

# Administración de Formoterol como Profiláctico de la Broncoconstricción Durante el Espujo Inducido con Solución Salina Hipertónica en Asmáticos y Sujetos Sanos

**Ana Julia Álvarez, 1 Jesús Rodríguez 2**

*1Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad de Carabobo.*

*2Centro de Investigaciones Ergológicas de la Universidad de Carabobo (Cieruc). Servicios Hospitalarios del Cieruc. Hospital Rafael González Plaza Naguanagua, estado Carabobo; y Hospital Dr. Miguel Malpica Guacara, Carabobo. Venezuela.*

*Correspondencia: Jesús Rodríguez Lastra. neumocupacional@gmail.com*

**Resumen** El asma es una enfermedad crónica e inflamatoria de las vías respiratorias que en algunos casos requiere la evaluación del grado de inflamación. El espujo inducido es un método no invasivo, reproducible, útil para evaluar la inflamación de vías aéreas, que permite reconocer la celularidad y cuantificación de sustancias inflamatorias vertidas en el moco bronquial. La técnica del espujo inducido requiere la inhalación de concentraciones crecientes de solución salina hipertónica (3, 4 y 5%), las cuales pueden causar broncoconstricción, lo cual puede ser peligroso para la salud respiratoria de los pacientes. Para evitar respuestas adversas a la inhalación de solución salina hipertónica durante la prueba del espujo inducido, a un grupo de 34 sujetos: 24 pacientes asmáticos (34-80 años) y 10 individuos aparentemente sanos (19-45 años), se les hizo una espirometría basal, pidiéndose luego que inhalaran el aerosol con 12 µg de formoterol, previo a la broncoestimulación; inmediatamente después se hizo otra espirometría. Se evidenció mejoría de la capacidad vital forzada (CVF), el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1), el flujo pico espiratorio máximo (PEF) y el flujo espiratorio forzado entre 25-75% (FEF 25-75%) de la CVF en ambos grupos. Los cambios fueron estadísticamente significativos para VEF1 ( $p=0,047$ ) y PEF ( $p=0,020$ ) en sujetos controles y FEF 25-75% ( $p=0,027$ ) en pacientes asmáticos. Los resultados sugieren que la administración inhalatoria de formoterol como broncodilatador, previa a la realización

del esputo inducido, disminuye el riesgo de broncoconstricción y hace la prueba más segura en asmáticos e individuos sanos.

**PALABRAS CLAVE:** Esputo inducido, Broncoconstricción, Formoterol, Espirometría.

## **Abstract**

### **FORMOTEROL ADMINISTRATION TO PREVENT BRONCHIAL CONSTRICTION DURING HYPERTONIC SALINE SPUTUM INDUCTION IN ASTHMATIC PATIENTS AND HEALTHY SUBJECTS**

Asthma is a chronic inflammatory disease of respiratory airways requiring in some cases the evaluation of the degree of bronchial inflammation. Sputum induction has been recognized as a noninvasive and reproducible method to evaluate airways inflammation, through cells identification and assay of inflammatory substances present in the bronchial mucous. Sputum induction is stimulated by the inhalation of increased concentrations of hypertonic saline solution (3, 4, and 5% NaCl). This process would cause bronchial constriction which is particularly dangerous for asthmatic patients. To avoid adverse events produced by hypertonic saline solution inhalation during the sputum induction test, we conducted a clinical study on 24 asthmatic patients, 34 to 80 years old, and 10 apparently healthy subjects 19 to 45 years old. Each patient underwent a basal spirometry test and then, 12 µg of nebulised formoterol was inhaled prior to the bronchial hypertonic saline stimulation. Another post-stimulation spirometric test was done to assess lung function. An improvement was found on forced vital capacity (FVC), first second forced spiratory volume (FEV1), peak spiratory flow (PEF) and forced spiratory flow 25-75% (FEF 25-75%) in both groups, that were statistically significant for FEV1 ( $p = 0.047$ ) and PEF ( $p = 0.020$ ) on control subjects and FEF 25-75% ( $p = 0.027$ ) on asthmatics patients. The result suggests that formoterol premedication as a bronchodilator before the induced sputum procedure reduces the bronchoconstriction risk and makes the test safer for both asthmatic patients and healthy individuals.

