la incipiente AO antes que los métodos disponibles en la actualidad o apoyar el diagnóstico en caso de resultados dudosos (descenso en los parámetros ventilatorios) de las pruebas de broncoprovocación.

Los objetivos clave en el manejo de enfermedades respiratorias ocupacionales, incluyen el control de la exposición ocupacional, un alto índice de sospecha de cualquier adulto con asma de nueva aparición, y su investigación detallada temprana¹.

La evaluación del asma por la historia y el examen físico puede ser engañosa, por lo que son importantes las pruebas de función pulmonar. En el caso de la AO, los resultados pueden ser normales si el paciente no ha estado expuesto recientemente al agente de la labor pertinente o está recibiendo medicamentos para el asma. Aunque la respuesta aceptada al broncodilatador en pacientes con asma es de una mejora de >12% y de 200 ml en el FEV₁², su ausencia no excluye asma³. La medición de la variabilidad en la limitación del flujo aéreo con un medidor de pico de flujo espiratorio (PEF) durante un período de 2 semanas también puede apoyar el diagnóstico de asma, aunque en la práctica tiene como desventajas la falta de estandarización en la interpretación de los resultados sumado a las dificultades técnicas y la escasa confiabilidad en la recolección de las mediciones por parte del pa-

ciente. Una variación diurna en PEF de >20% es considerada un criterio diagnóstico⁴.

En los pacientes con síntomas compatibles con asma, pero con función pulmonar normal, la medición de la capacidad de respuesta de la vía aérea a la metacolina, histamina, o al ejercicio puede ayudar a determinar el diagnóstico de asma. Estas pruebas de desafío en el AO se realizan preferiblemente antes y después de una exposición durante el trabajo (es decir, dentro de las 24 h después de una típica exposición) y son sensibles para el diagnóstico de asma, pero no son específicas ya que las vías respiratorias hiperreactivas pueden estar presentes en otras condiciones (por ejemplo, la rinitis alérgica o bronquiectasias). La ausencia de hiperreactividad de las vías respiratorias tiene un alto valor predictivo negativo para diagnóstico de asma, y en general se puede utilizar para descartar enfermedad activa. Sin embargo, ha habido informes documentados de personas sin hiperreactividad que responden a los test de provocación bronquial específicos (TPBE)⁵. Desafortunadamente, estos test requieren de laboratorios específicos de escasa disponibilidad en el país, sumado a los riesgos que implican el desafío con los alérgenos.

Las medidas no invasivas de la inflamación de las vías respiratorias son cada vez más utilizadas en la investigación y tratamiento del asma. El *esputo inducido* es la técnica no invasiva de recuperación de células y material soluble por inhalación de soluciones salinas hipertónicas que proporciona información sobre el estado inflamatorio de las vías respiratorias. Se ha aplicado con éxito para evaluar el estado de la vía aérea en el asma y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), que produce resultados fiables comparables a la biopsia y el lavado broncoalveolar. Los recuentos de eosinófilos en el esputo constituyen una herramienta más con-

fiable que la del óxido nítrico exhalado y permite discriminar con alta sensibilidad valores positivos y negativos en relación a los TPBE⁶.

En la evaluación de la inflamación de las vías respiratorias durante la investigación del AO, la evidencia apoya el uso de esputo inducido como una herramienta adicional para el diagnóstico⁷.

Pueden encontrarse en el esputo inducido perfiles celulares según el tipo de exposición laboral. Por lo general, en la exposición a agentes de alto peso molecular la respuesta inflamatoria es a predominio de eosinófilos, mientras que si lo es a agentes de bajo peso molecular, podrá ser eosinofílico o no-eosinofílico pero con predominio neutrofílico⁸. En el AO al cedro rojo se demostró un aumento de la eosinofilia⁹. En el caso de la exposición de los isocianatos se observa la presencia frecuente de neutrófilos en el esputo¹⁰. Y luego de las pruebas de desafío a persulfatos y cianoacrilatos, se observa elevación de los eosinófilos en el esputo¹¹.

Los sujetos con AO que han quedado con secuelas permanentes después de la eliminación de la exposición requieren de una evaluación de su deficiencia o discapacidad. Al respecto, la información sobre la inflamación de las vías respiratorias en el esputo inducido es relevante para la estimación de la deficiencia o discapacidad¹².

