

PROTEÍNA CATIONICA DEL EOSINÓFILO: ¿PUEDE PREDECIR SU CONCENTRACIÓN UNA EXACERBACIÓN EN ASMÁTICOS CÓRTICO-DEPENDIENTES?

Adolfo Baloira Villar, Carlos Vilariño Pombo, Dalia Antas Rodríguez, Mercedes Garat Caramé**

S. de Neumología, Complejo Hospitalario de Pontevedra

**Técnicos del laboratorio de Pruebas Funcionales Respiratorias*

Resumen

OBJETIVOS

Los pacientes asmáticos que precisan tratamiento por vía oral tienen características especiales y en general agudizaciones más frecuentes y graves. Sería interesante disponer de un marcador que se antecediera a la aparición de una exacerbación. El objetivo del estudio fue comprobar si la Proteína Cationica del Eosinófilo (PCE) puede cumplir ese papel.

MÉTODOS

6 pacientes (inicialmente 7 pero uno abandonó el estudio) asmáticos tratados desde al menos 3 meses con esteroides orales y sin exacerbaciones en los 2 meses previos forman la población de estudio. Tras dos semanas de observación, se inició un descenso de 5 mg/día de prednisona o equivalente cada 7 días hasta producirse una exacerbación definida por disminución del FEV¹ \geq 20%, del flujo-pico \geq 30% o necesidad de medicación de rescate al menos más de tres veces al día. En todos los casos se recogieron parámetros clínicos, funcionales respiratorios, analíticos y las cifras de PCE previo a cada descenso de la dosis de esteroides orales.

RESULTADOS

5 pacientes tuvieron una exacerbación según los criterios predefinidos tras un periodo medio de reducción de esteroides de 5,4 semanas. Durante la fase de descenso hubo un amplio rango de cifras de PCE (7,15-30,7 mcg/L). Existió un leve incremento en la fase previa a la exacerbación que no llegó a ser significativo ($19,73 \pm 14,44$ mcg/L vs $16,15$ mcg/L, $p = 0,48$), que si alcanzó significación durante la exacerbación ($38,86 \pm 16,9$, $p = 0,01$). Existió correlación entre las cifras de eosinófilos y PCE pero no con el FEV¹.

CONCLUSIONES

La PCE no es útil para predecir una exacerbación en pacientes asmáticos que precisan esteroides orales para el control de su enfermedad.

PALABRAS CLAVE

Asma grave, proteína cationica, exacerbación.

Correspondencia:

Adolfo Baloira Villar, Carlos Vilariño Pombo, Dalia Antas Rodríguez, Mercedes Garat Caramé

S. de Neumología, Complejo Hospitalario de Pontevedra. Mourente, s/n - Planta 7ª. 36161 Pontevedra

Tel.: 986 800 000. E-mail: adolfobaloiras@sogapar.org

Pneuma 2006; 6: 131- 136

El estudio de los marcadores de inflamación en el asma ha tomado una relevancia cada vez mayor en los últimos años a medida que se han ido desvelando las complejas interacciones que tiene lugar en el entorno celular del asmático. La vía aérea de estos pacientes presenta un tipo específico de inflamación, existiendo infiltración por diversos tipos de células, las cuales producen un gran número de citoquinas cuando se activan^{1,2}. En el desarrollo del asma parece de gran importancia la presencia de linfocitos T, funcionalmente del tipo Th2, los cuales, a través de la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, estimulan tanto la producción de IgE como la quimiotaxis y activación de eosinófilos³. Entre las sustancias que producen los eosinófilos activados se encuentra la Proteína Catiónica (PCE), una de las proteínas granulares de esta célula, la cual resulta relativamente fácil de medir tanto en suero como en esputo⁴. Se han publicado abundantes datos respecto al papel que puede desempeñar la medición de PCE en el manejo del asma^{5,6}. La mayor parte de los trabajos muestran una correlación significativa con el grado de control de la enfermedad.

Existe un pequeño porcentaje de asmáticos que precisan tomar esteroides orales de forma continuada para controlar sus síntomas. En estos pacientes una reducción de la dosis del esteroide supone un rápido incremento de células inflamatorias en la vía aérea, especialmente eosinófilos^{7,8}. El patrón inflamatorio de este tipo de asma es diferente al que presentan pacientes con afectación más leve, observándose en biopsias bronquiales una menor presencia de eosinófilos y de IL-4, mientras existe un incremento en la producción y secreción de IL-5⁹.