**KEY WORDS:** Induced sputum, Bronchialconstriction, Formoterol, Espirometry.

## **Introducción**

**D**esde que Pin en 1992 utilizó la técnica del esputo inducido en asmáticos, esta se ha usado ampliamente en los estudios de asma para obtener secreciones de las vías respiratorias.<sup>1</sup> Muchos han señalado la necesidad de que la metodología se haga de forma segura.<sup>2</sup> La inhalación de solución salina hipertónica implica el riesgo de broncoconstricción severa y podría poner en riesgo la vida del sujeto,<sup>3</sup> ya que se ha señalado que la solución salina puede provocar broncoconstricción en los pacientes asmáticos.<sup>4</sup> Los métodos de inducción del esputo se pueden dividir en dos tipos, tomando en cuenta la seguridad: la inducción con o sin tratamiento previo con un agonista 2 de acción corta. En el primer método, el paciente es tratado previamente con un inhalador agonista 2 de acción corta para inhibir la broncoconstricción de las vías respiratorias; luego es inhalada la solución salina hipertónica en forma de aerosol, generada por un nebulizador ultrasónico. En el segundo método, la solución salina hipertónica se administra sin tratamiento previo.<sup>5</sup> En ambos métodos, antes y después de cada período de inhalación, o cuando el sujeto se convierte en sintomático, se mide el FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo) y cualquier caída en el FEV1 es registrada. Si el FEV1 cae 20% o más, la inhalación se suspende, por considerarse una caída excesiva.<sup>5,6</sup> El broncodilatador utilizado en los protocolos de inducción del esputo es el salbutamol.<sup>5,7</sup> El formoterol es un broncodilatador de última generación, que tiene la propiedad de ser un agonista pleno, inicia su acción tan rápidamente como cualquier otro agente beta adrenérgico incluyendo el albuterol.<sup>8</sup> También posee una acción farmacológica amplia de doce horas de duración, con una potencia broncodilatadora que iguala o excede la de todos los broncodilatadores.<sup>9</sup> No hay reportes de estudios anteriores donde se utilice el formoterol como parte del protocolo de la prueba de esputo inducido y por esa razón decidimos evaluar el efecto del formoterol (Foradil® Aerolizer) como broncodilatador previo al esputo inducido, con el objetivo de determinar su utilidad para prevenir la broncoconstricción ocasionada por la solución hipertónica en los bronquios sanos y enfermos.

## **Pacientes y Métodos**

**C**riterios de inclusión. La muestra estuvo conformada por 34 personas adultas, de ambos géneros; 24 pacientes asmáticos con distinto grado de severidad, diagnosticados según los criterios recomendados por la Iniciativa Global para el Asma, y 10 sujetos