La *bronquitis eosinofílica* (BE) sin asma se puede presentar como una enfermedad respiratoria ocupacional. Esta condición se caracteriza por tos que responde a los corticosteroides y eosinofilia detectable en el esputo, sin obstrucción al flujo aéreo variable o hiperreactividad bronquial. La BE puede considerarse como un trastorno respiratorio ocupacional cuando se desarrolla como consecuencia de las exposiciones del trabajo. Recientemente, la exposición a ciertos alérgenos ocupacionales o sensibilizantes, como el látex de caucho natural, las esporas de hongos, acrilatos y un endurecedor de la resina de epoxy, han sido descritas como causantes de la BE sin asma. Varias hipótesis han sido formuladas tratando de explicar por qué los pacientes con BE no tienen hiperreactividad bronquial. Se desconoce si la BE puede progresar como AO típica, o si la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias puede persistir cuando los síntomas del asma y la hiperreactividad de las vías respiratorias han disminuido tras el cese de la exposición al agente ocupacional. El examen de esputo inducido es el método diagnóstico de elección para la BE y debería añadirse como método

diagnóstico objetivo durante los períodos de trabajo y fuera del trabajo¹³.

El análisis del esputo inducido en el campo de la medicina del trabajo se ha centrado principalmente en el AO, y menos a otros tipos de enfermedades profesionales. Sin embargo, recientemente se ha prestado atención a su eficacia en la evaluación de las enfermedades pulmonares intersticiales. El análisis cualitativo de la composición química de las partículas de esputo inducido se correlaciona bien con el espectro de elementos químicos en el lavado broncoalveolar, células de pulmón y en piezas de biopsia validadas con microscopía electrónica¹⁴. El subconjunto de células T en el esputo inducido puede ser utilizado como un marcador de la granulomatosis en la enfermedad crónica por berilio¹⁵. Recientemente se vio que las muestras recuperadas en los trabajadores expuestos al polvo inorgánico mostraron en un análisis cuantitativo y cualitativo un patrón similar a los de las muestras recuperadas por BAL en términos de porcentaje fenotipo de los linfocitos, los marcadores inflamatorios, la distribución del tamaño y tipo de partículas minerales¹⁶. Igualmente, las investigaciones recientes en este ámbito, podrían dar amplia información sobre la inflamación en la sarcoidosis pulmonar, tales como el recuento de células linfocíticas, las células CD4 + / CD8 + y la respuesta inmunológica Th1. Además de la sarcoidosis, el esputo inducido nos proporciona información útil sobre las enfermedades fibróticas y granulomatosas como la *alveolitis alérgica extrínseca*, trastornos del tejido conectivo, las enfermedades profesionales de pulmón y otras enfermedades sistémicas¹⁷.

La exposición a más de 100 sustancias químicas diferentes, como los metales (por ejemplo, plomo, cadmio), disolventes (por ejemplo, tolueno, tricloroetano) se puede estimar en un individuo mediante la medición de la sustancia química o sus metabolitos en la sangre, la orina o el aire exhalado. Sin embargo, las mediciones de polvos tóxicos se han basado principalmente en la historia laboral y la vigilancia ambiental. Actualmente, el uso del esputo inducido puede añadir una nueva dimensión a los parámetros tradicionales como es la historia ocupacional y ambiental pasada, para evaluación de las enfermedades por exposición a polvos tóxicos.

A modo de ejemplificar la utilidad del esputo inducido en enfermedades respiratorias ocupacionales se presentan tres casos representativos.

En ellos se abordaron las patologías en forma tradicional y al momento de no obtener rédito diagnóstico, se optó por la técnica no invasiva del esputo invasivo.

La técnica de inducción del esputo se realizó con un procedimiento previamente publicado¹⁸. En resumen, el procedimiento se inició 10 minutos después de la administración de 200 mg de salbutamol inhalado a través de la inhalación de nebulizaciones de solución salina en concentraciones crecientes (3%, 4% y 5%), durante 7 minutos con intervalos de 5 minutos de forma consecutiva, hasta que se obtuvo esputo suficiente para el análisis, o hasta que se produjo una disminución del Pico Flujo Espiratorio (PEF) del 20% en relación con el valor basal. La nebulización de solución salina se realizó con un nebulizador ultrasónico Ultraneb 2000, con una tasa de salida de 0,87 ml/min y partículas que presentan un diámetro medio de masa aerodinámico de 5 micras. Después de cada período de inhalación, el PEF fue medido para garantizar la seguridad de la prueba. Si hubo una disminución del PEF $\geq 10\%$ en relación al valor de referencia, la concentración salina no se incrementó. Las muestras de esputo fueron procesadas y analizadas dentro de las primeras 2 horas, según publicación previa¹⁸, seleccionando los grumos de la saliva y dispersando las células con Dithiothreitol. Se definió una muestra de esputo inducido adecuada para el análisis como aquella que contiene material expectorado con la viabilidad celular superior al 50% y la contaminación por células escamosas orofaríngeas inferior al 20%, así como de una cantidad suficiente para el recuento diferencial de 200 células no escamosas en un preparado de citospin teñido con Giemsa observado en microscopio de luz a 100X.

