



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Efecto de la exposición natural al alérgeno sobre la respuesta máxima a adenosina 5'-monofosfato, concentraciones de óxido nítrico exhalado y pH del condensado del aire exhalado en pacientes polínicos.

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Victoria López Calatayud

Valencia, 2014

Director:

Prof. Jesús Luís Prieto Andrés

Jesús Luis Prieto Andrés, Profesor Titular de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada **“Efecto de la exposición natural al alérgeno sobre la respuesta máxima a adenosina 5'-monofosfato, concentraciones de óxido nítrico exhalado y pH del condensado del aire exhalado en pacientes polínicos”**, cuyo autor es VICTORIA LÓPEZ CALATAYUD, está finalizada y reúne todos los requisitos necesarios para su lectura y defensa pública.

Para que conste, firmo el presente certificado en Valencia a 13 de Febrero de 2014

Fdo. Jesús Luis Prieto Andrés
Director de la tesis doctoral

A Sara
A Isaac
A mis padres

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr Luís Prieto, Jefe del Servicio de Alergia del Hospital Universitario Dr Peset y Profesor Titular de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, por sus ideas y sugerencias, por compartir conmigo su capacidad y experiencia científica, y por su gran implicación en este trabajo, fundamentales para la finalización de esta tesis.

A las Dras. Amparo Lanuza y Valentina Gutiérrez, médicos adjuntos del Servicio de Alergia del Hospital Universitario Dr Peset, por colaborar con algunos de sus pacientes en este proyecto. Y a la Dra Carmen Pérez, médico adjunto del Servicio de Alergia del Hospital Universitario Dr Peset, quien además compartió conmigo horas y horas de laboratorio, y siempre se preocupó por la evolución de este trabajo.

A Rocío Rojas, enfermera del Servicio de Alergia del Hospital Universitario Dr Peset, por su exquisita organización de las sucesivas visitas de los pacientes y de los materiales necesarios para la realización de las exploraciones, y por su eterna sonrisa.

A todos los pacientes del Servicio de Alergia del Hospital Universitario Dr Peset y a todos los voluntarios sanos que colaboraron en la realización de este estudio.

A mis amigos Arantxa Tamarit, Estefanía Delgado, M^o José Camacho, Ana Belén Sanz, María Rubio, Raquel Bañón, Elena Herrero, Irene Gregori, Marcela Cherner, Inés Gómez, Soledad Jorge y Jaime Escribano por su constante estímulo para la elaboración de este proyecto.

A mis padres, mi hermano y en general a toda mi familia por su respaldo en todas y cada una de las fases de realización de este trabajo.

A Sara por crecer durante su primer año entre referencias bibliográficas y representaciones gráficas sin reproches y con todo su afecto.

Por supuesto a Isaac por su apoyo incondicional, paciencia inagotable y cariño infinito.

Y a todos aquellos que han colaborado de una manera u otra en el proceso de elaboración de este trabajo y que, por la limitación de nuestra memoria, puedo haber olvidado mencionar.

Índice

	Página
I. Introducción:	1
I.1. Hiperrespuesta bronquial y obstrucción de la vía aérea	5
I.2. Óxido nítrico exhalado	29
I.3. Condensado del aire exhalado	53
II. Hipótesis de trabajo	67
III. Objetivos del estudio	71
IV. Pacientes y métodos:	75
IV.1. Selección de pacientes	76
IV.2. Diseño del estudio	77
IV.3. Aspectos éticos	79
IV.4. Métodos	80
IV.5. Análisis estadístico	93
V. Resultados:	97
V.1. Descripción de la muestra	99
V.2. Modificación de los parámetros durante la estación polínica y comparación con los controles sanos	101
V. 3. Comparación del efecto de la exposición natural al polen sobre la respuesta bronquial a AMP y a metacolina	121
V.4. Óxido nítrico exhalado	122
V.5. pH del condensado del aire exhalado	127
V.6. Correlaciones	130
VI. Discusión:	139
VI. 1. Hiperrespuesta bronquial en polínicos y sujetos sanos	142
VI. 2. Modificaciones de la hiperrespuesta bronquial inducidas por la exposición alérgica	153

VI. 3. Óxido nítrico exhalado	163
VI. 4. pH del condensado del aire exhalado	168
VIII. Conclusiones	171
IX. Publicaciones y comunicaciones a congresos generadas por la presente Tesis doctoral	175
X. Bibliografía	179

I. Introducción

La prevalencia de las enfermedades alérgicas como el asma bronquial y la rinitis está aumentando en diferentes países occidentales, y en la actualidad estos procesos son una causa frecuente de demanda sanitaria.

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que 300 millones de personas en el mundo sufren asma y que la mitad de ellas viven en países en vías de desarrollo. Teniendo en cuenta la previsión de crecimiento y el mayor grado de urbanización, se espera que en el año 2025 otros 100 millones de personas más sufran esta enfermedad¹.

A este respecto dos ambiciosos estudios internacionales, el *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*^{2,3} y el *European Community Respiratory Health Survey (ECRHS)*⁴, han comunicado incrementos en la prevalencia mundial de asma, objetivando aumentos significativos en los países con economía emergente de la región de Asia y del Pacífico, como consecuencia de los cambios ambientales, sociales y económicos asociados a la industrialización, así como en Norteamérica, Europa y Latinoamérica^{1,4}. Esta tendencia se observa en la infancia, adolescencia y edad adulta³.

En el ámbito nacional, el estudio Alergológica se diseñó con el objetivo de mejorar el cuidado de los pacientes alérgicos. Los resultados del mismo indicaban que, tanto para adultos como para menores de 14 años, la rinitis y el asma alérgicas son el primer y segundo motivo de consulta al especialista alergólogo^{5,6,7}.

Sin embargo, las cifras de prevalencia encontradas en diferentes estudios son muy variables, lo que puede deberse a diferencias reales entre las diferentes áreas investigadas o a los distintos métodos utilizados para identificar la presencia de la enfermedad¹.

Es evidente que para la adecuada identificación de la enfermedad en los estudios epidemiológicos es necesaria una definición precisa de la patología. En 1962, la *American Thoracic Society* definió al **asma bronquial** como una enfermedad caracterizada por un incremento de la reactividad bronquial frente a diferentes estímulos, que se manifiesta mediante el estrechamiento de la vía aérea, con las consiguientes variaciones en la gravedad y respuesta al tratamiento⁸.

Posteriormente la Organización Mundial de la Salud puntualizó que dichas alteraciones se presentaban de forma crónica⁹.

Unos años más tarde, la *American Thoracic Society* introdujo en este concepto las manifestaciones fisiopatológicas de la enfermedad, como la hiperreactividad, la obstrucción al flujo aéreo variable, el edema y la inflamación de mucosa y submucosa bronquial. Todas estas alteraciones son responsables de la expresión clínica del asma¹⁰.

Más de 20 años después, las definiciones de asma continúan únicamente describiendo sus características fisiopatológicas y clínicas^{11,12}, lo que junto con la ausencia de marcadores inmunológicos, biológicos o fisiológicos específicos de la enfermedad, condiciona que en no pocas ocasiones el diagnóstico se realice por exclusión. Esto es consecuencia de la similitud del asma con otras patologías respiratorias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o la bronquitis crónica.

De igual modo, tampoco existe una definición precisa para la **rinitis**, al margen de las alteraciones fisiopatológicas y de su expresión clínica^{12,13}.

Aunque la rinitis ha sido considerada tradicionalmente como una enfermedad leve, en los últimos años se ha demostrado que constituye una causa importante de morbilidad y que muestra una íntima relación e interacción con el asma, con quien comparte mecanismo inmunopatogénico^{1,3,12,13}.

Tanto el asma como la rinitis alérgicas tienen una alta morbilidad, repercutiendo decisivamente sobre la calidad de vida. Además, aunque la mortalidad asociada a estas enfermedades es pequeña, se mantiene en tasas superiores a las aceptables, sobre todo en países con difícil acceso a fármacos esenciales⁴. Todo ello incrementa los costes directos (hospitalización y necesidad de tratamiento) e indirectos (absentismo laboral y muerte prematura) generando una carga sanitaria de gran magnitud¹.

Así pues, las enfermedades alérgicas respiratorias han mostrado una prevalencia creciente durante los últimos años, con las consiguientes repercusiones socioeconómicas. Además, parece probable que la situación pueda empeorar durante los próximos años¹.

I.1. Hiperrespuesta bronquial y obstrucción de la vía aérea

Desde que en 1940 Tiffeneau desarrollara la tecnología para el estudio de enfermedades respiratorias mediante la espirografía o prueba de Tiffeneau, y posteriormente a través de los estudios de broncodilatación y de broncoconstricción, han acontecido avances considerables en los procedimientos diagnósticos^{14,15}.

La hiperrespuesta bronquial se considera una característica fundamental de la fisiopatología del asma bronquial, y se define como la tendencia de la vía aérea a estrecharse fácil, rápida e intensamente en respuesta a un estímulo broncoconstrictor.

