

DEPARTAMENT DE MEDICINA

DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA BRONQUIAL A
ADENOSINA 5' MONOFOSFATO Y DE LA
CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN AIRE
EXHALADO EN PACIENTES CON COLITIS ULCEROSA.

MARIA CARMEN PÉREZ FRANCÉS

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 17 de desembre de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Adolfo Benages Martínez
- Dr. César Picado Vallés
- Dr. Francisco Javier Fernández Sánchez
- Dr. Miguel Angel Tejedor Alonso
- Dr. Julio Marín Pardo

Va ser dirigida per:

Dr. Jesús Luis Prieto Andrés

©Copyright: Servei de Publicacions
Maria Carmen Pérez Francés

Dipòsit legal: V-1063-2011
I.S.B.N.: 978-84-370-7799-4

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115

Jesús Luis Prieto Andrés, Profesor Asociado Docente del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada **“Determinación de la respuesta bronquial a adenosina 5´-monofosfato y de la concentración de óxido nítrico en aire exhalado en pacientes con colitis ulcerosa”**, cuyo autor es MARIA CARMEN PÉREZ FRANCÉS, está finalizada y reúne todos los requisitos necesarios para su lectura y defensa pública.

Para que conste, firmo el presente certificado en Valencia a 6 de septiembre de 2009.

Fdo. Jesús Luis Prieto Andrés
Director de la tesis doctoral



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA – FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Determinación de la respuesta bronquial a adenosina 5'-monofosfato y de la concentración de óxido nítrico en aire exhalado en pacientes con colitis ulcerosa.

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

María Carmen Pérez Francés
Valencia, 2009

Director

Dr. Jesús Luis Prieto Andrés

A mis padres
A José Antonio

Agradecimientos:

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento y gratitud a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han colaborado y hecho posible la realización de este estudio.

Al Dr. Luis Prieto Andrés, Jefe de Servicio de Alergia del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia: por su fuerte compromiso con el desarrollo del presente trabajo. Quisiera agradecerle su dedicación y rigor en las continuas ideas, sugerencias, críticas y buenos consejos ofrecidos; y muy especialmente su generosidad en haber querido compartir conmigo el conocimiento acumulado en su experiencia científica. Sin él la tesis no se hubiera llevado a fin.

Al Dr. Eduardo Moreno Osset, Jefe de Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Universitario Dr. Peset y a los Dres. María del Miracle Barrachina García y José María Paredes Arquiola, Médicos Adjuntos del Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, por su colaboración en la remisión de los pacientes y por su apoyo y ayuda en todas las dudas sobre la enfermedad inflamatoria intestinal que me han surgido durante la realización de este trabajo.

A los pacientes con colitis ulcerosa que tan amablemente participaron en el estudio así como a los compañeros, estudiantes de Medicina, amigos y familiares que formaron parte del grupo control, por su entusiasmo a la hora de colaborar.

A Rocío Rojas Aguilera, enfermera del Servicio de Alergia del Hospital Universitario Universitario Dr. Peset: por la diligencia que siempre ha mostrado para que todo el material necesario en el estudio estuviese siempre a punto.

Al Dr. José María Tenías Burillo, de la Unidad de Apoyo a la Investigación, del Área I.D.F.(Investigación, Docencia y Formación) del Hospital La Mancha Centro, de Alcázar de San Juan, por su apoyo, interés y constante ayuda en la solución de las diferentes dificultades que aparecieron durante la elaboración de la tesis.

A los Médicos, Residentes y resto de Personal del Servicio de Alergia del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, que de una u otra manera, me han ayudado durante la realización de este trabajo.

Índice

| | Página |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1-Colitis ulcerosa. Generalidades | 2 |
| 1.1 Concepto, epidemiología, patogenia | 2 |
| 1.2 Diagnóstico | 3 |
| 1.3 Valoración de la actividad y de la extensión | 6 |
| 2-Colitis ulcerosa. Manifestaciones extraintestinales | 8 |
| 3-Manifestaciones pulmonares de la colitis ulcerosa. Generalidades | 10 |
| 4-Alteraciones en la función pulmonar en la enfermedad inflamatoria intestinal | 14 |
| 5-Marcadores de inflamación y la enfermedad inflamatoria intestinal. | 18 |
| 6- Hiperrespuesta bronquial a agonistas directos e indirectos y enfermedad inflamatoria intestinal. | 23 |
| | |
| HIPÓTESIS DE TRABAJO | 27 |
| | |
| OBJETIVOS | 29 |
| | |
| PACIENTES Y MÉTODOS | 31 |
| 1-Consideraciones sobre el tamaño de la muestra. | 32 |
| 2-Pacientes con colitis ulcerosa. | 33 |
| 3-Grupo control. | 34 |
| 4-Diseño del estudio. | 34 |
| 5-Métodos. | 37 |
| 5.1 Pruebas cutáneas. | 37 |
| 5.2 Espirometría. | 37 |
| 5.3 Provocación bronquial con metacolina. | 38 |
| 5.4 Provocación bronquial con adenosina 5´monofosfato. | 40 |
| 5.5 Programación del dosímetro. | 43 |
| 5.6 Determinación de óxido nítrico en aire exhalado. | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 6. Análisis estadístico | 46 |
| RESULTADOS | 49 |
| 1-Características de la población del estudio. | 50 |
| 1.1 Características clínicas de los pacientes con colitis ulcerosa | 50 |
| 1.2 Características de los sujetos del grupo control. | 52 |
| 1.3 Comparación de las características de las dos poblaciones estudiadas. | 53 |
| 1.4 Concentración de óxido nítrico en aire exhalado. | 54 |
| 1.5 Respuesta a metacolina y a AMP. | 55 |
| 1.6 Diferencias entre pacientes con colitis ulcerosa extensa y colitis ulcerosa izquierda. | 57 |
| 1.7 Diferencias entre pacientes con colitis ulcerosa activa e inactiva. | 60 |
| 2-Relación entre variables. | 62 |
| 2.1 Relación entre óxido nítrico, funcionalismo pulmonar y respuesta a la provocación bronquial. | 62 |
| 2.2 Relación entre la respuesta a los agentes broncoconstrictores y la función pulmonar basal. | 62 |
| 2.3 Relación entre la respuesta a ambos agonistas. | 64 |
| 2.4 Relación entre los años de evolución de la enfermedad, la respuesta a ambos agonistas y las concentraciones de óxido nítrico. | 65 |
| DISCUSIÓN | 67 |
| CONCLUSIONES | 95 |
| BIBLIOGRAFÍA | 97 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS EMPLEADAS.

- AMP: Adenosina 5'-monofosfato.
- BAL: Lavado broncoalveolar.
- CE: Colitis extensa.
- CI: Colitis izquierda.
- CU: colitis ulcerosa.
- cW: Concentración de NO en la pared bronquial.
- dNO: Difusión del NO hacia la luz bronquial.
- ENO: Óxido nítrico en aire exhalado.
- FEF₂₅: Flujo espiratorio forzado al 25% de la capacidad vital forzada.
- FEF₆₀: Flujo espiratorio forzado al 60% de la capacidad vital forzada.
- FEV₁: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo.
- FEV₁/FVC%: Cociente FEV₁/FVC%.
- FVC: Capacidad vital forzada
- HRB: Hiperrespuesta bronquial.
- IC: Intervalo de confianza
- iNOS: Sintasa del óxido nítrico inducible.
- IR: Índice de reactividad.
- IVC: Capacidad vital inspiratoria.
- NO: Óxido nítrico.
- NOS: Sintasa del óxido nítrico.
- PC₂₀: Concentración de agonista necesaria para inducir un deterioro del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) del 20%.
- ppb: Partes por billón.
- Visov: Volumen a igual flujo.
- ΔV max 50: Diferencias de flujos al 50% de la capacidad vital forzada

INTRODUCCIÓN

1-COLITIS ULCEROSA. GENERALIDADES

1.1 Concepto, epidemiología, patogenia.

La colitis ulcerosa, junto con la enfermedad de Crohn, se encuadra dentro del grupo de las enfermedades inflamatorias crónicas intestinales, de etiología no filiada, inespecífica o idiopática¹.

La colitis ulcerosa fue descrita por primera vez por el médico británico Sir Samuel Wilks en 1859. Esta enfermedad es una inflamación difusa limitada al colon, que afecta principalmente a las capas superficiales del intestino y que comenzando en el recto se extiende de manera proximal y continua. En ella son típicos los abscesos de las criptas (acumulación de neutrófilos alrededor de las criptas), la necrosis del epitelio, el edema, la hemorragia y los acúmulos de células inflamatorias, pero no se asocia con granulomas².

En Estados Unidos y Europa occidental, la colitis ulcerosa tiene una incidencia de alrededor de 6 a 8 casos por 100.000 habitantes y se calcula una prevalencia de unos 70 a 150 casos por 100.000 habitantes³. En nuestro país⁴, la incidencia de la colitis ulcerosa encontrada en los diversos estudios realizados varía entre 0,6 y 8 casos/100.000 personas/año, con una media de 3,8, cifras que difieren de las de un estudio europeo en el que la incidencia de la colitis ulcerosa era de 10,4/100.000 personas/año⁵. También en nuestro país⁴, como en el resto de Europa, se ha identificado un gradiente norte-sur y se ha señalado la existencia de una evolución ascendente de la incidencia con el tiempo.

La enfermedad afecta principalmente a adultos jóvenes de 20 a 40 años pero puede presentarse a cualquier edad. Muchas series demuestran un pico secundario de incidencia en los ancianos. No está bien definido que haya diferencias en cuanto al sexo, aunque en algunas series se ha descrito una mayor prevalencia en mujeres.

La etiología y patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal siguen siendo desconocidas en la actualidad. Probablemente ocurre como consecuencia de la

interacción de factores genéticos, exógenos y endógenos, con un papel relevante del sistema inmune⁶.

1.2 Diagnóstico

En la enfermedad inflamatoria intestinal no existen síntomas ni signos patognomónicos, por lo que su diagnóstico se basa en un conjunto de datos clínicos, biológicos, radiológicos, endoscópicos e histopatológicos.

La diarrea es la manifestación mas frecuente; la presencia de sangre en las heces es un dato a favor de la presencia de colitis ulcerosa. Puede aparecer también tenesmo y urgencia defecatoria, dolor abdominal, fiebre y pérdida de peso⁷. Los estudios microbiológicos¹ son útiles para descartar las causas infecciosas a considerar en el diagnóstico diferencial y para identificar las complicaciones sépticas que surjan en la evolución.

Los estudios de laboratorio, hematológicos y bioquímicos se emplean con frecuencia en la valoración de la enfermedad inflamatoria intestinal⁸. Van a permitir cuantificar la respuesta inflamatoria (proteína C reactiva –PCR-, velocidad de sedimentación globular –VSG-, orosomucoide, trombocitosis, leucocitosis) o bien valorar la repercusión sistémica cuando el curso de la enfermedad sea prolongado o grave (anemia, hipoalbuminemia...).

Las técnicas de radiología baritada (enema opaco y enteroclisia) son los métodos radiográficos mas exactos para evaluar la afectación de la mucosa intestinal. Los signos radiológicos que produce la colitis ulcerosa están bien establecidos y son diferentes a los hallazgos de la enfermedad de Crohn⁹. La existencia o no de asimetría, discontinuidad, la localización y mejoría de los hallazgos radiológicos durante la remisión de la enfermedad permitirán diferenciar ambas entidades. (**Tabla 1**)

Tabla 1. Hallazgos en la radiología baritada de la enfermedad inflamatoria intestinal.

| Colitis ulcerosa | Enfermedad de Crohn |
|---|---|
| | Cambios Agudos |
| 1-Mucosa granular. | 1-Aftas. |
| 2-Mucosa con punteado. | 2-Úlceras profundas confluentes (imagen de empedrado). |
| 3-Ulceras en botón de camisa | 3-Afectación asimétrica, segmentaria y lesiones parcheadas. |
| 4-Pérdida o engrosamiento de haustras | |
| 5-Afectación continua, circunferencial y confluyente. | |
| | Cambios Crónicos |
| 1-Pérdida de haustras. | 1-Fisuras, fistulas y abscesos. |
| 2-Estrechamiento de la luz. | 2-Pérdida de las haustras. |
| 3-Pérdida de las válvulas rectales | 3-Pseudodivertículos. |
| 4-Aumento del espacio presacro. | 4-Pseudopólipos inflamatorios. |
| 5-Ileitis por reflujo. | 5-Estenosis fibróticas. |
| 6-Pseudopólipos inflamatorios. | |

En cuanto a la endoscopia digestiva, su gran sensibilidad y especificidad en la valoración de la mucosa digestiva, hacen este procedimiento de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal¹⁰. La endoscopia ofrecerá un diagnóstico de presunción que deberá ser corroborado por el estudio anatomopatológico de las biopsias. Mediante endoscopia se valorará la afectación (continua, discontinua...), el aspecto de la pared (rígido, pérdida de haustras...), el aspecto de la mucosa (petequial, friable...) y el aspecto del patrón vascular.

Los hallazgos característicos de la colitis ulcerosa serán la distribución continua y simétrica de las lesiones, la presencia de erosiones y microúlceras, el aspecto granular de la mucosa y la afectación rectal¹¹.

El estudio anatomopatológico (macroscópico e histológico) de las piezas quirúrgicas y el estudio histológico de las biopsias endoscópicas de la zona, desempeñan un papel preponderante en el diagnóstico de la enfermedad inflamatoria

intestinal¹². Los hallazgos anatomopatológicos de la colitis ulcerosa se detallan en la **tabla 2**. De todos los hallazgos los más destacados son:

- Inflamación en todas las muestras.
- Mayor afectación en biopsias de zonas distales.
- Enfermedad limitada a la mucosa.
- Disminución de células secretoras de mucina.
- Ausencia de tejido de granulación, fibrosis y granulomas.
- Presencia de exudado inflamatorio agudo, con ectasia de capilares y vénulas.

Tabla 2. Hallazgos anatomopatológicos en la colitis ulcerosa

| Datos macroscópicos | Datos microscópicos |
|---|---|
| 1-Colon con afectación continua, nunca segmentaria. | 1-Inflamación superficial excepto en el megacolon tóxico. |
| 2-Pared intestinal con grosor normal. | 2-Reducción de células secretoras de mucina. |
| 3-No estenosis, acortamiento por espasmo. | 3-Abscesos en criptas en la lámina propia. |
| 4-Ectasia vascular y congestión. | 4-Exudado inflamatorio celular agudo. |
| 5-Mucosa granujienta, puede ser en empedrado. | 5-Marcada vascularización. |
| 6-Ulceras superficiales en la mucosa. | 6-Ulceras precoces. |
| 7-Pólipos inflamatorios y puentes prominentes. | 7-Escasos folículos linfoides |
| 8-Serositis inusual, salvo megacolon tóxico. | 8-No fisuras bajo la mucosa, salvo megacolon. |
| 9-No fistulas. | 9-No tejido de granulación |
| 10-No abscesos. | 10-Displasia frecuente. |
| 11-Megacolon tóxico. | 11-Ausencia de linfangiectasias |
| 12-Recto generalmente afectado. | 12-Curación granular de la mucosa. |
| 13-Ano no afectado. | 13-Muscularis mucosae intacta. |
| 14-Grasa mesentérica normal. | 14-Engrosamiento de la mucosa infrecuente. |
| 15-Ganglios linfáticos normales o reactividad leve. | 15-Ausencia de hiperplasia neuronal. |
| 16-Ileitis por reflujo en ocasiones. | 16-No vasculitis. |
| 17-Carcinoma en el 2-5% de casos. | 17-Ausencia de granulomas. |

1.3 Valoración de la actividad y de la extensión

La enfermedad inflamatoria intestinal se caracteriza por la heterogeneidad en su presentación y por su evolución incierta. Puede presentarse como brotes únicos de diferente gravedad, pero suele seguir un curso prolongado con exacerbaciones y remisiones o bien con sintomatología persistente¹³. Cuando se valora la actividad de la enfermedad se está intentando determinar su impacto en los diversos segmentos intestinales y sus efectos sistémicos. Al no existir marcadores patognomónicos en la enfermedad inflamatoria intestinal, la valoración de la actividad requiere un compendio de datos clínicos, biológicos, endoscópicos e histológicos agrupados en forma de “índices”.

La mayoría de los índices de actividad combinan, de forma variable, datos objetivos y subjetivos para obtener un valor único que describa la enfermedad de manera individual¹⁴. Mediante los índices de actividad¹⁵ se intenta 1) Determinar la gravedad de la enfermedad; 2) Establecer el pronóstico para los pacientes; 3) Evaluar el efecto de los tratamientos.

En la colitis ulcerosa, el índice clínico biológico más conocido y utilizado es el de Truelove y Witts¹⁶. Es un índice cualitativo ordinal que distingue tres categorías de gravedad (leve, moderada y grave) y fue diseñado para evaluar la respuesta al tratamiento esteroideo. A pesar de que no ha sido validado en su capacidad pronóstica, la sencillez de las variables que utiliza lo convierte en uno de los más empleados.

Su desventaja principal es que no incluye la extensión de la enfermedad, variable de gran valor predictivo en esta entidad. Se ha descrito un sistema de cuantificación numérica del índice de Truelove y Witts (índice de Truelove-Witts modificado¹⁷) con el fin de facilitar su manejo estadístico. Este sistema adjudica un valor de 1, 2 ó 3 a cada una de las variables según se considere leve, moderada o grave (**Tabla 3a**). Ello permite obtener un rango de valores que clasifica la enfermedad en leve, moderada y grave, dependiendo de la suma global de las puntuaciones asignadas a cada variable (**Tabla 3b**).

Tabla 3a. Índice de Truelove-Witts modificado

| VARIABLES | LEVE (1punto) | MODERADO (2puntos) | GRAVE(3puntos) |
|---|---------------|--------------------|----------------|
| Número deposiciones | <4 día | 4-6 día | ≥6 día |
| Sangre en las deposiciones | No | Si en alguna | En todas |
| Hemoglobina (g/L) | | | |
| -Hombres | >14 | 14-10 | <10 |
| -Mujeres | >12 | 12-10 | <10 |
| Albúmina (g/L) | >33 | 32-30 | <30 |
| Temperatura | <37°C | 37-38°C | >38°C |
| Frecuencia cardiaca (pulsaciones por minuto) | <80 | 80-100 | >100 |
| VSG mm/h | Normal | 15-30 | >30 |

Tabla 3b. Grados de actividad de la colitis ulcerosa (Índice de Truelove-Witts modificado).

| PUNTUACIÓN | ACTIVIDAD | |
|--------------|-----------|---------|
| ≤6 puntos | Inactivo | Grado 0 |
| 7-10 puntos | Leve | Grado 1 |
| 11-14 puntos | Moderado | Grado 2 |
| 15-21 puntos | Grave | Grado 3 |

La extensión de la enfermedad tiene un importante valor predictivo en este proceso; ésta no es estática¹³ y cambia con frecuencia en el tiempo en aproximadamente la mitad de los pacientes y en mayor proporción en los primeros 10 años tras el diagnóstico.

En el año 2003 un grupo de investigadores en enfermedad inflamatoria intestinal, estableció una nueva clasificación de la colitis ulcerosa en tres subgrupos¹⁸ (**Tabla 4**). Esta subclasificación tiene relevancia biológica en lo que se refiere a la

respuesta al tratamiento (diferencia la respuesta al tratamiento tópico), el uso de medicación, hospitalización y colectomía.

Tabla 4. Clasificación de Montreal de la extensión de la colitis ulcerosa

| | |
|---------------------------------------|---|
| Proctitis ulcerosa | Afectación limitada al recto (la extensión de la inflamación proximal es distal a la unión rectosigmoidea). |
| Colitis ulcerosa izquierda o distal | Afectación del colon hasta el ángulo esplénico |
| Colitis ulcerosa extensa o pancolitis | Afectación del colón que sobrepasa el ángulo esplénico |

2-COLITIS ULCEROSA. MANIFESTACIONES EXTRAINTESTINALES

La enfermedad inflamatoria intestinal, puede realmente considerarse como una enfermedad sistémica, asociándose a menudo con manifestaciones extraintestinales^{19, 20}. La incidencia de estas manifestaciones extraintestinales oscila entre un 21 y un 41 % de los pacientes, incrementándose con la duración de la enfermedad y siendo más frecuente en la enfermedad de Crohn que en la colitis ulcerosa²¹.

Prácticamente casi todos los órganos pueden afectarse, principalmente ojos, piel, articulaciones, riñones, hígado, tracto biliar y sistema vascular. Aunque con menor frecuencia también se han descrito la afectación pulmonar²², neurológica o cardíaca. La coincidencia de diversas manifestaciones extraintestinales en un mismo sujeto es mayor que la esperada por la mera casualidad, hecho que sugiere mecanismos patogénicos comunes.

Las manifestaciones extraintestinales pueden dividirse en dos grupos; el primer grupo incluye manifestaciones reactivas y directamente asociadas con la actividad inflamatoria intestinal, que reflejan un mecanismo patogénico común con la enfermedad intestinal (artritis, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, estomatis aftosa, iritis y

uveitis, manifestaciones pulmonares, etc). El segundo grupo incluirá muchas enfermedades autoinmunes que son reflejo de una mayor susceptibilidad a la autoinmunidad. Ejemplos de este segundo tipo de manifestaciones serían la espondilitis anquilosante o la cirrosis biliar primaria entre otras.

Además, existirán muchas complicaciones debidas a anomalías metabólicas o anatómicas, causadas directamente por la enfermedad inflamatoria intestinal y que pueden originar por ejemplo anemia, osteoporosis, osteopenia o colelitiasis.

Entre las manifestaciones directamente asociadas con la actividad inflamatoria intestinal, las más frecuentes son las articulares²⁰, con una prevalencia entre el 7 y el 25%. La afectación articular puede ser periférica o axial. La afectación axial puede variar desde una sacroileitis asintomática hasta la espondilitis anquilopoyética. La artritis periférica puede acompañarse de entesitis, tenosinovitis y dactilitis.

Entre un 10 y un 25% de los pacientes tienen manifestaciones cutáneas²³. Dentro de estas, las manifestaciones más frecuentes, son la estomatitis aftosa, el eritema nodoso y el pioderma gangrenoso. Un 10% de los pacientes tienen manifestaciones oculares; entre las inmuno-relacionadas están la epiescleritis, escleritis, uveitis y afectación corneal.

El riesgo de tromboembolismo es 3 veces mayor en estos pacientes, su incidencia oscila entre 1,2% y 6,1% según series y su localización predominante es el sistema venoso profundo y el pulmón.

La afectación hepatobiliar es frecuente¹⁹, con una elevación de los enzimas hepáticos observada en una proporción que oscila entre un 11 a un 49% de los pacientes, según series. La enfermedad más frecuentemente inmunomediada a nivel hepatobiliar es la colangitis esclerosante primaria cuya incidencia oscila entre un 2 y un 7% de los pacientes con colitis ulcerosa.

3-MANIFESTACIONES PULMONARES DE LA COLITIS ULCEROSA. GENERALIDADES.

La afectación pulmonar en la colitis ulcerosa representa una de las manifestaciones extraintestinales menos frecuentes en esta afección²⁴.

En una serie de 624 pacientes con colitis ulcerosa recogidos por Edwards y Truelove²⁵ en 1964, no se menciona la afectación bronquial o del parénquima pulmonar, y en la serie de 1400 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal descrita por Kraft²⁶ doce años más tarde, se registran sólo 6 pacientes con esta afectación.

Esta baja frecuencia puede obedecer a diferentes motivos. En primer lugar, a que estas manifestaciones pueden aparecer meses o años antes o después del comienzo de la enfermedad (incluso después de la colectomía), hecho que hace difícil su diagnóstico. Por otra parte, los pacientes pueden tener alteraciones en la función pulmonar²⁷ e incluso linfocitosis alveolar²⁸ sin manifestaciones clínicas asociadas. Además, pacientes con bronquiectasias en la tomografía axial computarizada pueden tener una radiografía de tórax normal²⁹ y pacientes con función pulmonar normal pueden tener bronquiectasias y atrapamiento aéreo en los estudios realizados mediante tomografía axial computarizada de alta resolución³⁰. Todos estos hechos dificultan la identificación de la afectación pulmonar.

La incidencia de la afectación pulmonar es mayor en la colitis ulcerosa que en la enfermedad de Crohn. Camus y cols²² efectúan una revisión de 98 casos publicados con enfermedad inflamatoria intestinal y afectación pulmonar y encuentran que un 89,8% de ellos corresponden a pacientes con colitis ulcerosa e iguales resultados obtienen Storch y cols³¹. Además el patrón de alteraciones respiratorias en ambas enfermedades es diferente. La afectación de los grandes bronquios y la bronquitis crónica es más frecuente en colitis ulcerosa y la alveolitis linfocítica subclínica en la enfermedad de Crohn.

En algunos trabajos se menciona una mayor frecuencia de afectación broncopulmonar en el sexo femenino²².

A medida que han aumentado los conocimientos sobre la enfermedad inflamatoria intestinal, la afectación pulmonar se ha identificado con mayor frecuencia. En una revisión³¹ de 400 casos de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y afectación pulmonar, se señala que 150 de ellos tienen enfermedad pulmonar activa, pero que la presencia de afectación pulmonar subclínica es mucho más frecuente. También es esta la impresión de la última revisión³² publicada en el año 2007, donde se sugiere que la afectación pulmonar es más frecuente de lo que había sido generalmente apreciada.

Históricamente, las primeras alteraciones pulmonares que se reconocieron asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal fueron descritas por Isenberg y cols³³ que comunicaron una vasculitis pulmonar en un paciente con colitis ulcerosa. La primera de las series que describió la afectación pulmonar fue publicada por Kraft²⁶ en seis pacientes (5 con colitis ulcerosa y 1 con enfermedad de Crohn) con supuración bronquial con o sin bronquiectasias.

Durante los años siguientes se han ido describiendo otros patrones de afectación pulmonar asociados a enfermedad inflamatoria intestinal, normalmente casos aislados: neumonitis intersticial³⁴, estenosis traqueal³⁵, bronquiolitis³⁶, vasculitis pulmonar, nódulos pulmonares necróticos, serositis, infiltrados pulmonares con eosinofilia³⁷ etc. Los estudios que describen series de pacientes con manifestaciones clínicas pulmonares son escasos^{22, 26, 29, 38}.

En 1993 se publica la serie²² con un mayor número de pacientes (33 pacientes) con manifestaciones pulmonares en la enfermedad inflamatoria intestinal; las anteriores series hasta ese momento habían sido de 6, 10 y 7 casos publicados por Kraft²⁶, Higenbottan²⁹ y Butland³⁸ respectivamente, en su mayor parte en pacientes con colitis ulcerosa (22 de los 23 pacientes).

Camus y cols²², en su estudio (realizado en 33 pacientes, 27 con colitis ulcerosa) catalogan la enfermedad respiratoria como asociada a la enfermedad inflamatoria intestinal cuando los pacientes desarrollan anomalías pulmonares clínicas o radiológicas, no explicadas por otras entidades ni por los efectos adversos de los

fármacos que los pacientes pudieran estar tomando (sulfapiridina y/o 5-aminosalicílico, metotrexate, etc). En un 84,8% de sus pacientes la afectación pulmonar ocurría en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal establecida, en un 60,7% de casos la enfermedad estaba inactiva y en 8 pacientes la afectación pulmonar se manifestó tras colectomía. Sólo en 4 casos la afectación pulmonar fue previa a la enfermedad inflamatoria intestinal. De los 27 pacientes con colitis ulcerosa, 17 tuvieron afectación de la vía aérea (2 superior, 13 grandes bronquios y 2 pequeños bronquios), 8 afectación del parénquima y 2 nódulos necrobióticos.

En el trabajo comentado previamente²², además de la serie propia de pacientes, los autores analizan los datos existentes en la literatura hasta ese momento junto con los suyos (en total 98 casos) y proponen una clasificación de la afectación respiratoria en cuatro categorías mayores:

- Afectación de la vía aérea: estenosis glótica o subglótica, estenosis traqueal, bronquitis crónica, supuración bronquial crónica, bronquiectasias, panbronquiolitis difusa, bronquiolitis necrotizante, bronquiolitis granulomatosa.
- Afectación pulmonar intersticial: bronquiolitis obliterante con neumonía organizada, infiltrados pulmonares con eosinofilia, enfermedad pulmonar intersticial inespecífica, neumonitis descamativa intersticial
- Nódulos necróticos en el parénquima
- Pleuritis

Los mismos autores²² encuentran que las alteraciones más frecuentes corresponden a la presencia de bronquiectasias (24,6% de los casos) y de enfermedad pulmonar intersticial (26,3%). Estos resultados han sido confirmados por estudios posteriores^{31, 39}. En la mayoría de los trabajos que han descrito series de pacientes, la enfermedad pulmonar se desarrolló tras el inicio de la enfermedad inflamatoria intestinal. Por ejemplo, en la serie de Camus la afectación pulmonar se detectaba tras el debut de la enfermedad inflamatoria intestinal en un 85% de las ocasiones.

Las razones para el desarrollo de la enfermedad pulmonar antes, durante o después de la aparición de la enfermedad inflamatoria intestinal no se conocen.

Tampoco se sabe por qué sólo unos pocos pacientes la desarrollan, ni se han identificado los factores que regulan sus exacerbaciones⁴⁰.

Habitualmente, la afectación pulmonar permanece localizada en un determinado nivel anatómico⁴⁰; es decir, el paciente no suele presentar afectación en diferentes niveles de vías respiratorias o parénquima y su gravedad puede modificarse bajo la influencia por una parte de la actividad de la enfermedad y por otra del tratamiento esteroideo.

En cuanto a la relación con la actividad de la enfermedad, Camus y cols²² encontraron que, en la mayoría de sus casos, la enfermedad inflamatoria intestinal estaba inactiva cuando apareció la afectación de la vía aérea o del parénquima, aunque parecía que las serositis tendían a aparecer en pacientes con enfermedad activa.

Los síntomas mas frecuentes son la tos, expectoración y disnea, a los cuales se puede añadir disfonía o estridor si se afectan las vías respiratorias superiores o neumotórax/neumomediastino u obstrucción grave al flujo aéreo cuando la afectación se localiza en la pequeña vía aérea.