Caso 1

Paciente femenina de 41 años de edad que consulta por episodios de disnea y broncoespasmos de más de 5 meses de evolución. La paciente tenía una historia de asma de la infancia, había transcurrido su juventud y embarazos sin dificultades. No fumadora. Trabajaba desde hacía 5 años en sala de diálisis renal, haciendo la limpieza de las salas con soluciones cloradas (bajo riesgo) y fraccionando estas soluciones (alto riesgo).

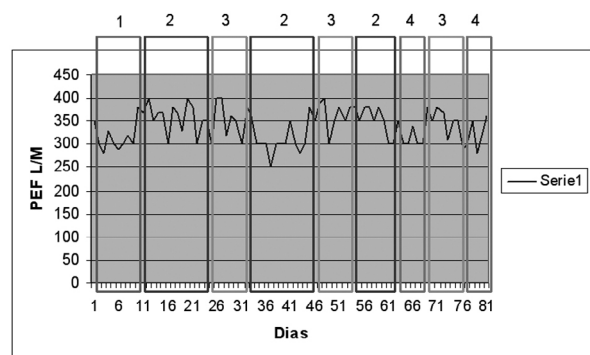
Al examen físico en el momento de la consulta no se auscultaban rales pulmonares, presentaba congestión nasal. La radiografía de tórax y

la espirometría eran normales. Se le solicitó un monitoreo de la variabilidad del PEF; en período de trabajo reveló descensos de $>20\%$, aunque en días no laborales también se registraron descensos significativos⁴ (Figura 1). Se realizó el análisis del esputo inducido, según la técnica previamente descrita durante el período laboral y se analizó otra muestra en período de vacaciones, revelando una diferencia significativa en el número de eosinófilos entre un período y otro (Gráfico 2). Se confirma el diagnóstico de asma ocupacional. A la paciente se la reubica laboralmente, se indica esteroides inhalados y mejora su condición de salud.

Comentarios: Es interesante resaltar en este caso algunos aspectos relevantes. Por un lado, la paciente tenía antecedentes de asma en la infancia, con lo cual se podría haber interpretado como una recidiva de su enfermedad y no agravada por la exposición laboral. Otro aspecto a considerar es que ningún método disponible contribuyó a corroborar asma agravada por exposición laboral excepto los hallazgos del esputo inducido. Estos datos apoyan las recomendaciones^{5, 6} de incluir al esputo inducido dentro de los estudios complementarios en el diagnóstico de AO.

Caso 2

Un paciente varón de 35 años de edad que consulta por tos en los últimos 4 meses que empeoraba durante la jornada de trabajo. No había historia de asma en la niñez ni en la familia, no fumador. Trabajaba en una destilería preparando vinagre de alcohol desde hacía 3 años. Al examen físico



1= Sin Trabajar. 2= Trabajo zona bajo riesgo. 3= Fin de semana. 4= Trabajo zona alto riesgo

Figura 1. Caso 1: Representación gráfica de monitoreo de variabilidad del pico de flujo. Variabilidades de más del 20% se registraron durante los períodos laborales.

Gráfico 2. Espujo inducido caso 1. A: recuento total y diferencial de células en citospin del espujo inducido durante periodo laboral. B recuento total y diferencial de células en citospin del espujo inducido durante periodo de vacaciones.