La presencia y magnitud de la hiperrespuesta bronquial se evalúa mediante la determinación de la respuesta a dosis progresivamente crecientes de broncoconstrictor administradas por vía inhalada^{16,17}. Mediante la representación de los deterioros del FEV₁ inducidos por cada dosis de broncoconstrictor se elabora una curva dosis-respuesta, en la que pueden identificarse los siguientes parámetros:

- ✓ **Sensibilidad bronquial** (PC₂₀). Este parámetro identifica la facilidad con la que ocurre la obstrucción y se determina mediante la concentración de agonista necesaria para inducir un deterioro del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) del 20%. En muchos estudios clínicos la respuesta a estímulos broncoconstrictores se ha expresado únicamente mediante este parámetro¹⁸. Además se ha asumido que el mismo identifica la posición de la curva dosis-respuesta, aunque en realidad dicha posición debe determinarse mediante la denominada EC50 (concentración de agonista que induce un 50% de la máxima respuesta posible)¹⁸.
- ✓ La **reactividad bronquial** se refiere a la rapidez con la que ocurre la broncoconstricción inducida por el agonista, y se determina mediante la pendiente de la porción lineal de la curva dosis-respuesta¹⁸.
- ✓ La **intensidad de la broncoconstricción**, equivale al máximo grado de broncoconstricción que es posible inducir y se determina mediante la identificación de la meseta (*plateau*) de la respuesta. In vivo, este nivel máximo

de respuesta se considera que está presente cuando no se observan variaciones relevantes del FEV₁ (cambios iguales o mayores al 5%) tras al menos 3 concentraciones dobles del agonista^{18,19}. La presencia de esta respuesta máxima puede identificarse generalmente en individuos no asmáticos y en pacientes con asma leve, pero resulta excepcional su identificación en asmáticos moderados o graves²⁰. Más recientemente se ha postulado que la presencia de respuesta máxima podía identificarse indirectamente mediante la determinación de la capacidad del broncoconstrictor para inducir deterioro de la capacidad vital forzada (FVC)^{21,22}. En realidad, los deterioros de la FVC producidos por el broncoconstrictor inhalado son una consecuencia del incremento del volumen residual (RV) y de la capacidad residual funcional (FRC) generados por la broncoconstricción. Ha despertado mucho interés la reciente observación de que, a niveles equivalentes de obstrucción identificados mediante la relación FEV₁/FVC en % del teórico, el grado de atrapamiento detectado mediante la FVC o el RV era mayor en los pacientes con asma grave que en aquellos con asma de menor gravedad (figura 1)²³.

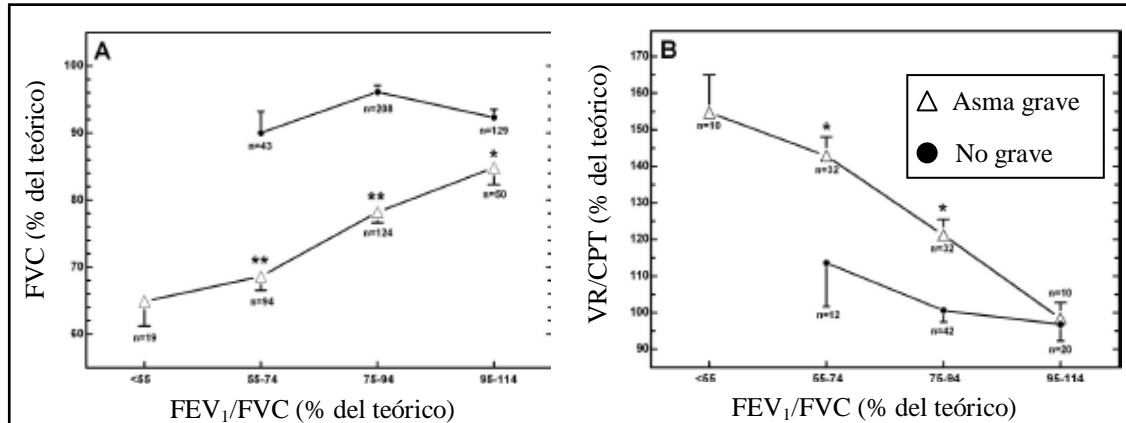


Figura 1. A niveles equivalentes de obstrucción, el deterioro de la FVC (A) y el incremento del RV (B) es mayor en asmáticos graves que en aquellos con menor gravedad (tomado de Sorkness et al²³).

El grado de **atrapamiento aéreo** inducido durante la broncoconstricción aguda puede cuantificarse mediante la representación de los deterioros de la FVC a medida que se reduce el FEV₁. La pendiente de la recta obtenida de esta manera estará positivamente relacionada con el grado de atrapamiento aéreo inducido, mientras que la intercepción de la misma sobre el eje Y estará negativamente relacionada con el grado

de atrapamiento inducido por el broncoconstrictor. En otras palabras, un atrapamiento intenso se manifestará por una pendiente alta y una intercepción baja (figura 2)²⁴.

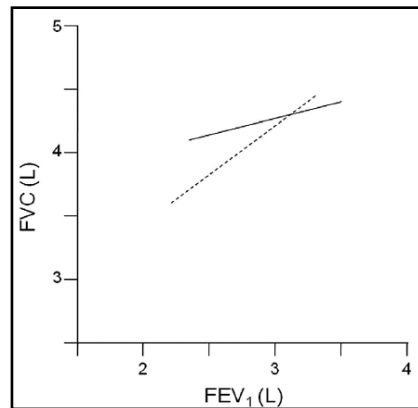


Figura 2. Cálculo de la pendiente e intercepción en Y de FVC vs FEV₁ (tomado de Prieto et al²⁴).

Por tanto, el grado de atrapamiento inducido por el broncoconstrictor puede estimarse mediante la determinación de la pendiente de la relación lineal entre los deterioros de la FVC y del FEV₁, y mediante la intercepción en el eje Y de la recta de regresión establecida entre ambos parámetros.

I. 1. a. Métodos de provocación bronquial:

La reactividad bronquial puede estudiarse mediante la determinación de la respuesta a agonistas broncoconstrictores. Tradicionalmente, se han empleado metacolina e histamina para este fin. Dichos agonistas se denominan broncoconstrictores **directos**, pues inducen broncoconstricción estimulando directamente los receptores específicos localizados en el músculo liso bronquial, glándulas mucosas y microvascularización²⁵.

Sin embargo, durante los últimos años ha aumentado el interés acerca de los agonistas broncoconstrictores **indirectos**, como la adenosina 5'-monofosfato (AMP). Este agonista produce broncoconstricción mediante la estimulación de mastocitos activados, con la consiguiente liberación de histamina, leucotrienos, prostaglandinas, etcétera. Estos productos liberados por los mastocitos inducen la broncoconstricción, aunque la misma se genera también a través de la estimulación de vías neurales²⁶.

En la figura 3 se representan los mecanismos de acción de ambos tipos de agonistas. Las diferencias entre unos y otros se detallan en la tabla 1.

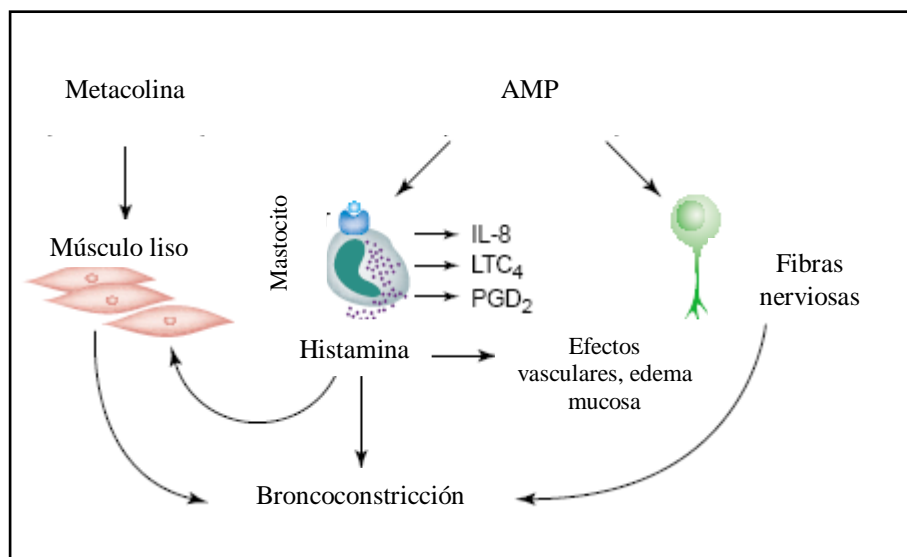


Figura 3. Mecanismo de acción de los broncoconstrictores (tomado de Spicuzza et al²⁶).

Abreviaturas: IL-8: interleucina 8, LTC₄: leucotrieno C₄, PGD₂: prostaglandina D₂.

Tabla 1. Características de los agonistas broncoconstrictores directos e indirectos (tomado de Cockcroft et al²⁵).

	Agonista directo	Agonista indirecto
Mecanismo	Efecto directo sobre los receptores de la vía aérea	Vía indirecta, con implicación de mediadores inflamatorios
Ejemplos	Metacolina Histamina	AMP, propranolol, suero salino hipertónico, ejercicio, bradicinina, manitol, hiperventilación isocápnic...
Dependiente de:		
Músculo liso de vía aérea	++++	++
Calibre de vía aérea	+++	-
Inflamación	++	++++
Dosificación:		
Dosis requerida	Baja	Alta
Taquifilaxia	No	Sí
Sensibilidad	Alta	Baja
Especificidad	Baja	Alta
Utilidad diagnóstica	Descarta asma Ayuda al diagnóstico de asma en pacientes con síntomas sugestivos	Confirma asma Diagnóstico en asma inducida por ejercicio

Además de estas características diferenciales, se ha comprobado que, tanto en asmáticos como en pacientes con rinitis alérgica, AMP es 17 y 1,3 veces menos potente que metacolina, respectivamente, para inducir broncoconstricción²⁷.

Las diferencias entre estos agentes sugieren que la respuesta a ambos tipos de agonistas probablemente no identifica las mismas alteraciones de la vía aérea, por lo que la información proporcionada por la respuesta a cada uno de ellos pudiera ser complementaria^{15,28}.

Para la correcta realización e interpretación de la prueba de provocación bronquial es necesario tener en cuenta determinados factores técnicos y, entre ellos, el **método de inhalación** parece especialmente relevante.

Los métodos de inhalación más frecuentemente utilizados para realizar las pruebas de provocación bronquial con broncoconstrictores incluyen:

- ✓ **Método dosimétrico**, propuesto por Chai y colaboradores²⁹. Mediante esta metodología, el paciente recibe 5 nebulizaciones de cada dosis de broncoconstrictor mediante un dosímetro programado para generar aerosol durante un periodo de 0,6 segundos.
- ✓ Método de **inhalación a volumen corriente**. De acuerdo con la metodología propuesta por Cockroft y Juniper^{30,31,32} cada dosis de broncoconstrictor se inhala mediante ventilación a volumen corriente durante 2 minutos.