controles sanos, quienes firmaron el consentimiento informado. A ambos grupos se les indicó interrumpir o no recibir por ninguna vía de administración fármacos inmunosupresores, broncodilatadores, corticosteroides o antiinflamatorios, doce horas previas a la obtención de la muestra. **Criterios de exclusión.** Los pacientes no debían sufrir de infecciones ni otras patologías clínicamente manifiestas asociadas a las vías respiratorias. **Evaluación espirométrica.** Antes de realizar la inducción del esputo se hizo una espirometría basal con un espirómetro Cosmed, modelo Microquark que cumplía con los criterios de aceptabilidad y reproducibilidad de la ATS (*American Thoracic Society*).<sup>10</sup> Seguidamente se administraron 12 µg de formoterol en aerosol (*Foradil Aerolizer®*) y se iniciaron las nebulizaciones con solución salina hipertónica. La evaluación espirométrica se repitió para determinar algún cambio producido por la inducción del esputo. **Esputo inducido.** Se utilizó la técnica descrita por Popov en 1995.<sup>11</sup> Se administraron concentraciones crecientes de solución salina hipertónica (3, 4 y 5% P/V de NaCl) con un nebulizador ultrasónico Micron, en períodos de 7 minutos alargando dicho período en los asmáticos severos si presentaban algún síntoma desfavorable. Llegado el momento de expectorar, se detiene el proceso, el paciente se enjuaga la boca y deposita la muestra en un envase plástico (recolector de orina). **Percusiones torácicas.** En forma paralela a la inducción del esputo, se sometió a los pacientes a palmopercusiones y percusiones con un percutor lineal marca Health-O-Meter 59000. Se aplicaron con la finalidad de incrementar la interacción cilio-moco por efecto de la resonancia que produce un aumento de la agitación ciliar, promoviendo la transferencia de energía entre el gas y el fluido, adicionalmente disminuye la viscosidad y modifica la estructura del moco para mejorar el flujo,<sup>12</sup> de esta manera se facilitó la expectoración. Las palmopercusiones se realizaron en la región dorsal con las manos en cúpula sobre la pared torácica en la zona superior, media e inferior del tórax, a la derecha y a la izquierda, durante la fase inspiratoria y expiratoria. De igual forma, se aplicó la percusión mecánica, colocando el percutor de forma perpendicular a la pared torácica. **Análisis de los datos.** Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS Statistics 17.0, con la prueba t (*Student*) de comparación de medias para muestras pareadas, con nivel de significación de 5% o menos (p 0,05). Los resultados se presentan en gráficos y tablas.

## Resultados

Luego de evaluar las capacidades y flujos pulmonares antes y después

de la inducción del esputo, previo al uso de formoterol, los resultados de la prueba de comparación de medias antes y después, en el grupo control, reflejan una mejoría de todos los parámetros estudiados: capacidad vital forzada (CVF), volumen espiratorio forzado en el primer segundo ( $FEV^1$ ), flujo espiratorio pico (PEF) y flujo espiratorio forzado entre 25-75% ( $FEF^{25-75\%}$ ); siendo estadísticamente significativos en el caso del  $FEV^1$  y el PEF (Tabla 1). Igualmente, en los pacientes asmáticos se observó mejoría de todos los parámetros estudiados, siendo estadísticamente significativa sólo la observada para el  $FEF^{25-75\%}$  en los valores medios (Tabla 1). Es de destacar que después de la administración de formoterol y la inducción del esputo se obtuvo un aumento del  $FEV^1$  en 8 de los sujetos controles y 18 de los pacientes asmáticos estudiados; la disminución del  $FEV^1$  observada sólo fue mayor de 20% en dos pacientes asmáticos y en ningún sujeto control (Figuras 1 y 3). Además, es notorio que el aumento de la media del  $FEV^1$  respecto del valor inicial es de 3,1% en los sujetos controles (Figura 2) y 6,5% en pacientes asmáticos (Figura 4).

## Discusión

**D**espués de la administración secuencial de formoterol en aerosol y solución salina hipertónica, la función pulmonar fue mayor que en las condiciones iniciales, estas diferencias fueron estadísticamente significativas para el  $FEV^1$  y el PEF de los controles, así como para el  $FEF^{25-75\%}$  de los pacientes asmáticos. Esto se debe a que el efecto broncoconstrictor por irritación bronquial que produce la solución salina hipertónica en la mucosa bronquial,<sup>13</sup> tanto en asmáticos como sujetos controles, no ocurre o se ve contrarrestado por el efecto broncodilatador del formoterol administrado antes de estimular el bronquio con la solución salina; el aumento en el flujo de aire posbroncodilatador se ve también favorecido por la limpieza bronquial que induce la solución salina, al extraer una cantidad importante de moco adherido a las paredes del bronquio, dejando una luz mayor para el paso de aire a través del árbol bronquial, lo cual aumenta el  $FEV^1$  incrementando, tanto las capacidades pulmonares como los flujos durante la maniobra espiratoria forzada. Es de importancia el hallazgo del aumento de la media del  $FEV^1$  luego de la aplicación del esputo inducido en vista de que algunos autores reportan su disminución con la administración de salbutamol previo a la inducción del esputo en pacientes asmáticos en porcentajes variados (5,3%<sup>1</sup>, 5,7%<sup>14</sup>, 5,9%<sup>15</sup>, 5,4%<sup>16</sup>, 7,4%<sup>17</sup>, 5,4%<sup>18</sup>, 2,0%<sup>19</sup>, 8,4%<sup>11</sup>, 27,0%<sup>20</sup>). En otros estudios, donde no se administró broncodilatador, se observó una caída excesiva de la media del  $FEV^1$