A)

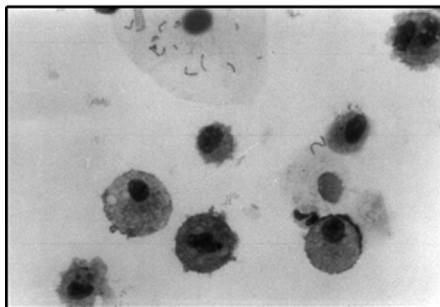
Peso bruto de la muestra: 7.98 gs
 Peso de la porción procesada: 0.45 gs
 Celularidad total : $8.26 \times 10^6/\text{mg}$ espujo
 Células escamosas: 6.5%
 Macrófagos: 80% - $6.6 \times 10^6/\text{mg}$ espujo
 Neutrófilos: 2% - $0.16 \times 10^6/\text{mg}$ espujo

Viabilidad (%) 66 % $5.45 \times 10^6/\text{mg}$ espujo
 Eosinófilos (20%) $1.65 \times 10^6/\text{mg}$ espujo
 Células epiteliales: 0.5% - $0.04 \times 10^6/\text{mg}$ espujo
 Basófilos: 0
 Linfocitos: 1.5% - $0.12 \times 10^6/\text{mg}$ espujo

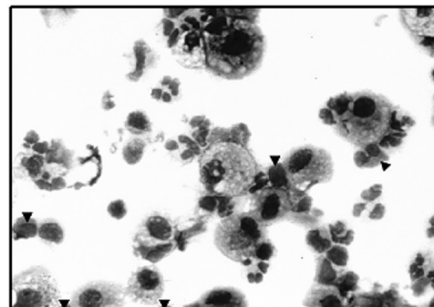
B)

Peso bruto de la muestra: 3.8 gs
 Peso de la porción procesada: 0.5 gs
 Celularidad total : $4.6 \times 10^6/\text{mg}$ espujo
 Células escamosas: 10.5 %
 Macrófagos: 92% - $4.23 \times 10^6/\text{mg}$ espujo
 Neutrófilos: 4.5% - $0.20 \times 10^6/\text{mg}$ espujo

Viabilidad (%) 75 % $3.45 \times 10^6/\text{mg}$ espujo
 Eosinófilos (1.5%) $0.06 \times 10^6/\text{mg}$ espujo
 Células epiteliales: 1.5% - $0.06 \times 10^6/\text{mg}$ espujo
 Basófilos: 0
 Linfocitos: 0.5% - $0.2 \times 10^6/\text{mg}$ espujo



Periodo sin exposición laboral



Periodo de exposición laboral

Gráfico 3. Caso 1. Preparado de citospin de espujo inducido. Obsérvese los eosinófilos en el periodo laboral señalado con flechas. Tinción de May Grünwald Giemsa. Microscopía de luz X100.

en el momento de la consulta no se auscultaban rales pulmonares, presentaba inyección conjuntival. La radiografía de tórax, la IgE sérica, los test cutáneos para alérgenos y la espirometría (Figura 1) eran normales. Se le solicitó un monitoreo de la variabilidad del PEF en periodo de trabajo y fuera del mismo que no reveló descensos de $>20\%$ según recomendaciones⁴ (Figura 2). Se realizó el análisis del espujo inducido, según la técnica previamente validada¹³ durante el periodo laboral y se analizó otra muestra en periodo de vacaciones, revelando una diferencia significativa en el número de eosinófilos entre un periodo y otro (Figura 3A). Se hace el

diagnóstico de bronquitis eosinofílica ocupacional. Al paciente se lo reubica laboralmente, se indica esteroides inhalados y mejora su condición de salud.

Caso 3 (Gentileza de la Dra. Raquel Irene Pendito)

Un paciente varón de 57 años de edad sin antecedentes personales previos a su ingreso laboral, ni familiares de patología respiratoria. Comienza con falta de aire a los esfuerzos, tos en general improductiva, es derivado por su médico tratante.

Antecedentes laborales: Desde hace 29 años, trabaja expuesto a caucho, negro de humo, ácidos, colorantes, pigmentos y diluyentes. Al decir del examinado, realiza su trabajo sin protección respiratoria. Al examen físico se auscultaban crepitantes sin signos de afección cardíaca.

Con la sospecha clínica de *alveolitis alérgica extrínseca*, se solicitó TAC de tórax con cortes de alta resolución sin lesiones del parénquima pulmonar. El monitoreo de Pico de flujo arrojó parámetros compatibles con hiperreactividad bronquial. En Figura 2 se muestra el test de la marcha de 6 minutos.