La reproductibilidad, fiabilidad, precisión y seguridad de ambos métodos ha sido comprobada en diversas publicaciones, e históricamente se ha aceptado que los resultados obtenidos con cada uno de ellos eran equivalentes^{30,31,32}. Sin embargo, la concordancia de dichos resultados en los estudios realizados en los últimos años ha sido objeto de controversia, pues se ha observado que los valores de PC₂₀ metacolina obtenidos mediante nebulización con dosímetro son significativamente mayores que los encontrados a volumen corriente (figura 4)³³. Las diferencias entre los valores de PC₂₀ obtenidos con cada método pueden deberse, al menos en parte, a las diferencias en la dosis nebulizada a la boca con cada uno de ellos. El débito del nebulizador utilizado en el método dosimétrico debe ajustarse a 0,009 ml, con lo que el volumen total de cada dosis aportado a la boca del paciente será de 0,045 ml (0,009 ml multiplicado por 5 nebulizaciones). Por el contrario, mediante el método de inhalación a volumen corriente, el volumen total de cada concentración liberada a la boca es de 0,090 ml^{31,33,34}.

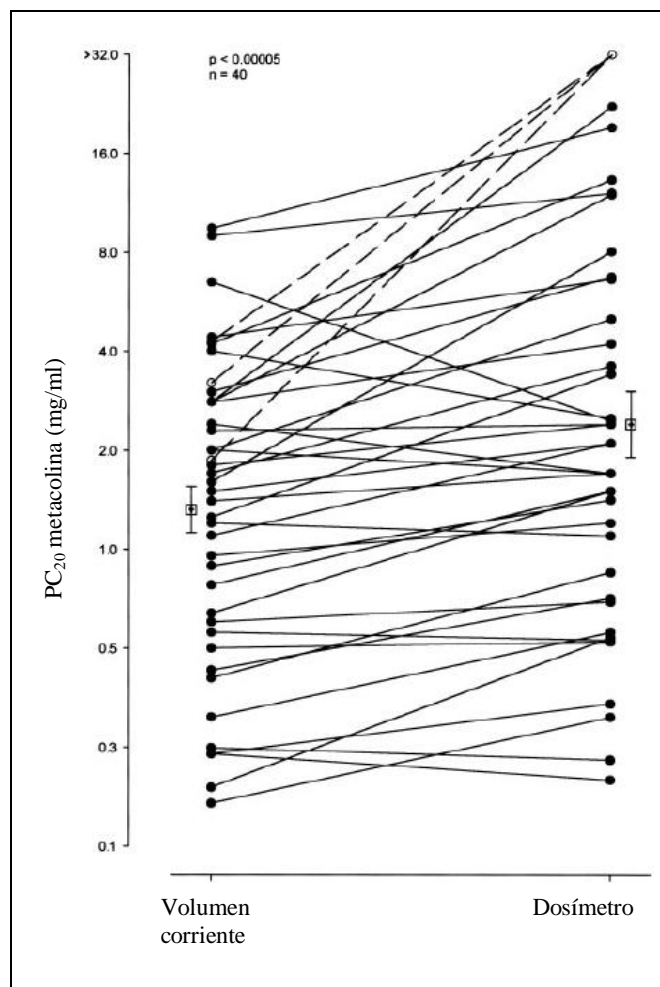


Figura 4. PC₂₀ metacolina a volumen corriente y con dosímetro (tomado de Cockcroft et al³³).

El tipo de nebulizador empleado, tamaño de partículas generado, forma de aerosolización, volúmenes pulmonares empleados, etcétera^{14,34,35,36}, son otros factores presumiblemente responsables de las diferencias entre ambos métodos de inhalación.

Utilizando diversos nebulizadores se han podido superar las diferencias entre la provocación bronquial mediante la inhalación a volumen corriente y con dosímetro en lo que se refiere a los valores de la pendiente y meseta de la curva dosis-respuesta³⁷. No obstante, los valores de PC₂₀ solo son similares si se utiliza el mismo tipo de nebulizador durante las exploraciones y se introducen determinadas modificaciones en la programación del dosímetro³⁸. Sin embargo las modificaciones sugeridas no han logrado, por el momento, eludir las diferencias entre ambos métodos en la caída de FVC como reflejo del atrapamiento inducido por el agonista³⁸.

I. 1. b. Hiperrespuesta bronquial en sujetos sanos:

El punto de corte para determinar la ausencia de hiperrespuesta bronquial frente a **broncoconstrictores directos** se estableció en valores de PC₂₀ superiores a 8 mg/ml^{14,16,17,32}. Utilizando puntos de corte más altos puede incrementarse la sensibilidad, pero a costa de una reducción de la especificidad^{16,17}.

A pesar de que se considera que dicho punto de corte es el más recomendado para la exclusión de asma bronquial activa, debe tenerse en consideración que los resultados de PC₂₀ comprendidos entre los 4 y 8 mg/ml pueden observarse en determinados individuos sanos^{14,16,17}, predominantemente fumadores^{39,40}, así como en el curso de infecciones respiratorias agudas^{16,17}. Por ello se ha sugerido que la identificación de otros parámetros de la curva dosis-respuesta podría aportar una información fundamental para el *screening* de diferentes enfermedades respiratorias.

Los valores límite para establecer hiperrespuesta bronquial mediante **broncoconstrictores indirectos**, han sido menos explorados. Algunos autores encontraron valores de PC₂₀ AMP menores o iguales a 400 mg/ml en poblaciones de pacientes con asma y, por este motivo, este punto de corte ha sido el más frecuentemente utilizado²⁷. Sin embargo, este aspecto no está definitivamente aclarado^{16,17}.

I. 1. c. **Hiperrespuesta bronquial en el diagnóstico de enfermedades respiratorias:**

El diagnóstico de diferentes enfermedades del aparato respiratorio se ve dificultado por el hecho de que muchas de ellas comparten manifestaciones clínicas comunes.

La disnea, tos y sibilantes son las manifestaciones clínicas más características del asma. No obstante dichos síntomas son también frecuentes en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis eosinofílica, enfermedades infecciosas de las vías respiratorias, entre otras entidades nosológicas más o menos frecuentes. Debido a que se intuye una patogenia común en muchas de estas patologías⁴¹, el desarrollo de técnicas más sensibles y específicas para el diagnóstico del asma debe ser un objetivo primordial²⁵.

Avital y sus colaboradores compararon los valores de PC₂₀ obtenidos con metacolina y con AMP en niños y adultos jóvenes sanos, y en pacientes con diferentes **enfermedades pulmonares crónicas** (fibrosis quística, bronquiolitis obliterante, discinesia ciliar primaria, bronquiectasias, asma bronquial). Como puede observarse en la figura 5, se encontró una importante superposición entre los valores de PC₂₀ metacolina encontrados en asmáticos y en individuos con patologías respiratorias diferentes del asma. Sin embargo, esta superposición de los valores de PC₂₀ era mucho menor en el caso del AMP. A la vista de estos resultados, parece evidente que, al menos en niños y adolescentes, el AMP muestra mayor capacidad discriminativa que la metacolina para diferenciar el asma de otras patologías respiratorias⁴¹.

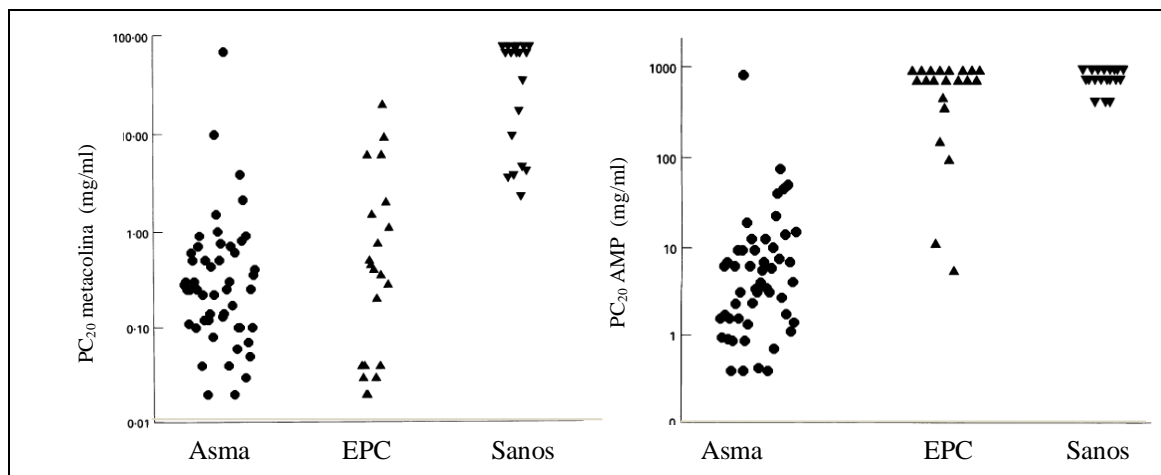


Figura 5. PC₂₀ metacolina y AMP en niños y adolescentes con distintas enfermedades respiratorias (tomado de Avital et al⁴¹).

Abreviaturas: EPC: enfermedades pulmonares crónicas diferentes del asma.

Históricamente el diagnóstico de **asma bronquial** en pacientes con función pulmonar normal se ha objetivado mediante la determinación de la PC₂₀ metacolina. En múltiples investigaciones se han demostrado valores reducidos de este parámetro en asmáticos^{37,42}, con niveles inferiores durante la agudización de la enfermedad⁴³. Sin embargo parece que la evaluación de la hiperrespuesta bronquial exclusivamente mediante la PC₂₀ metacolina, a pesar de ser la exploración más comúnmente empleada, no es suficientemente específica para diferenciar procesos respiratorios, por lo que el estudio de otros broncoconstrictores y el análisis de otros parámetros de las curvas dosis-respuesta obtenidos con los mismos aportaría información relevante.