El tratamiento de las manifestaciones respiratorias va a depender del patrón específico de afectación^{22, 40}. Los fármacos no esteroideos (sulfasalazina o 5-ASA) o los fármacos inmunosupresores utilizados en la enfermedad inflamatoria intestinal no son útiles, excepto en raros casos. Tampoco resulta útil la coloproctectomía, que incluso puede agravar las manifestaciones pulmonares. La mayoría de las manifestaciones respiratorias responderán a los corticoides, aunque las recomendaciones para su dosis, duración y vía de administración permanecen empíricas. En el caso de la afectación leve de los grandes bronquios se puede intentar un tratamiento con glucocorticoides inhalados. Las formas mas agresivas de afectación bronquial pueden requerir glucocorticoides orales combinados con inhalados. En casos muy agresivos se ha realizado fibrobroncoscopia y lavado bronquial con metilprednisolona.

Pese a todo lo referido anteriormente, la afectación pulmonar con manifestaciones clínicas en la enfermedad inflamatoria intestinal es poco frecuente, siendo mucho más frecuente la afectación pulmonar silente³¹.

4-ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN PULMONAR EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.

Diversos estudios han encontrado alteraciones de la función pulmonar en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal con o sin manifestaciones clínicas respiratorias.

Tzanakis y cols⁴¹ no encontraron alteraciones significativas en los parámetros espirométricos [capacidad vital forzada (FVC), volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁), cociente FEV₁/FVC %, capacidad pulmonar total, volumen residual, relación entre volumen residual y capacidad pulmonar total], con respecto al grupo control, en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn). Sin embargo, la proporción de pacientes con difusión pulmonar alterada era significativamente mayor en el grupo con enfermedad inflamatoria intestinal comparado con el grupo control, sobre todo en pacientes en fase activa.

Resultados parecidos se obtuvieron por Heatley y cols⁴². Estos autores no encontraron diferencias entre los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y los controles en la FVC y FEV₁, aunque cuando analizaron el bucle espiratorio encontraron una reducción del FEF₂₅ (flujo espiratorio forzado al 25% de la FVC) y FEF₆₀ (flujo espiratorio forzado al 60% de la FVC), en los enfermos con enfermedad inflamatoria intestinal; al igual que el grupo anterior, la alteración de la difusión era lo más frecuentemente detectado, pues se identificaba en el 25% de los pacientes. Además, esta alteración de la difusión era más intensa en la enfermedad de Crohn que en la colitis ulcerosa.

A diferencia de los hallazgos anteriores, se han encontrado⁴³ alteraciones de tipo obstructivo en un 24,1 % de pacientes con colitis ulcerosa e interesantemente el FEV₁ era menor en pacientes no fumadores que en los controles; a diferencia de los anteriores grupos, ningún paciente tuvo alteraciones en la difusión. Godet y cols⁴⁴, en un grupo de 55 pacientes con colitis ulcerosa, detectaron anomalías de la difusión en 19 pacientes y espirométricas en 16 pacientes (29%). En total, estas alteraciones ocurrían en un 55% de los pacientes (30 de 55). Este último dato contrasta con los estudios de

Tzanakis⁴¹ y Heatley⁴², aunque hay que destacar en este estudio la ausencia de grupo control, que quizás hubiese restado trascendencia a este hallazgo. Los autores destacaron que la presencia de síntomas pulmonares no se relacionó con la existencia de las alteraciones en el funcionalismo pulmonar.

En otro estudio efectuado por Tzanakis y cols⁴⁵, se determinó la afectación de vías aéreas pequeñas en un grupo de 30 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (18 con colitis ulcerosa). Se obtuvieron curvas flujo-volumen respirando aire ambiente y una mezcla de 80% helio y 20% O₂. Como índices de afectación de la pequeña vía aérea se utilizaron las diferencias de flujos al 50% de la FVC ($\Delta V_{max 50}$) y el volumen a igual flujo (Visov). Los autores detectaron un incremento del Visov, hecho que indica un estrechamiento de la vía aérea con la consiguiente alteración del flujo laminar a este nivel, sin apreciarse alteraciones en las pruebas espirométricas. Además se detectó alteración de la difusión pulmonar sólo en pacientes con enfermedad activa, al igual que en la serie de Munck y cols⁴⁶. Este hecho es diferente al comunicado por Godet y cols⁴⁴ que no encuentran relación de las alteraciones funcionales pulmonares con la actividad de la enfermedad.

Para finalizar este grupo de estudios, donde no se seleccionan los pacientes por la presencia o ausencia de manifestaciones pulmonares^{41-45, 47}, Douglas y cols⁴⁷, en 44 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (22 con colitis ulcerosa, 22 con enfermedad de Crohn), detectaron en un 20% de los mismos una elevación de la capacidad residual funcional y del volumen residual (sin que la espirometría detectase alteraciones obstructivas) durante la fase activa de la enfermedad. También en este estudio se detectaron alteraciones de la difusión en un 16% de los pacientes, sin relación con la actividad de la enfermedad.

En otros estudios^{26, 29, 38} se han seleccionado pacientes con manifestaciones pulmonares (tos, expectoración y disnea progresiva), con el fin de determinar las alteraciones funcionales más frecuentemente asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal. En la serie de Higgenbottam y cols²⁹, en 3 de los 10 pacientes con colitis ulcerosa la espirometría y difusión pulmonar fueron normales, en 4 existía un patrón restrictivo (estos mostraban opacidades en la radiografía de tórax) junto con

alteraciones en la difusión. Los 3 pacientes restantes presentaban alteraciones obstructivas menores.

En la serie de Butland y cols³⁸ constituida por 7 pacientes con colitis ulcerosa, todos ellos con clínica respiratoria y afectación del árbol bronquial, 6 presentaban un patrón obstructivo y uno mostraba espirometría normal. Además, en 3 pacientes se identificaron alteraciones en la difusión. Finalmente en otra serie de 6 pacientes con clínica pulmonar²⁶, 4 tuvieron alteraciones obstructivas y 2 un patrón mixto obstructivo-restrictivo.

Por otra parte, otros estudios^{27, 28, 46, 48-53} han tratado de identificar alteraciones de la función pulmonar en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal que no referían manifestaciones clínicas respiratorias y presentaban radiología de tórax normal:

- Bonniere y cols²⁸, en un estudio efectuado en pacientes con enfermedad de Crohn, encontraron alteraciones en las pruebas funcionales (espirometría, pletismografía o difusión pulmonar) en 15 de los 21 pacientes estudiados. Además se detectó un incremento de los linfocitos en el lavado broncoalveolar (BAL) en los pacientes ($25,1 \pm 19,7\%$) comparado con controles ($7,2 \pm 8\%$ $p < 0,001$). Otro grupo⁵⁰, había observado un incremento de los linfocitos en el BAL en pacientes con enfermedad de Crohn, sin encontrar correlación entre la linfocitosis del BAL y las anormalidades en la función pulmonar. En un grupo de 15 pacientes con colitis ulcerosa⁵², se evidenció la existencia de alveolitis de tipo mixto en 5 de los 10 pacientes a los que se les pudo efectuar el BAL.
- También se han efectuado estudios de la permeabilidad pulmonar en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal^{48, 53} mediante la medición del aclaramiento de tecnecio 99. En pacientes con enfermedad de Crohn⁴⁸ el tiempo medio de aclaramiento fue menor que en los sujetos control (45,5 minutos frente a 85 minutos, respectivamente), hecho que indica un incremento de la permeabilidad pulmonar. Este parámetro no se influyó en exceso por la actividad de la enfermedad (a diferencia de la permeabilidad intestinal aumentada durante la fase de actividad). Los mismos hallazgos han sido confirmados recientemente

por Gursoy y cols⁵³ en pacientes con colitis ulcerosa, sin evidenciar relación de dicho incremento con la actividad, extensión o duración de la enfermedad.

- Alteraciones espirométricas y/o en la difusión pulmonar aparecen tanto en la fase activa, como en la de remisión de la enfermedad inflamatoria intestinal. Eade y cols⁵⁰, en un estudio llevado a cabo en 36 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (13 con enfermedad de Crohn y 23 con colitis ulcerosa), encuentran una reducción significativa de la difusión pulmonar, comparado con controles, sin existir relación entre esta alteración y la actividad de la enfermedad. Alteraciones en la difusión pulmonar han sido encontradas por otros grupos^{27, 46, 51}. Herrlinger y cols⁵¹ encontraron, junto con las alteraciones en la difusión, una reducción del FEV₁ y capacidad vital inspiratoria (CVI); las alteraciones espirométricas (aunque no en la difusión) eran mayores en la fase activa de la enfermedad. Sin embargo, y a diferencia del anterior estudio, en una serie en niños⁴⁶ y otra en adultos²⁷ las alteraciones en la difusión fueron mayores durante la fase activa de la enfermedad.

A diferencia de los anteriores estudios, existen dos series que no detectaron diferencias significativas en la frecuencia de alteraciones de la función pulmonar (pletismografía, espirometría y difusión pulmonar) entre los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y el grupo control^{54, 55}.

Resumiendo las alteraciones funcionales encontradas en la enfermedad inflamatoria intestinal, sólo dos estudios^{54, 55} encuentran resultados negativos en todos los parámetros estudiados. En cuatro series^{27, 42, 44, 56}, tres de ellas con grupo control^{27, 42, 56}, más del 50% de los pacientes, presentan alteraciones en las pruebas de función pulmonar, siendo la alteración más frecuente el descenso de la difusión.

Esta alteración de los parámetros de función pulmonar parece obedecer a la presencia de una afectación respiratoria subclínica en una importante proporción de pacientes.

Aunque los mecanismos de estas alteraciones no son bien conocidos, en parte podrían ser el resultado de la producción incrementada de aniones superóxido por los

macrófagos alveolares y un dato que apoya esta teoría sería el incremento de la permeabilidad pulmonar encontrada en dos estudios^{48,53}.

5-MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.

En los últimos años se han realizado importantes esfuerzos para identificar la inflamación bronquial mediante métodos no invasivos. La determinación de óxido nítrico en aire exhalado (ENO), ha recibido mayor atención en los últimos años que otros mediadores volátiles⁵⁷ (monóxido de carbono, etano, pentano etc).

En 1991, Gustafsson y cols identificaron este marcador en aire exhalado, demostrándose posteriormente que sus niveles estaban incrementados en el asma⁵⁸. En los últimos años se han seguido publicando cientos de investigaciones sobre este mediador, fundamentalmente en la enfermedad asmática, aunque también se ha encontrado elevado en otras entidades pulmonares como bronquiectasias⁵⁹, fibrosis pulmonar idiopática⁶⁰, tuberculosis pulmonar⁶¹, infecciones respiratorias víricas⁶² etc.

El óxido nítrico (NO) endógeno se genera a partir de la L-arginina, mediante la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS) (**figura 1**). Existen al menos tres isoformas de esta enzima, dos de las cuales se expresan constitutivamente e incluyen la NOS neuronal (NOS1 o nNOS), expresada predominantemente en neuronas y la NOS endotelial (NOS3 o eNOS) que se expresa sobre todo en las células endoteliales. La tercera isoforma es la inducible (NOS2 o iNOS), que tiene una actividad mucho mayor que las anteriores y puede inducirse por citocinas inflamatorias, endotoxinas e infecciones víricas y cuya expresión se incrementa en las enfermedades inflamatorias.

La expresión de la iNOS se ha detectado en una gran variedad de células del tracto respiratorio (células epiteliales y alveolares tipo 2, fibroblastos, células del músculo liso bronquial) y otras células inflamatorias como eosinófilos y neutrófilos⁶³, aunque parece que este mediador procede en gran medida de las células del epitelio bronquial⁶⁴.

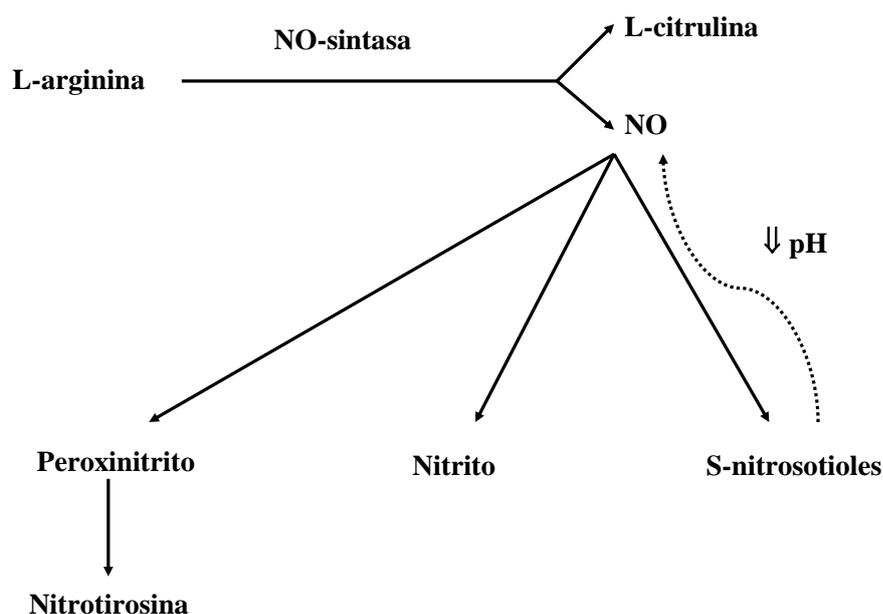


Figura 1. Síntesis de NO en las vías aéreas. Modificado de Prieto⁶⁶.

En enfermedades respiratorias se ha observado también que el incremento de las concentraciones de ENO puede deberse, al menos en parte, a su generación a través de una vía no enzimática (a partir de los s-nitrosotioles y también a partir de la protonación del nitrito para formar nitroso que libera NO a pH ácido)⁶⁵.

En el aparato respiratorio el NO se produce a lo largo de todo el árbol respiratorio, desde la nariz a los alvéolos. La producción de NO en las vías aéreas y los efectos de los diferentes factores que pueden influir sobre su determinación en el aire exhalado puede explicarse utilizando un modelo bicompartimental. El primer compartimento es el alveolar y el segundo el bronquial.

Durante la espiración, el NO del aire alveolar, es transportado a través de las vías aéreas donde se enriquecerá con el NO procedente de la difusión del NO a través de la pared bronquial. Esta difusión se realiza de acuerdo con la ley de Fick, por la diferencia de gradiente entre la concentración de NO en la pared y en la columna de aire procedente del alveolo. De esta manera, en cada punto de la luz bronquial la concentración de NO en el aire exhalado dependerá del flujo del aire desde el alveolo al

punto en cuestión y de la capacidad de difusión de NO desde la pared bronquial hasta la luz (**Figura 2**).

La difusión del NO hacia la luz bronquial (dNO) dependerá de la concentración de NO en la pared bronquial (Cw), resultado del equilibrio entre su producción y eliminación.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que la velocidad del flujo de exhalación determina qué compartimento contribuye más a la concentración de NO final. Así, a flujos espiratorios altos el tiempo para que el NO difunda hacia la columna de aire disminuye, predominando el NO alveolar, mientras que a flujos menores predomina el NO que difunde desde la pared bronquial⁶⁷.

Además, la capacidad de difusión de NO (dNO) está influenciada por el grosor de la pared bronquial y por la superficie de difusión, de tal forma que disminuciones en la superficie de difusión deberían alterar la capacidad de difusión, disminuyéndola, como por ejemplo ocurre tras la broncoconstricción inducida por histamina⁶⁸ u otros agentes. Por el contrario aumentos en la superficie de difusión⁶⁹, como los que ocurren en el asma como consecuencia del proceso inflamatorio, producen un incremento de la misma (**Figura 2**).

No son muchos los trabajos que han determinado los niveles de ENO en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. En 24 pacientes con colitis ulcerosa y 31 con enfermedad de Crohn, Koek y cols⁷⁰ encontraron niveles elevados [13,5±4,6 partes por billón (ppb) en enfermedad de Crohn y 15,8±6,2 ppb en colitis ulcerosa], comparado con controles sanos 10,2±2,5ppb (p<0,05 comparado con enfermedad de Crohn y p<0,01 comparado con colitis ulcerosa). Existía una correlación significativa entre el ENO y la actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal, siendo más fuerte en la colitis ulcerosa. En este último proceso los valores de ENO tendían a ser más elevados en aquellos pacientes con enfermedad más extensa, aunque sin alcanzar la significación. Así mismo, los valores de ENO eran mas altos en la colitis ulcerosa que en la enfermedad de Crohn, pero sin alcanzar la significación estadística. Los autores atribuyen esta elevación a la liberación desde el intestino de citocinas proinflamatorias que podrían favorecer la síntesis de la iNOS en el pulmón.

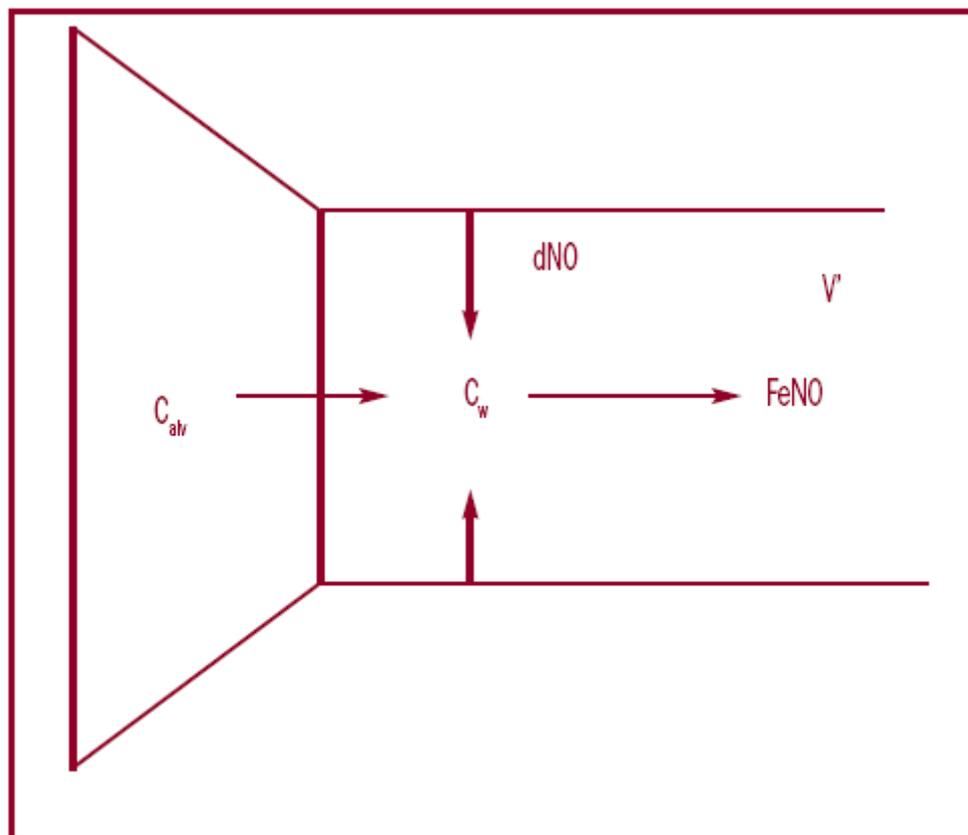


Figura 2. Modelo bicompartimental de ENO. C_{alv} =concentración alveolar de NO. C_w = concentración de NO en la pared de las vías aéreas. dNO =capacidad de difusión de NO. V' = flujo. $FeNO$ = fracción de óxido nítrico exhalado. Tomado de Óxido nítrico en aire exhalado. Bruno L, Ferrer A, Gutierrez V ⁷¹.

Sin embargo, Kanazawa y Yoshikawa⁷² no encuentran una elevación de ENO en sus pacientes con colitis ulcerosa, comparando con controles sanos.

Kimura⁷³ aprecia un aumento de la iNOS en la mucosa intestinal inflamada de la enfermedad inflamatoria intestinal, que generará una mayor producción de NO a nivel del colon. Sin embargo esta mayor producción de NO no es responsable del incremento de óxido nítrico en aire exhalado encontrado en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal ya que el NO es rápidamente inactivado formándose nitratos y nitritos plasmáticos que es lo que aparece elevado en pacientes con enfermedad inflamatoria activa con respecto a controles.

Desde 1989, distintos grupos de trabajo han contribuido a estandarizar la técnica del esputo inducido para la evaluación del componente inflamatorio bronquial, sin

necesidad de recurrir a métodos más agresivos como el BAL. De este modo se ha constatado que los recuentos celulares de muestras de esputo consecutivas, son altamente reproducibles y comparables a los obtenidos en el BAL ⁷⁴.

Mediante estudios de esputo inducido Louis y cols⁷⁵ demostraron, en niños con enfermedad de Crohn, un alto número de eosinófilos y de proteína catiónica eosinofílica (PCE) en el esputo, de similar magnitud al encontrado en asmáticos leves o moderados. Estos hallazgos diferían de los comunicados por Bonniere y cols²⁸, también en pacientes con enfermedad de Crohn, que habían identificado un incremento de los linfocitos en el BAL. Los autores argumentan que las diferencias citológicas entre ambos estudios pueden explicarse por la diferente procedencia de las células (proximales en el caso del esputo y más distales en el caso del BAL).

Sin embargo Fireman y cols⁷⁶ identificaron un cociente CD_4/CD_8 anormal en el esputo de un 65% de sus pacientes con enfermedad de Crohn sin alteraciones radiológicas, clínicas ni espirométricas. El número de linfocitos y neutrófilos fue también mayor en los pacientes que en los controles, sin apreciarse diferencias en el recuento de eosinófilos. Estos hallazgos fueron similares a los encontrados por Bonniere y cols²⁸ que comunicaron una proporción CD_4/CD_8 anormal en las muestras de BAL en un 54% de los pacientes.

En pacientes con colitis ulcerosa, Kanazawa y Yoshihawa⁷² no encontraron incremento en el número de eosinófilos en el esputo inducido. Por el contrario, otros investigadores⁵² identificaron un patrón sugestivo de alveolitis en el 50% de las muestras de BAL de pacientes con este proceso.

En resumen, los estudios que tratan de dilucidar la posible existencia de un componente inflamatorio en los bronquios de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal son escasos y en ocasiones aportan resultados contradictorios.

6-HIPERRESPUESTA BRONQUIAL A AGONISTAS DIRECTOS E INDIRECTOS Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.

La hiperrespuesta bronquial (HRB) es la capacidad de las vías áreas para responder fácil, rápida e intensamente a la estimulación mediante diferentes estímulos no inmunológicos. En la **tabla 5** se detallan los estímulos que se han utilizado para determinar la presencia y el grado de HRB. Aunque los mecanismos que originan esta respuesta exagerada no están definitivamente aclarados, parece que la inflamación bronquial es uno de los factores más relevantes en su patogenia⁷⁷.

Para determinar la presencia e intensidad de esta HRB clásicamente se han utilizado agonistas directos⁷⁸ (metacolina o histamina). Estos agentes actúan directamente sobre receptores específicos localizados en el músculo liso bronquial sin involucrar mecanismos intermedios⁷⁹. Por tanto la respuesta a los mismos viene determinada por las alteraciones estructurales de la pared bronquial y por las modificaciones de la interdependencia entre las vías aéreas y parénquima pulmonar^{80, 81}. La respuesta a estos agonistas dependerá no sólo de la presencia de inflamación bronquial activa, sino también y quizás en mayor medida, de la presencia de alteraciones persistentes en la estructura de la pared bronquial.

Tabla 5. Estímulos broncoconstrictores

| AGONISTAS INDIRECTOS | AGONISTAS DIRECTOS |
|--|--|
| Estímulos físicos y físico-químicos: -Ejercicio. -Estímulos osmóticos: aerosoles hipertónicos, hipotónicos, manitol. -Ventilación voluntaria eucápnica con aire frío. | Agonistas colinérgicos: -Acetilcolina. -Metacolina. -Carbacol. |
| Estímulos farmacológicos -Adenosina/AMP. -Taquicininas: sustancia P, neurocinina A. -Brdicininina. -Metabisulfito/Dióxido de sulfuro. -Propanolol. -Acetaldehido. | Histamina. Prostaglandina D₂/F_{2α} Leucotrienos C₄/D₄/E₄ |
| AMP= adenosina 5' monofosfato. | |

No son muchos los autores que han estudiado la HRB a agonistas directos (metacolina, histamina) en la enfermedad inflamatoria intestinal (**tabla 6**). Louis y cols⁸², encontraron que un 45% de sus 38 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (tanto colitis ulcerosa como enfermedad de Crohn), tenían HRB a la metacolina, frente a un 17% de los 24 controles ($p < 0,03$). Los autores no encontraron relación con la actividad o extensión de la enfermedad.

En niños con enfermedad de Crohn⁸³ se ha detectado con frecuencia (71%) una respuesta positiva a metacolina. Además este incremento de la respuesta se detectaba tanto en atópicos como en no atópicos y al igual que en el estudio de Louis y cols⁸², su intensidad no se correlacionaba con la actividad de la enfermedad.

Tabla 6. Prevalencia de HRB a agonistas directos en la enfermedad inflamatoria intestinal

| Autor | Ref | Año | Agonista | Nº pacientes | Punto de corte | Prevalencia% |
|----------|-----|------|------------|--------------|-------------------------------|------------------|
| Louis | 82 | 1995 | Metacolina | 11CU 27EC | PC ₂₀ < 16mg/ml | 36% CU 48% EC |
| Mansi* | 83 | 2000 | Metacolina | 14 EC | PD ₂₀ < 2600 µg | 71% |
| Kullmann | 84 | 1998 | Metacolina | 25CU 35EC | No referido | 8% CU 20%EC |
| Ceyhan | 85 | 2003 | Metacolina | 19CU 11EC | PD ₂₀ < 16mg/ml | 16%CU 18%EC |

CU= colitis ulcerosa; EC= enfermedad de Crohn; PC₂₀= concentración de agonista necesaria para inducir un deterioro del volumen espiratorio forzado en el primer segundo de un 20%.

*=niños.

Kullman y cols⁸⁴ encontraron que un 20% de sus pacientes con enfermedad de Crohn y un 8% de los que padecían colitis ulcerosa tenían HRB a metacolina, señalando

los autores que esta incidencia era mayor que en la población general. Sin embargo otro grupo⁸⁵ no halló un incremento significativo del grado de HRB a metacolina en sus pacientes comparado con los sujetos de su grupo control.

En 1981 Cushey y cols demostraron que la adenosina (un nucleósido purínico) inhalada inducía broncoconstricción en pacientes asmáticos⁸⁶. Con posterioridad, este mismo grupo de investigadores describieron que la adenosina 5' monofosfato (AMP) se transformaba rápidamente in vivo en adenosina e inducía efectos similares, con la ventaja de su mayor solubilidad⁸⁷. La AMP pertenece al grupo de los agentes broncoconstrictores indirectos, pues induce broncoconstricción estimulando la liberación de mediadores por determinadas células inflamatorias. (**Figura 3**)

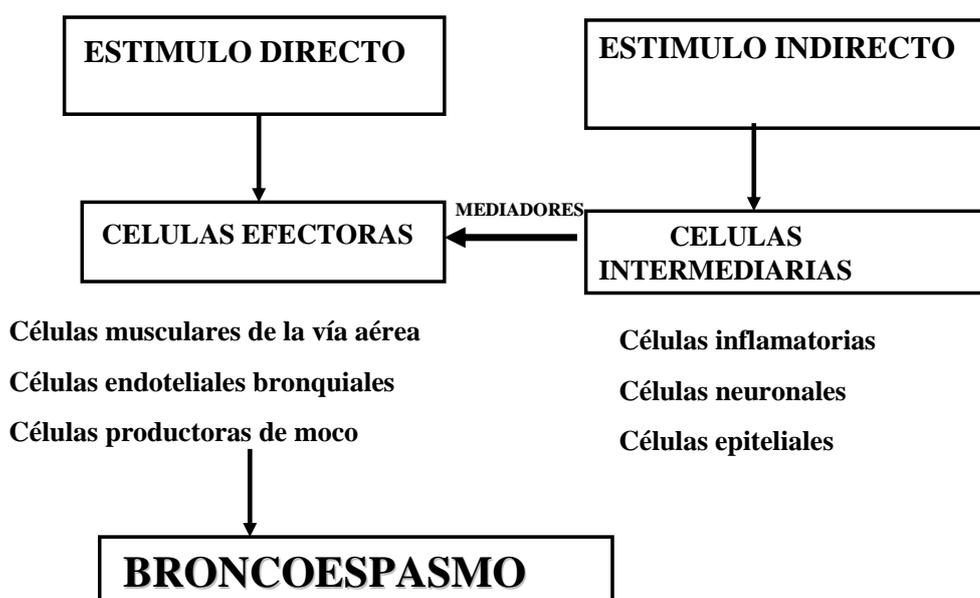


Figura 3. Diferencias en el mecanismo celular de la broncoconstricción inducida por agonistas directos e indirectos.

En particular, AMP estimula al receptor A_{2B} del mastocito, generándose la liberación de sus mediadores (histamina, leucotrienos, prostaglandinas y otros) que producirán broncoconstricción⁸⁸⁻⁹⁰. También, aunque de forma menos importante, este

agente produce broncoconstricción a través de la liberación de neuropéptidos procedentes de terminaciones nerviosas sensoriales y mediante un reflejo axónico⁹¹. (Figura 4).

En los pacientes asmáticos, algunas evidencias^{92, 93} sugieren que la respuesta a AMP se relaciona mejor que la respuesta a agonistas directos con el grado de inflamación bronquial activa. Sin embargo, la respuesta bronquial a la estimulación con este agonista en la enfermedad inflamatoria intestinal no se ha estudiado hasta la actualidad.