Entre los métodos diseñados para conocer el estado inflamatorio de la vía aérea quizá el esputo inducido y la medición del NO en el aire exhalado son los más empleados, aunque su uso clínico no se ha extendido, permaneciendo, sobre todo el primero, en el ámbito de la investigación fundamentalmente. La técnica del esputo inducido supone un importante consumo de tiempo tanto para la obtención como el procesado de la

muestra. Diversos estudios han encontrado una buena correlación entre el grado de activación de los eosinófilos en la mucosa bronquial y la concentración sérica de PCE¹⁰, así como con los síntomas, grado de obstrucción de la vía aérea e hiperreactividad bronquial¹¹⁻¹³. Con estas premisas, intentamos averiguar si la elevación de la concentración sérica de PCE podría anteceder al empeoramiento clínico en pacientes asmáticos córtico-dependientes, lo que podría ayudar a optimizar el tratamiento de estos pacientes de difícil control.

Material y Métodos

Pacientes

Siete pacientes fueron inicialmente incluidos en el estudio, pero uno lo abandonó antes de su conclusión y otro no llegó a tener una exacerbación. El diagnóstico de asma fue establecido en base a criterios clínicos y funcionales: síntomas de disnea episódica acompañada de sibilancias, variabilidad del flujo-pico matutino y vespertino superior al 15%, una mejoría tras terbutalina superior al 12% y variaciones en el FEV1 en diversos controles superior al 15%. Todos los pacientes estaban tomando corticoides orales sin variación de dosis desde al menos 3 meses antes, no habiendo tenido agudizaciones en los últimos 2 meses. Los pacientes fueron seleccionados de nuestra consulta ambulatoria en base a una buena adherencia previa a la medicación administrada y tras excluir cualquier factor que pudiera interferir con el estudio (mala técnica de inhalación, exposición a alérgenos conocidos, rinitis, medicación concomitante). En todos los casos se hicieron intentos de reducción de dosis de prednisona o equivalente sin que fuera posible suspenderla. El estudio fue aprobado por el comité de ética. Todos los pacientes dieron su consentimiento escrito tras explicación del protocolo.

Diseño del estudio

Los pacientes fueron seguidos previamente durante un periodo de 3 meses para establecer la mínima dosis de

Tabla 1. Características de los pacientes al inicio de la reducción de prednisona.

	EDAD (años)	Pi-Flu (L/m)	FEV1 (% teórico)	TRAT. INHA.	EOSINOF. (u/mm ³)	PCE (mcg/L)
CASO 1	45	450	102	Flu, Sal, Teof	600	25,9
CASO 2	66	300	70	Bud, Sal	300	10,1
CASO 3	45	300	112	Flu, Sal, Teof	500	30,7
CASO 4	34	300	105	Bud, Sal	100	6,9
CASO 5	49	250	77	Flu, Sal, Teof	800	7,15

Abreviaturas

Flu: fluticasona; Bud: budesonida; Sal: salmeterol; Teof: teofilina.

Las dosis de fluticasona fueron en todos los casos de 2.000 mcg/día, y las de budesonida de 1.600 mcg/día.

Las pacientes 3 y 4 habían tomado metotrexato en dosis de 15 mg/semana, 6 y 12 meses antes, respectivamente.

prednisona oral que conseguía mantener al paciente sin síntomas con espirometría y flujo-pico normales. En dos casos el FEV1 no llegó al 80% del teórico, aunque no presentaban síntomas. Durante este tiempo no se varió el resto del tratamiento, realizándose visitas mensuales a nuestra consulta. Todos los pacientes rellenaban una tarjeta que incluía el flujo-pico matutino y vespertino, uso de beta-adrenérgicos de rescate y síntomas diurnos y nocturnos. Una vez confirmada la dosis estable de prednisona se iniciaba el protocolo de estudio con una reducción semanal de 5 mg/d hasta la aparición de una exacerbación. En cada control semanal previo a la disminución de dosis se realizaba una exploración clínica, control de pico-flujo, hemograma con recuento de eosinófilos, espirometría y medición de PCE. El paciente debía entregar la tarjeta correctamente cubierta. El protocolo se detenía si existía exacerbación o bien si tras suspender los esteroides ésta no se había producido. En caso de detectarse exacerbación se aumentaba la dosis esteroidea hasta conseguir el control clínico y espirométrico, lo que se consiguió en todos los casos antes de una semana. Todos los pacientes disponían de acceso telefónico las 24 horas del día con cualquier de los dos investigadores