Figura 1. Espirometría caso 2

VARIABLES	Predic	Pre	%	Post	%	% cambio
CVF	4.51	4.98	110	4.97	110	0
FEV1	3.84	3.79	98	3.82	99	0
FEV1/CVF	85	76	-8	77	-8	0
PEF	548	553	100	596	108	7
FEF 25 -75	4.63	3.66	79	3.77	81	2

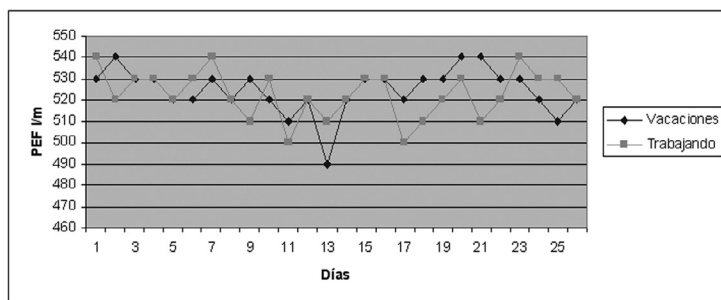


Figura 2. Monitoreo del PEF en periodo laboral y en vacaciones. Sin diferencias entre periodos ni variaciones > 20%.

Grafico 3. Espujo inducido caso 2. A: recuento total y diferencial de células en citospin del espujo inducido durante periodo laboral. B recuento total y diferencial de células en citospin del espujo inducido durante periodo de vacaciones.

Fecha: 7-06-03	N° Identificación: 0603	N° Historia	
Paciente: GB	Edad 35		
Médico Responsable: Loli Uribe	TE:		
Espujo espontaneo		Espujo inducido: X	
Características	Mucoso: X	Mucopurulento	Purulento

A) Contaje celular periodo laboral

Peso bruto de la muestra: 8.33 g

Peso de la porción procesada (gr) 1 g

Celularidad total (N° cels/ml): 1.17×10^6

Células escamosas(%): 16%

Macrófagos: 0.88×10^6 /mg espujo - 88%

Neutrófilos: 0.025×10^6 /mg espujo - 2.5%

Volumen sobrenadante: 1 ml

Viabilidad (%) 62

Eosinófilos: 0.04×10^6 /mg espujo (4,5%)

Células epiteliales: 0.03×10^6 /mg espujo - 3%

Basófilos: 0

Linfocitos: 0.01×10^6 /mg espujo - 1.5%

B) Contaje celular periodo vacaciones

Peso bruto de la muestra: 13.64 g

Peso de la porción procesada (gr) 2.16 g

Celularidad total (N° cels/ml): 1.16×10^6

Células escamosas(%): 4.5%

Macrófagos (%): 0.65×10^6 /mg espujo

Neutrófilos (%): 0.33×10^6 /mg espujo - 33%

Volumen sobrenadante: 3.2 ml

Viabilidad (%): 94%

Eosinófilos (0)

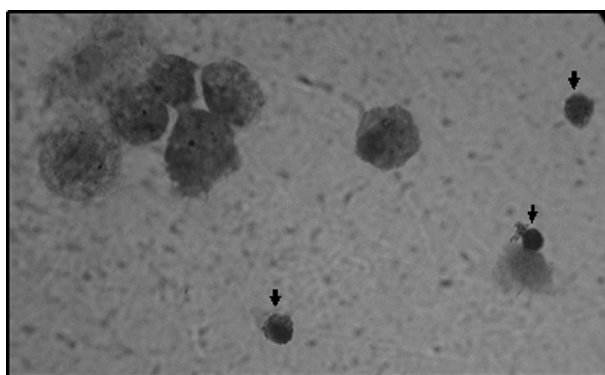
Células epiteliales: 0

Basófilos: 0

Linfocitos: 0.01×10^6 /mg espujo - 1.5%

Grafico 3. Caso 3. Recuento total y diferencial de células de citospin de esputo inducido. Resaltar el alto porcentaje de linfocitos.

Peso bruto de la muestra: 9.06 gs	Volumen sobrenadante: 0.5 ml
Peso de la porción procesada: 0.22 gs	Viabilidad 70%
Celularidad total 1.83×10^6 / mg esputo	Eosinófilos 0.33×10^6 / mg esputo 18.5%
Células escamosas 5.5%	Células epiteliales 0.10×10^6 / mg esputo 5.5%
Macrófagos 0.58×10^6 /mg esputo 32%	Basófilos 0.13×10^6 / mg esputo 7.5%
Neutrófilos 0.21×10^6 / mg esputo 12%	Linfocitos 0.44×10^6 / mg esputo (24.5%)



Preparado de citospin de esputo inducido. Obsérvese los linfocitos señalizados con flechas. Tinción de May Grünwald Giemsa. Microscopía de luz X100.