La investigación de la PC₂₀ en respuesta a AMP ha demostrado reiteradamente valores medios menores en pacientes asmáticos que en sujetos sanos^{44,45,46}, con resultados semejantes a los derivados de los estudios con metacolina anteriormente citados.

Adicionalmente, la observación de la respuesta máxima a metacolina permitió a Prieto et al objetivar diferencias entre sujetos con asma bronquial leve, pacientes con rinitis e individuos sanos. Estos autores encontraron que el grado de broncoconstricción al que se identificaba respuesta máxima (*plateau*) era significativamente mayor en asmáticos que en las otras dos poblaciones²⁰. Este resultado ha sido una constante en

diversos proyectos^{37,42}. Al mismo tiempo, los asmáticos con mayor intensidad de síntomas han mostrado niveles más elevados de *plateau* tras la provocación bronquial con metacolina, llegando a desaparecer el mismo en presencia de una exacerbación clínica⁴³.

Por el contrario, la determinación de la respuesta máxima a AMP se ha investigado en un único estudio. Prieto et al encontraron que el *plateau* a AMP se identifica con un grado de obstrucción menor que el necesario para ponerlo de manifiesto con metacolina y que además, la presencia de *plateau* en respuesta a uno y otro agonista no se identificaba en los mismos pacientes⁴⁴.

En pacientes con asma, se ha identificado una relación negativa entre los valores de PC₂₀ metacolina y el grado de obstrucción al que se detecta *plateau* en respuesta a este agonista^{20,43,47}, lo que también se ha confirmado en población general^{48,49}. Esta relación no se ha investigado en el caso de AMP.

Por otro lado, y como se ha indicado anteriormente, se ha sugerido que los pacientes con asma grave manifiestan grados mayores de atrapamiento de la vía aérea, tanto espontáneamente²³ como en respuesta a broncoconstrictores inhalados²⁴, que los individuos con asma leve o moderada.

En la actualidad no ha podido demostrarse ningún tipo de asociación entre la PC₂₀ o la respuesta máxima y la presencia o grado de atrapamiento aéreo para ningún tipo de broncoconstrictor^{24,38}.

Los resultados comentados previamente parecen sugerir que, mientras la sensibilidad bronquial (PC₂₀) y el grado de obstrucción al que se detecta *plateau* pudieran obedecer a mecanismos patogénicos al menos parcialmente comunes, la intensidad del atrapamiento aéreo inducido por los agonistas broncoconstrictores es independiente de las otras características de las curvas dosis-respuesta obtenidas con los mismos.

Simultáneamente se ha investigado la posible relación entre la información de los diferentes parámetros de la curva dosis-respuesta obtenida mediante la provocación

bronquial con metacolina y su correspondiente valor en respuesta a AMP. Así se ha demostrado una relación significativa entre los valores de PC_{20} en respuesta a ambos broncoconstrictores^{27,44,46}.

La **rinitis** puede considerarse una patología limitada a la vía aérea superior, pero su relación con el asma es incuestionable⁵.

En este sentido, Prieto y sus colaboradores investigaron la sensibilidad bronquial en pacientes con rinitis asociada o no a asma y en sujetos sanos. Estos autores demostraron que los pacientes con rinitis alérgica presentaban valores de PC_{20} metacolina y AMP intermedios entre los encontrados en asmáticos y los identificados en sujetos sanos (figura 6)²⁷.

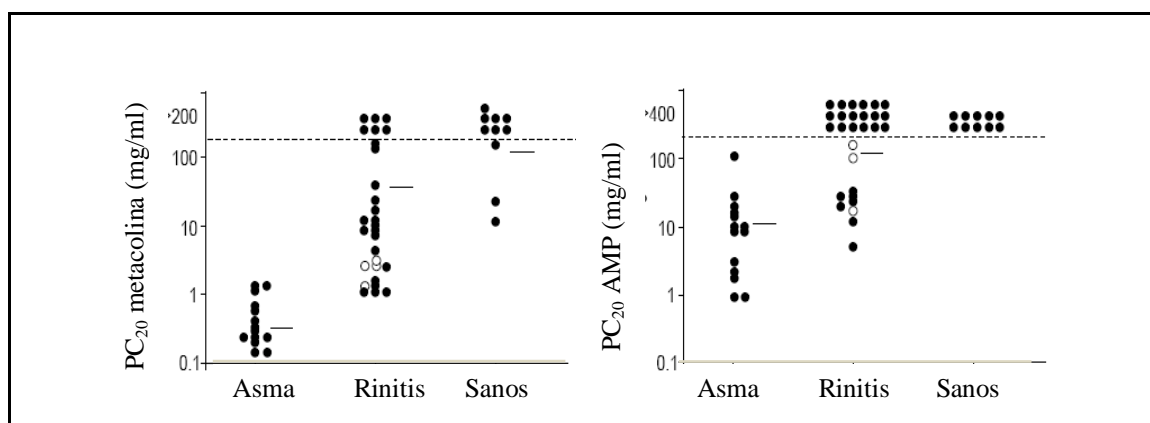


Figura 6. PC_{20} metacolina y AMP en asma, rinitis alérgica y sanos (tomada de Prieto et al²⁷).

Diferentes investigadores han comunicado resultados similares para el grado de obstrucción al que se identifica respuesta máxima. Los pacientes con rinitis alérgica sin asma presentan respuesta máxima tanto a metacolina^{20,21,50} como a AMP¹⁸ a un grado de obstrucción intermedio entre el identificado en asmáticos y en sujetos sanos.

En cuanto al estudio de la presencia y grado de atrapamiento aéreo, Boulet y sus colaboradores evidenciaron, en individuos con síntomas exclusivos de rinitis, cierto grado de atrapamiento tras la provocación bronquial con metacolina²¹. Sin embargo, la capacidad de AMP para inducir atrapamiento aéreo en pacientes con rinitis aislada no han sido estudiadas hasta la actualidad.

Hoy por hoy, y en pacientes con rinitis sin asma asociada, no existen suficientes evidencias de la existencia o no de relación estadística entre los diferentes parámetros de la curva dosis-respuesta para cada broncoconstrictor, ni se ha confirmado ningún tipo de asociación estadística entre los parámetros que definen las curvas dosis-respuesta obtenidas con metacolina y con AMP^{27,51,52}.

Diferentes autores insinúan, en sus conclusiones, que la detección de hiperrespuesta bronquial en pacientes con manifestaciones exclusivas de rinitis podría considerarse un factor de riesgo para el desarrollo futuro de asma, o bien la expresión de un asma subclínica. Estas connotaciones pronósticas de la presencia de hiperrespuesta bronquial a agonistas directos e indirectos en los pacientes con rinitis alérgica, aunque teóricas, son consistentes con el concepto de “vía aérea única”¹³, que postula que la rinitis alérgica y el asma constituyen manifestaciones de un mismo proceso. En consecuencia, las guías para el diagnóstico y tratamiento de la rinitis¹³ indican la necesidad de identificar y tratar la rinitis en los pacientes con asma, así como el asma en los pacientes con rinitis. Con esta última finalidad suelen ser necesarias determinaciones de la hiperrespuesta bronquial.

I. 1. c. 1. **Relación entre los marcadores de inflamación y la hiperreactividad bronquial:**

El estrechamiento de la vía aérea en el asma bronquial es el resultado de la interacción entre múltiples y complejos mecanismos, entre los que se incluye la presencia de un **proceso inflamatorio**.

Durante décadas la exploración de la hiperrespuesta bronquial se ha realizado mediante la determinación de la respuesta a **broncoconstrictores directos** (histamina y metacolina), los cuales, como se ha especificado anteriormente, inducen broncoconstricción estimulando directamente receptores localizados en el músculo liso bronquial, aunque en los últimos años ha surgido un interés creciente en el estudio de la hiperrespuesta bronquial mediante **broncoconstrictores indirectos** (AMP)^{26,53,54}. Estos últimos agentes inducen broncoconstricción mediante la estimulación de células inflamatorias para que generen mediadores que estimulan broncoconstricción (tabla 1). Por ello se ha sugerido que mientras la metacolina identifica cambios estructurales en la vía aérea de los pacientes **asmáticos**, AMP detecta alteraciones en los mecanismos inflamatorios involucrados en su desarrollo^{15,54,55}. Son múltiples los argumentos que sustentan esta afirmación, entre los que cabe destacar los que se comentan a continuación.

En un estudio realizado en 230 adultos con asma, De Meer y colaboradores identificaron una asociación inversa entre el grado de sensibilidad bronquial a AMP y la **eosinofilia** en sangre **periférica**⁵⁶. Esta asociación se ha confirmado posteriormente en niños con asma (figura 7)⁵⁷.

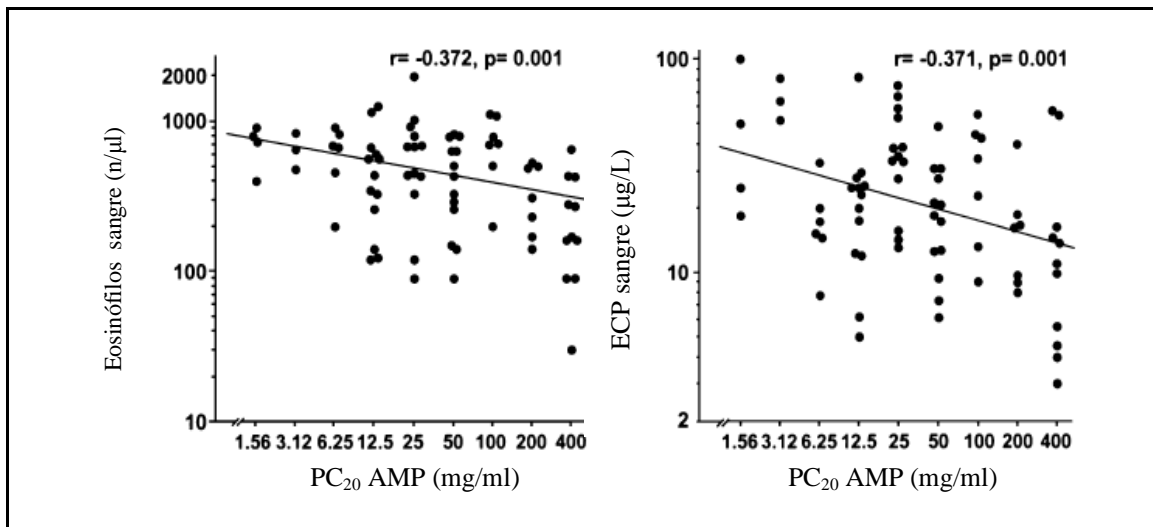


Figura 7. Relación entre sensibilidad a AMP y número de eosinófilos o proteína catiónica del eosinófilo en sangre en niños con asma (tomada de Choi et al⁵⁷).