después de la inducción del esputo (24,7%<sup>21</sup>, 20,7%<sup>11</sup>, 29,4%<sup>22</sup>). En los estudios espirométricos se ha usado con mayor frecuencia el salbutamol como agente broncodilatador.<sup>5,23,24</sup> A juicio de los autores, una de las razones por las que se ha mantenido el uso del salbutamol a través del tiempo es la aparición de escasos eventos adversos que se observan durante la realización de espirometrías y la estandarización de la prueba posbroncodilatador. En los últimos años se han producido nuevos medicamentos que acortan el tiempo del efecto broncodilatador en los asmáticos; sin embargo, se mantiene el uso del salbutamol como agente para estudiar el efecto broncodilatador. El formoterol es un medicamento broncodilatador de última generación, con propiedad agonista adrenérgico 2, de acción rápida y prolongada (más de 12 horas), lo que brinda seguridad en el uso del medicamento al producir la estimulación bronquial con solución salina, ya que no aparecen respuestas broncoconstrictoras tardías que pudieran complicar el estado del paciente.<sup>8</sup> Su potencia broncodilatadora garantiza, en combinación con la rapidez del efecto protector, la prevención del accidente broncoconstrictor al realizar la inducción del esputo, lo que ha quedado evidenciado en este trabajo.<sup>9</sup> Vale la pena destacar que la finalidad del proceso fue obtener una muestra suficiente y representativa de la secreción de las vías aéreas más bajas; por lo tanto, un factor que debe tomarse en cuenta al favorecer la expectoración, además de la solución salina, es practicar la maniobra percutora manual e instrumental, la cual se aplicó a todos los pacientes por igual. Sin embargo, aunque no puede atribuirse a las percusiones un incremento de la salida de moco, se recomienda esta técnica por su basamento teórico. No se encontró reporte alguno de aplicación de percusiones en otros estudios de esputo inducido. En el presente trabajo se comparó la función pulmonar antes y después de aplicar la técnica del esputo inducido, luego de administrar formoterol en cada grupo investigado por separado. Es posible que el aumento del tamaño de la muestra en ambos grupos de estudio pueda hacer que todos los parámetros evaluados sean estadísticamente significativos. Estudios posteriores podrían confirmarlo. El uso de formoterol en los pacientes estudiados disminuyó el riesgo de broncoconstricción, empeoramiento de los síntomas y emergencias respiratorias en el curso de la obtención del esputo inducido, sin alterar la obtención de la muestra ni su calidad; además, no causó ningún efecto adverso en los sujetos estudiados, pacientes asmáticos y controles sanos, lo cual nos permite recomendarlo para ser agregado a los protocolos de inducción del esputo, tanto en asmáticos como en individuos sanos. Sin embargo, no previno la caída excesiva del FEV<sup>1</sup> en dos pacientes asmáticos sometidos a la inducción de esputo, por lo que se recomienda el monitoreo frecuente de los asmáticos durante el proceso de inducción. El uso de la broncodilatación previa a la prueba,

abre las puertas para convertir al esputo inducido en una herramienta diagnóstica de mayor uso y con pocos efectos secundarios, por ser una técnica no invasiva que incluso algunos han comparado con el lavado broncoalveolar,<sup>25</sup> obteniéndose una muestra citoquímica de la secreción bronquial y de los alvéolos de utilidad diagnóstica comprobada.