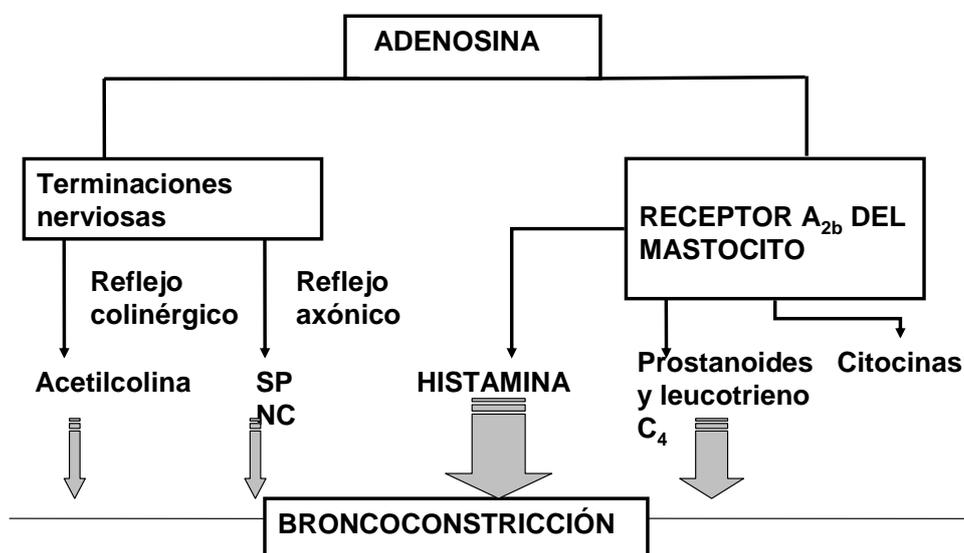


Figura 4. Mecanismos celulares de la broncoconstricción inducida por adenosina.

Tomado de Polosa⁹⁰. SP= sustancia P; NC= neurocinina.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Son muchos los datos experimentales que demuestran que, al menos en los pacientes con patología respiratoria, la información aportada por el estudio de la respuesta a agonistas directos e indirectos es complementaria, pues los primeros identifican alteraciones estructurales persistentes y déficit funcional⁹², mientras que los segundos detectan inflamación bronquial activa⁹²⁻⁹⁴. Además generalmente se acepta que la determinación de la concentración de óxido nítrico en el aire exhalado⁹⁵ aporta información acerca del grado de inflamación bronquial, aunque los argumentos que fundamentan esta afirmación no son suficientemente sólidos.

Por otra parte, son muchas las evidencias a favor de la presencia de alteraciones inflamatorias evidentes en el parénquima y en las vías aéreas de los pacientes con colitis ulcerosa^{22, 24, 96-98} e igualmente parece claro que la afectación respiratoria subclínica^{27, 31, 48, 53} (sin síntomas identificables) no es infrecuente en este proceso.

De acuerdo con los datos experimentales anteriores, nosotros razonamos que la identificación de la respuesta a la inhalación de AMP debería estar afectada más precozmente que la respuesta a metacolina en los pacientes con colitis ulcerosa y debería mostrar una relación más directa con el grado de inflamación bronquial identificada por la concentración de ENO.

En consecuencia, nuestra HIPÓTESIS DE TRABAJO postula que, en los pacientes con colitis ulcerosa, la utilización conjunta de los marcadores de inflamación bronquial (respuesta a AMP y ENO) pudiera identificar “precozmente” la presencia de alteraciones pulmonares inflamatorias subclínicas.

Si la hipótesis anterior se confirmase, en el futuro pudiera resultar interesante determinar la capacidad de estos marcadores para identificar a los individuos con colitis ulcerosa que presentan mayor riesgo de sufrir manifestaciones pulmonares.

OBJETIVOS

De acuerdo con la hipótesis de trabajo indicada previamente, los objetivos del presente estudio fueron:

Objetivo principal:

Identificar diferencias en la prevalencia y grado de hiperrespuesta bronquial a AMP y en las concentraciones de ENO entre individuos con colitis ulcerosa y controles sanos.

Objetivos secundarios:

- Identificar la prevalencia de HRB a metacolina en pacientes con colitis ulcerosa.
- Determinar la relación entre la respuesta a metacolina y AMP.
- Determinar la relación entre la respuesta a ambos broncoconstrictores y la concentración de ENO.
- Identificar la relación entre los marcadores de inflamación bronquial y la actividad de la enfermedad

PACIENTES

Y

MÉTODOS

1-CONSIDERACIONES SOBRE EL TAMAÑO DE LA MUESTRA

El objetivo principal del presente estudio fue identificar diferencias en la prevalencia de hiperrespuesta bronquial a AMP y en las concentraciones de ENO entre individuos con colitis ulcerosa y controles sanos. En consecuencia las dos variables principales fueron:

- Broncoconstricción en respuesta a AMP
- Concentración de ENO

Para el cálculo del tamaño de la muestra, la respuesta bronquial a AMP se consideró como variable categórica (presencia o ausencia de broncoconstricción, es decir, caída del $FEV_1 \geq 20\%$ con una concentración de AMP $\leq 400\text{mg/ml}$). Estudios previos han encontrado una prevalencia de broncoconstricción en respuesta a AMP $< 5\%$ en individuos sanos^{99, 100}, pero no existen datos en la literatura acerca de la prevalencia de respuesta a este agonista en los pacientes con colitis ulcerosa.

Se fijó como clínicamente relevante una diferencia en la prevalencia de broncoconstricción en respuesta a AMP del 35%, asumiendo una prevalencia de esta respuesta, en la población sana del 5%. Asumiendo un riesgo $\alpha = 0,05$ y un riesgo $\beta = 0,20$ (poder = 0,80) se calculó que eran necesarios 22 pacientes en el grupo de estudio y 17 en el grupo control.

La dispersión de los valores ENO en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal se ha tomado del estudio de Koek y cols⁷⁰. Aunque el método utilizado por estos autores utiliza un flujo mayor que el que se usó en el presente estudio, la desviación típica para el ENO en la colitis ulcerosa es de 6,4 ppb. Se fijó como clínicamente relevante una diferencia entre las dos poblaciones de 7 ppb. Aceptando un error $\alpha = 0,05$ y un poder $(1-\beta)$ de 0,80, es necesario analizar 14 pacientes en cada grupo.

En consecuencia, aceptando un número aproximado de pérdidas de un 15%, se programó la inclusión de 25 pacientes con colitis ulcerosa y 20 controles.

2-PACIENTES CON COLITIS ULCEROSA

Los 24 pacientes con colitis ulcerosa nos fueron remitidos por el Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Universitario Dr. Peset. El diagnóstico de colitis ulcerosa, fue establecido de acuerdo a los siguientes criterios, universalmente aceptados^{7, 9-11}: historia clínica, afectación radiográfica del tracto gastrointestinal, hallazgos endoscópicos, estudio histológico y afectación sistémica. Se incluyeron pacientes adultos (>18 años) en fase activa o en fase de remisión de acuerdo con el índice de Truelove y Witts modificado¹⁷. Ninguno de los individuos seleccionados presentaba síntomas o signos de afectación pulmonar, como tos, expectoración, disnea (en reposo o de esfuerzo) o sibilantes ni tenía antecedentes de enfermedades pulmonares previas (bronquiectasias, bronquitis crónica o enfisema). Se exigió también que la radiografía de tórax fuese normal. Ninguno de los participantes había recibido tratamiento con corticoides sistémicos o padecido una infección de las vías respiratorias superiores o inferiores, en las cuatro semanas previas al estudio.

Se excluyeron fumadores y exfumadores que hubiesen abandonado el hábito menos de 6 meses antes. Todos los pacientes incluidos en el estudio presentaban una función pulmonar basal normal (FEV_1 y $FVC \geq 80\%$ del teórico). No se seleccionaron pacientes con historia de rinitis crónica (rinorrea, estornudos, obstrucción nasal) persistente o episódica ni de eczema atópico, así como mujeres embarazadas o que estuvieran lactando a sus hijos.

No se incluyeron pacientes con otras enfermedades concomitantes como: hipertensión no controlada, diabetes mellitus insulino-dependiente, hepatopatía crónica, nefropatía, hipo-hipertiroidismo, enfermedades cardiovasculares, procesos convulsivos, procesos malignos o cualquier otro proceso que no hiciese recomendable su selección. Se excluyeron así mismo individuos con alcoholismo, drogo-dependencias, enfermedades mentales y otros factores que pudiesen limitar la capacidad de colaboración.

3-GRUPO CONTROL

El grupo control estuvo constituido por 24 individuos adultos (>18 años) sanos reclutados de forma voluntaria entre estudiantes, familiares de los pacientes y personal del hospital. Se excluyeron fumadores o exfumadores que hubiesen abandonado el hábito menos de 6 meses antes. Ninguno refería síntomas actuales o en el pasado de colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. No tenían síntomas respiratorios actuales ni previos al estudio (disnea sibilante, tos o expectoración crónica), ni antecedentes de rinitis alérgica, rinitis crónica (vasomotora o intrínseca), poliposis nasal y eczema atópico.

Ninguno había recibido tratamiento con esteroides sistémicos ni había presentado una infección respiratoria en las 4 semanas previas al estudio. Se exigió una función pulmonar basal normal (FEV_1 y $FVC \geq 80\%$ del teórico). No se incluyeron mujeres embarazadas o que estuvieran lactando a sus hijos, ni individuos con otras enfermedades concomitantes como hipertensión no controlada, diabetes mellitus insulino-dependiente, hepatopatía crónica, nefropatía, hipo-hipertiroidismo, enfermedades cardiovasculares, procesos convulsivos o procesos malignos. Finalmente se excluyeron individuos con alcoholismo, drogo-dependencias, enfermedades mentales y otros factores que pudiesen limitar su capacidad de colaboración.

4-DISEÑO DEL ESTUDIO.

El presente estudio tuvo un diseño transversal y abierto, si bien el orden de las exploraciones con uno u otro broncoconstrictor se aleatorizó. Los pacientes y controles fueron informados de los objetivos y métodos utilizados en el estudio, pero debido a la ausencia de agresividad y de riesgo (en manos expertas) de los métodos, únicamente se solicitó su consentimiento oral.

El estudio se completó en 3 visitas y los procedimientos realizados en cada una de ellas se indican en la **tabla 7**.

Procedimientos de la visita 1:

En la visita 1 se explicaron los procedimientos del estudio y se solicitó el consentimiento verbal. Se recogió la información acerca de las características clínicas del paciente, bien directamente de la historia clínica o mediante preguntas concretas. La información relevante de la historia clínica en lo referente a la enfermedad inflamatoria intestinal fue: la localización de la enfermedad, su actividad, tratamiento actual, años de evolución, existencia de otras manifestaciones extraintestinales y necesidad de tratamiento quirúrgico.

Tanto en los pacientes como en los controles se recabó información acerca de otras patologías alérgicas (rinitis, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma) y no alérgicas.

Se analizaron los criterios de inclusión y de exclusión.

Se efectuó una exploración física que incluyó el aspecto general, cabello, piel, ganglios linfáticos, cabeza, ojos, nariz, faringe, auscultación cardio-respiratoria, abdomen, sistema músculo-esquelético, estado mental y estado neurológico. Se determinaron las constantes vitales (frecuencia respiratoria y cardiaca, presión sistólica y diastólica), peso y altura.

En los pacientes con colitis ulcerosa, se solicitó una radiografía de tórax si no se había realizado en los últimos 12 meses.

Procedimientos de la visita 2:

A los pacientes y controles del sexo femenino en edad fértil, se les realizó prueba de embarazo en orina.

Se efectuaron las pruebas cutáneas con los alérgenos relevantes de nuestro medio. Se realizó la determinación de óxido nítrico en aire exhalado, espirometría y provocación bronquial con metacolina o AMP con un orden aleatorizado.

Procedimientos de la visita 3 (tres a siete días después de la visita 2):

Se realizó determinación de óxido nítrico en aire exhalado, espirometría y la provocación bronquial con el broncoconstrictor no empleado en la visita 2.

Tabla 7. Procedimientos realizados en cada visita

| Visita | 1 Selección | 2 | 3 |
|---|-------------|---|---|
| Consentimiento informado | * | | |
| Características clínicas | * | | |
| Criterios de inclusión/exclusión | * | | |
| Constantes vitales | * | | |
| Exploración física | * | | |
| Prueba de embarazo | | * | |
| Pruebas cutáneas | | * | |
| Función pulmonar | | * | * |
| PC ₂₀ metacolina # | | | * |
| PC ₂₀ AMP # | | * | |
| NO exhalado | | * | * |
| Rx de tórax ☒ | * | | |
| PC ₂₀ = concentración de agonista que induce un deterioro del FEV ₁ del 20% # : las exploraciones con metacolina y con AMP se realizaron con un intervalo de 3-7 días entre las mismas. El orden de las exploraciones se aleatorizó. ☒ : si no se había realizado en los últimos 12 meses | | | |

5-MÉTODOS.

5.1 Pruebas cutáneas.

Las pruebas cutáneas se realizaron mediante el método de prick test. En esta prueba se coloca una gota del alérgeno en la superficie volar del antebrazo puncionándose la piel (a través de dicha gota) con una lanceta de acero Prick Lanceter (DHS BAYER Química Farmacéutica Bayer, Valdemoro Madrid). La punta de esta lanceta es de 1mm de longitud y un ángulo de inclusión de 25°. Su longitud es de 3 cm y su anchura de 5mm. Se realiza la punción (a través de dicha gota) de la piel. La lectura se efectuó a los 15 minutos.

Se consideró una respuesta positiva si se obtenía una pápula¹⁰¹ ≥ 3 mm en ausencia de respuesta al diluyente (glicerosalino al 50%).

Los alérgenos estudiados, fueron los más relevantes en nuestro medio como inductores de patología alérgica respiratoria: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, epitelio de perro, epitelio de gato, polen de platanus acerifolia, cupresus arizónica, olea europea, mezcla de gramíneas no cultivadas, *cynodon dactylon*, *phragmites comunis*, *parietaria judaica*, *chenopodium album*, *salsola kali*, *plantago lanceolata* y *artemisia vulgaris*, así como hongos aerógenos (*alternaria alternata*, *aspergillus fumigatus*, *cladosporium herbarum* y *penicillium notatum*).

Para valorar las reacciones no específicas que se pueden producir en la piel por el trauma de las lancetas se realizó una prueba con una solución de glicerosalino, utilizada como control negativo. Para demostrar la normal reactividad de la piel se realizó un control positivo, en nuestro caso dihidrocloruro de histamina a 10 mg/ml considerándose una pápula adecuada aquella ≥ 3 mm.

5.2 Espirometría.

Las espirometrías fueron realizadas con un neumotacógrafo (Jaeger MasterScope, Erich Jaeger GmbH, Würzburg, Germany) que cumplía los requisitos

técnicos de la American Thoracic Society¹⁰². Para la realización técnica e interpretación de la exploración se siguió la normativa de la American Thoracic Society^{102, 103}.

El espirómetro se calibró diariamente, utilizando una jeringa con capacidad de calibración de 1 litro. Para mantener la nariz ocluida se utilizó pinza nasal. Se verificó que el paciente fuese capaz de realizar maniobras técnicamente correctas¹⁰³ y repetibles (variaciones del $FEV_1 \leq 5\%$ o ≤ 100 ml entre las 3 mejores). Para el análisis se eligió aquella maniobra con mayor suma FEV_1+FVC .

Como valores de referencia se utilizaron los de la Comunidad Europea del Carbón y del Acero (CECA)^{104, 105}.

5.3 Provocación bronquial con metacolina.

La exploración se realizó de acuerdo con el método dosimétrico descrito por Chai y cols¹⁰⁶, adaptado a la normativa posterior de la American Thoracic Society¹⁰⁷. Tanto la solución salina como las diferentes concentraciones de metacolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) se generaron por medio de un nebulizador Mefar calibrado, activado por un dosímetro MEFAR MB3 (Mefar, Bovezzo. Italia)

El nebulizador calibrado para la prueba de provocación con metacolina se calibró para un débito de $10\mu\text{l} \pm 10\%$ tras cada activación de un segundo. Antes de iniciar la exploración, se adiestró al paciente hasta que fue capaz de realizar las maniobras de inhalación correctamente. El paciente realizó una espiración hasta su capacidad residual funcional y, tras adaptar la boca a la boquilla del nebulizador, realizó una inspiración lenta y profunda, hasta su capacidad inspiratoria. A continuación y sin período de apnea en inspiración, retiró el nebulizador de la boca y respiró aire ambiental normalmente. Esta fase de adiestramiento se utilizó también para ajustar la sensibilidad del termistor del dosímetro, de manera que se disparara al inicio de la inspiración (ver programación del dosímetro). Durante el período de inhalación, el paciente mantuvo la nariz ocluida mediante una pinza nasal.

Tras realizar 5 inhalaciones de salino se nebulizaron concentraciones dobles (5 inhalaciones) de metacolina entre 0,39 y 25mg/ml. Después de la inhalación de salino y de cada concentración de metacolina se efectuó una única espirometría, a no ser que la maniobra se considerase técnicamente incorrecta o el paciente sufriera tos durante los dos primeros segundos de la espiración. De esta manera se trató de evitar el efecto de las maniobras inspiratorias repetidas sobre el FEV_1 ¹⁰⁸.

La descripción por pasos de la exploración con metacolina se aporta a continuación:

1. Se completó el cuestionario acerca de situación clínica basal y períodos de supresión de fármacos.
2. Se realizaron al menos tres maniobras espirométricas basales correctas y repetibles. La repetibilidad estuvo definida por una variabilidad del $FEV_1 \leq 5\%$ o $\leq 100\text{ml}$ entre las tres maniobras mejores
3. Se confirmó que la función pulmonar basal era aceptable ($FEV_1 \geq 80\%$; $FVC \geq 80\%$ y $FEV_1 / FVC\% \geq 65\%$).
4. Se adiestró al paciente en las maniobras de inhalación mediante el dosímetro.
5. Se adaptó la sensibilidad del termistor a la capacidad inspiratoria del paciente como se indica en el apartado “programación del dosímetro”.
6. En el nebulizador se colocaron 2 ml de salino y de cada una de las concentraciones de broncoconstrictor a administrar
7. Se inició la exploración administrando 5 inhalaciones de suero fisiológico. La espirometría se efectuó al cabo de 60 a 90 segundos. El valor del FEV_1 obtenido se consideró el de referencia y con el se compararon los obtenidos tras cada concentración del agonista.
8. A continuación se comenzó con la primera concentración de metacolina (5 inhalaciones) realizando espirometría con el mismo intervalo (60-90segundos). Se calculó el porcentaje de caída del FEV_1 con respecto al valor tras salino mediante la siguiente fórmula: $[(FEV_1 \text{ postsalino} - FEV_1 \text{ post-metacolina}) / FEV_1 \text{ post-salino}] \times 100$.
9. Se continuó con las concentraciones progresivas de metacolina, de manera idéntica al punto 8. Se realizó una única maniobra tras cada concentración de metacolina, a no ser que la misma fuese técnicamente incorrecta, con el fin de

evitar el efecto acumulativo de las inspiraciones forzadas repetidas sobre el FEV_1^{108} .

10. Se interrumpió la exploración tras administrar la concentración de 25 mg/ml o cuando se detectaron deterioros del $FEV_1 \geq 20\%$ tras alguna concentración.
11. Si el FEV_1 era inferior al 90% del post-salino al finalizar la prueba, se administraron 200 μ g de salbutamol (2 inhalaciones de Ventolin®) confirmándose, al cabo de 15-20 minutos, que el FEV_1 había revertido a valores $\geq 90\%$ del post-salino.
12. El resultado de la exploración con metacolina se expresó mediante la PC_{20} (concentración de agonista necesaria para inducir un deterioro del FEV_1 del 20%). El cálculo de la PC_{20} se realizó mediante la siguiente fórmula de interpolación logarítmica:

$$PC_{20} = \text{antilog} \left[\log C_1 + \frac{(\log C_2 - \log C_1) (20 - R_1)}{R_2 - R_1} \right]$$

Donde:

- C_1 = concentración de metacolina que induce una caída del FEV_1 inmediatamente inferior al 20%.
- C_2 = Concentración de metacolina que induce una caída del FEV_1 inmediatamente superior al 20%.
- R_1 = Porcentaje de caída del FEV_1 obtenido tras la concentración C_1 .
- R_2 = Porcentaje de caída del FEV_1 obtenido tras la concentración C_2 .

5.4 Provocación bronquial con AMP.

La exploración se realizó mediante una técnica similar a la descrita para metacolina. Tanto la solución salina como las diferentes concentraciones de AMP (Adenosine 5' monophosphate, sodium salt; Sigma Chem. St Louis, MO, USA) se

generaron por medio de un nebulizador Mefar calibrado, activado por un dosímetro MEFAR MB3 (Mefar, Bovezzo. Italia).

El nebulizador calibrado para la prueba de provocación con AMP se calibró para un débito de $10\mu\text{l} \pm 10\%$ tras cada activación de un segundo. Antes de iniciar la exploración, se adiestró al paciente hasta que fue capaz de realizar las maniobras de inhalación correctamente. El paciente realizó una espiración hasta su capacidad residual funcional y, tras adaptar la boca a la boquilla del nebulizador, efectuó una inspiración lenta y profunda, hasta su capacidad inspiratoria. A continuación y sin período de apnea en inspiración, se retiró el nebulizador de la boca respirándose aire ambiental normalmente. Esta fase de adiestramiento se utilizó también para ajustar la sensibilidad del termistor del dosímetro, de manera que se disparase al inicio de la inspiración (ver programación del dosímetro). Durante el período de inhalación, el paciente mantuvo la nariz ocluida mediante una pinza nasal.

Tras realizar 5 inhalaciones de salino se nebulizaron concentraciones dobles (5 inhalaciones) de AMP entre 3,12 y 400 mg/ml. Después de la inhalación de salino y de cada concentración de AMP se realizó una única espirometría, a no ser que la maniobra se considerase técnicamente incorrecta o el paciente hubiese sufrido tos durante los dos primeros segundos de la espiración. De esta manera se trató de evitar el efecto de las maniobras inspiratorias repetidas sobre el FEV_1^{108} .

La descripción por pasos de la exploración con AMP se aporta a continuación:

1. Se completó el cuestionario acerca de situación clínica basal y períodos de supresión de fármacos.
2. Se realizaron al menos tres maniobras espirométricas basales correctas y repetibles. La repetibilidad estuvo definida por una variabilidad del $FEV_1 \leq 5\%$ o ≤ 100 ml entre las tres maniobras mejores.
3. Se confirmó que la función pulmonar basal era aceptable ($FEV_1 \geq 80\%$; $FVC \geq 80\%$ y $FEV_1 / FVC \geq 65\%$)
4. Se adiestró al paciente en las maniobras de inhalación mediante dosímetro.
5. Se adaptó la sensibilidad del termistor a la capacidad inspiratoria del paciente como se indica en el punto 2 del apartado “programación del dosímetro”.

6. En el nebulizador se colocaron 2 ml de salino y de cada una de las concentraciones de broncoconstrictor a administrar
7. Se inició la exploración administrando 5 inhalaciones de suero fisiológico. Se realizó la espirometría al cabo de 60 a 90 segundos. El valor del FEV₁ obtenido se consideró el de referencia y con el se compararon los obtenidos tras cada concentración del agonista.
8. Se continuó con la primera concentración de AMP (5 inhalaciones) realizando espirometría con el mismo intervalo (60-90segundos). Se calculó el porcentaje de caída del FEV₁ con respecto al valor tras salino mediante la siguiente fórmula: $[(FEV_1 \text{ postsalino} - FEV_1 \text{ post-AMP}) / FEV_1 \text{ post-salino}] \times 100$.
9. Se administraron las concentraciones progresivas de AMP, de manera idéntica al punto 8. Se realizó una única maniobra tras cada concentración de AMP, con el fin de evitar el efecto acumulativo de las inspiraciones forzadas repetidas sobre el FEV₁¹⁰⁸.
10. Se suspendió la exploración tras administrar la concentración de 400 mg/ml o cuando se detectaron deterioros del FEV₁ $\geq 20\%$ tras alguna concentración.
11. Si el FEV₁ era inferior al 90% post-salino al finalizar la prueba, se administraron 200 μg de salbutamol (2 inhalaciones de Ventolin®) confirmándose, al cabo de 15-20 minutos, que el FEV₁ había revertido a valores $\geq 90\%$ del post-salino.
12. El resultado de la exploración con AMP se expresó mediante la PC₂₀ (concentración de agonista necesaria para inducir un deterioro del FEV₁ del 20%). El cálculo de la PC₂₀ se realizó mediante la siguiente fórmula de interpolación logarítmica:

$$PC_{20} = \text{antilog} \left[\log C_1 + \frac{(\log C_2 - \log C_1) (20 - R_1)}{R_2 - R_1} \right]$$

Donde:

- C_1 = concentración de AMP que induce una caída del FEV_1 inmediatamente inferior al 20%.
- C_2 = Concentración de AMP que induce una caída del FEV_1 inmediatamente superior al 20%.
- R_1 = Porcentaje de caída del FEV_1 obtenido tras la concentración C_1 .
- R_2 = Porcentaje de caída del FEV_1 obtenido tras la concentración C_2 .

5.5 Programación del dosímetro.

1. El dosímetro MB3 fue programado, de acuerdo con los siguientes parámetros:
 - Tiempo de inhalación = 1.0 seg.
 - Tiempo de pausa = 06.0 seg.
 - Número de inhalaciones = 05
2. Se ajustó la sensibilidad del termistor a la capacidad inspiratoria de cada paciente. Para ello, se colocaron 2 ml de suero fisiológico en el nebulizador y se pidió al paciente que realizara una inspiración hasta capacidad inspiratoria (partiendo de su capacidad residual funcional). Se incrementó la sensibilidad del termistor hasta conseguir que se disparase con la inspiración.
3. Si, en alguna ocasión, el nebulizador no se activó durante la inspiración, se efectuó la activación manualmente al inicio de cada ciclo inspiratorio, mediante el interruptor de emergencia.

5.6 Determinación de óxido nítrico en aire exhalado.

En 21 de los 24 pacientes con colitis ulcerosa y en los 24 controles se efectuó la determinación de NO exhalado mediante un sistema de quimioluminiscencia (NIOX®, Aerocrine, Solna, Suecia), mientras que en 3 pacientes con colitis ulcerosa la determinación se realizó mediante un método electroquímico (NIOX-MINO®, Aerocrine, Solna, Suecia), por avería del trazador de quimioluminiscencia.

Ambos equipos se adaptan a los requerimientos técnicos de la American Thoracic Society^{95, 109} (presión en boca, flujo en boca, velocidad de toma de muestra, filtro para NO y ozono ambiental y ayuda visual para mantener un flujo uniforme). Ambos equipos aseguran el cierre del velo del paladar, mediante una resistencia a la espiración, lo que evita la contaminación de la muestra analizada por NO nasal. Las características de ambos sistemas se detallan en la **tabla 8**.

En el NIOX ® se prefijaron los siguientes parámetros en el trazador (de acuerdo con la normativa de la American Thoracic Society):

- Tiempo de espiración = 10 segundos.
- Espacio muerto (no analizable) = 0,7 L.
- Flujo máximo medio = 0,055 L/s.
- Flujo mínimo medio = 0,045 L/s.
- Flujo instantáneo mínimo = 0,0375 L/s.
- Flujo instantáneo máximo = 0,0626 L/s.
- Presión instantánea mínima = 5cm H₂O.
- Presión instantánea máxima = 20 cm H₂O.
- Máxima desviación permitida en plateau NO = 5ppb o 10%.
- Tiempo de demora mínimo entre dos determinaciones = 30 seg.
- Rango de la determinación para cálculo de plateau NO = 70-100% de la maniobra espirométrica.

A continuación se explicó detalladamente al paciente como debía realizar las maniobras, ayudándose de un adiestramiento visual. La maniobra comenzó con una espiración hasta capacidad residual funcional, sin conectarse al sistema. A continuación, el paciente adaptó los labios a la boquilla del trazador y realizó una inspiración máxima hasta capacidad pulmonar total (el aire inhalado por el paciente está libre de NO y de ozono). Inmediatamente y sin periodo de apnea, se realizó una espiración manteniendo un flujo adecuado y constante, para lo que se ayudó con una animación visual.

Se advirtió al paciente que debía realizar todas las maniobras sin respiración nasal, pero no se utilizó pinza nasal. La espiración frente a resistencia asegura el cierre del velo del paladar, con lo que se evita la contaminación del aire exhalado por el NO nasal.

Se realizaron tres determinaciones de ENO, que mostrasen concentraciones repetibles (variaciones $\pm 10\%$) y, entre las mismas, se respetó un período de al menos 30 segundos, durante el cual el paciente respiró aire ambiental a volumen corriente.

La señal luminosa detectada en la cámara de quimioluminiscencia del trazador (el NO reacciona con O_3 y la reacción libera un fotón) se transmite a una computadora, que registra además el flujo y la presión en la boca. La concentración de ENO se determina mediante el software apropiado, midiendo las concentraciones de ENO durante la fase final del plateau de la curva (tres últimos segundos). Además, durante el período de plateau debe mantenerse un flujo uniforme, sin variaciones importantes. Si no se consiguen estas condiciones, la maniobra se considera incorrecta.

La determinación de ENO se realizó antes de la espirometría y de la prueba de provocación bronquial con cada uno de los broncoconstrictores.

El dispositivo electroquímico para la determinación de ENO (NIOX-MINO[®] Aerocrine, Solna, Suecia), que fue utilizado en 3 pacientes, se adapta igualmente a los requerimientos de la American Thoracic Society⁹⁵ (**tabla 8**).

Existe la posibilidad de utilizar dos tiempos de espiración, de 10 segundos y de 6 segundos. En nuestro caso se utilizó el tiempo de espiración de 10 segundos.

Otras características del NIOX-MINO[®] son:

- Flujo máximo medio = 0,055 L/sg
- Flujo mínimo medio = 0,045 L/sg.
- Flujo instantáneo mínimo = 0,0375 L/s.
- Flujo instantáneo máximo = 0,0626 L/s.
- Presión instantánea mínima = 5 cm H₂O
- Presión instantánea máxima = 20 cm H₂O
- Tiempo de demora mínimo entre dos determinaciones: al menos 30 segundos.

La maniobra con este segundo sistema es idéntica a la descrita para el NIOX[®], pero la ayuda visual es diferente. Con el NIOX-MINO[®] los valores de ENO fueron determinados a partir de una única maniobra técnicamente correcta.

Tabla 8. Características de los equipos de detección de óxido nítrico en aire exhalado

| | Trazador de quimioluminiscencia NIOX ® | Método electroquímico NIOX-MINO® |
|---|--|---|
| Sensibilidad | 1,5ppb. | 5ppb. |
| Precisión | 0-200 ppb: $\pm 2,5$ ppb. 200-1000 ppb: $\pm 1\%$ | <50ppb: ± 5 ppb. ≥ 50 ppb: ± 10 ppb |
| Rango: Modo clínico Modo investigación | 0-200 ppb. 0-1000 ppb. | 5 -300 ppb |
| Tiempo de demora | <0,8sg. | <2min. |
| Frecuencia de muestreo | 20 Hz. | No especificado. |
| ppb = partes por billón. | | |

6- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables numéricas se han expresado mediante la media aritmética y el intervalo de confianza del 95% (95% IC), mientras que las categóricas se han expresado como número y porcentaje.