Abreviaturas: ECP: proteína catiónica del eosinófilo.

Utilizando métodos como el estudio de muestras de **esputo inducido**, que identifican de manera más directa inflamación bronquial, Van Den Berge y colaboradores encontraron una correlación significativa entre los valores de PC₂₀ AMP y el número de eosinófilos (figura 8) o la concentración de proteína catiónica del eosinófilo en asmáticos. Por el contrario, la relación entre estos marcadores de inflamación bronquial en muestras de esputo y el grado de sensibilidad bronquial a metacolina era mucho más débil^{58,59}.

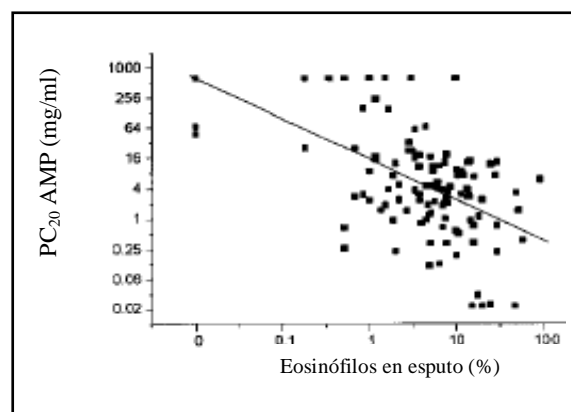


Figura 8. Relación entre PC₂₀ AMP y eosinofilia en esputo en asma (tomada de Van Den Berge et al⁵⁸).

En un grupo de individuos con asma alérgica en remisión (ausencia completa de síntomas asmáticos sin tratamiento durante al menos los 12 meses previos) y en pacientes con asma activa, Van Den Toorn et al determinaron la relación entre marcadores de inflamación en muestras de **biopsia bronquial** procesadas inmunohistoquímicamente y la respuesta bronquial a la inhalación tanto de metacolina como de AMP. Estos autores encontraron una correlación significativa entre los valores de PC₂₀ AMP y la densidad de la proteína básica mayor en el subepitelio, tanto en los pacientes con asma en remisión como en los individuos con asma activa, mientras que esta correlación no se observaba en el caso de metacolina. Además se observó una correlación significativa entre el grosor de la membrana basal y la sensibilidad bronquial a AMP ($r=0,47$, $p<0,05$), mientras que esta correlación no era significativa para metacolina ($r=0,36$, $p=0,1$)⁶⁰.

Resultados similares a los descritos para el asma se han comunicado también en pacientes con rinitis alérgica. Una importante proporción de pacientes con **rinitis** alérgica presenta inflamación bronquial. En esta población, Polosa et al demostraron una correlación significativa entre el porcentaje de eosinófilos en muestras de **esputo inducido** y la PC₂₀ AMP⁵¹. Esta correlación no ha sido confirmada para metacolina⁵².

Sin embargo, Boulet y colaboradores no pudieron identificar ningún tipo de asociación entre los marcadores de inflamación bronquial en muestras de **biopsia** obtenidas de pacientes con rinitis alérgica, y la respuesta a metacolina (sensibilidad, nivel de *plateau* y grado de atrapamiento aéreo)²¹. Hoy por hoy no existen investigaciones al respecto de la posible relación entre los marcadores proinflamatorios de muestras histológicas y la respuesta máxima y atrapamiento de la vía aérea en respuesta a AMP en individuos con rinitis sin síntomas de asma.

Por consiguiente, las publicaciones disponibles insinúan que los estudios de hiperrespuesta bronquial mediante AMP podrían reflejar, más específicamente que los estudios con broncoconstrictores directos, la presencia de un proceso inflamatorio en la vía aérea de pacientes con asma bronquial, aunque evidencian la necesidad de una mejor estandarización de su método de provocación y un mejor conocimiento de todos los componentes de la curva dosis-respuesta obtenida con los mismos.

I. 1. c. 2. **Efecto del tratamiento con corticosteroides sobre la determinación de la hiperrespuesta bronquial:**

El tratamiento mediante **corticosteroides** ejerce un efecto antiinflamatorio en las vías respiratorias de los pacientes asmáticos. Este hecho se manifiesta a través de la mejoría en los parámetros de función respiratoria, lo que se traduce en la reducción de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo las modificaciones inducidas por estos fármacos en la sensibilidad bronquial y en otros parámetros de la curva dosis-respuesta obtenida mediante la provocación bronquial, no son cruciales a la hora de adoptar decisiones terapéuticas en estos pacientes. Nuevamente el parámetro de la curva dosis-respuesta utilizado para determinar la respuesta al broncoconstrictor en esta población de pacientes ha sido la PC₂₀.

Prosperini y colaboradores encontraron que el tratamiento con budesonida inhalada durante 6 semanas se asociaba con incrementos significativos de los valores de PC₂₀ obtenidos con metacolina y con AMP⁶¹. Como puede observarse en la figura 9, estos incrementos de la PC₂₀ inducidos por el esteroide eran más evidentes para AMP que para metacolina. Sin embargo, al cabo de una semana de retirar el tratamiento, los valores de PC₂₀ habían disminuido de nuevo y en el caso de AMP habían alcanzado los valores basales. Estos resultados claramente sugieren que la respuesta a AMP es mucho más sensible a los efectos de los esteroides inhalados que la respuesta a metacolina. Estas observaciones han sido repetidamente confirmadas en múltiples publicaciones que han evaluado los efectos de diferentes corticosteroides^{62,63}.

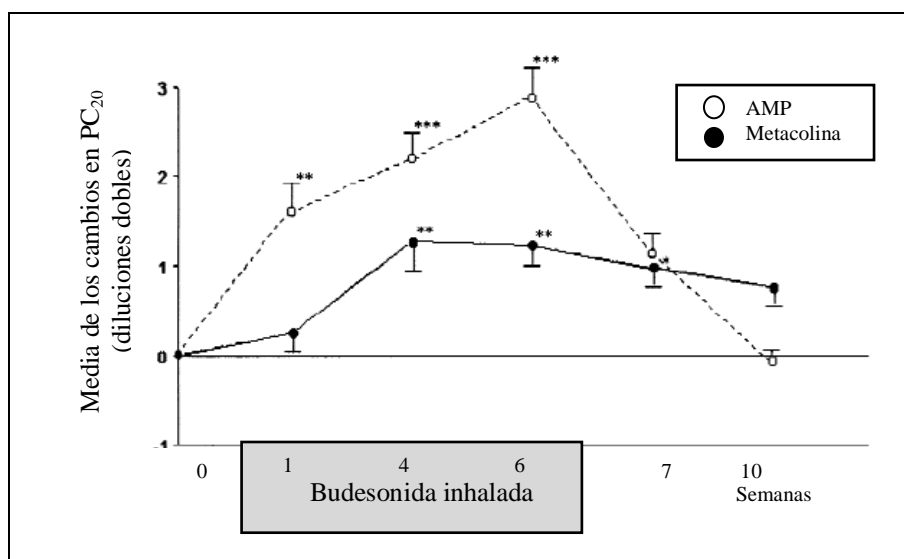


Figura 9. Cambios en PC₂₀ AMP y metacolina inducidos por el tratamiento con budesonida inhalada (tomada de Prosperini et al⁶¹).

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

A los estudios anteriormente citados es fundamental añadir el de Prieto y sus colaboradores al respecto de las modificaciones inducidas en la respuesta máxima a metacolina como consecuencia de cambios en las dosis de corticosteroides inhalados. En pacientes con asma moderada, estos investigadores demostraron incrementos en el nivel de la respuesta máxima tras reducir la dosis habitual del esteroide inhalado⁴³.

Más recientemente, se ha objetivado que el tratamiento con esteroides inhalados se asociaba con una reducción del grado de atrapamiento aéreo inducido por metacolina²⁴.

La información aportada previamente sugiere que la evaluación de los diferentes parámetros de la curva dosis-respuesta frente a broncoconstrictores directos e indirectos podría ser de utilidad para la dosificación del tratamiento corticoideo en pacientes con asma.

I. 1. c. 3. **Influencia de la sensibilización alérgica sobre la determinación de la hiperrespuesta bronquial:**

La **exposición alérgica** estimula el proceso inflamatorio responsable de las alteraciones fisiopatológicas que inducen la agudización de los síntomas respiratorios en individuos con rinitis asociada o no a asma bronquial atópica. En investigaciones recientes se ha insinuado que la presencia e intensidad de dicho mecanismo inflamatorio, en sujetos alérgicos, podría cuantificarse mediante la identificación de la respuesta a la provocación bronquial a AMP.

Con el fin de confirmar la asociación entre atopia e hiperrespuesta bronquial a AMP, Van Velzen y sus colaboradores evaluaron niños con **asma bronquial alérgica** sensibilizados a ácaros del polvo doméstico. Tras 1 mes de evitación alérgica se objetivó una reducción en la sensibilidad a AMP, mientras que las modificaciones de la sensibilidad bronquial a metacolina no fueron significativas⁶⁴.

Así mismo, Grootendorst et al investigaron las modificaciones de la respuesta a la provocación bronquial con broncoconstrictores directos e indirectos en adultos con asma alérgica sensibilizados a ácaros, tras la evitación del alérgeno sensibilizante. Contrariamente a lo esperado, estos autores no evidenciaron diferencias significativas en las modificaciones de PC₂₀ entre ambos tipos de broncoconstrictores⁶⁵.