Definición de exacerbación

Se definió exacerbación tanto por criterios clínicos como funcionales en base a una disminución del FEV1 respecto al basal igual o mayor del 20% o del pico-flujo igual o mayor del 30% o bien incremento de los síntomas con aparición de sibilancias y necesidad de beta-adrenérgicos de rescate más de cuatro veces al día. Sólo en una paciente se estableció el diagnóstico de exacerbación con una disminución del pico-flujo inferior al 30%, cumpliendo los demás requisitos.

Pruebas de función pulmonar

Para la medición del pico-flujo se usó un medidor Personal Best (Vitalograph, Buckingham, Reino Unido). Se realizaron 3 mediciones matutinas y otras tantas vespertinas, apuntando en el diario la más elevada. Las pruebas espirométricas se llevaron a cabo en nuestro laboratorio de función pulmonar entre las 9 y las 10 de la mañana siguiendo las recomendaciones SEPAR, con un espirómetro GS-Plus (Collins, Massachusetts, EEUU), siempre por el mismo técnico. Para medir la respuesta broncodilatadora utilizamos 1000 mcg de terbutalina mediante sistema turbuhaler midiendo el porcentaje de cambio en el FEV1 entre 15-20 minutos más tarde.

Medición del número de eosinófilos y de la PCE

Todas las muestras de sangre fueron extraídas entre las 8 y las 9 horas. Para el recuento de eosinófilos utilizamos un aparato de medición automática Coulter (Coulter Corporation, Florida, EEUU). La concentración de PCE puede influenciarse por procesos de manipulación

y coagulación. Por tanto, existió un exquisito cuidado en el manejo de la muestra. Se extrajeron 4 cc de sangre que se mantuvieron una hora a 25° C y posteriormente se centrifugaron a 1200 G a 4° C durante 10 minutos. Una vez finalizado este proceso el suero se almacenó a -20° C hasta la medición. Para ésta se utilizó el sistema CAP de fluoroinmunoanálisis (Pharmacia Diagnostics, Upsala, Suecia). El umbral de detección de la técnica es 2 mcg/L.

Análisis de los datos

Todos los datos aparecen referidos como media \pm desviación estándar. Dado el pequeño tamaño de la muestra se utilizaron test no paramétricos (test de Wilcoxon) para comparar la media de los valores en situación estable, previos a la agudización y durante ésta. Para correlaciones usamos el coeficiente de Spearman. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. Para todos los análisis se empleó el paquete estadístico SPSS 13.

Resultados

De los 6 pacientes que completaron el protocolo, 5 (todas mujeres) tuvieron una exacerbación acorde a la definición establecida. Estas pacientes constituyen la base del estudio. Las características de las mismas pueden verse en la Tabla 1. Las cinco pacientes habían tomado esteroides durante los dos años previos de forma prácticamente continua oscilando las dosis entre 10 y 30 mg/día (mediana 15 mg/día). Como posibles efectos secundarios, tres casos presentaban osteoporosis y uno diabetes insulín-dependiente. La dosis media inicial fue de 30 mg/día y el periodo de reducción 5,4 semanas. Tres pacientes mostraban un FEV1 normal mientras dos lo tenían disminuido (70% y 77% del teórico). Todas se encontraban asintomáticas sin precisar medicación de rescate en los 7 días previos. La concentración de PCE mostró un amplio rango ($16,15 \pm 11,29$ mcg/L, valores extremos 7,15-30,7 mcg/L). Esta importante dispersión de valores se mantuvo durante todo el estudio. Durante la fase de descenso de esteroides tres pacientes tuvieron variaciones inferiores al 20% mientras las otras dos las tuvieron superiores. Durante la exacerbación el FEV1 disminuyó un promedio del 21,2%, mientras en la semana previa lo había hecho un 6% ($p < 0,05$). En dos pacientes se mantuvo sin cambios. El número de eosinófilos no mostró variaciones significativas entre la situación inicial y pre-exacerbación. Durante ésta sólo se elevó de forma evidente en 2 pacientes. La concentración de PCE se elevó levemente previo a la exacerbación pero sin alcanzar significación estadística, mostrando igualmente una gran variabilidad entre pacientes ($19,73 \pm 14,44$ mcg/L $p = 0,48$). Durante el episodio de exacerbación sí existió un aumento significativo ($38,86 \pm 16,9$ mcg/L, $p = 0,01$) (Tabla 2,