**Agradecimientos** Los autores agradecen la participación de la doctora Florelba Martínez, neumonólogo-profesora de la Universidad de Carabobo, por el apoyo brindado en la búsqueda y selección de los pacientes que contaban con los criterios de inclusión para el estudio. La contribución de Richard Wever, TSU Cardiopulmonar, quien realizó las espirometrías y la terapia percutora.

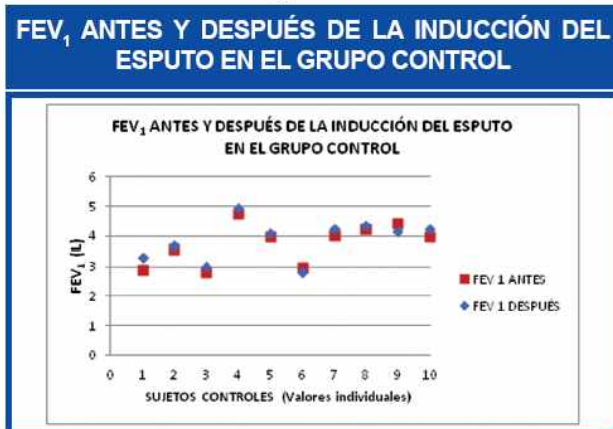
Tabla 1

COMPARACIÓN DE MEDIAS PAREADAS DE VALORES ESPIROMÉTRICOS ANTES Y DESPUÉS DEL ESPUTO INDUCIDO CON FORMOTEROL COMO BRONCODILADOR EN PACIENTES ASMÁTICOS Y CONTROLES							
GRUPO CONTROL (n = 10)	ANTES			DESPUÉS			T STUDENT Significación (unilateral)
	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA ± DS	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA ± DS	
CVF (L)	3,19	5,23	4,32 ± 0,67	3,39	5,33	4,41 ± 0,67	0,124
FEV <sub>1</sub> (L)	2,81	4,76	3,77 ± 0,68	2,81	4,93	3,88 ± 0,66	0,047*
PEF (L . s <sup>-1</sup> )	2,98	10,35	7,39 ± 2,58	4,27	10,77	8,66 ± 2,05	0,020*
FEF <sub>25-75%</sub> (L)	2,61	6,98	4,47 ± 1,41	2,71	6,19	4,70 ± 1,17	0,124
PACIENTES (n = 24)							
	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA ± DS	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA ± DS	
CVF (L)	1,03	4,19	2,27 ± 0,72	1,00	4,26	2,36 ± 0,80	0,112
FEV <sub>1</sub> (L)	0,54	3,30	1,74 ± 0,62	0,74	3,54	1,85 ± 0,67	0,061
PEF (L . s <sup>-1</sup> )	1,42	8,75	4,00 ± 1,76	0,65	8,15	4,15 ± 1,77	0,226
FEF <sub>25-75%</sub> (L)	0,28	4,35	1,81 ± 1,07	0,44	4,70	2,01 ± 1,15	0,027*

CVF (capacidad vital forzada), FEV<sub>1</sub> (volumen expiratorio forzado en el primer segundo), PEF (flujo pico expiratorio máximo), FEF<sub>25-75%</sub> (flujo expiratorio forzado entre 25 y 75% de la capacidad vital forzada). \*(p < 0,05 estadísticamente significativo).