Estudios posteriores han encontrado que la sensibilidad bronquial a metacolina es similar en pacientes con asma alérgica y en individuos con asma no alérgica. Por el contrario, la respuesta a AMP es mayor en los individuos atópicos (figura 10)⁶⁶.

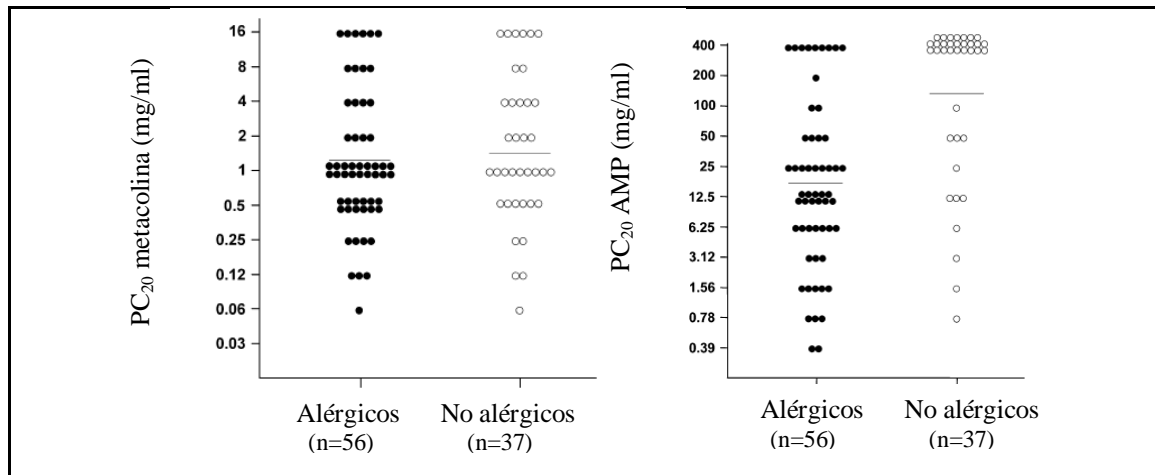


Figura 10. PC₂₀ metacolina y AMP en asmáticos alérgicos y no alérgicos (tomada de Kim et al⁶⁶).

Solamente un estudio ha investigado los efectos de la exposición alérgica sobre el nivel de respuesta máxima identificado con metacolina. En pacientes con asma polínica, Prieto et al han encontrado que la exposición natural al polen durante la estación se asociaba con incrementos significativos del grado de obstrucción al que se identificaba la respuesta máxima⁶⁷. El efecto de la exposición alérgica sobre la respuesta máxima a AMP no se ha estudiado hasta la actualidad.

Tampoco existe información acerca del efecto de la exposición alérgica sobre el grado de atrapamiento aéreo inducido por broncoconstrictores directos e indirectos en pacientes asmáticos alérgicos.

Las modificaciones de la respuesta a metacolina y a AMP, en individuos con **rinitis alérgica** sin asma, han sido similares a las descritas en los pacientes con asma. En este grupo de pacientes, la exposición natural a los alérgenos se asociaba con incrementos significativos de la sensibilidad bronquial a metacolina y a AMP (figura 11)^{52,68}.

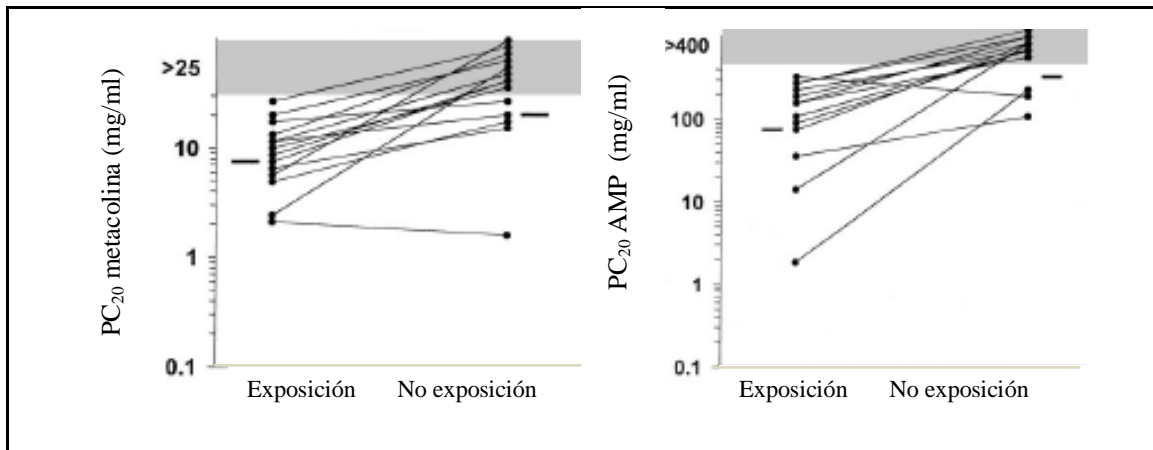


Figura 11. Valores de PC₂₀ metacolina y AMP en pacientes con rinitis alérgica, en periodos de exposición y no exposición al alérgeno sensibilizante (tomada de Prieto et al⁶⁸).

El grado de obstrucción al que se detecta respuesta máxima^{69,70} y la intensidad del atrapamiento aéreo en respuesta a metacolina (figura 12)²¹ también se modifican significativamente durante la exposición alérgica, en esta población de individuos con rinitis alérgica sin asma.

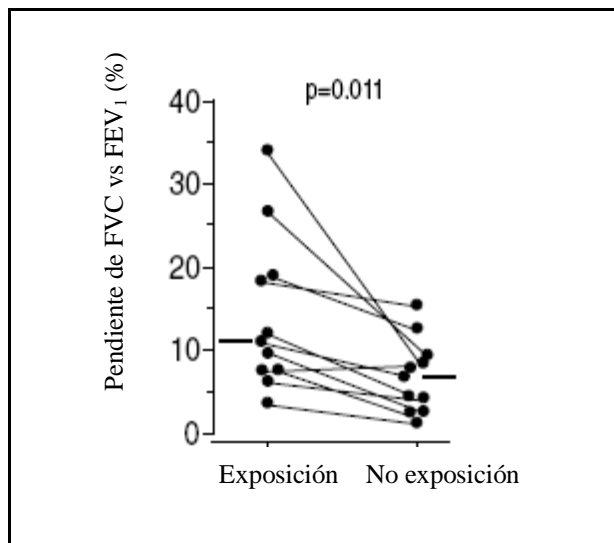


Figura 12. Cambios en la pendiente de FVC vs FEV₁ a metacolina inducidos por la exposición alérgica (tomada de Boulet et al²¹).

No hay datos en la literatura acerca del efecto de la exposición alérgica sobre el nivel de *plateau* y sobre el atrapamiento aéreo inducidos por AMP en individuos con rinitis alérgica sin asma.

Por tanto parece que la ausencia de exposición alérgica reduce la sensibilidad, respuesta máxima y atrapamiento aéreo inducidos por la provocación bronquial con metacolina. Aunque dichas modificaciones se han investigado en menor medida en respuesta a AMP, los resultados disponibles sugieren que AMP es un marcador más sensiblemente relacionado con la atopia y el proceso inflamatorio que otros broncoconstrictores.

Conceptos clave: Hiperrespuesta bronquial

- ✓ La evaluación de la hiperrespuesta bronquial en pacientes asmáticos se ha realizado tradicionalmente mediante estudios de la respuesta frente a metacolina, fundamentalmente mediante la investigación de la sensibilidad a este broncoconstrictor.
- ✓ Otros parámetros de la curva dosis-respuesta a metacolina y a otros tipos de broncoconstrictores han sido menos explorados.
- ✓ Por estos motivos, en los últimos años se ha incentivado la elaboración de nuevos proyectos para establecer un mejor conocimiento de todas las variables de la curva dosis-respuesta a metacolina y a otros broncoconstrictores, ya que se cree que los avances en estos aspectos posibilitarían una mejor comprensión del comportamiento de la vía aérea en condiciones de normalidad y de enfermedad.

I. 2. Óxido nítrico exhalado

I. 2. a. Metabolismo del óxido nítrico:

El **óxido nítrico** (NO) es una molécula gaseosa de vida media ultracorta (6 milisegundos) con actividad biológica en humanos.

Se **sintetiza** en el endotelio a partir del aminoácido L-arginina, produciendo como metabolito intermedio L-citrulina, fundamentalmente a través del grupo de enzimas NO sintasa. Sin embargo, si las concentraciones de arginina son menores o la necesidad de sustrato incrementa, se generan radicales libres y se producen peroxinitritos. Otros productos de degradación pueden ser nitritos y S-nitrosotioles, estos últimos involucrados en un mecanismo de retro-alimentación negativa sobre la síntesis de NO (figura 13)⁷¹.

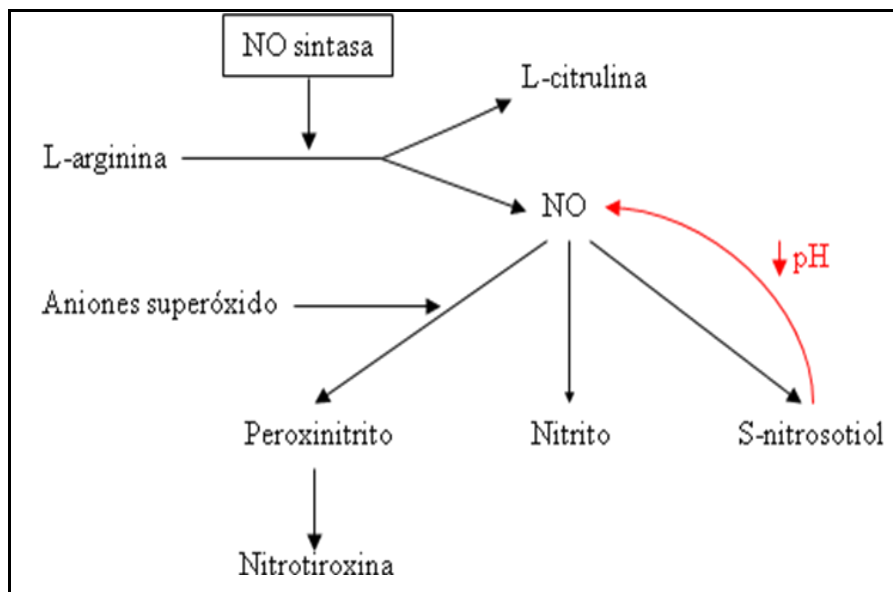


Figura 13. Metabolismo del NO (tomada de Duarte et al⁷¹).