Tabla 2. Valores de PCE pre-exacerbación y durante la exacerbación (mcg/L).

	Pre-exacerbación	Exacerbación
PACIENTE 1	44,4	37,1
PACIENTE 2	12,2	30
PACIENTE 3	20,1	66
PACIENTE 4	8,08	20,7
PACIENTE 5	13,9	40,5

Salvo en la paciente 1, en todos los casos se observó un incremento significativo de las cifras de PCE en el momento de la exacerbación, respecto a las basales y pre-exacerbación.

gráfico 1). La concentración de PCE mostró correlación con el número absoluto de eosinófilos ($r = 0,53$, $p = 0,02$) pero no con el FEV1.

Discusión

Nuestros resultados parecen indicar que en este grupo especial de pacientes asmáticos la concentración sérica de PCE no sirve para predecir una posible exacerbación de su enfermedad.

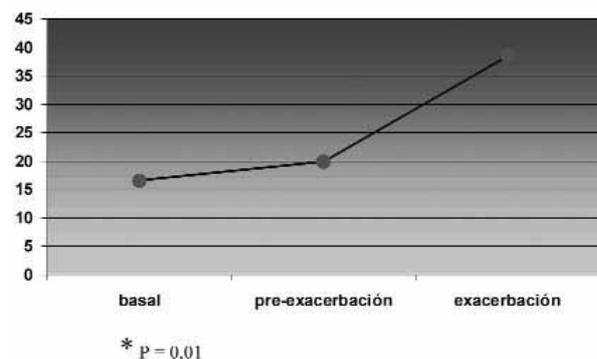
Existe un amplio espectro en las manifestaciones clínicas del asma, sin embargo la inmunopatogenia parece tener más puntos en común que discrepancias entre los diferentes tipos no siendo demasiado diferentes los perfiles de activación celular y producción de citoquinas encontrados por ejemplo en asma atópica y no atópica¹⁴. Sin embargo, los pacientes que precisan corticoides orales de forma mantenida para controlar sus síntomas sí constituyen un grupo especial. Ello se debe tanto a las propias características de la enfermedad con una actividad inflamatoria más intensa en la vía aérea y quizás mayores posibilidades de producir remodelado^{9,15} con un aumento de la presencia de neutrófilos respecto a otras formas menos graves de asma¹⁶, como por los efectos adversos de los esteroides, lo que otorga capital importancia a utilizar la mínima dosis posible. Mediante evaluación del NO exhalado parece demostrarse que incluso en formas intermitentes de asma existe un estado de inflamación casi permanente de la vía aérea si no se utilizan esteroides inhalados¹⁷.

Por tanto, aunque en la práctica clínica habitual se utilizan criterios clínicos y espirométricos para controlar a los pacientes, ello puede resultar insuficiente puesto que unas pruebas funcionales normales o la percepción subjetiva de ausencia de síntomas no aseguran una mucosa bronquial exenta de procesos inflamatorios activos que a largo plazo conlleven cambios estructurales permanentes¹⁸. Es pues evidente la importancia de