La respuesta bronquial a metacolina y AMP se ha considerado como variable categórica (presencia o ausencia de hiperrespuesta a cada agonista) y como numérica. Los puntos de corte para metacolina y AMP han sido 8mg/ml y 400mg/ml, respectivamente. Por tanto, se consideró que los individuos con valor de PC₂₀

metacolina $\leq 8\text{mg/ml}$ o valor de PC_{20} AMP $\leq 400\text{mg/ml}$ presentaban HRB a cada uno de los agonistas.

La expresión numérica de la respuesta bronquial a cada uno de los agonistas mediante el valor de la PC_{20} se vio dificultada por el escaso número de individuos en los que pudo obtenerse un deterioro del $\text{FEV}_1 \geq 20\%$. Debido al elevado número de valores censurados, la respuesta a metacolina y a AMP se expresó numéricamente mediante el denominado índice de reactividad (IR) propuesto por Burrows y cols¹¹⁰, que se ha utilizado en estudios previos realizados en nuestro centro¹¹¹. Este IR se calcula mediante el cociente entre la máxima caída del FEV_1 y el logaritmo de la última concentración de agonista administrado, expresado en mg/ml . Para evitar valores negativos (individuos en los que el FEV_1 aumentó con respecto al post-salino tras la dosis más alta de broncoconstrictor administrado) y ceros, se ha añadido un valor de 7 al valor de todos los individuos en el caso de AMP y de 2 en el caso de metacolina.

Para evaluar la normalidad de la distribución de las variables numéricas se ha utilizado la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Todas las variables mostraron distribución normal y se utilizó, por tanto, estadística paramétrica.

Las variables categóricas se analizaron mediante prueba exacta de Fisher, mientras que las numéricas se compararon mediante la *t* de Student para determinaciones independientes (con la corrección de Welch si las desviaciones estandar de la variable en cada grupo eran significativamente diferentes) o pareadas según procediese. Para determinar la relación entre variables numéricas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Valores de $p < 0,05$ (dos colas) se consideraron significativos estadísticamente.

El análisis se realizó mediante el programa InStat para Windows versión 3.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

1-CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO.

El estudio se realizó entre el mes de Abril del 2004 y Junio de 2006 y en total se incluyeron en el mismo 24 pacientes con colitis ulcerosa y 24 controles sanos.

1.1 Características clínicas de los pacientes con colitis ulcerosa.

La edad media (95% IC) de los pacientes con colitis ulcerosa era de 37 (30 - 43), con un rango de edad de 18 a 63 años. El 50% de ellos eran mujeres.

El 25% de los pacientes (6 de 24) tenían una colitis extensa. Uno de los pacientes (4%) sufría una proctitis y el 71% restante (17 de 24) estaban diagnosticados de colitis izquierda. A efectos del análisis estadístico, el único paciente con proctitis se incluyó dentro del grupo de pacientes con colitis izquierda. (**Tabla 9**).

Un 33% de los pacientes con colitis (8 de 24) tenían la enfermedad en fase activa⁽¹⁷⁾ (3 de ellos con colitis extensa y 5 colitis izquierda). En 13 pacientes con colitis izquierda y 3 con colitis extensa su enfermedad estaba en fase inactiva (**Tabla 9**).

Tabla 9. Distribución de actividad y extensión de la enfermedad.

| | ACTIVA | INACTIVA |
|------------------------------------|---------------|-----------------|
| COLITIS EXTENSA (n=6) | 3 (50) | 3 (50) |
| COLITIS IZQUIERDA (n=18) | 5 (28) | 13 (73) |
| Valores expresados como número (%) | | |

Ninguno de los pacientes había sufrido cirugía por la enfermedad y en 2 de los 24 pacientes existía además afectación extraintestinal. Uno de los pacientes tenía colitis extensa activa y una colangitis esclerosante, mientras que el segundo paciente estaba diagnosticado de colitis izquierda en fase inactiva y había sufrido un episodio de uveítis.

23 de los 24 pacientes recibían tratamiento para su enfermedad intestinal, siendo el fármaco más frecuentemente indicado la sulfasalazina oral. En la tabla siguiente se recogen los tratamientos utilizados (**Tabla 10**). Ningún paciente utilizaba o había

utilizado en las 4 semanas anteriores corticoides sistémicos (criterio de exclusión del estudio).

Tabla 10. Fármacos indicados

| Tratamiento | Nº de pacientes |
|------------------------------------|-----------------|
| Sulfasalazina oral | 18 (75) |
| 5-aminosalicílico oral | 1 (4) |
| 5-aminosalicílico rectal | 13 (54) |
| Triamcinolona rectal | 1 (4) |
| Azatioprina | 1 (4) |
| Hierro, ácido fólico, vitamina B12 | 9 (38) |
| Valores expresados como número (%) | |

Un 25% de los pacientes (6 de 24) eran atópicos, con un número de sensibilizaciones entre 2 a 5 alérgenos. Uno de los pacientes atópicos tenía una colitis extensa y el resto colitis izquierda. En la **tabla 11** se describen las sensibilizaciones.

Tabla 11. Sensibilizaciones en sujetos con colitis ulcerosa

| Nº de paciente | localización | Nº positividads | Descripción de las positividads |
|---|--------------|-----------------|--|
| 6 | CI | 3 | Perro, gato, olea |
| 13 | CI | 2 | Olea, mezcla de gramíneas. |
| 18 | CI | 2 | D.pteronyssinus y D.farinae. |
| 19 | CE | 3 | Chenopodium, salsola, artemisia |
| 20 | CI | 5 | D.pteronyssinus, D.farinae, gato, olea, alternaria |
| 22 | CI | 2 | D.farinae, mezcla de gramíneas. |
| CI= colitis izquierda; CE= colitis extensa. | | | |

La media (95% IC) de los años de evolución de la enfermedad era 5,5 años (3-8), con un rango de 1 a 15 años. Un total de 19 pacientes eran no fumadores, mientras que 5 eran exfumadores (**tabla 12**).

Tabla 12. Características clínicas de los pacientes con colitis ulcerosa

| | |
|---|-----------------------------------|
| Edad media (95% IC) | 37 (30-43) |
| Sexo hombres/mujeres | 12/12 |
| Años de evolución media (95% IC) | 5,5 (3,0-8,0) |
| Localización de la enfermedad, n (%) | Proctitis 1 (4%) |
| | Colitis extensa 6 (25%) |
| | Colitis izquierda 17 (71%) |
| Actividad, n (%) | Activa 8 (33%) |
| | Inactiva 16 (67%) |
| Cirugía por la enfermedad, n | 0 |
| Afectación extraintestinal SI/NO, n | 2/22 |
| Tratamiento SI/NO, n | 23/24 |
| Atópicos SI/NO, n | 6/18 |
| Exfumador/nunca fumador, n | 5/19 |

1.2 Características de los sujetos del grupo control.

La edad media (95% IC) de los sujetos del grupo control era de 35 años (31 – 40), con un rango entre 21 a 62 años. El 58% de ellos eran mujeres.

Cinco de los controles fueron atópicos (21%). En la siguiente tabla se detallan sus sensibilizaciones (**Tabla 13**).

Un total de 23 de los individuos sanos (97%) eran no fumadores, mientras que uno era exfumador.

Tabla 13. Sensibilizaciones en el grupo control

| Nºde control | Nºpositividades | Descripción de las positividades |
|---------------------|------------------------|---|
| 1 | 2 | D.pteronyssinus , D.farinae |
| 3 | 5 | D.pteronyssinus , D.farinae, perro, gato, olea |
| 8 | 2 | D.pteronyssinus, D.farinae. |
| 18 | 6 | D.pteronyssinus , D.farinae, gato, platanus, ciprés, gramíneas. |
| 24 | 3 | D.pteronyssinus, D.farinae, olea |

1.3 Comparación de las características de las dos poblaciones estudiadas.

En la **tabla 14**, se comparan las características de los pacientes con colitis ulcerosa y de los controles sanos.

Como puede observarse, ambas poblaciones fueron homogéneas en lo que se refiere a la edad, distribución por sexos, proporción de atópicos y exfumadores. Sin embargo, la función pulmonar basal estaba significativamente más deteriorada en los pacientes con colitis ulcerosa, en comparación con los individuos sanos. Este deterioro funcional era evidente para el FEV₁ en % del teórico y para la relación FEV₁/FVC %, pero no para la FVC.

Tabla 14. Diferencias entre pacientes con colitis ulcerosa y grupo control.

| | COLITIS ULCEROSA | SANOS | p |
|--|-------------------------|-----------------|----------|
| EDAD * | 37 (30 – 43) | 35 (31 – 40) | 0,68 |
| SEXO (hombres/mujeres)** | 12/12 | 10/14 | 0,77 |
| ATOPICOS SI/NO** | 6/18 | 5/19 | 1 |
| FUMADOR (NO/EX)** | 19/5 | 23/1 | 0,18 |
| FEV1, % teórico* | 104 (98 – 110) | 115 (112 – 118) | 0,0015 |
| FVC,% teórico* | 108 (102 – 114) | 114 (110 – 117) | 0,12 |
| FEV1/FVC%* | 81 (77 – 84) | 82 (83 – 87) | 0,02 |
| *resultado expresado como media e intervalo de confianza del 95% | | | |
| **número de pacientes. | | | |

1.4 Concentración de óxido nítrico en aire exhalado.

Los valores individuales de las concentraciones de ENO en las dos poblaciones se indican en la **figura 5**. El valor medio (95% IC) era de 20,1 ppb (15,9 – 24,2) en los pacientes con colitis ulcerosa y de 20,4 ppb (16,0 – 24,8) en los individuos sanos ($p = 0,90$).

En 3 pacientes con colitis ulcerosa se realizó la determinación de ENO mediante el sistema NIOX-MINO®. Por este motivo, las concentraciones de ENO se han comparado también tras excluir estos tres individuos. En los 21 pacientes con colitis ulcerosa estudiados mediante el método de detección de quimioluminiscencia, la concentración media (95% IC) de ENO fue de 20,42 ppb (15,7-25) comparado con 20,4 ppb (16,0 – 24,8) ($p = 0,96$) en los controles sanos.

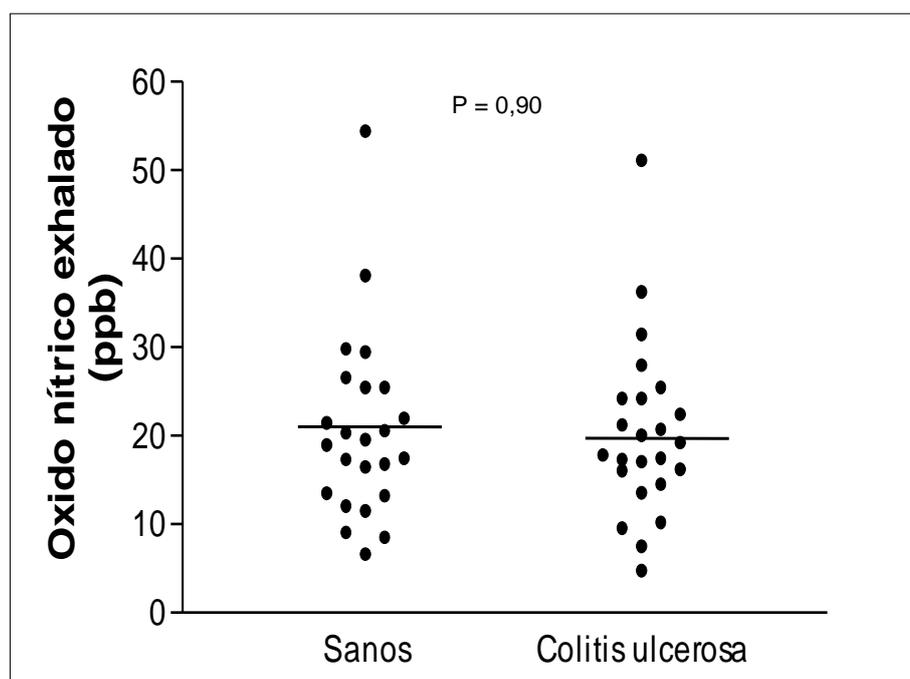


Figura 5. Valores de óxido nítrico en aire exhalado en pacientes con colitis ulcerosa y sanos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

1.5 Respuesta a metacolina y AMP.

Se identificó HRB a metacolina (valor de $PC_{20} \leq 8\text{mg/ml}$) en 2 pacientes (8%) con colitis ulcerosa, mientras que esta no se detectó en ninguno de los controles sanos ($p = 0,49$). Ninguno de los pacientes con colitis ulcerosa ni de los sujetos sanos respondió positivamente ($PC_{20} \leq 400\text{mg/ml}$) a AMP.

En la **figura 6** se representan los valores individuales para el IR a AMP en las dos poblaciones. Este parámetro era significativamente mas alto (indicando mayor grado de respuesta al agonista) en los pacientes con colitis ulcerosa, con una media (95% IC) de 4,2%/log mg/ml (3,4 – 5,0), comparado con 3,2%/lg mg/ml (2,8 – 3,7 $p = 0,034$) en los controles sanos.

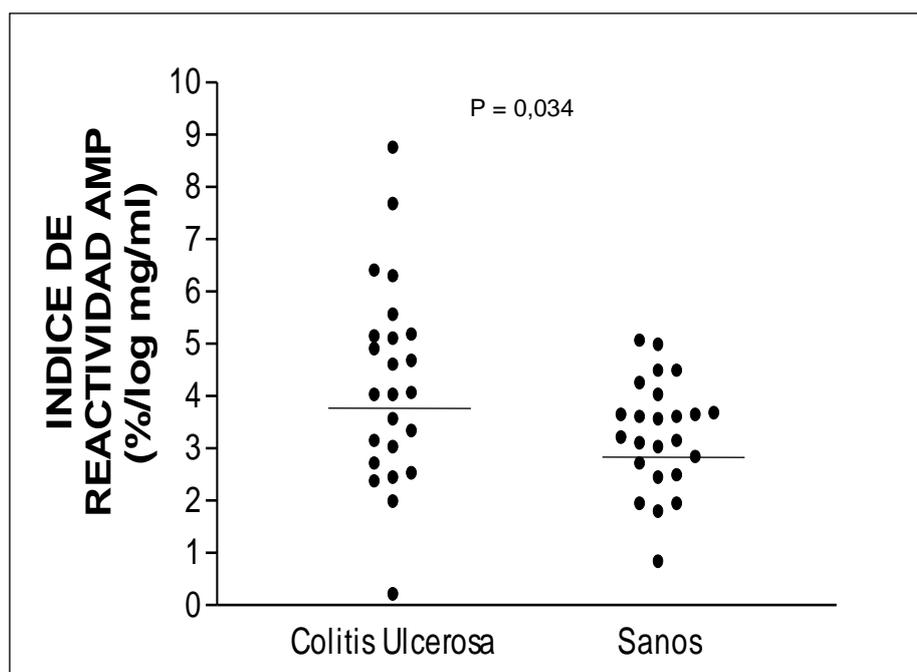


Figura 6. Valores del índice de reactividad a AMP en sujetos con colitis ulcerosa y sanos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

En la **figura 7** se representan los valores individuales para el IR a metacolina en las dos poblaciones. Los valores tendían a ser mas altos (mayor grado de respuesta) en los pacientes con colitis ulcerosa, con una media (95% IC) de 10,1% / log mg/ml (5,5-14,6), comparado con 5,8% / log mg/ml (4,5-7,0, $p = 0,07$) en los controles sanos, pero las diferencias no alcanzaban la significación estadística.

En los individuos con colitis ulcerosa, los valores medios (95% IC) del FEV₁ basal previo a la exploración con metacolina eran de 3,51 L (3,13 – 3,89), comparado con 3,61 L (3,07 – 4,15, $p = 0,50$) antes de la exploración con AMP. En los individuos sanos, los valores de este parámetro antes de la exploración con metacolina eran de 3,83 L (3,51-4,15), comparado con 3,84 L (3,55 – 4,14, $p = 0,87$) antes de la exploración con AMP.

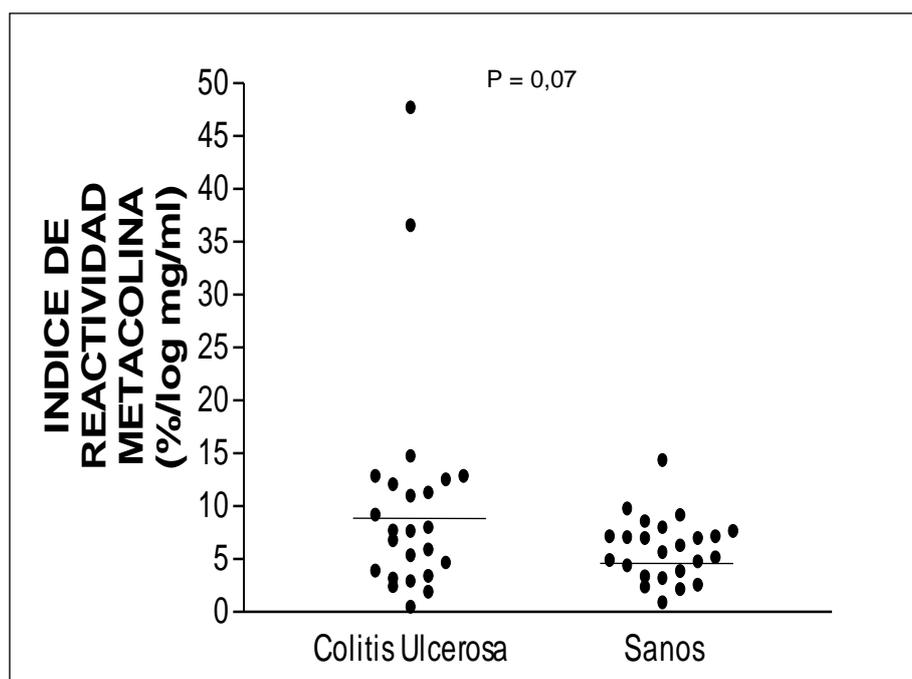


Figura 7. Valores del índice de reactividad a metacolina en sujetos con colitis ulcerosa y sanos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

1.6 Diferencias entre pacientes con colitis ulcerosa extensa y colitis ulcerosa izquierda.

La media y dispersión de los valores de ENO, respuesta a metacolina y respuesta a AMP en cada una de las dos poblaciones se detallan en la **tabla 15** y los valores individuales de cada uno de estos parámetros se han representado en las **figuras 8, 9 y 10**.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en ninguno de estos parámetros.

Tabla 15. Diferencias entre colitis ulcerosa extensa y colitis ulcerosa izquierda.

| | COLITIS EXTENSA | COLITIS IZQUIERDA | p |
|----------------------|------------------------|--------------------------|----------|
| ENO | 19,4 (14,8 – 24,5) | 21,9 (12,3 – 31,6) | 0,60 |
| IR METACOLINA | 9,6(6,7 – 12,6) | 10,2 (4,5 – 16,4) | 0,90 |
| IR AMP | 4,1 (1,5 – 6,8) | 4,25 (3,4 – 5,1) | 0,89 |

Los valores se expresan mediante la media (95% IC)

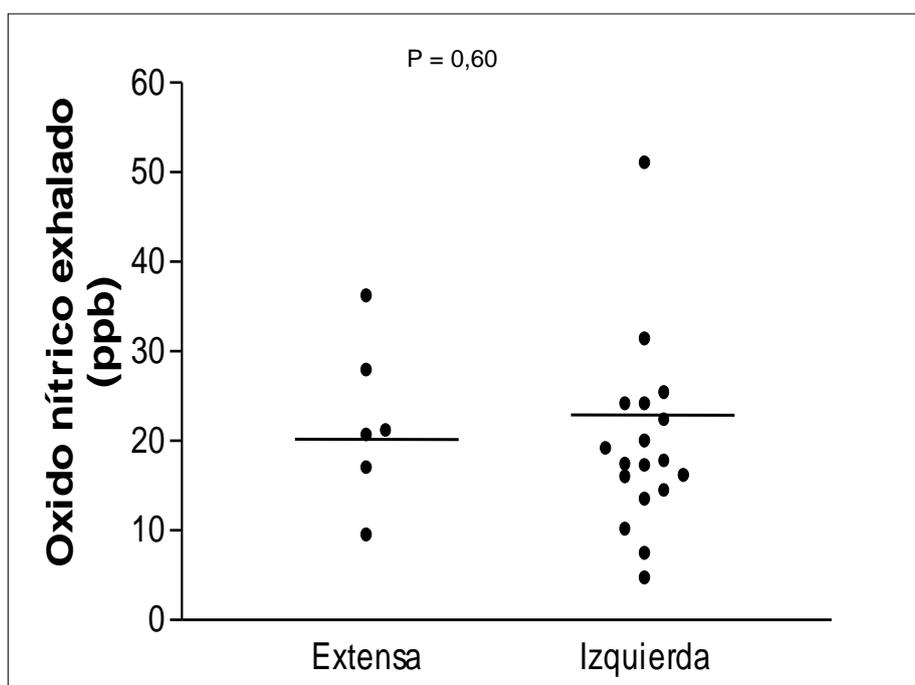


Figura 8 .Valores de óxido nítrico en aire exhalado en pacientes con colitis ulcerosa izquierda y extensa. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

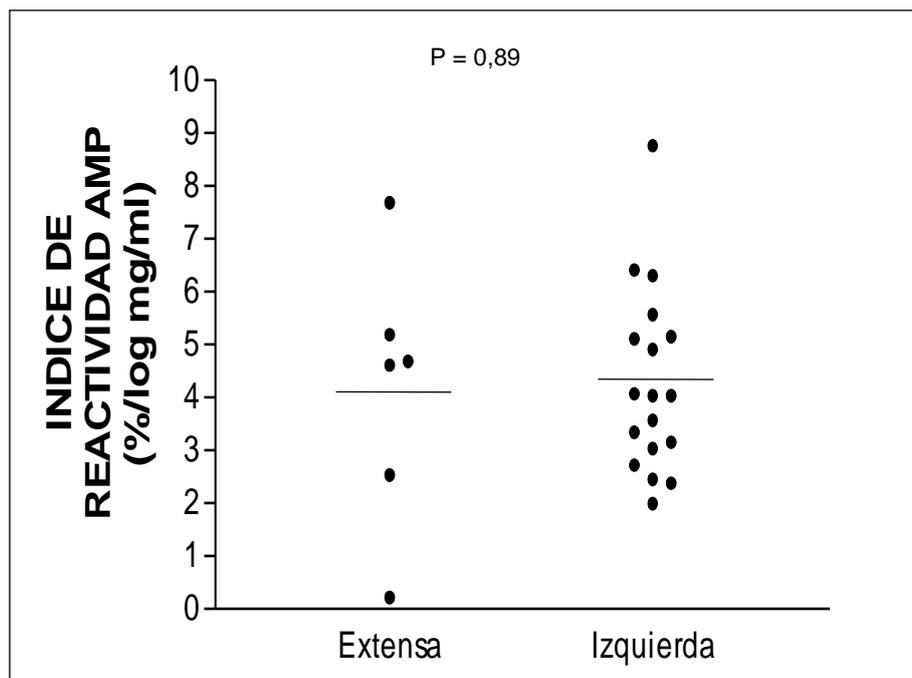


Figura 9. Valores del índice de reactividad a AMP en pacientes con colitis ulcerosa izquierda y extensa. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

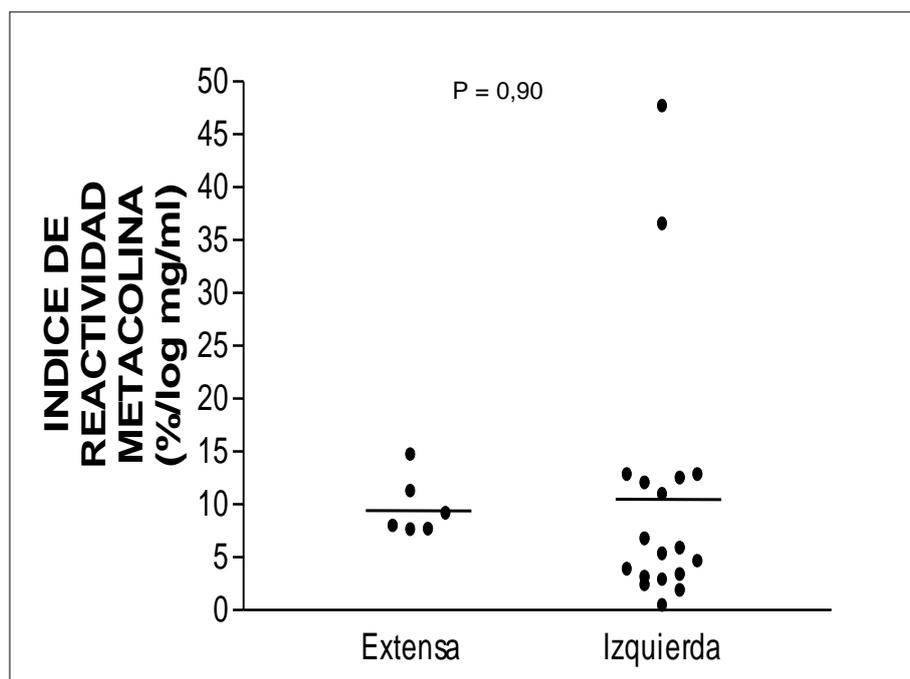


Figura 10. Valores del índice de reactividad a metacolina en pacientes con colitis ulcerosa izquierda y extensa. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

1.7 Diferencias entre pacientes con colitis ulcerosa activa e inactiva.

La media y la dispersión de los valores de ENO, respuesta a metacolina y respuesta a AMP en cada una de las dos poblaciones a estudio se detallan en la **tabla 16** y los valores individuales de cada uno de estos parámetros se han representado en las **figuras 11,12 y 13**.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en ninguno de estos parámetros.

Tabla 16. Diferencias entre pacientes con colitis ulcerosa activa e inactiva.

| | COLITIS ACTIVA | COLITIS INACTIVA | P |
|----------------------|--------------------|-------------------|------|
| ENO | 23,8 (12,6 – 35,0) | 18,2(14,3 – 22,1) | 0,20 |
| IR METACOLINA | 12,4(3,6 – 21,3) | 8,9(3,9 – 14,7) | 0,46 |
| IR AMP | 4,4(2,8 – 5,9) | 4,1 (3,8 – 5,1) | 0,76 |

Los valores se expresan mediante la media (95% IC)

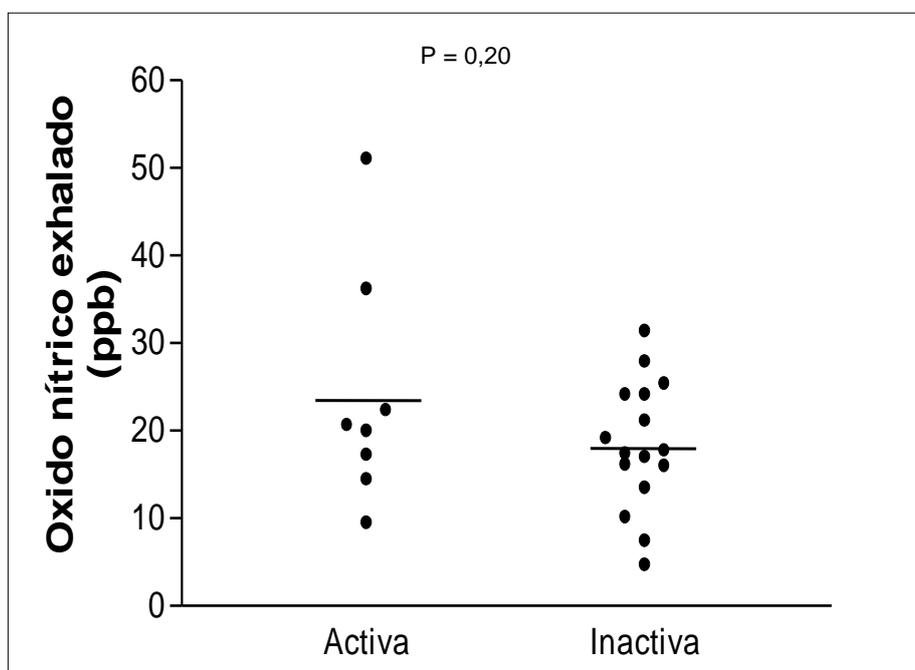


Figura 11. Valores de óxido nítrico en aire exhalado en colitis ulcerosa activa e inactiva. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

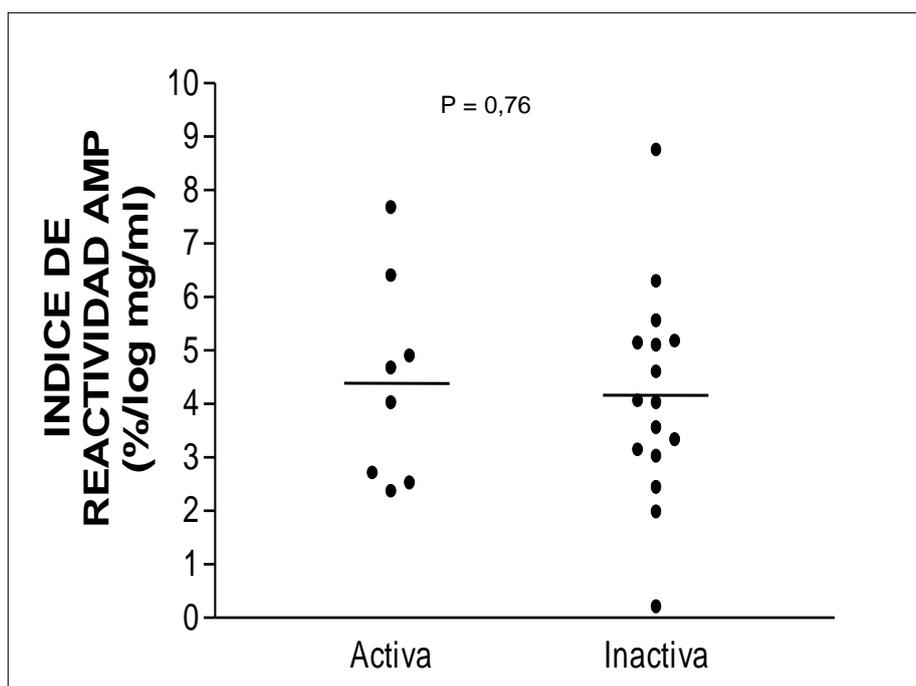


Figura 12. Valores del índice de reactividad a AMP en pacientes con colitis ulcerosa activa e inactiva. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

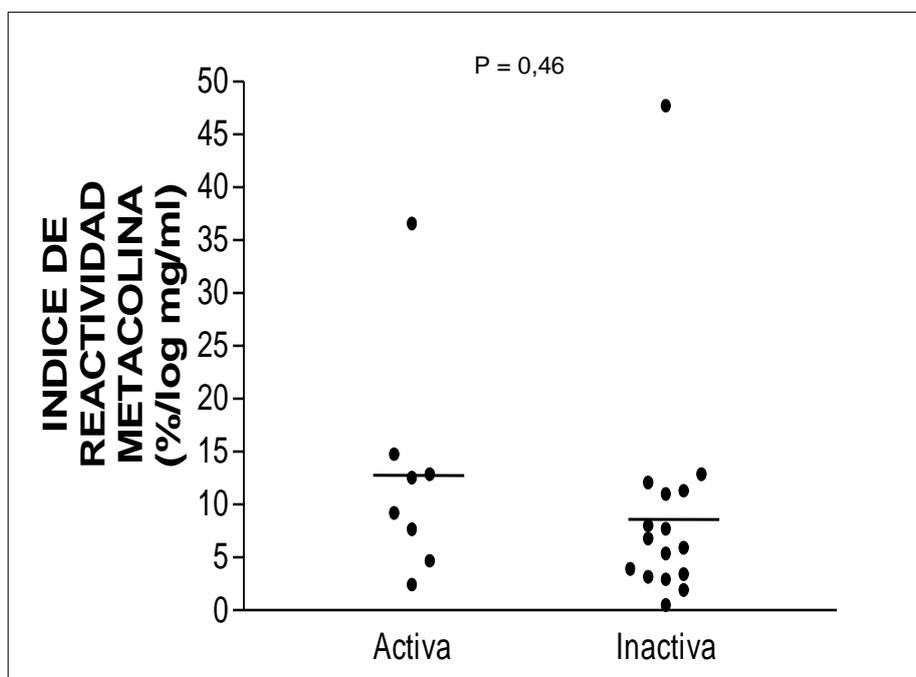


Figura 13. Valores del índice de reactividad a metacolina en pacientes con colitis ulcerosa activa e inactiva. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

2-RELACIÓN ENTRE VARIABLES.