Se han descrito tres **isoformas de la enzima NO sintasa**^{72,73}:

- ✓ **Tipo 1** o constitutiva neuronal. Se localiza en los nervios colinérgicos, células epiteliales y neumocitos tipo 1 de la pared de la vía aérea. Requiere la activación por iones de calcio para la obtención de pequeñas cantidades de NO.
- ✓ Constitutiva endotelial o **tipo 3**. Se expresa en las células endoteliales de bronquios y circulación pulmonar. Es calcio dependiente y sintetiza pequeñas cantidades de la molécula.
- ✓ **Tipo 2** o inducible. Se ubica en células epiteliales, endotelio, músculo liso de la vía aérea y vascular, fibroblastos, mastocitos y neutrófilos. Obtiene cantidades mayores de NO independientemente de los iones de calcio, en respuesta a mediadores inflamatorios (factor de necrosis tumoral α , interferon γ , interleucina 1β , interleucina 13), alérgenos, agentes infecciosos y contaminantes ambientales.

La **dinámica** de intercambio gaseoso de la molécula de NO es diferente a la del oxígeno, nitrógeno y monóxido de carbono. Esto es debido a que es un radical libre reactivo frente a sustancias endógenas, y después de formarse se une ávida e irreversiblemente al grupo Hemo⁷⁴.

El NO está **involucrado** en la regulación del tono vascular y bronquial, en la inflamación y en la neurotransmisión^{71,72,73}.

I. 2. b. Determinación del óxido nítrico exhalado:

El NO fue descubierto por primera vez en el exhalado de humanos y otros vertebrados en 1991 y en la actualidad se emplean principalmente dos técnicas para su medición^{75,76,77,78}:

- ✓ Trazador de **quimioluminiscencia**. Utilizando este sistema se detectan moléculas de NO mediante la identificación de la intensidad de la radiación electromagnética creada a partir de una reacción química.

- ✓ Sensor **electroquímico**. Mediante una técnica amperométrica se aplican diferentes voltajes a la molécula a estudio para lograr su oxidación o reducción, lo que permite posteriormente su detección mediante este sensor.

Se ha sugerido que las diferencias en las características de ambos métodos detalladas en la tabla 2, podrían ser la causa fundamental de las diferencias entre los resultados obtenidos con cada uno de ellos. Por ello se recomienda que la información resultante de cada uno se interprete con independencia y complementariedad^{76,77,78}.

Tabla 2. Características de los equipos de detección de NO exhalado (tomada de Alving et al⁷⁵).

	Equipo de quimioluminiscencia	Sensor electroquímico
Tamaño (cm)	50 x 30 x 40	25 x 15 x 10
Peso (kg)	40	< 1
Coste	Alto	Medio
Dificultad de uso	Alta	Baja
Necesidad de calibración	Al menos 1 vez cada 14 días	Con cada cambio de sensor
Rango de medida (ppb)	0 a 200	5 a 300
Límite inferior de detección (ppb)	1,5	5
Precisión: <50 ppb >50 ppb	2,5 5%	5,0 10%
Linealidad	<2,5 ppb	3-5%
Tiempo respuesta del sensor (s)	<0,7	<30-120
Tiempo de medida y presentación de resultados (s)	10	<120
Flujo exhalatorio (ml/s)	Variable	50

I. 2. c. **Dinámica de intercambio gaseoso del óxido nítrico:**

Diversos grupos de investigadores han dedicado sus esfuerzos a la comprensión de la dinámica de intercambio del NO y, a través de diferentes modelos matemáticos, se ha pretendido una aproximación a sus valores en el exhalado de humanos^{74,79}.

Inicialmente se emplearon modelos **unicompartimentales** en los que se consideraba a la vía aérea inferior como un único compartimento. Aunque posteriormente Tsoukias y George⁷⁴ desarrollaron un modelo **bicompartimental**, mediante el que se definían dos zonas principales:

- ✓ **Zona bronquial.** Es un compartimento cilíndrico, rígido y homogéneo, rodeado de mucosa y de circulación bronquial.

- ✓ **Zona alveolar o acinar.** Compartimento flexible y expansible en función del tiempo, rodeado de membrana alveolar y de circulación pulmonar.

De este modo se diferenciaron dos compartimentos, el primero relativamente rígido y el segundo expansible, cada uno adyacente a un tejido capaz de producir y consumir NO. A su vez este tejido contacta con la circulación bronquial o pulmonar (figura 14)⁷⁴.

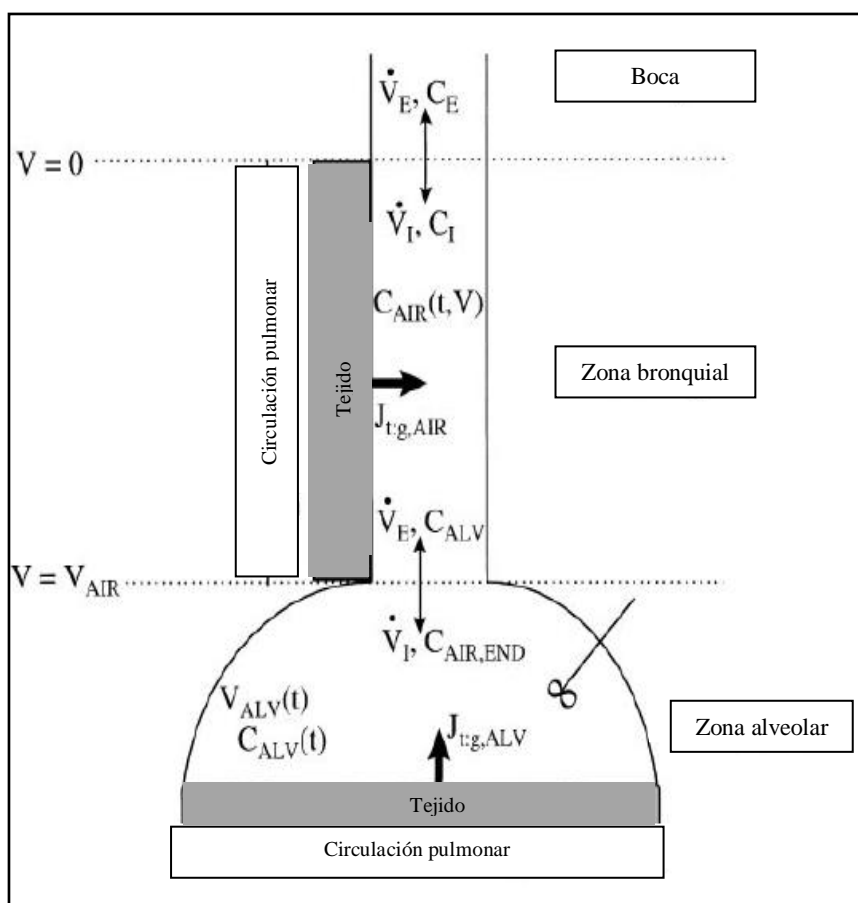


Figura 14. Modelo bicompartmental de Tsoukias y George (tomada de Tsoukias y George⁷⁴).

Abreviaturas: V : volumen, V_{air} : volumen de la vía aérea, V_{alv} : volumen alveolar, V_E : volumen espiratorio, V_I : volumen inspiratorio, C_{air} : concentración de la vía aérea, C_{alv} : concentración alveolar, C_E : concentración espiratoria, C_I : concentración inspiratoria, $J_{\text{tg,air}}$: flujo de óxido nítrico total del tejido a la vía aérea, $J_{\text{tg,alv}}$: flujo de óxido nítrico total del tejido al alveolo.

La obtención del NO en dichos modelos bicompartmentales se realiza empleando múltiples flujos exhalatorios, y como se ha indicado con anterioridad únicamente el trazador de quimioluminiscencia tiene esta característica (tabla 2). Por ello, éste será el método de detección de óxido nítrico exhalado (ENO) que se empleará de forma constante en este tipo de estudios^{73,79,80}.

Mediante la representación del débito de NO con respecto a cada uno de los flujos a los que se realiza la determinación se obtiene una recta de regresión. La pendiente de la misma es la concentración alveolar de NO (CA_{NO}), mientras que su intercepción en Y representa el óxido nítrico bronquial (J'_{awNO}) (figura 15)⁸⁰.

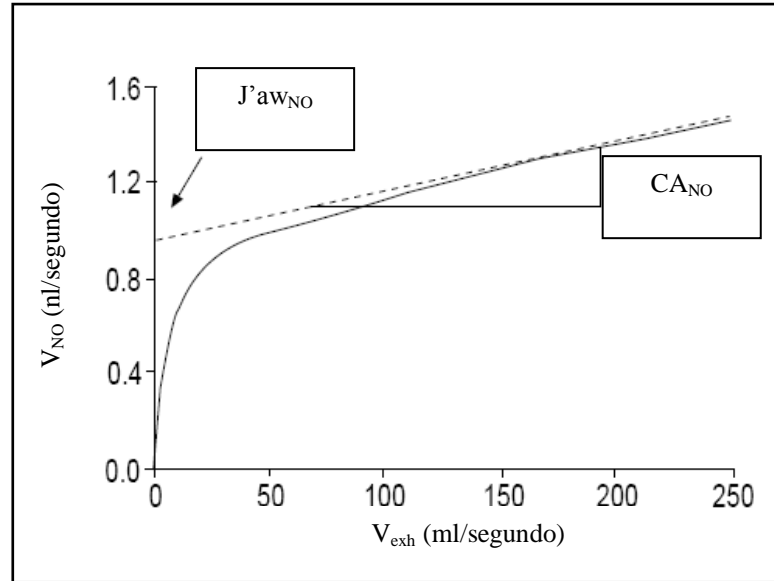


Figura 15. Cálculo de la concentración alveolar de NO y de la concentración bronquial de NO (tomada de Lehtimaki et al⁸⁰).