disponer de algún indicador fiable de actividad inflamatoria subyacente en la mucosa bronquial. La medición del NO exhalado es probablemente el método más sencillo actualmente. Requiere una importante inversión inicial pero es rápido y fiable. En ocasiones el sistema presenta problemas importantes de calibración en función de las condiciones ambientales. El esputo inducido permite obtener células y productos de activación de éstas directamente de la vía aérea, pero tiene el inconveniente de requerir un tiempo de inducción en ocasiones largo y un procesado de la muestra bastante laborioso, lo que no siempre permite su utilización en la práctica diaria. Por ello nosotros optamos por estudiar la PCE sérica para comprobar si podía ser un buen predictor de exacerbación en este tipo de asmáticos graves. Un problema importante de esta sustancia es la variabilidad de su concentración incluso en individuos sanos, considerando como normales valores entre 2-20 mcg/L¹⁹. Durante los tres meses previos al comienzo del estudio realizamos mediciones mensuales de PCE sérica en nuestros pacientes y observamos variaciones notables en 2 de ellos, mientras en los otros cinco no superaron el 25%. Aunque la manipulación de la muestra puede ser una fuente importante de error, tuvimos cuidado extremo en evitarlo, por lo que no creemos que la dispersión de valores estuviera influenciada por ella. Otro factor de confusión es la rinitis alérgica, que también es sabido que puede elevar la PCE²⁰. En este trabajo se excluyeron los pacientes con rinitis.

A pesar de todos estos inconvenientes existen numerosos estudios que muestran una buena correlación entre la concentración sérica de PCE y diversos parámetros clínicos y funcionales en pacientes asmáticos^{4,5,21}. Existen fundamentos para pensar que tras una exposición a un alérgeno el individuo asmático desarrolla una activación de los eosinófilos dentro de las vías aéreas pero también en la médula ósea y sangre periférica debido a citoquinas, principalmente IL-5, que parten del pulmón, con lo que la PCE sérica sería el reflejo de la inflamación eosinofílica bronquial²². Con todos estos

Gráfico 1. Evolución de las cifras de PCE.



datos parece razonable un diseño como el nuestro, en el que a pacientes con asma grave cuyo tratamiento incluye corticoides orales se les provoca una exacerbación controlada en base a criterios previamente establecidos monitorizando los cambios en la concentración de PCE sérica. Ello permite conocer, dadas las múltiples mediciones, si para un mismo control clínico y funcional se mantienen unas cifras estables en cada paciente a pesar de la reducción de esteroides. Esto último sólo sucedió en tres de las cinco pacientes que completaron el estudio, existiendo 2 casos con amplia variación. La tendencia se mantuvo similar a lo que había ocurrido en el periodo pre-inclusión, en donde el tratamiento esteroideo se mantuvo constante. Existen evidencias de que tras la reducción de esteroides tanto orales como inhalados la aparición de síntomas o el empeoramiento de las pruebas funcionales es precedido por cambios en parámetros inflamatorios como el incremento de eosinófilos en esputo, del mismo modo que el incremento en la dosis mejora antes la situación clínica que la inflamación^{7,23}. Partimos de la hipótesis de que lo mismo podía suceder con la PCE sérica, lo que la convertiría en un marcador de importancia clínica, algo que nuestros resultados no han podido confirmar.

El modelo utilizado por nosotros parece adecuado habiendo sido utilizado anteriormente tanto en pacientes dependientes de esteroides orales como inhalados^{7,24}. Para establecer la dosis de partida seguimos a los pacientes durante 6 meses y posteriormente establecimos un periodo de run-in de tres meses comprobando la estabilidad de los parámetros clínicos y funcionales además de observar el buen cumplimiento del protocolo. A pesar de ello, no conseguimos que todos los pacientes llegaran hasta el final. Como dato anecdótico, el paciente que no finalizó el estudio fue el único varón del grupo.

Nuestro trabajo presenta varias limitaciones siendo la más importante el reducido número de pacientes. El porcentaje de asmáticos que precisan esteroides orales de forma más o menos continua es reducido, por lo que es difícil reclutar un número mucho mayor que el nuestro en un solo hospital. A pesar de haber hecho una selección muy cuidadosa una paciente no llegó a tener exacerbación. La cadencia de reducción de dosis es similar a la utilizada en otros estudios, aunque podría haberse escogido otra menor. Por último, la manipulación y procesado de las muestras para la medición de PCE, aún utilizando un especial cuidado, podrían suponer una fuente de error. Reconociendo todos estos problemas, creemos que los datos obtenidos permiten extraer algunas conclusiones válidas. La concentración sérica de PCE no parece ser una buena guía para determinar la mínima dosis necesaria de prednisona en pacientes asmáticos que precisan este fármaco, debiendo recurrir a otros parámetros tanto clínicos como

inflamatorios. Este tipo especial de asmáticos exigen una vigilancia más de cerca y en ellos, a pesar del consumo de tiempo y esfuerzo, probablemente sea costoso utilizar la medición del NO exhalado y la concentración de eosinófilos en el esputo inducido.