2.1 Relación entre ENO, funcionalismo pulmonar y respuesta a la provocación bronquial.

En la población estudiada no se encontró una relación significativa entre los valores de ENO y el FEV₁ en % del valor teórico, tanto en el grupo con colitis ulcerosa ($r = -0,17$, $p = 0,42$) como en el grupo control ($r = 0,14$, $p = 0,50$). Resultados similares se obtuvieron entre el ENO y el cociente FEV₁/FVC %, en el grupo con colitis ulcerosa ($r = -0,30$, $p = 0,15$) y en la población control ($r = -0,29$, $p = 0,17$).

La relación entre los valores de ENO y el IR a metacolina, no fue significativa en ambos grupos (colitis ulcerosa: $r = 0,27$, $p = 0,21$, grupo control: $r = -0,03$, $p = 0,89$). Tampoco se encontró una relación significativa entre la concentración de ENO y el IR a AMP en el grupo con colitis ulcerosa ($r = 0,06$, $p = 0,76$). Por el contrario, la relación entre estos dos parámetros era significativa en los individuos sanos ($r = -0,47$, $p = 0,02$).

Analizando la gráfica de correlación ENO e IR a AMP se observó, que uno de los sujetos del grupo control tenía unos niveles de ENO de 54,2 ppb que condicionó en gran manera los resultados de dicho coeficiente. Excluyendo este dato, la correlación entre ambos parámetros no alcanza la significación estadística ($r = -0,19$, $p = 0,37$) (**figura 14**)

2.2 Relación entre la respuesta a los agentes broncoconstrictores y la función pulmonar basal

En los individuos con colitis ulcerosa, el IR a metacolina se correlacionaba significativamente tanto con los valores de FEV₁ en % del valor teórico ($r = -0,44$, $p = 0,03$, **figura 15**) como con los valores del FEV₁/FVC % ($r = -0,49$, $p = 0,01$, **figura 16**). Por el contrario, no se encontró correlación significativa para ninguna de estas variables en el grupo control (**tabla 17**).

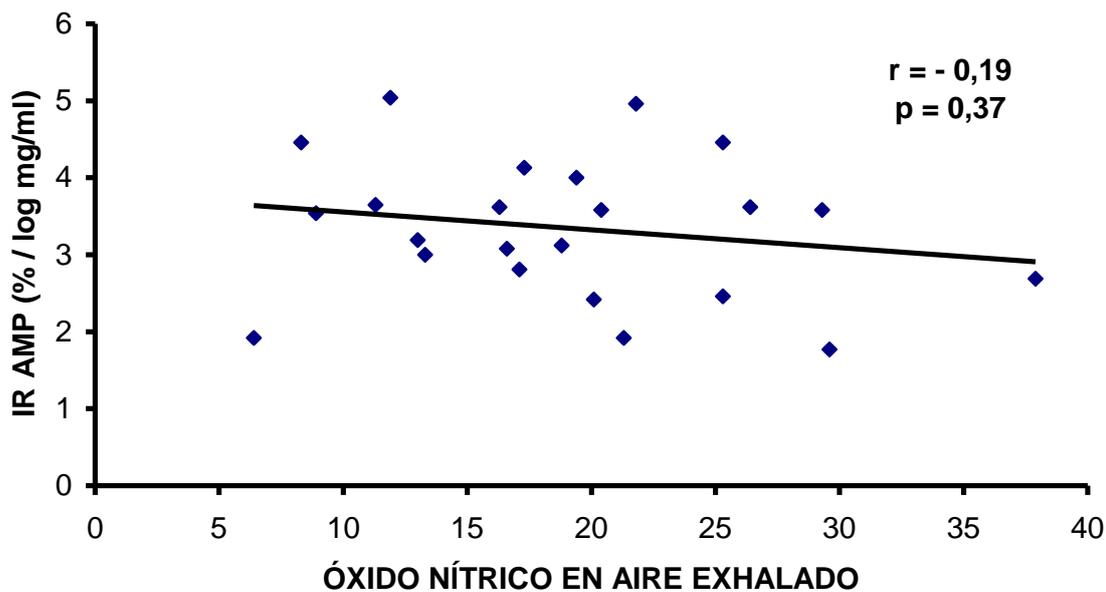


Figura 14. Correlación entre óxido nítrico en aire exhalado e índice de reactividad (IR) a AMP en individuos sanos.

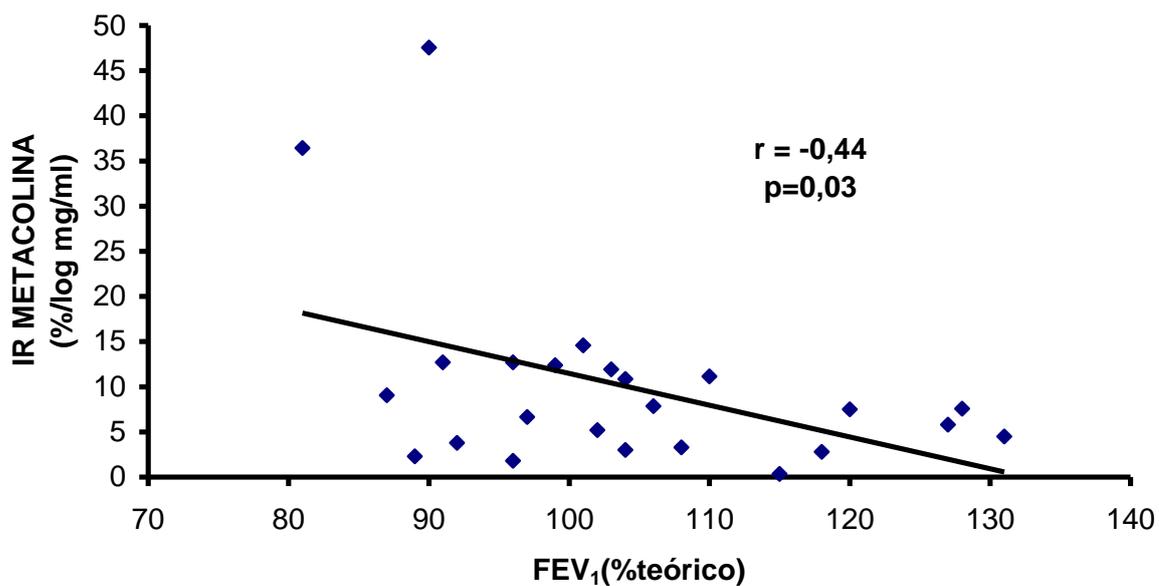


Figura 15. Correlación entre FEV₁ en % del valor teórico y el índice de reactividad (IR) a metacolina en pacientes con colitis ulcerosa.

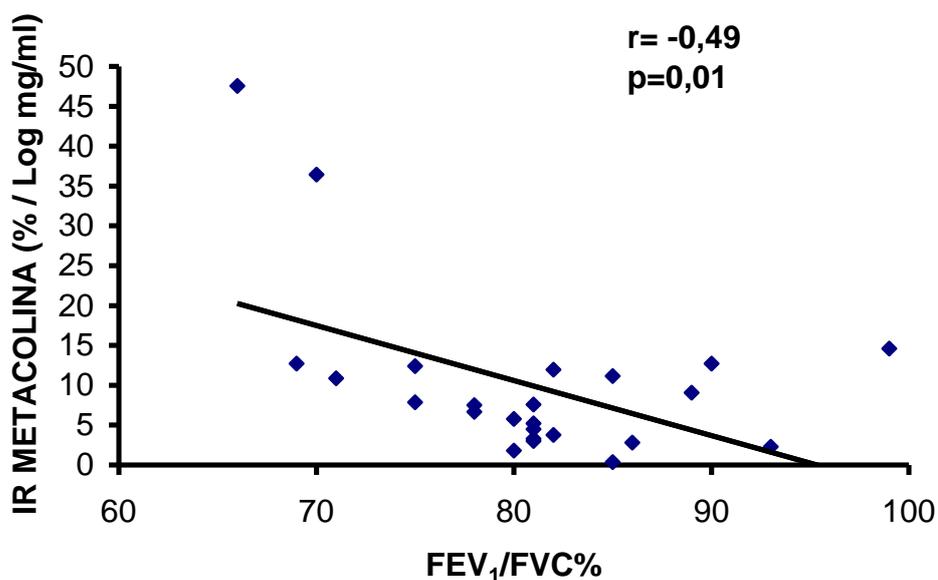


Figura 16. Correlación entre FEV₁/FVC% e índice de reactividad (IR) a metacolina en pacientes con colitis ulcerosa.

En los pacientes con colitis ulcerosa, no pudo identificarse relación entre el IR a AMP y el FEV₁ en % del valor teórico ($r = -0,31$ $p = 0,1$) o la relación FEV₁/FVC% ($r = -0,07$, $p = 0,72$). Tampoco se encontró relación entre estos parámetros en los individuos sanos (**Tabla 17**).

2.3 Relación entre la respuesta a ambos agonistas.

En los pacientes con colitis ulcerosa, el IR a metacolina y a AMP se correlacionaban significativamente ($r = 0,56$, $p = 0,004$) (**Figura 17**), mientras que estos parámetros no se correlacionaban en los individuos sanos ($r = 0,23$, $p = 0,27$).

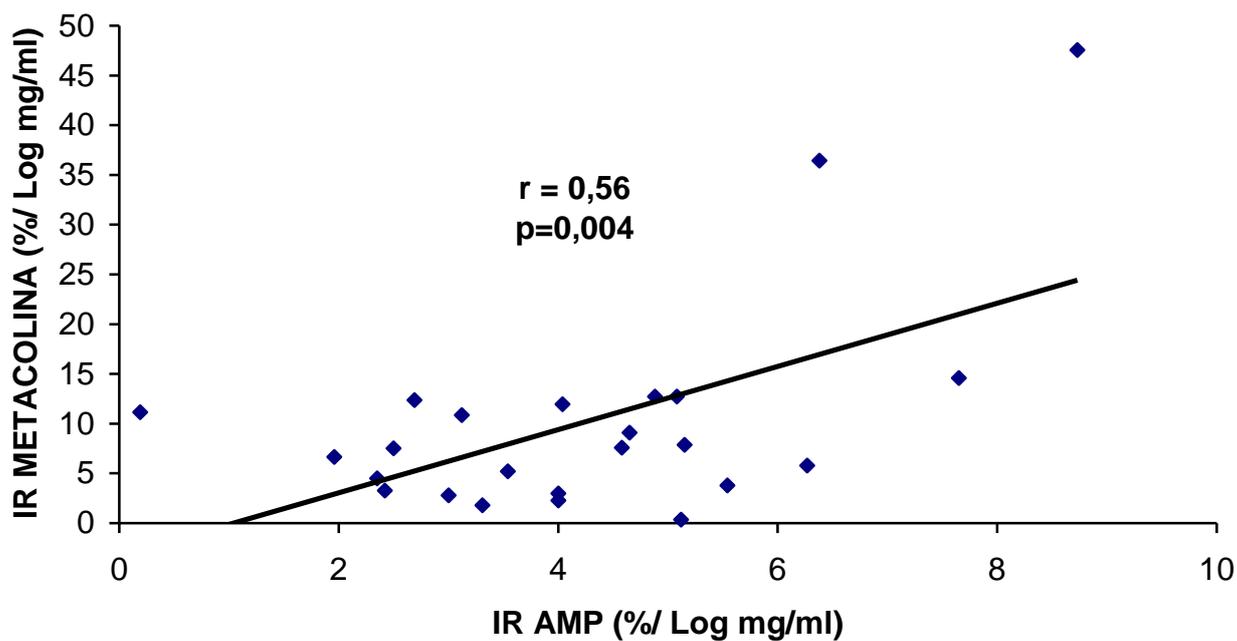


Figura 17. Correlación entre el índice de reactividad (IR) a metacolina y a AMP en pacientes con colitis ulcerosa.

2.4 Relación entre los años de evolución de la enfermedad y la respuesta a ambos agonistas o las concentraciones de ENO.

No pudo detectarse correlación entre los años de evolución de la colitis ulcerosa y la respuesta a ambos broncoconstrictores o las concentraciones de ENO (**Tabla 17**).

Tabla 17. Correlación entre diferentes parámetros en pacientes con colitis ulcerosa y sujetos sanos.

| CORRELACIÓN VARIABLES | COLITIS ULCEROSA | | GRUPO CONTROL | |
|---|------------------|--------------|---------------|-------------|
| | r | p | r | p |
| FEV ₁ %-ENO | -0,17 | 0,41 | 0,14 | 0,50 |
| FEV ₁ /FVC % – ENO | -0,30 | 0,15 | -0,29 | 0,17 |
| ENO – IR METACOLINA | 0,27 | 0,21 | -0,029 | 0,89 |
| ENO – IR AMP | 0,06 | 0,76 | -0,47 | 0,02 |
| FEV ₁ % – IR METACOLINA | -0,44 | 0,03 | 0,02 | 0,90 |
| FEV ₁ /FVC %– IR METACOLINA | -0,49 | 0,01 | -0,27 | 0,19 |
| FEV ₁ %- IR AMP | -0,31 | 0,14 | -0,12 | 0,56 |
| FEV ₁ /FVC% – IR AMP | -0,075 | 0,72 | 0,07 | 0,74 |
| IR METACOLINA- IR AMP | 0,56 | 0,004 | 0,23 | 0,27 |
| AÑOS EVOLUCIÓN - ENO | -0,2368 | 0,26 | | |
| ANOS EVOLUCIÓN – IR MET | -0,1181 | 0,58 | | |
| AÑOS EVOLUCIÓN – IR AMP | 0,1560 | 0,47 | | |
| En negrita se resaltan las correlaciones estadísticamente significativas | | | | |

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio demuestran claramente que, aunque la prevalencia de HRB a AMP ($PC_{20} \leq 400\text{mg/ml}$) en los pacientes con colitis ulcerosa es similar a la identificada en sujetos sanos, los pacientes con colitis ulcerosa sin síntomas sugestivos de afectación pulmonar, presentan un significativamente mayor grado de respuesta bronquial a AMP que los individuos sanos. No obstante, aunque el grado de respuesta bronquial a metacolina era mayor en los pacientes con colitis ulcerosa que en los controles sanos, las diferencias no alcanzaban la significación estadística. En los pacientes con colitis ulcerosa se detectó una relación significativa entre la respuesta bronquial a ambos broncoconstrictores inhalados, pero sólo la respuesta a metacolina se relacionaba significativamente con la función pulmonar basal. Por el contrario las concentraciones de ENO eran similares en los pacientes con colitis ulcerosa y en los controles sanos. Además, la respuesta bronquial a AMP y a metacolina, así como los valores de ENO, no mostraron ninguna relación con la actividad, extensión o tiempo de evolución de la colitis ulcerosa.

Diversos estudios han demostrado la presencia de HRB a AMP en diferentes entidades tales como el asma^{112, 113}, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o bronquitis crónica¹¹⁴⁻¹¹⁶ y rinitis alérgica^{99, 117} o poliposis nasosinusal¹¹⁸. Cuando se analizan los resultados de las series publicadas, muchos asmáticos sin tratamiento responden con obstrucción^{115, 119-121} a la administración de concentraciones de $AMP \leq 400\text{mg/ml}$. En pacientes con EPOC, Rutgers y cols¹¹⁴ encuentran en un 67% de sus pacientes una respuesta positiva a la provocación bronquial con AMP. En cuanto a la rinitis alérgica, se estima, que entre un 36 a un 70% de pacientes (según diversas series) tienen una respuesta positiva^{99, 117, 118}.

La provocación bronquial con AMP en la enfermedad asmática ha permitido identificar de forma no invasiva la actividad de la enfermedad, así como estados pre-clínicos o latentes de enfermedad, incluso en ausencia de síntomas clínicos. Van den Toorn y cols⁹⁴ observaron que en adolescentes con asma alérgica en remisión clínica, se encontraba una respuesta positiva a AMP y ésta se correlacionaba de forma inversa con la presencia de eosinófilos en las muestras de biopsia bronquial. Sin embargo esta relación no se observaba cuando se analizaba la respuesta bronquial a metacolina. Estos hallazgos evidenciaban la existencia de un proceso inflamatorio subyacente y continuado, pese a la ausencia de manifestaciones clínicas. En otro estudio llevado a

cabo en 118 trabajadores expuestos a alérgenos ocupacionales, la presencia de HRB a AMP representaba un factor de riesgo mayor para desarrollar síntomas respiratorios que la HRB a metacolina¹²². El riesgo medio relativo para aquellos sujetos que respondían a AMP era de 3,7 comparado, con 2,8 en los individuos que respondían a metacolina. También en pacientes asmáticos⁹², la respuesta positiva a AMP se correlacionó más intensamente con la eosinofilia en muestras de esputo que la respuesta a metacolina, hecho que subraya la mayor relación de la respuesta bronquial a AMP con los marcadores de inflamación bronquial. Otro argumento a favor de la relación entre la respuesta a AMP y la inflamación bronquial pudiera ser la extremada sensibilidad de la respuesta a este agonista a los efectos de fármacos antiinflamatorios como los esteroides inhalados¹²³ y de estímulos pro-inflamatorios como los alérgenos¹²⁴.

No sólo en el asma se ha demostrado la buena relación de la respuesta a AMP con la inflamación. En la rinitis alérgica, entidad donde se ha demostrado la existencia de cambios inflamatorios en la vías aéreas inferiores^{125, 126}, se ha demostrado una asociación entre los eosinófilos en esputo y la PC₂₀ a AMP, pero no a metacolina^{117, 127}. En el caso de la EPOC¹¹⁴, los sujetos con HRB a AMP mostraron un mayor número de linfocitos CD8+ en las muestras de biopsia bronquial y mayor número de eosinófilos en esputo que aquellos sin HRB a este agonista.

El mecanismo fundamental por el cual la adenosina actúa no es completamente conocido, aunque en este interviene fundamentalmente la activación mastocitaria. La adenosina interacciona con el receptor A_{2B} del mastocito pulmonar^{90, 128}, activándose por una parte la adenilciclase con el consiguiente aumento del AMPc, pero también activándose la fosfolipasa C, que finalmente movilizará el calcio de los depósitos de calcio intracelular, con la consiguiente degranulación del mastocito y liberación de sus mediadores preformados y sintetizados de novo⁸⁸. También, aunque de forma menos importante, adenosina produce broncoconstricción a través de la liberación de neuropéptidos procedentes de terminaciones nerviosas sensoriales y por un reflejo axónico^{91, 129}.

Sobre todo en el caso del asma y de la EPOC, la presencia de HRB a AMP se ha correlacionado con la existencia de un proceso inflamatorio subyacente (aunque diferente) en ambas entidades¹³⁰. En el caso del asma, el mastocito se encuentra en un

estado de activación orquestado por un patrón de citocinas Th2, y por tanto puede ser más fácilmente estimulado por AMP¹³¹. En la EPOC, la relación entre la activación mastocitaria y la respuesta a AMP es menos clara. Aunque el mastocito no constituye la célula predominante en la inflamación identificada en la EPOC, se ha encontrado un incremento del número de mastocitos en biopsias procedentes de esta población, hallazgo en el que parece intervenir el hábito tabáquico¹³².

En nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se ha determinado la respuesta a la inhalación de AMP en pacientes con colitis ulcerosa. Nuestros resultados demuestran claramente que la prevalencia de HRB a AMP en los pacientes con colitis ulcerosa es similar a la encontrada en población sana. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la respuesta a este agonista se encuentra claramente incrementada en los pacientes con colitis ulcerosa, a pesar de que esto mismo no se observa con un broncoconstrictor directo como metacolina. Si, como se ha indicado previamente, la respuesta a AMP está relacionada con la presencia de un proceso inflamatorio activo en la pared bronquial, nuestros resultados sugieren que, en los pacientes con colitis ulcerosa, pudiera existir una inflamación bronquial activa y, como consecuencia de ello, una activación de las células sensibles a los efectos de AMP, como mastocitos y basófilos. Sin embargo, existen pocos estudios realizados sobre muestras de biopsia bronquial obtenidos de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal^{22, 29, 52, 133, 134}. De los cinco estudios publicados, tres corresponden a series constituidas fundamentalmente por pacientes con colitis ulcerosa^{22, 29, 52} y los otros dos son casos clínicos referidos a pacientes con enfermedad de Crohn^{133, 134}. La serie más amplia corresponde al estudio de Camus y cols²², donde se recogen 15 pacientes con afectación de vías respiratorias (13 de ellos sufrían colitis ulcerosa). Los autores efectuaron biopsias en 11 de estos 15 pacientes, detectando un infiltrado denso de linfocitos y células plasmáticas en la submucosa. En la serie de Karadag y cols⁵² se efectuó biopsia transbronquial a 9 de 15 pacientes con colitis ulcerosa, correspondiendo sólo dos de las biopsias a la pequeña vía aérea donde se apreciaron acúmulos linfocitarios. En la serie de diez pacientes con colitis ulcerosa de Higgenbottam y cols²⁹, se efectuaron biopsias en cuatro de ellos pero no se especifica el patrón de afectación pulmonar existente. Los autores de este último estudio describieron la existencia de un infiltrado inflamatorio en las biopsias bronquiales, pero sin detallar el patrón celular. Así pues los datos procedentes de biopsias bronquiales no aportan

evidencia directa de la presencia y activación de mastocitos a nivel bronquial en pacientes con colitis ulcerosa, aunque el número de pacientes estudiados ha sido pequeño y en ninguna de las series se han utilizado marcadores inmunohistoquímicos específicos para identificar estas células. En consecuencia, son necesarios estudios que determinen la presencia de estas células inflamatorias de manera más específica.

Sin embargo, existen evidencias indirectas que podrían explicar la mayor respuesta a la provocación bronquial con AMP en nuestros pacientes. En muestras de biopsia de colon de pacientes con colitis ulcerosa^{135, 136}, se ha demostrado un patrón linfocitario con predominio del patrón de citocinas Th2 (IL-5 e IL-13, pero no IL-4) aunque también se han encontrado niveles elevados de IFN- γ . Este patrón de citocinas guarda algunas similitudes con el encontrado en el caso del asma y en esta entidad, los procesos inflamatorios generados por la influencia de estas citocinas, favorecen la permanencia del mastocito próximo al músculo liso bronquial¹³⁷.

Por otra parte, los mastocitos pulmonares se pueden activar por diversos estímulos¹³⁸ como IgE monomérica, proteasas incluyendo la triptasa, “stem cell factor”, c-kit ligando, TNF- α , IFN- γ , C5a, adenosina, “receptor toll like” o neuropéptidos, entre otros. Algunos de estos mediadores se han encontrado elevados en pacientes con colitis ulcerosa. Así por ejemplo, se ha detectado un incremento de los niveles de C5a en sangre en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Este incremento es debido al hipercatabolismo del sistema de complemento^{139, 140} que se produce en estos procesos. También Komatsu y cols¹⁴¹, han detectado en esta población un incremento de los niveles de TNF- α mediante técnicas de gran sensibilidad (inmuno PCR altamente sensible). Los pacientes con colitis ulcerosa tenían niveles de TNF- α 380 veces superiores a los sujetos sanos. Al menos teóricamente, la presencia de estos factores elevados en sangre (C5a y TNF- α), podría favorecer la activación del mastocito a nivel pulmonar.

También se ha detectado una elevación de n-metilhistamina (metabolito estable de la histamina) en la orina de pacientes con colitis ulcerosa¹⁴², hecho que es un reflejo directo de la mayor histaminemia circulante en este proceso. El incremento en la producción de histamina, procede muy probablemente de la producción incrementada

en la mucosa intestinal por los mastocitos a este nivel. Así, se han encontrado niveles elevados de histamina en la mucosa intestinal de pacientes con colitis ulcerosa¹⁴³ y se ha comunicado un incremento en la producción de histamina en muestras de mucosa colónica, previa incubación con sustancia P o anti IgE¹⁴⁴. En mastocitos procedentes de biopsias de colon se ha demostrado una liberación espontánea de mediadores significativamente superior a muestras procedentes de controles sanos. Este incremento en la liberación de mediadores por parte de la mucosa del colon afecto de colitis ulcerosa, se ha demostrado tanto en zonas inflamadas como no inflamadas¹⁴⁵ y estudios ultraestructurales han demostrado un aumento del número y, lo que es más importante, del porcentaje de mastocitos degranulados en la colitis ulcerosa^{146, 147}. Una de las numerosas acciones que ejerce la histamina, es de la tener efecto amplificador de la liberación de mediadores por parte del mastocito¹⁴⁸ y de esta forma el incremento de la histamina plasmática, podría ejercer un efecto favorecedor de la activación mastocitaria en diversas localizaciones, entre ellas a nivel pulmonar. Todos los hallazgos anteriores orientan a pensar, que puede existir un aumento de diversos factores circulantes capaces de inducir la activación del mastocito pulmonar.

Además existen evidencias que sugieren que los linfocitos sensibilizados en una localización, en este caso el tubo digestivo, pueden circular y localizarse en la mucosa de otros órganos donde podrían inducir inflamación (en este caso el pulmón)⁴¹. Ambos, tubo digestivo y aparato respiratorio, proceden del mismo saco embrionario (intestino primitivo). Es importante recordar que existen similitudes morfológicas y de desarrollo entre el epitelio del colon y el bronquial (epitelio columnar, células caliciformes, glándulas submucosas), así como un tejido linfoide submucoso que juega un papel crucial en la defensa frente a antígenos. Los cambios inflamatorios inespecíficos en ambos epitelios son similares. En pacientes con colitis ulcerosa y supuración bronquial se han visto cambios en el epitelio bronquial consistentes en hiperplasia de células basales, engrosamiento de la membrana basal, inflamación submucosa y un aumento de grosor del epitelio²⁹. Además los mastocitos que contienen fundamentalmente triptasa, se encuentran tanto en las vías aéreas como en la mucosa del intestino¹⁴⁹.

Parece razonable pensar, por todo lo anteriormente expuesto, que la activación celular del infiltrado inflamatorio de la mucosa colónica en la colitis ulcerosa, genere la producción de mediadores, que puedan tener efectos a nivel bronquial, favoreciendo la

activación de los mastocitos pulmonares, hecho que los haría más sensibles a la acción del AMP. El origen embriológico común, pudiera explicar la similitud del proceso inflamatorio localizado en la mucosa colónica y bronquial.

En nuestro estudio también se efectuó provocación bronquial con metacolina, agonista con el que, a diferencia de AMP, existían estudios previos realizados en población con patología inflamatoria intestinal^{75, 82-85} (**tabla 6**). Al menos en pacientes con patología respiratoria, la información aportada por el estudio de la respuesta a cada uno de los dos agonistas (metacolina y AMP) es complementaria. Mientras que los estudios realizados con AMP subrayan su exquisita relación con la inflamación aguda en el bronquio⁹²⁻⁹⁴, la respuesta a los agonistas directos (metacolina) traduce más bien secuelas crónicas permanentes de los procesos inflamatorios a nivel bronquial^{80, 150}.

A diferencia de los datos obtenidos mediante la provocación bronquial con AMP, en nuestro estudio no se detectó una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta a la provocación bronquial con metacolina entre la población con colitis ulcerosa y los controles sanos, aunque los valores tendían a ser más altos (mayor grado de respuesta) en los pacientes con colitis ulcerosa. Además sólo un 8% de nuestros pacientes con colitis ulcerosa presentaban HRB a metacolina. Estos resultados contrastan con los resultados del estudio de Louis y cols⁸², efectuado en 38 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (27 con enfermedad de Crohn y 11 con colitis ulcerosa) y 24 controles sanos. En este estudio, 17 de los 38 pacientes (45%), presentaban HRB a metacolina, frente a un 17% de los controles ($p < 0,03$). Cuatro de los once pacientes con colitis ulcerosa (36%) tenían HRB a metacolina. También encontraron que las caídas del FEV₁, tras las concentraciones de metacolina de 1 y 4mg/ml fueron mayores en la población con enfermedad inflamatoria intestinal que en los controles sanos.