**Figura 1**



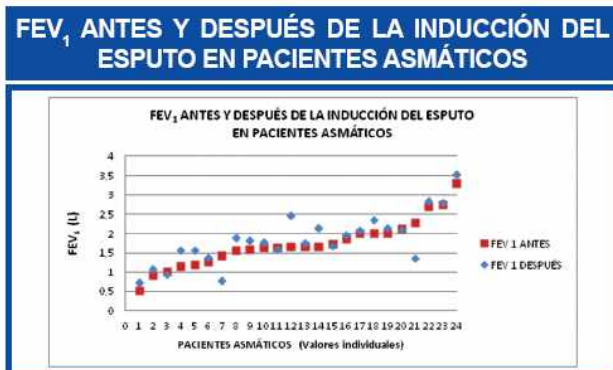
Ordenadas: FEV<sub>1</sub> (volumen expiratorio forzado en el primer segundo/L) de sujetos controles antes y después de la inducción del esputo con nebulizaciones de concentración creciente de solución salina hipertónica, previa administración de formoterol. Abscisa: Sujetos controles numerados del 1-10.

**Figura 2**



Ordenada: FEV<sub>1</sub> (volumen expiratorio forzado en el primer segundo/L). Abscisa: Situación de los sujetos controles en estudio: 1) Antes: Estado basal, 2) Después: Estado postinducción del esputo con nebulizaciones de concentraciones crecientes de solución salina hipertónica, previa administración de formoterol.

**Figura 3**

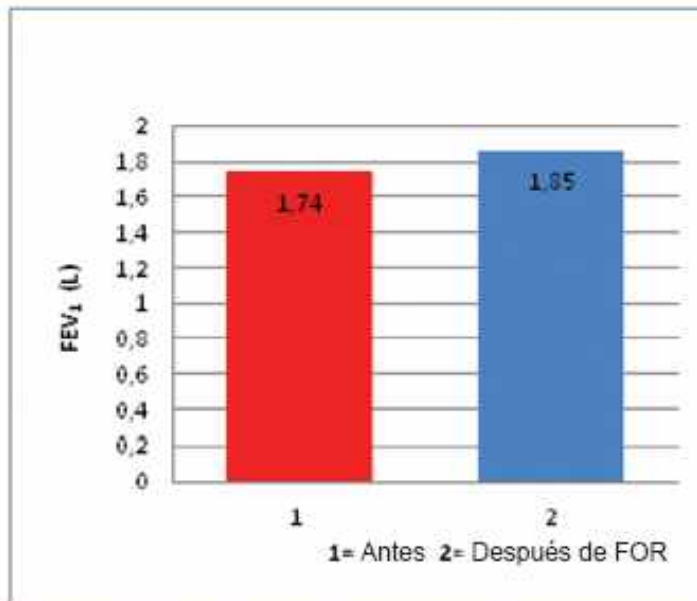


Ordenada: FEV<sub>1</sub> (volumen expiratorio forzado en el primer segundo/L). Abscisa: Situación de los sujetos controles en estudio: 1) Antes: Estado basal, 2) Después: Estado postinducción del esputo con nebulizaciones de concentraciones crecientes de solución salina hipertónica, previa administración de formoterol.



### Figura 4

#### VALOR DE MEDIA DE FEV<sub>1</sub> ANTES Y DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN DEL ESPUTO EN PACIENTES ASMÁTICOS



Ordenadas: FEV<sub>1</sub> (Volúmen expiratorio forzado en el primer segundo/L). Abscisa: Situación de los pacientes asmáticos en estudio: 1) Antes: Estado basal, 2) Después: Estado postinducción del esputo con nebulizaciones de concentraciones crecientes de solución salina hipertónica, previa administración de formoterol. FOR= formoterol.

## Referencias

1. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg J, Hargreave F, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25-29.
2. Djukanovic R, Sterk P, Fahy J, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:1s-2s.
3. Schoeffel R, Anderson S, Altounyan R. Bronchial hyperreactivity in response to inhalation of ultrasonically nebulised solutions of distilled water and saline. *BMJ (Clin Res Ed)* 1981;283:1285-7.