Este trabajo fue posible gracias a una beca de Laboratorios GSK.

Bibliografía

- 1 Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiades A, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproductibility and validity of cell and fluid phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:308-17
- 2 Azzavi M, Bradley B, Jeffery PK, et al. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Med* 1990; 142:1407-13
- 3 Barnes PJ. Cytokine modulators for allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1:555-60
- 4 Venge P. Serum measurements of eosinophil cationic protein (ECP) in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23 (Suppl 2):3-7
- 5 Niimi A, Amitami R, Suzuki K, Tanaka E, Murayama T, Kuze F. Serum eosinophil cationic protein as a marker of eosinophil inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:233-40
- 6 Fujimoto K, Kubo K, Matsuzawa Y, Sekiguchi M. eosinophil cationic protein levels in induced sputum correlate with the severity of bronchial asthma. *Chest* 1997; 112:1241-7
- 7 Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland LL, et al. Prednisone-dependent asthma: inflammatory indices in induced sputum. *Eur Respir J* 1999; 13:15-21
- 8 Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med* 2003; 139:359-70
- 9 Vrugt B, Wilson S, Underwood J, et al. Mucosal inflammation in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur Respir J* 1999, 13:1245-52
- 10 Hoshimo M, Nakamura Y. Relationship between activated eosinophils of the bronchial mucosa and serum eosinophil cationic protein in atopic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112:59-64

11. Zimmerman B, Lanner A, Enander I, et al. Total blood eosinophils, serum eosinophil cationic protein, and eosinophil cationic protein X in childhood asthma: relation to disease status and therapy. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:789-93
12. Rao R, Frederick JM, Enander I, Gregson RK, Warner JA, Warner JO. Airway function correlates with circulating eosinophil, but not mast cell, markers of inflammation in childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:789-93
13. Balóira A, Martínez JM. Serum levels of eosinophil cationic protein (ECP) and IL-5 in acute and stable asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:A101
14. Humbert M, Menz G, Ying S, et al. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today* 1999; 20:528-533
15. Wenzel SE, Szefler SJ, Leung DY, Sloam SJ, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma: persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:737-43
16. Louis R, Lan LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanovi R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:9-16
17. Haahtela T, Tamminen K, Malmberg LP, et al. Formoterol as needed with or without budesonide in patients with intermittent asthma and raised NO levels in exhaled air: a SOMA study. *Eur Respir J* 2006; 28:748-55
18. Rosi E, Scano G. Association of sputum parameters with clinical and functional measurements in asthma. *Thorax* 2000; 55:235-8
19. Peterson CG, Enander I, Nystrand J, Anderson AS, Nilsson L, Venge P. Radioimmunoassay of human eosinophil cationic protein (ECP) by an improved method. Establishment of normal levels in serum and turnover in vivo. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 561-7
20. Álvarez FJ, Valenzuela F, Rodríguez JA, Sánchez R, Taberero E, Castillo J. Niveles séricos de proteína catiónica de eosinófilos en pacientes con rinitis alérgica. Evolución tras tratamiento con corticoides. *Arch Bronconeumol* 1997; 33:6-11
21. Koller DY, Herouy Y, Götz M, Hagel E, Urbanek R, Eichler I. Clinical value of monitoring eosinophil activity in asthma. *Arch Dis Child* 1995; 73:413-7
22. Koshino T, Morita Y, Ito K, Teshima S, Sano Y. Activation of bone marrow eosinophils in asthma. *Chest* 1993; 103:1931-1932
23. Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland LL, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1501-8
24. In't Veen JCCM, Smits HH, Hiemstra PS, Zwinderman AE, Sterk PJ, Bel EH. Lung function and sputum characteristics of patients with severe asthma during an induced exacerbation by double-blind steroid withdrawal. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:91-9