Para explicar las diferencias con nuestros resultados, es necesario tener en cuenta que en este estudio 11 de los 38 pacientes (29%) tenían historia clínica de enfermedades atópicas (cinco dermatitis atópica, tres rinitis alérgica y tres ambos procesos). Existen diversos estudios¹⁵¹⁻¹⁵³ que han demostrado la presencia de un elevado porcentaje (30% o más) de HRB a metacolina en pacientes con dermatitis atópica sin asma bronquial. También han sido muchos los estudios¹⁵⁴⁻¹⁵⁸ que han

encontrado que una importante proporción de pacientes con rinitis alérgica presentan HRB a agonistas broncoconstrictores directos como la histamina o metacolina aunque la prevalencia de hipersensibilidad bronquial, en las diferentes series ha sido muy variable, con cifras que oscilaron desde el 14%¹⁵⁴ hasta el 97%¹⁵⁵. Así pues, el hecho de que un 30% de los pacientes del estudio de Louis y cols⁸² tuviesen patologías concomitantes, en las que es más frecuente un incremento de la HRB a metacolina, puede justificar la mayor prevalencia de HRB a metacolina encontrada con respecto a nuestro estudio, ya que nosotros excluimos a pacientes con historia actual o pasada de estas entidades para evitar factores de confusión. Analizando el grupo control del mismo trabajo⁸² sólo un 12,5% de los controles sanos, padecían rinitis o dermatitis atópica y este hecho pudo haber influido decisivamente en las diferencias de la prevalencia de HRB entre las dos poblaciones analizadas.

Otro factor relevante que puede explicar las diferencias entre nuestros resultados y los comunicados por Louis y cols⁸² es el hábito tabáquico. Ninguno de nuestros pacientes era fumador actual, mientras que un 47% de los pacientes del estudio de Louis y cols⁸² eran fumadores. Esto puede ser especialmente relevante, pues se ha encontrado que los individuos fumadores asintomáticos presentan un incremento de la respuesta bronquial a metacolina¹⁵⁹⁻¹⁶².

Finalmente añadir que la metodología de la provocación bronquial empleada en el estudio de Louis y cols⁸², fue diferente a la nuestra. Estos autores utilizaron el método de inhalación a volumen corriente mientras que nosotros utilizamos el método dosimétrico. Se ha demostrado recientemente que el método dosimétrico tiene una menor sensibilidad^{163, 164} que el método de inhalación a volumen corriente para detectar HRB a metacolina. Por otra parte el punto de corte utilizado por Louis y cols⁸² para considerar una respuesta positiva ($PC_{20} < 16\text{mg/ml}$) es superior al que nosotros utilizamos (respuesta positiva si $PC_{20} \leq 8\text{mg/ml}$). Ambos factores pueden contribuir también en alguna medida a las diferencias entre los resultados obtenidos en ambos estudios.

En otro estudio, Kullman y cols⁸⁴ encuentran HRB a metacolina en un 20% de pacientes con enfermedad de Crohn y en un 8% de los pacientes con colitis ulcerosa. Los autores concluyen además que la incidencia de HRB a metacolina es mayor que en

la población general. La información aportada en la comunicación es escasa, destacando que no parece claro la existencia de grupo control. Además, 12 de los 35 pacientes con enfermedad de Crohn y 2 de los 11 pacientes con colitis ulcerosa eran fumadores. Todo esto hace difícil la comparación con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

En el estudio de Ceyhan y cols⁸⁵, 3 de los 19 pacientes con colitis ulcerosa (16%) y 2 de los 11 (18%) pacientes con enfermedad de Crohn tuvieron HRB a metacolina mientras que esto no ocurría en ningún individuo del grupo control. Las diferencias en la prevalencia de HRB a metacolina entre el estudio de Ceyhan y cols⁸⁵ y el nuestro pueden deberse a la discordancia en las características de los pacientes seleccionados y en los aspectos metodológicos entre ambas investigaciones. En el estudio de Ceyhan y cols⁸⁵, 6 de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal sufrían rinitis alérgica y 3 presentaban historia de asma. Por el contrario, en nuestro estudio se excluyeron sistemáticamente los pacientes con estas manifestaciones. Además, 8 de los pacientes estudiados por Ceyhan y cols⁸⁵ eran fumadores, mientras que en nuestro estudio no se incluyeron fumadores. Si se tiene en cuenta que, como se ha indicado previamente, tanto la presencia de rinitis alérgica y/o asma como el hábito tabáquico incrementan la respuesta bronquial a metacolina, es evidente que estos factores pueden explicar, en una gran proporción, las diferencias entre los dos estudios. Además, aunque la metodología utilizada para la exploración (método dosimétrico) fue similar en ambos estudios, el punto de corte para la PC₂₀ utilizado por Ceyhan y cols⁸⁵ (16mg/ml) es superior al de 8mg/ml utilizado en nuestro estudio. Indudablemente, este factor pudo haber contribuido también a las diferencias entre las cifras de prevalencia encontradas en las dos series.

En población infantil, sólo hay un estudio publicado y este se realizó en pacientes con enfermedad de Crohn. Mansi y cols⁸³, encontraron HRB a metacolina en un 71% de sus pacientes (10 de 14), frente a ninguno en el grupo control. Esta diferencia se mantuvo incluso excluyendo los dos pacientes con historia de asma en la infancia del grupo con enfermedad de Crohn. Ningún paciente sufría rinitis alérgica, aunque no se especificó si alguno de estos niños tenía dermatitis atópica. Hay que destacar que es un hecho conocido que la HRB disminuye con la edad¹⁶⁵ y precisamente la edad de los pacientes del estudio y de los incluidos en el nuestro, el diferente tipo de enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn en su caso frente a colitis

ulcerosa en el nuestro), así como el diferente punto de corte (Mansi y cols⁸³ utilizaron un punto de corte arbitrario de 2.600µg para la PD₂₀) hacen que los resultados de ambos estudios sean difícilmente comparables.

A la vista de los datos anteriores, resulta difícil comparar los resultados de estudios previos, con los nuestros. Los datos previos aportan información sobre todo en pacientes con enfermedad de Crohn⁸²⁻⁸⁵ (87 pacientes frente a 55 pacientes con colitis ulcerosa en el total de estudios), algunos de ellos adolecen de los defectos metodológicos ya referidos en cuanto a la selección de la población a estudio^{82, 84, 85}, no son comparables por la diferente edad de la población a estudio⁸³ o existen diferencias en la metodología empleada⁸² o en el punto de corte para definir la existencia o no de HRB a metacolina^{82, 83, 85}. Por otra parte, el estudio de Ceyhan y cols⁸⁵, que es el que mas pacientes con colitis ulcerosa reclutó (19 de los 30 pacientes del estudio), no es comparable al nuestro al no tener en cuenta la presencia de manifestaciones pulmonares en estos individuos. En nuestro estudio, puesto que el objetivo era identificar alteraciones pulmonares subclínicas, se excluyeron aquellos pacientes que clínicamente tenían síntomas sugestivos de enfermedad pulmonar (tos, expectoración, sibilantes o disnea de esfuerzo) o enfermedades pulmonares ya diagnosticadas o alteraciones en la radiología simple de tórax.

Nuestro estudio es el único de los publicados hasta la actualidad en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal en el que se ha evaluado el grado de sensibilidad bronquial a metacolina. Los resultados indican que el grado de sensibilidad bronquial a metacolina encontrado en los pacientes con colitis ulcerosa no era significativamente mayor que el identificado en sujetos sanos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el tamaño de muestra de nuestro estudio se calculó para tener suficiente poder para identificar diferencias en la prevalencia de HRB a AMP y en las concentraciones de ENO, por lo que no podemos descartar que la ausencia de diferencias en el grado de respuesta a metacolina pueda obedecer a un error estadístico tipo II (tamaño de muestra insuficiente). Este aspecto debe aclararse en futuros estudios diseñados con este objetivo. No creemos que nuestros hallazgos puedan atribuirse a deficiencias metodológicas ya que los resultados se obtuvieron prestando una particular atención a la metodología de las provocaciones bronquiales.

No obstante, nuestro estudio tiene algunas limitaciones metodológicas que es importante tener en cuenta. En primer lugar, no pudo calcularse la PC_{20} en la mayoría de los pacientes con colitis ulcerosa y en ninguno de los sujetos sanos, pues no se observaron deterioros del $FEV_1 \geq 20\%$ tras nebulizar la concentración mas alta del agonista. Por este motivo, la respuesta a cada uno de los broncoconstrictores se ha expresado mediante el índice de reactividad propuesto por Burrows y cols¹¹⁰. De esta manera, se pudo asignar un valor numérico a la respuesta de cada paciente, lo que permitió comparar la intensidad de la respuesta en las dos poblaciones y determinar la relación con otros parámetros. Este método de expresión cuantitativa de la respuesta ha sido utilizado en estudios previos realizados en nuestro centro¹¹¹. En segundo lugar, el hecho de que en nuestro estudio se haya efectuado la provocación bronquial mediante el método dosimétrico pudo haber condicionado una menor prevalencia de HRB a metacolina identificada mediante la PC_{20} . Hasta hace pocos años se aceptaba que la respuesta a metacolina e histamina obtenida con el método dosimétrico era de intensidad similar a la obtenida mediante el método de inhalación a volumen corriente y que los resultados obtenidos con uno u otro método de provocación eran intercambiables. Sin embargo recientemente se ha puesto en duda esta equivalencia. Cockcroft y cols¹⁶³, compararon los valores de PC_{20} metacolina obtenidos mediante ambos métodos de provocación, en un grupo de 40 pacientes asmáticos. Estos autores encontraron que el valor medio de la PC_{20} mediante el método dosimétrico era casi el doble del identificado mediante el método de inhalación a volumen corriente (2,4mg/ml vs 1,3mg/ml, $p < 0,00005$). Además, las diferencias entre los valores obtenidos con uno y otro método eran mayores en los individuos con un grado más leve de sensibilidad bronquial (valores más elevados de la PC_{20}). En consecuencia, parecía evidente que los valores obtenidos con uno u otro método no eran estrictamente comparables. En otro estudio¹⁶⁶, en pacientes sometidos a prueba de provocación bronquial con metacolina por sospecha de asma y espirometría con valores en rango de referencia, se encontraron valores de la PC_{20} significativamente mas altos con el método dosimétrico (media geométrica, 8,9 mg/ml; 95 IC 4,3-18,2 mg/ml) que con el método de inhalación a volumen corriente (media geométrica, 5,2 mg/ml; 95% IC, 2,7-9,9mg/ml $p = 0,01$). Además, aceptando un punto de corte para la PC_{20} metacolina de 8 mg/ml, un 17% de los pacientes con HRB mediante el método de inhalación a volumen corriente presentaban respuesta normal mediante el método dosimétrico.

Recientemente¹⁶⁷ se han demostrado también valores más bajos para la PC₂₀ AMP obtenida mediante el método de inhalación a volumen corriente que para la identificada con el método dosimétrico. En 25 sujetos con sospecha de asma y espirometría con valores en el rango de referencia, los valores de la PC₂₀ fueron significativamente más altos con el método dosimétrico (media geométrica, 50,35mg/ml; 95% IC, 19,50-129,72) que con el método de inhalación a volumen corriente (media geométrica, 28,97mg/ml; 95% IC, 11,99-69,98 p = 0,02).

Los mecanismos que conducen a estas diferencias en la respuesta no se han aclarado definitivamente. No obstante, además de la menor cantidad de aerosol aportada a la boca con el dosímetro parece que el efecto broncodilatador y broncoprotector de las cinco maniobras inspiratorias profundas, que son inherentes al método dosimétrico, puede ser un importante factor para explicar las diferencias^{164, 168}.

Aunque en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal no hay estudios que hayan comparado la respuesta a la provocación bronquial con agonistas directos o indirectos entre ambos métodos, parece razonable pensar que en nuestra población pudiera haber existido una mayor prevalencia de HRB si se hubiera utilizado el método de inhalación a volumen corriente. En cualquier caso nuestro estudio no ha sido diseñado para estudiar las diferencias entre la respuesta a la provocación bronquial con ambos métodos (inhalación a volumen corriente y dosímetro) y este aspecto, debería ser aclarado en futuros estudios.

Las diferencias encontradas en nuestro estudio entre el índice de reactividad a AMP y a metacolina (significativas en el primer caso) tampoco estuvieron justificadas por diferencias en el calibre basal de las vías aéreas entre los dos días del estudio en que se efectuaron las provocaciones bronquiales, ya que no existieron diferencias significativas en los parámetros espirométricos entre ambos días. Además, los estudios se llevaron a cabo en el mismo momento del día para evitar la muy hipotética influencia del ritmo circadiano en la respuesta bronquial y el orden de las exploraciones se aleatorizó. Ambas pruebas estuvieron separadas por un intervalo de 3 a 7 días, por lo que es poco probable que una pudiese haber influido sobre la otra. También hay que destacar que el protocolo utilizado fue idéntico en el grupo control y en el grupo con colitis ulcerosa, por lo que si hubiese habido algún efecto de una provocación sobre la

otra, éste habría sido igual en ambos grupos. Al efectuarse las provocaciones con los dos agonistas a los mismos sujetos, pudo efectuarse una comparación directa del efecto de cada agonista en el mismo individuo. Ninguno de los sujetos estudiados estaba tomando medicaciones que hubiesen podido interferir en la respuesta a los agentes broncoconstrictores en los dos días que se efectuaron dichas pruebas. Por protocolo se excluyeron además pacientes que hubieran recibido tratamiento con glucocorticoides sistémicos en las 4 semanas previas, para evitar el efecto de estos fármacos sobre la provocación bronquial, especialmente con AMP¹⁶⁹.

No creemos que el mayor grado de respuesta a AMP en los pacientes con colitis ulcerosa, comparado con los controles sanos, pueda atribuirse a las diferencias en la función pulmonar basal entre estas dos poblaciones. Hay evidencias previas^{92, 170} que indican que la respuesta bronquial a AMP (al menos en población asmática) se correlaciona menos intensamente con los valores del FEV₁ en % del teórico que la respuesta bronquial a metacolina. Por el contrario, es un hecho bien conocido que la geometría de la vía aérea afecta decisivamente a la respuesta a los agonistas directos. En un estudio llevado a cabo por Britton y cols¹⁷¹, en una población de 2.415 adultos, el calibre basal de la vía aérea (FEV₁, FEV₁ en % del teórico y FEV₁/FVC%) se asociaba intensamente con la presencia de HRB a metacolina. En otro estudio publicado más recientemente y realizado en población general¹⁵⁹, también se constató la relación entre el FEV₁ y la respuesta a metacolina inhalada. Esta respuesta es mucho más evidente en pacientes con enfermedades que condicionan obstrucción al flujo aéreo^{172, 173} y en pacientes con asma bronquial¹⁷⁴. Resultados similares se han demostrado con otros agonistas directos¹⁷⁵ como la histamina.

No hay ningún estudio previo que haya analizado la relación entre la función pulmonar basal y la respuesta a agonistas directos e indirectos en la enfermedad inflamatoria intestinal. Sin embargo y de acuerdo con los anteriores estudios, resulta razonable pensar que, al igual que en otras poblaciones, la función pulmonar basal tenga una mayor influencia sobre la respuesta a metacolina que sobre la respuesta a AMP. Nuestros pacientes con colitis ulcerosa mostraban un incremento de la respuesta bronquial a AMP, pero no de la respuesta a metacolina, junto con alteraciones subclínicas de la función pulmonar que se concretaban en una reducción de los valores del FEV₁ y FEV₁/FVC%, lo que sugiere obstrucción basal. Sin embargo, este

incremento de la respuesta a AMP no parece ser consecuencia de la obstrucción basal, pues la respuesta a metacolina (que depende más directamente de la función pulmonar basal) no estaba incrementada significativamente. Todo esto confiere un alto interés clínico a los incrementos de la respuesta bronquial a AMP en la colitis ulcerosa, pues sugiere que los mismos deben ocurrir como consecuencia de un proceso inflamatorio bronquial activo o de algún otro tipo de alteración relevante, aún no adecuadamente identificada. Independientemente del mecanismo que genere el incremento de la respuesta al broncoconstrictor indirecto, es evidente que este hallazgo puede tener interés pronóstico y este aspecto debe aclararse en futuras investigaciones.

Pudiera argumentarse que el incremento de la respuesta a AMP, en los pacientes con colitis ulcerosa, pudiera deberse a una mayor potencia de este agonista, comparado con metacolina. No obstante, los diferentes estudios publicados hasta la actualidad coinciden en la observación de que, tanto en los asmáticos^{119, 176, 177} como en pacientes con EPOC¹¹⁶ y en individuos con rinitis alérgica⁹⁹, AMP es un broncoconstrictor menos potente que metacolina o histamina. En asmáticos, AMP es entre 4 a 16 veces menos potente que metacolina^{119, 177-179}. De igual manera AMP es alrededor de 11 veces menos potente como broncoconstrictor que metacolina en pacientes con EPOC¹¹⁶ y alrededor de 1,3 veces menos potente en los pacientes con rinitis alérgica⁹⁹.

No hay estudios comparativos de la potencia de AMP frente a metacolina en la población con colitis ulcerosa, pero el hecho de que la provocación bronquial con AMP excepcionalmente induzca broncoconstricción en individuos sanos^{86, 180} y que en entidades donde se ha demostrado la presencia de inflamación, como es el caso del asma, la EPOC y la rinitis, se comporte como un broncoconstrictor menos potente que metacolina, apoya la hipótesis de que, en nuestra población con colitis ulcerosa, la mayor respuesta a AMP es altamente específica y relacionada con la existencia de una inflamación aguda subyacente a nivel bronquial, que condicionará una activación mastocitaria y la consiguiente mayor respuesta a este broncoconstrictor selectivamente.

Hay que tener en cuenta que estos datos reflejan la respuesta a ambos broncoconstrictores en una población con colitis ulcerosa muy seleccionada, donde se ha excluido a los pacientes fumadores dado el notable efecto del tabaco sobre la respuesta bronquial a AMP (incrementándola^{116, 120}) y los valores de óxido nítrico

(reduciéndolos¹⁸¹). Por tanto, nuestros resultados pudieran no ser aplicables al conjunto de la población con colitis ulcerosa.

En nuestros pacientes con colitis ulcerosa, se ha comprobado la existencia de una correlación entre el índice de reactividad a metacolina y a AMP ($r = 0,56$ $p = 0,004$). La metacolina, interacciona directamente con el receptor M_2 del músculo liso bronquial^{79, 182} produciendo su contracción y el AMP actúa fundamentalmente sobre el receptor A_{2B} del mastocito^{113, 128} dando lugar a la liberación de diversos mediadores (histamina, leucotrienos, prostaglandinas etc) que también van a actuar sobre el músculo liso originando su contracción. En consecuencia, parece lógico presuponer que ambas respuestas broncoconstrictoras estén en cierta medida interrelacionadas. Nuestro estudio ha confirmado experimentalmente esta interrelación en pacientes sin patología primariamente respiratoria.

No existen estudios previos que hayan investigado la correlación entre la respuesta a metacolina y a AMP en la enfermedad inflamatoria intestinal. Sin embargo la relación significativa entre la respuesta a ambos agonistas ha sido evidenciada en pacientes con rinitis alérgica^{99, 117, 183}, asma (alérgica y no alérgica)^{99, 170, 178, 180, 184-186} y síndrome de Sjögren¹⁸⁷. En pacientes con asma se ha evidenciado una correlación significativa en asmáticos tanto alérgicos^{99, 170, 178, 180, 185, 186} como en no alérgicos^{180, 184}, entre la respuesta a ambos agonistas; Phillips y cols¹⁸⁴ encontraron, en un grupo de 11 asmáticos no alérgicos, una correlación entre la PD_{20} (dosis acumulada de agonista que induce una caída del FEV_1 del 20%) a ambos agonistas de 0,75 ($p = 0,01$) y Prieto y cols¹⁸⁶, en 24 pacientes asmáticos alérgicos con asma leve y moderada, encontraron una correlación entre la PC_{20} a metacolina y a AMP de 0,68 ($p < 0,001$). Resultados muy similares a este han sido encontrados por otros grupos y así Polosa y cols¹⁷⁸, en 12 pacientes asmáticos demostraron una correlación entre la PC_{20} a AMP y a metacolina de 0,75 ($p < 0,01$). Se ha visto como esta correlación se mantenía tanto en asmáticos con asma activa como en aquellos con asma en remisión¹⁸⁵ ($r = 0,72$ $p < 0,001$).

En pacientes con rinitis alérgica diversos grupos de trabajo^{99, 117, 183} han encontrado una buena correlación entre la respuesta bronquial a metacolina y AMP. Por ejemplo, en un grupo de 12 pacientes con rinitis alérgica, Polosa y cols¹¹⁷ evidenciaron una correlación de 0,77 ($p = 0,004$) entre la respuesta bronquial a metacolina y a AMP.

En el Síndrome de Sjögren¹⁸⁷, entidad en la que se ha demostrado un incremento de la respuesta bronquial a metacolina, se ha comunicado la existencia de una correlación ($r = 0,61$, $p < 0,05$) entre la respuesta bronquial a ambos agonistas. Nuestro estudio ha demostrado, por primera vez, que la relación significativa entre la respuesta bronquial a metacolina y a AMP se identifica también en los pacientes con colitis ulcerosa.

Aunque los dos agonistas detectan finalmente hiperexcitabilidad del músculo liso, hay que destacar que estos agentes (AMP y metacolina) no inducen una respuesta positiva en los mismos individuos. En nuestro estudio, los dos pacientes con una PC_{20} a metacolina menor de 8mg/ml no tuvieron respuesta positiva a AMP. Interesantemente, en otra entidad como es el caso de la rinitis alérgica^{99, 118, 188}, los dos broncoconstrictores tampoco identificaron siempre a los mismos individuos y así se identificaron sujetos con respuesta positiva aislada a uno de los agonistas. Estos hechos sugieren que la hiperrespuesta a AMP y a metacolina no está reflejando las mismas anomalías en las vías aéreas. Mientras que la respuesta a metacolina estaría determinada en mayor grado por alteraciones estructurales permanentes⁸⁰, la respuesta a AMP pudiera reflejar cambios inflamatorios agudos de la mucosa bronquial.

Por otra parte nuestro estudio no ha identificado diferencias en la concentración de ENO entre los pacientes con colitis ulcerosa y los individuos sanos. En la literatura existen pocos grupos que hayan estudiado los valores de ENO en la enfermedad inflamatoria intestinal^{70, 72}. Kanazawa y Yoshiwama⁷², encontraron resultados similares a los nuestros. En su estudio, compararon los niveles de ENO en cuatro grupos (controles sanos, pacientes con colitis ulcerosa y pacientes asmáticos con y sin colitis ulcerosa). En los pacientes con colitis ulcerosa sin asma, no existían diferencias estadísticamente significativas en los valores de ENO con respecto a los controles sanos. Nuestros resultados confirman esta observación. Por el contrario y como cabía esperar, los valores de ENO en los pacientes asmáticos (con y sin colitis ulcerosa) fueron superiores a los encontrados en el grupo con colitis ulcerosa sin asma y en el grupo de controles sanos. Además no existían diferencias significativas entre las dos poblaciones de asmáticos.

Es importante resaltar que, al igual que en nuestro estudio, Kanazawa y Yoshiwama⁷² estudiaron pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal

mayoritariamente en fase inactiva y utilizaron un método similar al nuestro para determinar las concentraciones de ENO. Todo ello hace que los resultados de ambos estudios sean perfectamente comparables. Por el contrario, el estudio realizado por Koek y cols⁷⁰ ofrece resultados diferentes a los nuestros, detectando una elevación de ENO en pacientes con colitis ulcerosa sin clínica respiratoria. Además estos autores demostraron una correlación positiva entre los niveles de ENO y el índice de actividad de la enfermedad ($r = 0,63$ $p < 0,001$). Las diferencias encontradas entre los datos obtenidos en nuestro estudio y los aportados por Koek y cols⁷⁰ no parecen estar justificadas por la existencia de una mayor actividad de la enfermedad intestinal en su población con colitis ulcerosa, dado que también en su grupo de pacientes existía un predominio de los sujetos en fase inactiva (18 de 24), muy similar al de nuestro estudio (16 de 24). Sin embargo, la presencia de rinitis no constituyó un criterio de exclusión en esta serie⁷⁰ y hay que tener en cuenta que la rinitis es una patología muy prevalente (puede llegar a afectar hasta un 23% de la población europea¹⁸⁹) y que origina elevaciones de los valores de ENO^{118, 190, 191}. Tampoco se estudió la sensibilización alérgica de los pacientes del estudio, por lo que no se puede excluir que la población de pacientes con colitis ulcerosa pudiese haber tenido una mayor prevalencia de sensibilizaciones a inhalantes que el grupo control, circunstancia en si misma^{192, 193} que justificaría unos niveles de ENO diferentes entre ambos grupos. Finalmente es necesario destacar que la metodología utilizada en el trabajo de Koek y cols⁷⁰ y la utilizada en el nuestro ha sido diferente, ya que estos autores utilizaron la metodología propuesta por la European Respiratory Society¹⁹⁴ que recomienda utilizar flujos mucho más elevados que los 50ml/segundo recomendados por la American Thoracic Society¹⁰⁹, que se han utilizado en nuestro estudio.

El hecho de no encontrar una elevación de los valores de ENO en la población con colitis ulcerosa, no debe ser interpretado como sinónimo de la inexistencia de inflamación a nivel pulmonar en los pacientes con la enfermedad. Incluso en enfermedades como el asma, donde la existencia de una inflamación bronquial crónica es un hecho claramente establecido y en la cual numerosos estudios han demostrado una elevación de ENO^{58, 190, 195, 196}, la correlación entre los niveles de ENO y los marcadores directos de inflamación ha sido bastante débil^{197, 198}, sin que esto ponga en duda la base inflamatoria de esta enfermedad. Al menos en el asma bronquial, las concentraciones de ENO se han relacionado de manera mucho más evidente con la

inflamación eosinofílica^{94, 197, 199, 200}, célula que juega un papel fundamental en esta entidad. Esta situación parece ser diferente en los estudios de biopsias bronquiales que se han efectuado en la población con colitis ulcerosa, donde los eosinófilos no parecen ser el patrón celular predominante. Así en el estudio de Camus y cols²² que constituye la serie con mayor número de pacientes con biopsia bronquial, la célula predominante en el infiltrado inflamatorio era el linfocito. Este hecho podría justificar, que pese a la existencia de una inflamación bronquial subyacente, no se detectaran incrementos de los valores de ENO, pues este marcador podría no ser suficientemente sensible a este fenotipo concreto de inflamación.

Una situación diferente a la expuesta, pero que también pone de manifiesto la disociación entre inflamación y concentraciones de ENO, es la referida a los efectos del humo del tabaco. Es un hecho conocido que el hábito tabáquico causa inflamación de la vías aéreas²⁰¹⁻²⁰⁴. Sin embargo, este agente reduce los niveles de ENO¹⁸¹.

Por otra parte, en la colitis ulcerosa¹³⁶ se produce un patrón de citocinas predominantemente Th2 con elevación de IL-5, IL-13 pero no de IL-4 y además se han visto niveles elevados de IFN- γ y TNF- α . Se puede especular que la presencia de este fenotipo de citocinas en la colitis ulcerosa condicione que quizás, pese a la existencia de algunos de los factores estimulantes de la producción de ENO, no se llegue a producir finalmente su incremento.

Podría argumentarse que los valores de ENO en nuestro grupo control son anormalmente altos y que este hecho pudiera dificultar la existencia de diferencias significativas con los pacientes con colitis ulcerosa. Sin embargo los valores de ENO de los individuos sanos se encontraron dentro de los valores considerados como normales de acuerdo con los datos procedentes de otros estudios. Así Olin y cols²⁰⁵, en un estudio efectuado siguiendo la normativa de la American Thoracic Society en población sana (tanto atópicos como no atópicos) consideran como límite normal superior de valores de ENO los comprendidos entre 24 a 54 ppb. En nuestros sujetos sanos el valor más alto fue de 54,2 ppb, que está muy próximo al valor más alto del citado estudio. Para Olin y cols²⁰⁶, la edad de los sujetos aumenta los niveles de ENO y en nuestro estudio el valor más alto de ENO entre los individuos del grupo control correspondió al de un sujeto de 62 años. En otro estudio publicado en 72 sanos no fumadores²⁰⁷, usando flujos

idénticos al de nuestro estudio, la media de ENO era de 23 ppb, muy similar a nuestro valor medio de 20,4 ppb. Tampoco en nuestra población control hubo una mayor prevalencia de atopia con respecto al grupo con colitis ulcerosa, hecho que hubiera podido suponer un mayor incremento de los niveles de ENO en el grupo control y dificultar la identificación de diferencias entre ambas poblaciones.

Esta ausencia de diferencias entre las dos poblaciones de nuestro estudio, no parece estar justificada tampoco por defectos metodológicos, pues se excluyeron aquellos factores que pudieran haber tenido alguna influencia sobre los valores de ENO. Por ejemplo, dado el notable efecto de los corticoides sobre los niveles de ENO²⁰⁸ no se incluyeron a aquellos sujetos que hubiesen recibido tratamiento con glucocorticoides sistémicos en las 4 semanas previas al mismo. Además, fueron excluidos los fumadores, dado que este hábito reduce los niveles de ENO^{181, 206} y también los individuos que habían sufrido infecciones respiratorias en las cuatro semanas anteriores al estudio, pues este factor incrementa transitoriamente las concentraciones de ENO⁶².