Podemos concluir que las enfermedades respiratorias ocupacionales son frecuentes en los países industrializados. Su diagnóstico comporta aspectos de salud del trabajador y también aspectos médico-legales y económicos, por lo que un diagnóstico etiopatogénico correcto es de gran importancia.

El esputo inducido es una técnica no invasiva bien tolerada que abre una nueva ventana en el campo de las enfermedades profesionales respiratorias y puede ser integrada a los criterios diagnósticos y de seguimiento de estas enfermedades especialmente cuando los parámetros tradicionales no alcanzan a confirmar el diagnóstico y las técnicas invasivas son clínicamente contraindicadas o poco prácticas.

Bibliografía

- Stenton SC. Occupational and environmental lung disease: occupational asthma. *Chron Respir Dis.* 2010; 7: 35-46.
- Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26: 948-68.
- Goldstein MF, Veza BA, Dunsky EH, et al. Comparisons of peak diurnal expiratory flow variation, postbronchodilator FEV1 responses, and methacholine inhalation challenges in the evaluation of suspected asthma. *Chest* 2001; 119: 1001-10.
- Quackenboss JJ, Lebowitz MD, Krzyzanowski M. The normal range of diurnal changes in peak expiratory flow rates: relationship to symptoms and respiratory disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 323-30.
- Lemière C, D'Alpaos V, Chaboillez S, César M, Wattiez M, Chiry S, Vandenplas O. Investigation of occupational asthma: sputum cell counts or exhaled nitric oxide? *Chest.* 2010; 137: 617-22.
- Lemiere C. Induced sputum and exhaled nitric oxide as noninvasive markers of airway inflammation from work exposures *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007; 7: 133-7.
- Yacoub MR, Lavoie K, Lacoste G, et al. Assessment of impairment/disability due to occupational asthma through a multidimensional approach. *Eur Respir J.* 2007; 29: 889-96.
- Anees W, Huggins V, Pavord D. et al. Occupational asthma due to low molecular weight agents: eosinophilic and non-eosinophilic variants. *Thorax,* 2002; 57: 231-6.
- Obata H, Dittrick M, Chan H, Chan-Yeung M. Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthmatic reaction in patients with western red cedar asthma. *Eur Respir J,* 1999; 13: 489-95.
- Lemière C, Romeo P, Chaboillez S, Tremblay C, Malo JL. Airway inflammation and functional changes after expo-

- sure to different concentrations of isocyanates. *J Allergy Clin Immunol*, 2002; 110: 641-6.
11. Quirce S, Baeza ml, Tornero P, Blasco A, Barranco R, Sastre J. Occupational asthma caused by exposure to cyanoacrylate. *Allergy*, 2001; 56: 446-9.
 12. Susan M, Tarlo SM, Balmes J, et al. Diagnosis and Management of Work-Related Asthma. *CHEST* 2008; 134: 1S-41S
 13. Quirce S. Eosinophilic bronchitis in the workplace. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004; 4: 87-91.
 14. Fireman EM, Lerman Y, Ben Mahor M, Ganor E, Kramer MR. Redefining idiopathic interstitial lung disease into occupational lung diseases by analysis of chemical composition of inhaled dust particles in induced sputum and/or lung biopsy specimens. *Toxicol Ind Health*. 2007; 23: 607-15.
 15. Fireman E. Induced sputum and occupational diseases other than asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009; 9: 93-6.
 16. Fireman E, Greif J, Schwarz Y, Man A, Ganor E, Ribak Y, Lerman Y. Assessment of hazardous dust exposure by BAL and induced sputum. *Chest*. 1999 Jun;115: 1720-8.
 17. Economidou F, Samara KD, Antoniou KM, Siafakas NM. Induced sputum in interstitial lung diseases: novel insights in the diagnosis, evaluation and research. *Respiration*. 2009; 77: 351-8.
 18. Uribe Echevarría E, Pérez P, Bonaterra M, et. al. Safety, reproducibility and validity of induced sputum technique. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* 2003; 34: 41-6.
 19. Fink Y, Ortega H, Reynolds H, et al. Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 171:792-5