4. Joos G, O'Connor B, Anderson S, Chung F, Cockcroft D, Dahlén B, DiMaria G, Foresi A, Hargreave F, Holgate S, Inman M, Lötvall J, Magnussen H, Polosa R, Postma D, Riedler J. Indirect airway challenges. *Eur Respir J* 2003;21:1050-68.
5. Pizzichini E, Pizzichini M, Leigh R, Djukanovic R, Sterk P. Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:9s-18s.
6. Wong H, Fahy J. Safety of One Method of Sputum Induction in Asthmatic Subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:299-303.
7. Delvaux M, Henket M, Lau L, Kange P, Bartsch P, Djukanovic R, Louis R. Nebulised salbutamol administered during sputum induction improves bronchoprotection in patients with asthma. *Thorax* 2004;59:111-115.
8. Benhamou D, Cuvelier A, Muir J, Lederer V, Le Gros V, Kottakis J, Bourdeix I. Rapid onset of bronchodilation in COPD: a placebo-controlled study comparing formoterol (Foradil® Aerolizer™) with salbutamol (Ventodisk™). *Respir Med* 2001;95:817-821.
9. Steiropoulos P, Tzouveleki A, Bouros D. Formoterol in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulm Dis* 2008;3:205-215.
10. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1107-36.
11. Popov T, Pizzichini M, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, Hargreave F. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995;8:559-565.
12. Postiaux G. Fisioterapia respiratoria en el niño. Primera edición (2000). Editorial Mc Graw Gill Interamericana de España.
13. Fahy J, Boushey H, Lazarus S, Mauger E, Cherniack R, Chinchilli V, Craig T, Drazen J, Ford J, Fish J, Israel E, Kraft M, Lemanske R, Martin R, McLean D, Peters S, Sorknees C, Szeffler S. Safety and Reproducibility of Sputum Induction in Asthmatic Subjects in a Multicenter Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1470-1475.
14. Pizzichini E, Pizzichini M, Efthimiadis A, Evans S, Morris M, Squillace D, Gleich G, Dolovich J, Hargreave F. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:308-317.
15. Wong H, Fahy J. Safety of one method of sputum induction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:299-303.

16. Hunter C, Ward R, Woltmann G, Wardlaw A, Pavord I. The safety and success rate of sputum induction using a low output ultrasonic nebuliser. *Respir Med* 1999;93:345-348.
17. Fahy J, Liu J, Wong H, Boushey H. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1126-1131.
18. Vlachos-Mayer H, Leigh R, Sharon R, Hussack P, Hargreave F. Success and safety of sputum induction in the clinical setting. *Eur Respir J* 2000;16:997-1000.
19. De la Fuente P, Romagnoli M, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Safety of inducing sputum in patients with asthma of varying severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1127-1130.
20. Louis R, Shute J, Biagi S, Stanciu L, Marrelli F, Tenor H, Hidi R, et al. Chemotactic activity in asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:466-472.
21. Iredale M, Wanklyn S, Phillips I, Krausz T, Ind P. Non-invasive assessment of bronchial inflammation in asthma: no correlation between eosinophilia of induced sputum and bronchial responsiveness to inhaled hypertonic saline. *Clin Exp Allergy* 1994;24:940-945.
22. Bacci E, Cianchetti S, Paggiaro P, Carnevali S, Bancalari L, Dente F, Di Franco A, Giannini D, Vagaggini B, Giuntini C. Comparison between hypertonic and isotonic saline-induced sputum in the evaluation of airway inflammation in subjects with moderate asthma. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:1395-1400.
23. Delvaux M, Henket M, Lau L, Kange P, Bartsch P, Djukanovic R, Louis R. Nebulised salbutamol administered during sputum induction improves bronchoprotection in patients with asthma. *Thorax* 2004;59:111-115.
24. Dima E, Rovina N, Gerassimou C, Roussos C, Gratziou C. Pulmonary function tests, sputum induction, and bronchial provocation tests: diagnostic tools in the challenge of distinguishing asthma and COPD phenotypes in clinical practice. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 2010;5:287-296.
25. Fahy J, Wong H, Liu J, Boushey H. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:53-58.