En nuestro trabajo, la determinación de ENO se ha efectuado con dos métodos diferentes debido a problemas técnicos. En los 24 sujetos del grupo control y 21 de los 24 pacientes con colitis ulcerosa, las determinaciones de ENO se efectuaron con el equipo NIOX®, mientras que en los 3 pacientes restantes se utilizó el equipo portátil NIOX MINO®. Existen diversos trabajos publicados donde se demuestra la excelente correlación entre los valores de ENO obtenidos con ambos equipos. Sovijärvi y cols²⁰⁹, en una población de 35 pacientes adultos con patologías respiratorias diversas (13 con asma, 1 con bronquitis crónica, 4 pacientes con disnea, 6 con tos irritativa, 1 con tos productiva y 9 con otros síntomas respiratorios) encontraron un coeficiente de correlación entre los valores de ENO obtenidos con ambos equipos de 0,99 ($p < 0,0001$). Menzies y cols²¹⁰ en un estudio comparativo entre NIOX® y NIOX MINO®, en 101 pacientes asmáticos y 50 individuos sanos encuentran un coeficiente de correlación entre los valores obtenidos con cada método de 0,94 en la población asmática y de 0,96 en la población sana. Esta alta correlación entre los valores identificados con ambos trazadores ha sido demostrada en otros muchos estudios tanto en población infantil^{211, 212} como en adultos²¹³⁻²¹⁶.

No obstante, esta magnífica correlación entre las concentraciones de ENO obtenidas con cada método en absoluto garantiza que los valores obtenidos con cada uno de los trazadores sean equivalentes. En este sentido resultan mas ilustrativos los estudios que han comparado las concentraciones de ENO obtenidas mediante quimioluminiscencia (NIOX®) con las obtenidas mediante el método electroquímico NIOX MINO®. Aunque la mayoría de los estudios^{209-212, 216} coinciden en la observación de que los valores obtenidos con el NIOX MINO® son mas elevados que los detectados mediante el NIOX®, la experiencia previa de nuestro grupo es discordante. En una muestra de 112 individuos a los que se determinaron las concentraciones de ENO con ambos sistemas, se encontró que las concentraciones de ENO obtenidas mediante quimioluminiscencia eran significativamente más altas que las detectadas mediante el método electroquímico. Además, las diferencias eran cuantitativamente mayores en los individuos que presentaban altas concentraciones de ENO (≥ 60 ppb)²¹⁷. Sin embargo, no creemos que nuestros resultados puedan haberse visto afectados por los valores obtenidos en los 3 pacientes con colitis ulcerosa en los que la determinación se realizó mediante el sistema NIOX MINO® pues los resultados eran similares cuando se eliminaron del análisis los valores de estos tres pacientes .

En nuestro estudio, la determinación de ENO mediante quimioluminiscencia se ha realizado de acuerdo con la normativa de la American Thoracic Society de 1999¹⁰⁹ y el valor de ENO se ha obtenido mediante la media de tres determinaciones técnicamente correctas. Una revisión mas reciente de la normativa anterior recomienda realizar solo dos determinaciones⁹⁵, aunque son muchos los estudios que han continuado empleando las tres maniobras recomendadas inicialmente^{210, 211, 214-216, 218}.

Por el contrario, para la determinación de ENO mediante el método electroquímico hemos utilizado una sola maniobra. Existen diversos trabajos que avalan la validez de utilizar una única determinación con el sistema NIOX MINO® . Alving y cols²¹⁶ en un estudio en el que participan 32 controles sanos y 39 asmáticos adultos, encontraron que la mediana de la variabilidad de la medición de ENO intrasujeto era de 1,2 ppb con rango intercuartiles de -3,3 a 0,8 ppb. En otro estudio²¹⁵, en el que se efectúan cinco mediciones consecutivas a diez controles sanos, la mediana de la repetibilidad en las determinaciones de ENO, fue de 1,3 ppb. Sovijärvi y cols²⁰⁹, en 35 pacientes con diversa patología y sintomatología respiratoria, efectúan dos mediciones

de ENO con este trazador y encuentran una diferencia de 1,3 ppb entre la primera y la segunda determinación con un coeficiente de repetibilidad del 7,4%. Torre y cols²¹³, en un estudio efectuado en 82 sujetos sin patología respiratoria, encuentran una diferencia media entre la primera y segunda determinación de $-1,1 \pm 6$ ppb, con un coeficiente de repetibilidad del 7,7%. Además, se ha demostrado muy escasa variabilidad entre las determinaciones de ENO obtenidas mediante NIOX MINO® efectuadas en días consecutivos²¹⁹ y entre las determinaciones obtenidas en un mismo sujeto con dos trazadores de NIOX MINO® diferentes²²⁰. Por todos estos motivos, parece que una única determinación es suficiente para evaluar con precisión la concentración de ENO mediante el método electroquímico.

Los niveles de ENO, no se correlacionaron, en los pacientes con colitis ulcerosa de nuestro estudio, con la respuesta a la provocación bronquial con AMP y metacolina. Los estudios en los que se ha analizado la correlación entre los valores de ENO y la respuesta a la provocación bronquial con AMP son escasos. En el caso del asma bronquial alérgica, en cuatro estudios se analizó la respuesta a ambos agonistas y su correlación con los valores de ENO^{111, 185, 196, 221}, detectándose en dos de ellos una correlación significativa entre respuesta a AMP y ENO^{185, 196}, pero no entre respuesta a metacolina y ENO. Sólo en uno de estos estudios se evidenció una relación entre los cambios en los valores de ENO y las modificaciones en el índice de reactividad a la metacolina¹¹¹, aunque los autores subrayaron que se trataba de una correlación débil. En otro de estos estudios realizados en pacientes asmáticos alérgicos a polen, Prieto y cols²²¹ no observaron correlación significativa entre los cambios en la concentración de ENO inducidos por la exposición al alergeno durante la estación polínica y el aumento de la respuesta bronquial, tanto a AMP como a metacolina.

Otros tres estudios en pacientes con rinitis (tanto alérgica como no alérgica)^{100, 118, 196} no han evidenciado relación entre los valores de ENO y la respuesta bronquial a AMP. Al igual que ocurrió en uno de los estudios en asma²²¹, en uno de estos trabajos¹⁰⁰ realizados sobre 14 pacientes con rinitis alérgica polínica que habían presentado HRB a metacolina y AMP durante la estación polínica, se evidenció que los incrementos de la HRB a ambos agentes no se correlacionaban con el incremento de los valores de ENO, hecho que induce a pensar en un mecanismo diferente para aumentar la respuesta bronquial y para incrementar el ENO.

Existen diversos estudios en los que se ha identificado de forma aislada la relación entre la respuesta a metacolina (o histamina) y los valores de ENO, en la enfermedad asmática. Los resultados de los mismos han sido discordantes. Existen casi tantos estudios que han demostrado una correlación significativa^{197, 222-225} como que no han logrado identificarla^{174, 198, 199, 226}, por lo que no se pueden aventurar conclusiones definitivas. Tampoco en la rinitis se ha detectado relación entre los valores de ENO y la respuesta bronquial a metacolina^{100, 118, 196}.

En cualquier caso parece evidente que la determinación de la respuesta bronquial a un broncoconstrictor inhalado y la cuantificación de las concentraciones de ENO identifican aspectos distintos de la fisiopatología del aparato respiratorio. El primero de estos marcadores identifica predominantemente facilidad para inducir incrementos en el tono del músculo liso bronquial, mientras que el segundo detecta concentraciones de un producto generado por el efecto de diferentes enzimas presumiblemente reguladas por la intensidad del proceso inflamatorio. En consecuencia, la información aportada por ambos marcadores puede ser complementaria, pero en ningún caso equivalente.

Hasta la fecha, no hay estudios que hayan analizado, en la enfermedad inflamatoria intestinal, la relación entre la respuesta bronquial a agonistas tanto directos como indirectos y los valores de ENO. Los hallazgos de nuestro estudio orientan a pensar que, en los pacientes con colitis ulcerosa, la respuesta a la provocación bronquial con agonistas directos e indirectos y las concentraciones de ENO, son consecuencia de procesos diferentes. Es decir, los mecanismos que determinan la hiperexcitabilidad bronquial en esta enfermedad no tienen por qué intervenir en la generación de ENO.

Sin embargo en el grupo control, sí que se encontró una correlación significativa entre los niveles de ENO y la respuesta bronquial a la provocación con AMP. Este resultado no parece debido a problemas metodológicos ya que tanto en el grupo control como en el afecto de colitis ulcerosa, se utilizó una metodología idéntica. Cuando se analizó detalladamente la correlación entre ENO e índice de reactividad a AMP en este grupo, se observó, que uno de los sujetos tenía unos niveles de ENO de 54,2 ppb, que condicionaba en gran manera los resultados del coeficiente de correlación (outlier).

Excluyendo este dato, el coeficiente de correlación no es significativo (**figura 14**). No se puede excluir que este sujeto, hubiese hecho una dieta rica en arginina o que, por una maniobra defectuosa no se hubiese producido una elevación adecuada del velo del paladar que hubiese generado una contaminación por óxido nítrico procedente de las vías respiratorias superiores, aunque se respetó rigurosamente la metodología recomendada para la determinación de ENO.

Otro aspecto analizado fue el de si se detectaban diferencias en la respuesta bronquial a metacolina y AMP, así como en los valores de ENO, en función de la actividad de la enfermedad, valorada mediante el índice de Truelove-Witts modificado. En nuestra población no se encontraron diferencias significativas en estas variables en función de dicho índice. Es decir, la actividad de la enfermedad no determinaba diferencias en la respuesta a ambos agonistas o en los valores de ENO. Nuestros resultados confirman los hallazgos de otros estudios que han identificado la HRB en esta enfermedad mediante metacolina. En un estudio⁸² realizado sobre 38 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (11 con colitis ulcerosa y 27 con enfermedad de Crohn), 16 de ellos en fase activa (4 con colitis ulcerosa y 12 en el grupo con enfermedad de Crohn), los autores no encontraron diferencias significativas en la HRB a metacolina en función de la actividad de la enfermedad. Tampoco Ceyhan y cols⁸⁵ y Kullmann y cols⁸⁴ encontraron diferencias en función de la actividad de la enfermedad en la respuesta bronquial a metacolina de sus pacientes.

Al igual que sucedió en nuestro estudio, en los trabajos de Louis y cols⁸² y Ceyhan y cols⁸⁵ el mayor porcentaje de pacientes correspondió a pacientes con enfermedad en fase inactiva. En nuestro estudio, todos los pacientes con enfermedad en fase activa (8 de 24) tenían un grado de actividad leve (puntuación entre 7 a 11), valorados mediante el índice de actividad de Truelove-Witts modificado¹⁷. Debemos aceptar que nuestros resultados podrían haber sido diferentes si los pacientes hubiesen presentado un mayor grado de actividad o se hubiese incluido una mayor proporción de sujetos con enfermedad activa (error tipo II).

No existen estudios previos que hayan comparado la respuesta a AMP en pacientes con colitis ulcerosa activa e inactiva. De manera similar a lo que ocurría con metacolina, no hemos podido demostrar diferencias en la respuesta a AMP inhalada

entre estas dos poblaciones. Similarmente a lo indicado para metacolina, debe aceptarse que la ausencia de diferencias pueda deberse a que la enfermedad estuviese en un estadio leve o al pequeño número de sujetos con enfermedad en fase activa. Al menos en parte, este pequeño número de pacientes con enfermedad activa pudo estar condicionado por nuestros criterios de selección, pues se excluyeron del estudio los pacientes tratados con corticoides, con el fin de evitar el factor de confusión asociado con el efecto de estos fármacos sobre la respuesta a AMP¹⁶⁹ y sobre las concentraciones de ENO²⁰⁸.

Al igual que sucedió con la respuesta a agonistas, tampoco se detectaron diferencias en los niveles de ENO en función de la actividad de la enfermedad. Estos resultados diferían de los comunicados por Koek y cols⁷⁰, que encontraron una correlación significativa entre la actividad de la enfermedad y los valores de ENO, tanto en los pacientes con colitis ulcerosa ($r = 0,63$, $p < 0,001$) como en los que padecían enfermedad de Crohn ($r = 0,39$, $p < 0,05$). En este estudio, al igual que en el nuestro, había una mayor proporción de pacientes con enfermedad en fase inactiva que en fase activa. Sin embargo existen diferencias metodológicas entre ambos estudios. En primer lugar, Koek y cols⁷⁰ no estudiaron la sensibilización a alérgenos, circunstancia que, aún sin expresión clínica, puede conducir a una elevación de los niveles de ENO^{192, 193}. Por otra parte, estos autores⁷⁰ siguieron la normativa de la European Respiratory Society, que utiliza un flujo para la determinación de ENO notablemente superior al utilizado en nuestro estudio.

Al igual que en nuestro estudio, la mayoría de los autores^{28, 46, 49-53} que han seleccionado población sin manifestaciones pulmonares ni alteraciones en la radiografía de tórax, no han podido detectar que la actividad de la enfermedad intestinal mostrase alguna relación con la intensidad de las alteraciones pulmonares estudiadas. Estos estudios abarcaron desde la difusión pulmonar^{50, 51}, hallazgos en el BAL^{28, 49, 52}, permeabilidad del epitelio pulmonar⁵³, biopsia bronquial⁵² o pruebas funcionales respiratorias^{46, 49}. A destacar, que a pesar de que en alguno de estos estudios había un predominio de pacientes con la enfermedad en fase activa^{46 49, 50, 53}, tampoco se detectaron diferencias en función de la actividad de la enfermedad. Incluso otros estudios en los que la presencia de manifestaciones pulmonares no constituyó un criterio de exclusión^{42, 44, 45, 47}, tampoco encontraron una relación entre las

alteraciones pulmonares (espirometría, volúmenes pulmonares y difusión) y la actividad de la enfermedad.

En nuestros pacientes con colitis ulcerosa no se encontraron diferencias significativas ni en los valores de ENO, ni en la respuesta bronquial a AMP, ni en la respuesta bronquial a metacolina en función del grado de extensión de la enfermedad. Únicamente el estudio de Louis y cols⁸² ha analizado las diferencias en la respuesta bronquial a metacolina en una población con colitis ulcerosa extensa y en otra con colitis izquierda, sin encontrar diferencias significativas. En cuanto a las concentraciones de ENO, sólo el estudio de Koek y cols⁷⁰ tuvo en cuenta la extensión de la enfermedad inflamatoria intestinal, sin encontrar diferencias en función de la misma. En el estudio⁷⁰ se incluyeron 24 pacientes con colitis ulcerosa y la media de los valores de ENO en el subgrupo con colitis ulcerosa izquierda era de $13,6 \pm 4,6$ ppb frente a $16,8 \pm 7,6$ ppb en los sujetos con colitis extensa ($p = 0,32$).

La duración de la enfermedad en nuestros pacientes no se relacionó con los valores de ENO ni con la repuesta a la provocación bronquial con AMP o con metacolina. Nuestros resultados coinciden con otros estudios publicados^{43, 50, 51, 53, 82-85}, donde se ha intentado relacionar la duración de la enfermedad con diversos parámetros. En cuatro de los trabajos, se analizó la relación entre la duración de la enfermedad con la HRB a metacolina^{48, 82, 84, 85}, sin evidencia de correlación. En los otros estudios, no se identificaron diferencias en el FEV₁^{43, 51}, la difusión pulmonar⁵¹, la permeabilidad pulmonar⁵³ o los hallazgos en el BAL⁵⁰ en función de la duración del proceso inflamatorio intestinal.

Todos estos hallazgos sugieren que las alteraciones pulmonares encontradas son consecuencia de la presencia de la enfermedad inflamatoria intestinal, pero no dependen de su extensión, grado de actividad o duración.

Finalmente destacar que en nuestro estudio, pese a que se seleccionaron pacientes sin manifestaciones clínicas pulmonares y sin imágenes radiológicas patológicas, se detectaron deterioros espirométricos en los pacientes con colitis ulcerosa con respecto al grupo control, tanto en el FEV₁ en % del teórico como en el cociente FEV₁/FVC%. Estos hallazgos han sido también encontrados por otros autores

que utilizaron unos criterios de selección similares a los nuestros (pacientes sin clínica ni radiología sugestivas de afectación pulmonar). En 66 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (35 con enfermedad de Crohn y 30 con colitis ulcerosa), Herrlinger y cols⁵¹ encontraron una reducción del FEV₁ y de la capacidad vital inspiratoria con respecto a sujetos sanos, siendo esta diferencia mayor en pacientes con enfermedad activa. También otro estudio²⁷ realizado sobre 62 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (30 con colitis ulcerosa) se encontró una reducción del FEV₁ (p<0,005) comparado con el grupo control. Por el contrario Louis y cols^{75, 82} no observaron diferencias espirométricas entre los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y los controles sanos.

Otros trabajos también encontraron diversos deterioros en el funcionalismo pulmonar mediante espirometría y/o volúmenes pulmonares, aunque son estudios que, a diferencia del nuestro, no especificaron claramente la presencia o ausencia de manifestaciones clínicas pulmonares en los pacientes seleccionados. Los pacientes reclutados por Böker y cols⁴³ mostraban una reducción del FEV₁ (p<0,005) comparado con el grupo control. Otros autores⁴² demostraron una reducción en el FEF₂₅ y FEF₆₀ con respecto al grupo control y, en un estudio reciente, Mohamed y cols²²⁷ encontraron una reducción del FEV₁, FVC y FEF₂₅₋₇₅ en sus 26 pacientes con colitis ulcerosa, comparado con los controles sanos, existiendo una correlación negativa con la actividad de la enfermedad. Otros autores⁴⁵ han identificado alteraciones sugestivas de afectación de la pequeña vía aérea (Visov).

No obstante también hay que destacar la existencia de diversos estudios que no evidencian deterioros en la función pulmonar valorada mediante espirometría pese a que los pacientes seleccionados podían tener manifestaciones clínicas pulmonares. Songur y cols⁵⁶ no detectaron diferencias en el FEV₁, FVC, FEV₁/FVC% entre los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (23 con colitis ulcerosa) y el grupo control. Otros grupos^{41, 45, 54, 55, 72} obtuvieron resultados similares.

En resumen, los estudios realizados para identificar alteraciones espirométricas en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal han aportado resultados muy variables, pero parece razonable aceptar que la espirometría no es una exploración

suficientemente sensible ni específica para evaluar con garantías la afectación pulmonar silente en la colitis ulcerosa.

En nuestro estudio no se encontró una relación significativa entre los parámetros de función pulmonar y los valores de ENO tanto en el grupo con colitis ulcerosa como en los controles sanos. En los dos estudios donde se han determinado los valores de ENO en pacientes con colitis ulcerosa^{70, 72} esta correlación no se estudió. Sin embargo, nuestros resultados son similares a los encontrados en los asmáticos (población donde esta relación ha sido ampliamente estudiada). En la mayoría de los estudios realizados en asmáticos, no se ha podido identificar una relación entre las concentraciones de ENO y los parámetros de función pulmonar^{199, 200, 228-231}. Además en los estudios en los que pudo determinarse relación, esta era bastante débil^{174, 198, 232, 233}, lo que sugiere que la información aportada por ambas pruebas no es equivalente y quizás pueda resultar complementaria.

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con colitis ulcerosa sin manifestaciones clínicas respiratorias, presentan un incremento de la respuesta bronquial a adenosina 5'-monofosfato, mientras que las modificaciones en la respuesta bronquial a metacolina son menos evidentes. Estos datos sugieren más la presencia de un proceso inflamatorio activo en la pared bronquial, que la existencia de alteraciones estructurales bronquiales persistentes.
2. Sin embargo, las concentraciones de óxido nítrico en aire exhalado son similares en los pacientes con colitis ulcerosa y en los individuos sanos. Por tanto parece que, en la colitis ulcerosa, las alteraciones inflamatorias presentes en la pared bronquial son distintas de las encontradas en las enfermedades alérgicas y no estimulan la síntesis enzimática o no enzimática de óxido nítrico en el aparato respiratorio.
3. La presencia de deterioros de la función pulmonar, que se han confirmado en la presente Tesis Doctoral, sugiere también la existencia de una afectación pulmonar subclínica en la colitis ulcerosa.
4. No ha podido demostrarse una relación entre el grado de afectación de la respuesta bronquial a adenosina 5'-monofosfato y la actividad o extensión de la afección intestinal. En consecuencia, parece que la afectación respiratoria subclínica no depende de la intensidad del cuadro digestivo.
5. Globalmente, los resultados de la presente Tesis Doctoral demuestran que la determinación de la respuesta a adenosina 5'-monofosfato, un broncoconstrictor indirecto, es más sensible que la identificación de la respuesta a metacolina para detectar alteraciones inflamatorias subclínicas en el aparato respiratorio de los pacientes con colitis ulcerosa. Parecen necesarios estudios prospectivos para determinar si el incremento de la respuesta bronquial a adenosina se asocia con un mayor riesgo de desarrollar patología respiratoria clínicamente evidente.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989; 170:2-6.
- (2) Jewell DP. Ulcerative colitis. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, editors. *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and liver disease. Pathophysiology, diagnosis, management*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998: 1735-61.
- (3) Glickman RM. Enfermedad inflamatoria intestinal: colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. In: Fauci AS, editor. *Harrison Principios de Medicina Interna*. Aravaca: Mc Graw. Interamericana de España, S. A. U., 1998: 1853-68.
- (4) Pajares JM, Gisbert JP. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Spain. A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig* 2001; 93(1):9-20.
- (5) Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996; 39(5):690-7.
- (6) Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369(9573):1627-40.
- (7) Gasull MA, Cabre E. Manifestaciones clínicas para el diagnóstico de la EII. In: Gasull MA, Obrador A, Chantar C, editors. *Enfermedad inflamatoria intestinal*. Barcelona: Prous JR editores, 1994: 12-137.
- (8) Goebell H. The role of laboratory test in the assessment of IBD. In: Rach Milewitz D, editor. *Inflammatory Bowel Disease. Symposium Falk 72*. Dordrech: Kluwer Academic Publisher, 1994: 117-23.
- (9) Ramos L, Chantar C. Métodos de diagnóstico por la imagen en la EII. In: Gasull MA, Obrador A, Chantar C, editors. *Enfermedad inflamatoria intestinal*. Barcelona: Prous JR, 1994: 13-37.
- (10) Pera A, Bellando P, Caldera D, Ponti V, Astegiano M, Barletti C et al. Colonoscopy in inflammatory bowel disease. Diagnostic accuracy and proposal of an endoscopic score. *Gastroenterology* 1987; 92(1):181-5.
- (11) Boix JV. Endoscopia y ecoendoscopia en la EII. In: Gasull MA, Obrador A, Chantar C, editors. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. Barcelona: Prous JR, 1994: 39-50.
- (12) Geller AS. Pathology of inflammatory bowel disease: a critical appraisal in diagnosis and management. In: Targan SR, Shanahan F, editors. *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994: 336-51.

-
- (13) Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Nielsen OH, Binder V. Changes in extent of ulcerative colitis: a study on the course and prognostic factors. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(3):260-6.
- (14) Hanauer SB. Measurements of disease activity. In: Targan SR, Shanahan F, editors. *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994: 429-44.
- (15) Singleton JW. Clinical activity assessment in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1987; 32(12 Suppl):42S-5S.
- (16) Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2(4947):1041-8.
- (17) Gonzalez-Huix F, Fernandez-Banares F, Esteve-Comas M, bad-Lacruz A, Cabre E, Acero D et al. Enteral versus parenteral nutrition as adjunct therapy in acute ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88(2):227-32.
- (18) Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006; 55(6):749-53.
- (19) Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferrri F, Fedeli G et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11(46):7227-36.
- (20) Levine JB, Lukawski-Trubish D. Extraintestinal considerations in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995; 24(3):633-46.
- (21) Veloso FT, Carvalho J, Magro F. Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *J Clin Gastroenterol* 1996; 23(1):29-34.
- (22) Camus P, Piard F, Ashcroft T, Gal AA, Colby TV. The lung in inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72(3):151-83.
- (23) Kethu SR. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel diseases. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40(6):467-75.
- (24) Marvisi M, Bassi E, Civardi G. Pulmonary involvement in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3(4):437-9.
- (25) Edwards FC, Truelove SC. The course and prognosis of ulcerative colitis. III. Complications. *Gut* 1964; 5:1-22.
- (26) Kraft SC, Earle RH, Roesler M, Esterly JR. Unexplained bronchopulmonary disease with inflammatory bowel disease. *Arch Intern Med* 1976; 136(4):454-9.

-
- (27) Kuzela L, Vavrecka A, Prikazska M, Drugda B, Hronec J, Senkova A et al. Pulmonary complications in patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1999; 46(27):1714-9.
- (28) Bonniere P, Wallaert B, Cortot A, Marchandise X, Riou Y, Tonnel AB et al. Latent pulmonary involvement in Crohn's disease: biological, functional, bronchoalveolar lavage and scintigraphic studies. *Gut* 1986; 27(8):919-25.
- (29) Higenbottam T, Cochrane GM, Clark TJ, Turner D, Millis R, Seymour W. Bronchial disease in ulcerative colitis. *Thorax* 1980; 35(8):581-5.
- (30) Mahadeva R, Walsh G, Flower CD, Shneerson JM. Clinical and radiological characteristics of lung disease in inflammatory bowel disease. *Eur Respir J* 2000; 15(1):41-8.
- (31) Storch I, Sachar D, Katz S. Pulmonary manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9(2):104-15.
- (32) Black H, Mendoza M, Murin S. Thoracic manifestations of inflammatory bowel disease. *Chest* 2007; 131(2):524-32.
- (33) Isenberg JI, Goldstein H, Korn AR, Ozeran RS, Rosen V. Pulmonary vasculitis--an uncommon complication of ulcerative colitis. Report of a case. *N Engl J Med* 1968; 279(25):1376-7.
- (34) Gabazza EC, Taguchi O, Yamakami T, Machishi M, Ibata H, Fukukita S et al. Bronchopulmonary disease in ulcerative colitis. *Intern Med* 1992; 31(9):1155-9.
- (35) Wilcox P, Miller R, Miller G, Heath J, Nelems B, Muller N et al. Airway involvement in ulcerative colitis. *Chest* 1987; 92(1):18-22.
- (36) Desai SJ, Gephardt GN, Stoller JK. Diffuse panbronchiolitis preceding ulcerative colitis. *Chest* 1989; 95(6):1342-4.
- (37) Vennera MC, Picado C. [Pulmonary manifestations of inflammatory bowel disease]. *Arch Bronconeumol* 2005; 41(2):93-8.
- (38) Butland RJ, Cole P, Citron KM, Turner-Warwick M. Chronic bronchial suppuration and inflammatory bowel disease. *Q J Med* 1981; 50(197):63-75.
- (39) Hoffmann RM, Kruis W. Rare extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10(2):140-7.
- (40) Camus P, Colby TV. The lung in inflammatory bowel disease. *Eur Respir J* 2000; 15(1):5-10.
- (41) Tzanakis N, Bouros D, Samiou M, Panagou P, Mouzas J, Manousos O et al. Lung function in patients with inflammatory bowel disease. *Respir Med* 1998; 92(3):516-22.

-
- (42) Heatley RV, Thomas P, Prokipchuk EJ, Gauldie J, Sieniewicz DJ, Bienenstock J. Pulmonary function abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Q J Med* 1982; 51(203):241-50.
- (43) Böker KHW, Gehrdes R, Welte T, Wagner TOF, Manns MP. Pulmonary complications in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994; 106:A655.
- (44) Godet PG, Cowie R, Woodman RC, Sutherland LR. Pulmonary function abnormalities in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(7):1154-6.
- (45) Tzanakis N, Samiou M, Bouros D, Mouzas J, Kouroumalis E, Siafakas NM. Small airways function in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(2):382-6.
- (46) Munck A, Murciano D, Pariente R, Cezard JP, Navarro J. Latent pulmonary function abnormalities in children with Crohn's disease. *Eur Respir J* 1995; 8(3):377-80.
- (47) Douglas JG, McDonald CF, Leslie MJ, Gillon J, Crompton GK, McHardy GJ. Respiratory impairment in inflammatory bowel disease: does it vary with disease activity? *Respir Med* 1989; 83(5):389-94.
- (48) Adenis A, Colombel JF, Lecouffe P, Wallaert B, Hecquet B, Marchandise X et al. Increased pulmonary and intestinal permeability in Crohn's disease. *Gut* 1992; 33(5):678-82.
- (49) Wallaert B, Colombel JF, Tonnel AB, Bonniere P, Cortot A, Paris JC et al. Evidence of lymphocyte alveolitis in Crohn's disease. *Chest* 1985; 87(3):363-7.
- (50) Eade OE, Smith CL, Alexander JR, Whorwell PJ. Pulmonary function in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1980; 73(2):154-6.
- (51) Herrlinger KR, Noftz MK, Dalhoff K, Ludwig D, Stange EF, Fellermann K. Alterations in pulmonary function in inflammatory bowel disease are frequent and persist during remission. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(2):377-81.
- (52) Karadag F, Ozhan MH, Akcicek E, Gunel O, Alper H, Veral A. Is it possible to detect ulcerative colitis-related respiratory syndrome early? *Respirology* 2001; 6(4):341-6.
- (53) Gursoy S, Guven K, Kula M, Canoz O, Yurci A, Unluhizarci K et al. Subclinical alveolar involvement in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(4):372-5.
- (54) Johnson NM, Mee AS, Jewell DP, Clarke SW. Pulmonary function in inflammatory bowel disease. *Digestion* 1978; 18(5-6):416-8.

-
- (55) Neilly JB, Main AN, McSharry C, Murray J, Russell RI, Moran F. Pulmonary abnormalities in Crohn's disease. *Respir Med* 1989; 83(6):487-91.
- (56) Songur N, Songur Y, Tuzun M, Dogan I, Tuzun D, Ensari A et al. Pulmonary function tests and high-resolution CT in the detection of pulmonary involvement in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37(4):292-8.
- (57) Barnes PJ. Nitric oxide and airway disease. *Ann Med* 1995; 27(3):389-93.
- (58) Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343(8890):133-5.
- (59) Kharitonov SA, Wells AU, O'Connor BJ, Cole PJ, Hansell DM, Logan-Sinclair RB et al. Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(6):1889-93.
- (60) Paredi P, Kharitonov SA, Loukides S, Pantelidis P, du Bois RM, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide is increased in active fibrosing alveolitis. *Chest* 1999; 115(5):1352-6.
- (61) Wang CH, Liu CY, Lin HC, Yu CT, Chung KF, Kuo HP. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1998; 11(4):809-15.
- (62) Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J* 1995; 8(2):295-7.
- (63) Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84(3):731-65.
- (64) Lane C, Knight D, Burgess S, Franklin P, Horak F, Legg J et al. Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath. *Thorax* 2004; 59(9):757-60.
- (65) Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(3 Pt 1):694-9.
- (66) Prieto L. Determinación de las concentraciones de óxido nítrico exhalado en el asma. Aspectos técnicos y utilidad clínica. *Alergol Inmunol Clin* 2002; 17:72-87.
- (67) Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol* 1998; 85(2):653-66.
- (68) De Gouw HW, Hendriks J, Woltman AM, Twiss IM, Sterk PJ. Exhaled nitric oxide (NO) is reduced shortly after bronchoconstriction to direct and indirect stimuli in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(1):315-9.

-
- (69) Lehtimaki L, Turjanmaa V, Kankaanranta H, Saarelainen S, Hahtola P, Moilanen E. Increased bronchial nitric oxide production in patients with asthma measured with a novel method of different exhalation flow rates. *Ann Med* 2000; 32(6):417-23.
- (70) Koek GH, Verleden GM, Evenepoel P, Rutgeerts P. Activity related increase of exhaled nitric oxide in Crohn's disease and ulcerative colitis: a manifestation of systemic involvement? *Respir Med* 2002; 96(7):530-5.
- (71) Bruno L, Ferrer A, Gutierrez V. Óxido nítrico en el aire exhalado. In: Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM, editors. Barcelona: MRA ediciones, 2005: 63-85.
- (72) Kanazawa H, Yoshikawa J. A case-control study of bronchial asthma associated with ulcerative colitis: role of airway microvascular permeability. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(11):1432-6.
- (73) Kimura H, Miura S, Shigematsu T, Ohkubo N, Tsuzuki Y, Kurose I et al. Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1997; 42(5):1047-54.
- (74) Fireman E, Topilsky I, Greif J, Lerman Y, Schwarz Y, Man A et al. Induced sputum compared to bronchoalveolar lavage for evaluating patients with sarcoidosis and non-granulomatous interstitial lung disease. *Respir Med* 1999; 93(11):827-34.
- (75) Louis E, Louis R, Shute J, Lau L, Franchimont D, Lamproye A et al. Bronchial eosinophilic infiltration in Crohn's disease in the absence of pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(5):660-6.
- (76) Fireman Z, Osipov A, Kivity S, Kopelman Y, Sternberg A, Lazarov E et al. The use of induced sputum in the assessment of pulmonary involvement in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(3):730-4.
- (77) Ollerenshaw SL, Woolcock AJ. Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145(4 Pt 1):922-7.
- (78) Hargreave FE, Ryan G, Thomson NC, O'Byrne PM, Latimer K, Juniper EF et al. Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma: measurement and clinical significance. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68(5):347-55.
- (79) Joos GF, O'Connor B, Anderson SD, Chung F, Cockcroft DW, Dahlen B et al. Indirect airway challenges. *Eur Respir J* 2003; 21(6):1050-68.
- (80) Moreno RH, Hogg JC, Pare PD. Mechanics of airway narrowing. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133(6):1171-80.
- (81) Pare PD, Bai TR. The consequences of chronic allergic inflammation. *Thorax* 1995; 50(4):328-32.

-
- (82) Louis E, Louis R, Drion V, Bonnet V, Lamproye A, Radermecker M et al. Increased frequency of bronchial hyperresponsiveness in patients with inflammatory bowel disease. *Allergy* 1995; 50(9):729-33.
- (83) Mansi A, Cucchiara S, Greco L, Sarnelli P, Pisanti C, Franco MT et al. Bronchial hyperresponsiveness in children and adolescents with Crohn's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(3 Pt 1):1051-4.
- (84) Kullmann M, Kullmann F, Andus T, Schölmerich J, Riegger GAJ, Pfeifer M. Pulmonary Involvement in inflammatory bowel disease (IBD). *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:A807.
- (85) Ceyhan BB, Karakurt S, Cevik H, Sungur M. Bronchial hyperreactivity and allergic status in inflammatory bowel disease. *Respiration* 2003; 70(1):60-6.
- (86) Cushley MJ, Tattersfield AE, Holgate ST. Inhaled adenosine and guanosine on airway resistance in normal and asthmatic subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1983; 15(2):161-5.
- (87) Mann JS, Holgate ST, Renwick AG, Cushley MJ. Airway effects of purine nucleosides and nucleotides and release with bronchial provocation in asthma. *J Appl Physiol* 1986; 61(5):1667-76.
- (88) Peachell PT, Columbo M, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Marone G. Adenosine potentiates mediator release from human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138(5):1143-51.
- (89) Polosa R, Ng WH, Crimi N, Vancheri C, Holgate ST, Church MK et al. Release of mast-cell-derived mediators after endobronchial adenosine challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(3 Pt 1):624-9.
- (90) Polosa R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2002; 20(2):488-96.
- (91) Crimi N, Palermo F, Oliveri R, Polosa R, Settineri I, Mistretta A. Protective effects of inhaled ipratropium bromide on bronchoconstriction induced by adenosine and methacholine in asthma. *Eur Respir J* 1992; 5(5):560-5.
- (92) Van Den Berge M, Meijer RJ, Kerstjens HA, de Reus DM, Koeter GH, Kauffman HF et al. PC(20) adenosine 5'-monophosphate is more closely associated with airway inflammation in asthma than PC(20) methacholine. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(7):1546-50.
- (93) Van Den Berge M, Kerstjens HA, Meijer RJ, de Reus DM, Koeter GH, Kauffman HF et al. Corticosteroid-induced improvement in the PC20 of adenosine monophosphate is more closely associated with reduction in airway inflammation than improvement in the PC20 of methacholine. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(7):1127-32.

-
- (94) Van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, Prins JB. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(11):2107-13.
- (95) ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(8):912-30.
- (96) Moles KW, Varghese G, Hayes JR. Pulmonary involvement in ulcerative colitis. *Br J Dis Chest* 1988; 82(1):79-83.
- (97) Garg K, Lynch DA, Newell JD. Inflammatory airways disease in ulcerative colitis: CT and high-resolution CT features. *J Thorac Imaging* 1993; 8(2):159-63.
- (98) McKee AL, Rajapaksa A, Kalish PE, Pitchumoni CS. Severe interstitial pulmonary fibrosis in a patient with chronic ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1983; 78(2):86-9.
- (99) Prieto L, Gutierrez V, Linana J, Marin J. Bronchoconstriction induced by inhaled adenosine 5'-monophosphate in subjects with allergic rhinitis. *Eur Respir J* 2001; 17(1):64-70.
- (100) Prieto L, Uixera S, Gutierrez V, Bruno L. Modifications of airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate and exhaled nitric oxide concentrations after the pollen season in subjects with pollen-induced rhinitis. *Chest* 2002; 122(3):940-7.
- (101) Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1989; 44 Suppl 10:1-59.
- (102) Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(3):1107-36.
- (103) Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. American Thoracic Society. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144(5):1202-18.
- (104) Standardized lung function testing. Report working party. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1983; 19 Suppl 5:1-95.
- (105) Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993; 16:5-40.
- (106) Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR et al. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56(4):323-7.

-
- (107) Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(1):309-29.
- (108) Prieto L, Marin J. Methacholine inhalation challenge. Practical consequences of using duplicate spirometry after each concentration. *Ann Allergy* 1993; 70(6):487-90.
- (109) Recommendations for standardized procedures for the on-line and off-line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(6):2104-17.
- (110) Burrows B, Sears MR, Flannery EM, Herbison GP, Holdaway MD. Relations of bronchial responsiveness to allergy skin test reactivity, lung function, respiratory symptoms, and diagnoses in thirteen-year-old New Zealand children. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95(2):548-56.
- (111) Prieto L, Gutierrez V, Perez-Frances C, Badiola C, Lanuza A, Bruno L et al. Effect of fluticasone propionate-salmeterol therapy on seasonal changes in airway responsiveness and exhaled nitric oxide levels in patients with pollen-induced asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 95(5):452-61.
- (112) Phillips GD, Holgate ST. Absence of a late-phase response or increase in histamine responsiveness after bronchial provocation with adenosine 5'-monophosphate in atopic and non-atopic asthma. *Clin Sci (Lond)* 1988; 75(4):429-36.
- (113) Polosa R, Holgate ST. Adenosine bronchoprovocation: a promising marker of allergic inflammation in asthma? *Thorax* 1997; 52(10):919-23.
- (114) Rutgers SR, Timens W, Tzanakis N, Kauffman HF, van der Mark TW, Koeter GH et al. Airway inflammation and hyperresponsiveness to adenosine 5'-monophosphate in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(5):657-62.
- (115) Avital A, Springer C, Bar-Yishay E, Godfrey S. Adenosine, methacholine, and exercise challenges in children with asthma or paediatric chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1995; 50(5):511-6.
- (116) Oosterhoff Y, de Jong JW, Jansen MA, Koeter GH, Postma DS. Airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in chronic obstructive pulmonary disease is determined by smoking. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(3):553-8.
- (117) Polosa R, Ciamarra I, Mangano G, Prosperini G, Pistorio MP, Vancheri C et al. Bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation markers in nonasthmatics with allergic rhinitis. *Eur Respir J* 2000; 15(1):30-5.

- (118) Prieto L, Seijas T, Gutierrez V, Uixera S, Bruno L, Lopez R. Exhaled nitric oxide levels and airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in subjects with nasal polyposis. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134(4):303-9.
- (119) Aalbers R, Kauffman HF, Koeter GH, Postma DS, De VK, De Monchy JG. Dissimilarity in methacholine and adenosine 5'-monophosphate responsiveness 3 and 24 h after allergen challenge. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144(2):352-7.
- (120) Oosterhoff Y, Jansen MA, Postma DS, Koeter GH. Airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in smokers and nonsmokers with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92(5):773-6.
- (121) Church MK, Featherstone RL, Cushley MJ, Mann JS, Holgate ST. Relationships between adenosine, cyclic nucleotides, and xanthines in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78(4 Pt 2):670-5.
- (122) De Meer G, Postma DS, Heederik D. Bronchial responsiveness to adenosine-5'-monophosphate and methacholine as predictors for nasal symptoms due to newly introduced allergens. A follow-up study among laboratory animal workers and bakery apprentices. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(6):789-94.
- (123) Ketchell RI, Jensen MW, Lumley P, Wright AM, Allenby MI, O'Connor BJ. Rapid effect of inhaled fluticasone propionate on airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in mild asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(4):603-6.
- (124) Van Velzen E, van den Bos JW, Benckhuijsen JA, van ET, de BR, Aalbers R. Effect of allergen avoidance at high altitude on direct and indirect bronchial hyperresponsiveness and markers of inflammation in children with allergic asthma. *Thorax* 1996; 51(6):582-4.
- (125) Djukanovic R, Lai CK, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Roche WR et al. Bronchial mucosal manifestations of atopy: a comparison of markers of inflammation between atopic asthmatics, atopic nonasthmatics and healthy controls. *Eur Respir J* 1992; 5(5):538-44.
- (126) Foresi A, Leone C, Pelucchi A, Mastropasqua B, Chetta A, D'Ippolito R et al. Eosinophils, mast cells, and basophils in induced sputum from patients with seasonal allergic rhinitis and perennial asthma: relationship to methacholine responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(1):58-64.
- (127) Beier J, Beeh KM, Kornmann O, Morankic E, Ritter N, Buhl R. Dissimilarity between seasonal changes in airway responsiveness to adenosine-5'-monophosphate and methacholine in patients with grass pollen allergic rhinitis: relation to induced sputum. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 132(1):76-81.
- (128) Meade CJ, Dumont I, Worrall L. Why do asthmatic subjects respond so strongly to inhaled adenosine? *Life Sci* 2001; 69(11):1225-40.

- (129) Polosa R, Rajakulasingam K, Prosperini G, Church MK, Holgate ST. Relative potencies and time course of changes in adenosine 5'-monophosphate airway responsiveness with inhaled furosemide and bumetanide in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92(2):288-97.
- (130) Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1(3):176-83.
- (131) Van Den Berge M, Polosa R, Kerstjens HA, Postma DS. The role of endogenous and exogenous AMP in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(4):737-46.
- (132) Grashoff WF, Sont JK, Sterk PJ, Hiemstra PS, de Boer WI, Stolk J et al. Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages. *Am J Pathol* 1997; 151(6):1785-90.
- (133) Kuzniar T, Sleiman C, Brugiere O, Groussard O, Mal H, Mellot F et al. Severe tracheobronchial stenosis in a patient with Crohn's disease. *Eur Respir J* 2000; 15(1):209-12.
- (134) Valletta E, Bertini M, Sette L, Braggion C, Pradal U, Zannoni M. Early bronchopulmonary involvement in Crohn disease: a case report. *BMC Gastroenterol* 2001; 1:13.
- (135) Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347(6):417-29.
- (136) Brown SJ, Mayer LJ. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:1-12.
- (137) Robinson DS. The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle? *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(1):58-65.
- (138) Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(6):1277-84.
- (139) Hodgson HJ, Potter BJ, Jewell DP. C3 metabolism in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1977; 28(3):490-5.
- (140) Nielsen H, Petersen PH, Svehag SE. Circulating immune complexes in ulcerative colitis.--II. Correlation with serum protein concentrations and complement conversion products. *Clin Exp Immunol* 1978; 31(1):81-91.
- (141) Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, Furuya D, Yagihashi A, Araake H et al. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem* 2001; 47(7):1297-301.
- (142) Winterkamp S, Weidenhiller M, Otte P, Stolper J, Schwab D, Hahn EG et al. Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(12):3071-7.

-
- (143) Raithel M, Matek M, Baenkler HW, Jorde W, Hahn EG. Mucosal histamine content and histamine secretion in Crohn's disease, ulcerative colitis and allergic enteropathy. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108(2):127-33.
- (144) Fox CC, Lichtenstein LM, Roche JK. Intestinal mast cell responses in idiopathic inflammatory bowel disease. Histamine release from human intestinal mast cells in response to gut epithelial proteins. *Dig Dis Sci* 1993; 38(6):1105-12.
- (145) Raithel M, Winterkamp S, Pacurar A, Ulrich P, Hochberger J, Hahn EG. Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36(2):174-9.
- (146) Siddiqui AA, Miner PB, Jr. The role of mast cells in common gastrointestinal diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004; 4(1):47-54.
- (147) Stoyanova II, Gulubova MV. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem* 2002; 104(2):185-92.
- (148) Xie H, He SH. Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2005; 11(19):2851-7.
- (149) Prussin C, Metcalfe DD. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2 Suppl):S486-S494.
- (150) Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(3):551-9.
- (151) Barker AF, Hirshman CA, D'Silva R, Hanifin JM. Airway responsiveness in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87(4):780-3.
- (152) Corbo GM, Ferrante E, Macciocchi B, Foresi A, De A, V, Fabrizi G et al. Bronchial hyperresponsiveness in atopic dermatitis. *Allergy* 1989; 44(8):595-8.
- (153) Kyllonen H, Malmberg P, Remitz A, Ryttilä P, Metso T, Helenius I et al. Respiratory symptoms, bronchial hyper-responsiveness, and eosinophilic airway inflammation in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(2):192-7.
- (154) Cockcroft DW, Murdock KY, Berscheid BA, Gore BP. Sensitivity and specificity of histamine PC20 determination in a random selection of young college students. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89(1 Pt 1):23-30.
- (155) Melillo G, Cocco G, Balzano G, Schiano M. Evaluation of non-specific bronchial hyperreactivity in different respiratory diseases. *Eur J Respir Dis Suppl* 1986; 147:282-5.
- (156) Prieto L, Marin J. Measurement of response to methacholine inhalation challenge in asthma and allergic rhinitis. PC20 or PC35FEV1? *Allergol Immunopathol (Madr)* 1990; 18(5):285-9.

- (157) Koh YY, Lee MH, Kim CK, Min YG, Kim YK, Min KU et al. A familial predisposition in bronchial hyperresponsiveness among patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(6 Pt 1):921-6.
- (158) Henriksen AH, Sue-Chu M, Holmen TL, Langhammer A, Bjermer L. Exhaled and nasal NO levels in allergic rhinitis: relation to sensitization, pollen season and bronchial hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 1999; 13(2):301-6.
- (159) Schwartz J, Schindler C, Zemp E, Perruchoud AP, Zellweger JP, Wuthrich B et al. Predictors of methacholine responsiveness in a general population. *Chest* 2002; 122(3):812-20.
- (160) Chinn S, Jarvis D, Luczynska CM, ckermann-Liebrich U, Anto JM, Cerveri I et al. An increase in bronchial responsiveness is associated with continuing or restarting smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(8):956-61.
- (161) Cerveri I, Bruschi C, Zoia MC, Maccarini L, Grassi M, Lebowitz MD et al. Smoking habit and bronchial reactivity in normal subjects. A population-based study. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140(1):191-6.
- (162) Paoletti P, Carrozzi L, Viegi G, Modena P, Ballerin L, Di PF et al. Distribution of bronchial responsiveness in a general population: effect of sex, age, smoking, and level of pulmonary function. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(6):1770-7.
- (163) Cockcroft DW, Davis BE, Todd DC, Smycniuk AJ. Methacholine challenge: comparison of two methods. *Chest* 2005; 127(3):839-44.
- (164) Allen ND, Davis BE, Hurst TS, Cockcroft DW. Difference between dosimeter and tidal breathing methacholine challenge: contributions of dose and deep inspiration bronchoprotection. *Chest* 2005; 128(6):4018-23.
- (165) Clifford RD, Radford M, Howell JB, Holgate ST. Prevalence of respiratory symptoms among 7 and 11 year old schoolchildren and association with asthma. *Arch Dis Child* 1989; 64(8):1118-25.
- (166) Prieto L, Ferrer A, Domenech J, Perez-Frances C. Effect of challenge method on sensitivity, reactivity, and maximal response to methacholine. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97(2):175-81.
- (167) Prieto L, Reig I, Rojas R, Ferrer A, Domenech J. The effect of challenge method on sensitivity and reactivity to adenosine 5'-monophosphate in subjects with suspected asthma. *Chest* 2006; 130(5):1448-53.
- (168) Todd DC, Davis BE, Hurst TS, Cockcroft DW. Dosimeter methacholine challenge: comparison of maximal versus submaximal inhalations. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(3):517-9.
- (169) Taylor DA, Jensen MW, Kanabar V, Engelstatter R, Steinijs VW, Barnes PJ et al. A dose-dependent effect of the novel inhaled corticosteroid

- ciclesonide on airway responsiveness to adenosine-5'-monophosphate in asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(1):237-43.
- (170) De Meer G, Heederik D, Postma DS. Bronchial responsiveness to adenosine 5'-monophosphate (AMP) and methacholine differ in their relationship with airway allergy and baseline FEV(1). *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(3):327-31.
- (171) Britton J, Pavord I, Richards K, Knox A, Wisniewski A, Wahedna I et al. Factors influencing the occurrence of airway hyperreactivity in the general population: the importance of atopy and airway calibre. *Eur Respir J* 1994; 7(5):881-7.
- (172) Ramsdale EH, Morris MM, Roberts RS, Hargreave FE. Bronchial responsiveness to methacholine in chronic bronchitis: relationship to airflow obstruction and cold air responsiveness. *Thorax* 1984; 39(12):912-8.
- (173) Verma VK, Cockcroft DW, Dosman JA. Airway responsiveness to inhaled histamine in chronic obstructive airways disease. *Chronic bronchitis vs emphysema. Chest* 1988; 94(3):457-61.
- (174) Ichinose M, Takahashi T, Sugiura H, Endoh N, Miura M, Mashito Y et al. Baseline airway hyperresponsiveness and its reversible component: role of airway inflammation and airway calibre. *Eur Respir J* 2000; 15(2):248-53.
- (175) Chung KF, Morgan B, Keyes SJ, Snashall PD. Histamine dose-response relationships in normal and asthmatic subjects. The importance of starting airway caliber. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126(5):849-54.
- (176) Phillips GD, Rafferty P, Beasley R, Holgate ST. Effect of oral terfenadine on the bronchoconstrictor response to inhaled histamine and adenosine 5'-monophosphate in non-atopic asthma. *Thorax* 1987; 42(12):939-45.
- (177) Phillips GD, Finnerty JP, Holgate ST. Comparative protective effect of the inhaled beta 2-agonist salbutamol (albuterol) on bronchoconstriction provoked by histamine, methacholine, and adenosine 5'-monophosphate in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85(4):755-62.
- (178) Polosa R, Lau LC, Holgate ST. Inhibition of adenosine 5'-monophosphate- and methacholine-induced bronchoconstriction in asthma by inhaled frusemide. *Eur Respir J* 1990; 3(6):665-72.
- (179) Prieto L, Gutierrez V, Cervera A, Linana J. Airway obstruction induced by inhaled acetaldehyde in asthma: repeatability relationship to adenosine 5'-monophosphate responsiveness. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2002; 12(2):91-8.
- (180) Chan W, Cushley MJ, Holgate S. The effect of inhaled adenosine-5'-monophosphate (AMP) on airway calibre in normal and asthmatic subjects. *Clinical Science* (1979); 1986 (70 Suppl): 65-6.

-
- (181) Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(2):609-12.
- (182) Van Schoor J, Pauwels R, Joos G. Indirect bronchial hyper-responsiveness: the coming of age of a specific group of bronchial challenges. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(3):250-61.
- (183) Phillips GD, Ng WH, Church MK, Holgate ST. The response of plasma histamine to bronchoprovocation with methacholine, adenosine 5'-monophosphate, and allergen in atopic nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141(1):9-13.
- (184) Phillips GD, Scott VL, Richards R, Holgate ST. Effect of nedocromil sodium and sodium cromoglycate against bronchoconstriction induced by inhaled adenosine 5'-monophosphate. *Eur Respir J* 1989; 2(3):210-7.
- (185) van den Toorn LM, Prins JB, Overbeek SE, Hoogsteden HC, de Jongste JC. Adolescents in clinical remission of atopic asthma have elevated exhaled nitric oxide levels and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(3 Pt 1):953-7.
- (186) Prieto L, Gutierrez V, Colas C, Tabar A, Perez-Frances C, Bruno L et al. Effect of omalizumab on adenosine 5'-monophosphate responsiveness in subjects with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139(2):122-31.
- (187) Ludviksdottir D, Janson C, Bjornsson E, Stalenheim G, Boman G, Hedenstrom H et al. Different airway responsiveness profiles in atopic asthma, nonatopic asthma, and Sjogren's syndrome. BHR Study Group. *Bronchial hyperresponsiveness. Allergy* 2000; 55(3):259-65.
- (188) Prieto L, Gutierrez V, Marin J. Relationship between airway sensitivity to adenosine 5' monophosphate and the shape of the concentration-response curve to methacholine in subjects with allergic rhinitis. *Respir Med* 2001; 95(6):457-63.
- (189) Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J* 2004; 24(5):758-64.
- (190) Kharitonov SA, Rajakulasingam K, O'Connor B, Durham SR, Barnes PJ. Nasal nitric oxide is increased in patients with asthma and allergic rhinitis and may be modulated by nasal glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(1 Pt 1):58-64.
- (191) Prieto L, Gutierrez V, Uixera S. Exhaled nitric oxide and bronchial responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in subjects with allergic rhinitis. *Chest* 2002; 121(6):1853-9.
- (192) Horvath I, Barnes PJ. Exhaled monoxides in asymptomatic atopic subjects. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(9):1276-80.

-
- (193) Moody A, Fergusson W, Wells A, Bartley J, Kolbe J. Increased nitric oxide production in the respiratory tract in asymptomatic pacific islanders: an association with skin prick reactivity to house dust mite. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(5):895-9.
- (194) Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1997; 10(7):1683-93.
- (195) Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; 6(9):1368-70.
- (196) Prieto L, Gutierrez V, Uixera S, Bruno L. Concentrations of exhaled nitric oxide in asthmatics and subjects with allergic rhinitis sensitized to the same pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(12):1728-33.
- (197) Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998; 53(2):91-5.
- (198) Berlyne GS, Parameswaran K, Kamada D, Efthimiadis A, Hargreave FE. A comparison of exhaled nitric oxide and induced sputum as markers of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(4):638-44.
- (199) Chan-Yeung M, Obata H, Dittrick M, Chan H, Abboud R. Airway inflammation, exhaled nitric oxide, and severity of asthma in patients with western red cedar asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(5 Pt 1):1434-8.
- (200) Piacentini GL, Bordini A, Costella S, Vicentini L, Mazzi P, Sperandio S et al. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J* 1999; 13(6):1386-90.
- (201) Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Postma DS, Timens W. Association of current smoking with airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asymptomatic smokers. *Respir Res* 2005; 6:38.
- (202) Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128(5):833-8.
- (203) O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155(3):852-7.
- (204) Saetta M, Di SA, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(3 Pt 1):822-6.

-
- (205) Olin AC, Bake B, Toren K. Fraction of exhaled nitric oxide at 50 mL/s: reference values for adult lifelong never-smokers. *Chest* 2007; 131(6):1852-6.
- (206) Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, Lissner L, Bake B, Toren K. Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest* 2006; 130(5):1319-25.
- (207) Grasmann H, Storm van's GK, Buscher R, Drazen JM, Ratjen F. Effects of sex and of gene variants in constitutive nitric oxide synthases on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(8):1113-6.
- (208) Massaro AF, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM. Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(2):800-3.
- (209) Sovijärvi A, Järvinen H, Uusi-Simola J, Nikkinen P, Piirilä P. Accuracy and repeatability of a hand-held nitric oxide analyzer in adults with respiratory symptoms. *European Respiratory Society Annual Congress, Copenhagen 2005*;3670.
- (210) Menzies D, Nair A, Lipworth BJ. Portable exhaled nitric oxide measurement: Comparison with the "gold standard" technique. *Chest* 2007; 131(2):410-4.
- (211) McGill C, Malik G, Turner SW. Validation of a hand-held exhaled nitric oxide analyzer for use in children. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41(11):1053-7.
- (212) Vahlkvist S, Sinding M, Skamstrup K, Bisgaard H. Daily home measurements of exhaled nitric oxide in asthmatic children during natural birch pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(6):1272-6.
- (213) Torre O, Spencer A, Olivieri D, Barnes PJ, Kharitonov SA. Feasibility and repeatability of fractional exhaled nitric oxide (FENO) measurements using a hand-held NO monitoring device in asthma in general practice. *American Thoracic Society International Conference San Diego 2006*; 3:A484.
- (214) Gill M, Graff GR, Adler AJ, Dweik RA. Validation study of fractional exhaled nitric oxide measurements using a handheld monitoring device. *J Asthma* 2006; 43(10):731-4.
- (215) Chen W, Purohit A, Barnig C, Casset A, de BF. Niox and Niox Mino: comparison of exhaled NO in grass pollen allergic adult volunteers. *Allergy* 2007; 62(5):571-2.
- (216) Alving K, Janson C, Nordvall L. Performance of a new hand-held device for exhaled nitric oxide measurement in adults and children. *Respir Res* 2006; 7:67.
- (217) Llusar R., López V., Barato D., Prieto L. Exhaled nitric oxide measurements using a hand-held monitor and chemiluminescence

- equipment: difference is more evident in subjects with higher concentrations. *Allergy* 2008; 63 (Suppl.88): A284.
- (218) Fortuna AM, Feixas T, Casan P. [Measurement of fraction of exhaled nitric oxide with the portable NIOX-MINO monitor in healthy adults]. *Arch Bronconeumol* 2007; 43(3):176-9.
- (219) Nordvall L, Janson C, Alving K. Agreement between NIOX (stationary device) and NIOX-MINO (hand-held device) for fractional exhaled nitric oxide (FENO) measurements in adults and children. *World Allergy Congress, Munich*; 2005;A 164.
- (220) Khalili B, Boggs PB, Bahna SL. Reliability of a new hand-held device for the measurement of exhaled nitric oxide. *Allergy* 2007; 62(10):1171-4.
- (221) Prieto L, Gutierrez V, Torres V, Uixera S, Marin J. Effect of salmeterol on seasonal changes in airway responsiveness and exhaled nitric oxide in pollen-sensitive asthmatic subjects. *Chest* 2002; 122(3):798-805.
- (222) Dupont LJ, Rochette F, Demedts MG, Verleden GM. Exhaled nitric oxide correlates with airway hyperresponsiveness in steroid-naive patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(3 Pt 1):894-8.
- (223) De Gouw HW, Grunberg K, Schot R, Kroes AC, Dick EC, Sterk PJ. Relationship between exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness following experimental rhinovirus infection in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1998; 11(1):126-32.
- (224) Lim S, Jatakanon A, John M, Gilbey T, O'Connor BJ, Chung KF et al. Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation. Assessment by various inflammatory markers in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(1):22-30.
- (225) Verleden GM, Dupont LJ, Verpeut AC, Demedts MG. The effect of cigarette smoking on exhaled nitric oxide in mild steroid-naive asthmatics. *Chest* 1999; 116(1):59-64.
- (226) Silvestri M, Spallarossa D, Battistini E, Brusasco V, Rossi GA. Dissociation between exhaled nitric oxide and hyperresponsiveness in children with mild intermittent asthma. *Thorax* 2000; 55(6):484-8.
- (227) Mohamed-Hussein AA, Mohamed NA, Ibrahim ME. Changes in pulmonary function in patients with ulcerative colitis. *Respir Med* 2007; 101(5):977-82.
- (228) Artlich A, Busch T, Lewandowski K, Jonas S, Gortner L, Falke KJ. Childhood asthma: exhaled nitric oxide in relation to clinical symptoms. *Eur Respir J* 1999; 13(6):1396-401.
- (229) Silvestri M, Spallarossa D, Frangova Y, V, Battistini E, Fregonese B, Rossi GA. Orally exhaled nitric oxide levels are related to the degree of blood

-
- eosinophilia in atopic children with mild-intermittent asthma. *Eur Respir J* 1999; 13(2):321-6.
- (230) Stirling RG, Kharitonov SA, Campbell D, Robinson DS, Durham SR, Chung KF et al. Increase in exhaled nitric oxide levels in patients with difficult asthma and correlation with symptoms and disease severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. *Asthma and Allergy Group. Thorax* 1998; 53(12):1030-4.
- (231) Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Chung KF et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(4):1042-6.
- (232) Crater SE, Peters EJ, Martin ML, Murphy AW, Platts-Mills TA. Exhaled nitric oxide and airway obstruction in asthma patients with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(3):806-11.
- (233) Piacentini GL, Bordini A, Costella S, Suzuki Y, Zerman L, Peterson CG et al. Exhaled nitric oxide, serum ECP and airway responsiveness in mild asthmatic children. *Eur Respir J* 2000; 15(5):839-43.