Abreviaturas: V_{exh} : flujo espiratorio, V_{NO} : output de óxido nítrico, CA_{NO} : concentración alveolar de NO, J'_{awNO} : concentración bronquial de NO.

Se ha comprobado que las células son capaces de producir NO y, asumiendo que esta producción es constante, la molécula producida puede seguir tres caminos. Puede ser consumida por los propios tejidos, difundir hacia la circulación pulmonar o bronquial, o difundir hacia la luz de la vía aérea. Siguiendo estas directrices, el débito del NO dependería del intercambio en el compartimento alveolar a través de la zona bronquial^{74,79}.

De estas observaciones se dedujo que el débito de ENO es inversamente proporcional al flujo exhalatorio para una fuente de volumen fijo, porque si el flujo de exhalación incrementa, el tiempo de contacto entre la columna de aire y la superficie de la pared como fuente de NO se reduce, reduciendo así su difusión desde la pared hacia la luz bronquial. Con todo ello, si la vía aérea es la única fuente de NO se podría predecir la producción de ENO, el cual sería constante sobre un amplio rango de flujos⁷³.

Sin embargo, la incorporación de nuevos elementos matemáticos a la ecuación, en trabajos posteriores, evidenció la simplicidad de este modelo inicial.

La difusión molecular es fundamental en la determinación del ENO. Por ello Condorelli y sus colaboradores incorporaron el factor de **difusión axial** al modelo anteriormente descrito⁸¹. Esta modificación del modelo bicompartimental original propuesto por Tsoukias y George⁷⁴ tiene en cuenta el flujo lineal del aire desde el alveolo a la boca y corrige para la contaminación del aire alveolar con NO procedente de la luz bronquial que refluye hacia el alveolo (la denominada difusión axial) (figura 16). Por otra parte, Condorelli et al⁸¹ y otros investigadores⁸² demostraron que el ENO es una función positiva del flujo exhalatorio, consistente en una fuente de NO de una región del pulmón que cambia de volumen durante la exhalación.

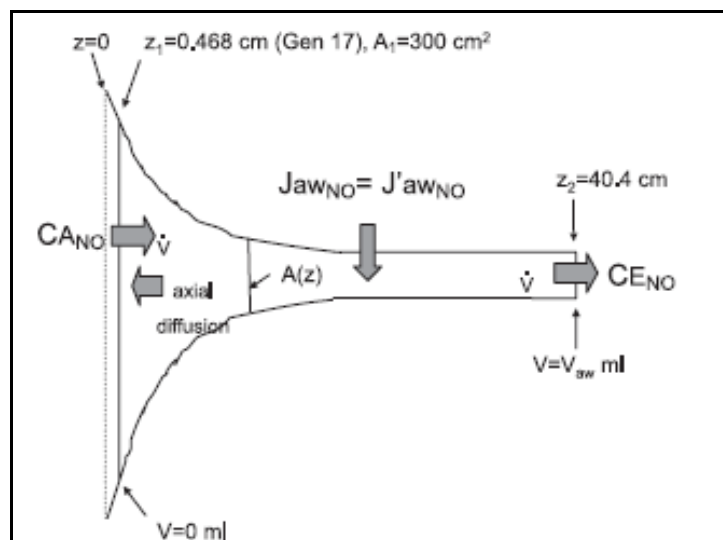


Figura 16. Modelo bicompartimental de Condorelli (tomada de Condorelli et al⁸¹).

Abreviaturas: z : sección, $A(z)$: sección transversal, A_1 : área, V : volumen, V_{aw} : volumen bronquial, CE_{NO} : concentración espiratoria de óxido nítrico, CA_{NO} : concentración alveolar de óxido nítrico, $J_{aw_{NO}}$ y $J'_{aw_{NO}}$: concentración bronquial de óxido nítrico.

En esta representación se definen los dos compartimentos del modelo a modo de morfología en trompeta, con una sección transversal que disminuye con la proximidad al área orofaríngea. Se incluye el concepto de difusión y transporte de NO en la dirección axial desde y hacia la región alveolar.

En consecuencia este modelo evita que se infravalore el NO elaborado en el compartimento bronquial y que se sobreestime el producido en la zona alveolar⁸².

Más recientemente se ha sugerido que las asimetrías de los acinos podrían afectar a la difusión y transporte del NO, por lo que se ha propuesto el desarrollo de modelos **multicompartimentales** que permitan una estimación de la distribución axial de dicha molécula de forma no homogénea^{83,84}.

Por consiguiente, el progreso hacia un mejor conocimiento del intercambio dinámico del NO requiere el perfeccionamiento de los modelos analíticos y experimentales para facilitar el conocimiento de los factores involucrados en su intercambio.

I. 2. d. **Óxido nítrico exhalado en individuos sanos:**

En la actualidad se consideran **normales** los valores de ENO inferiores a 30 ppb⁸⁵. Sin embargo es primordial tener en cuenta los valores individuales para establecer la normalidad en cada sujeto estudiado⁷³, ya que la normativa vigente de la *American Thoracic Society* y *European Respiratory Society* pone de manifiesto que dichos valores pueden verse alterados en diferentes situaciones^{86,87}.

Así por ejemplo, se han objetivado variaciones irregulares en función de la **edad, sexo, ciclo menstrual y embarazo**^{86,87}. Además la ingesta de **alimentos o bebidas** ricas en nitratos es causa de incremento en los niveles de ENO. No obstante la limpieza de la cavidad orofaríngea con un antiséptico local antes de cada exploración se ha demostrado eficaz para reducir la influencia de estos factores⁸⁸. Por otra parte, el hábito **tabáquico** disminuye las concentraciones de ENO⁸⁹, mientras que las **infecciones respiratorias** las incrementan⁹⁰.

Si se evita la apnea antes de la exhalación, las **maniobras respiratorias** necesarias para determinar el ENO no tienen influencia sobre las concentraciones del mismo^{86,87}. Mención especial merecen las maniobras respiratorias necesarias para realizar la espirometría sobre los valores de ENO. Algunos estudios encontraron que las maniobras espirométricas producían una reducción significativa en la concentración de ENO^{91,92,93}, mientras que otros no han podido confirmarlo^{94,95,96}. Un estudio completado recientemente en nuestro centro ha encontrado que las maniobras espirométricas no modifican significativamente ni las concentraciones de NO a 50 ml/s ni el NO alveolar ni el bronquial⁹⁷. En consecuencia, parece que la determinación de ENO puede realizarse antes o después de la espirometría, sin que esto tenga influencia alguna sobre las concentraciones de este marcador.

Otros factores como la **contaminación** por el NO nasal o ambiental, parecen haber sido subsanadas mediante los elementos técnicos que configuran los equipos de detección de ENO^{86,87,98}.

I. 2. e. Óxido nítrico exhalado en el diagnóstico de enfermedades respiratorias:

Numerosas enfermedades prioritariamente respiratorias, así como patologías sistémicas con afección respiratoria como la esclerosis sistémica⁹⁹ o la cirrosis¹⁰⁰ causan alteraciones en las concentraciones de ENO.

El estudio de las concentraciones de NO nasal y exhalado de 157 niños con diferentes **enfermedades respiratorias** (discinesia ciliar primaria, bronquiectasias, fibrosis quística, asma bronquial) y de 53 controles sanos, permitió a Narang y sus colaboradores objetivar que los valores más bajos se identificaban en los pacientes con discinesia ciliar primaria, seguidos por aquellos con fibrosis quística y bronquiectasias (figura 17)¹⁰¹.

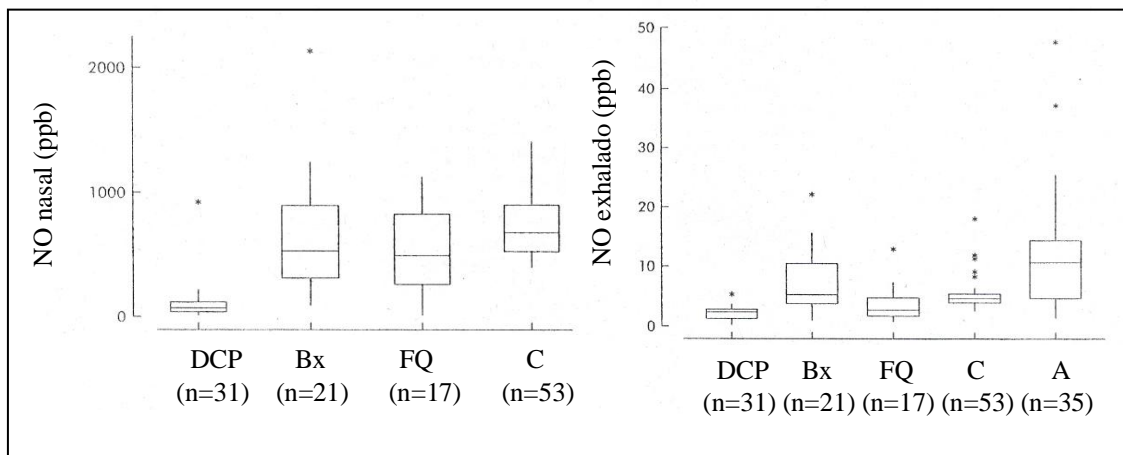


Figura 17. Concentración de NO nasal y exhalado en niños con diferentes enfermedades respiratorias (tomada de Narang et al¹⁰¹).

Abreviaturas: DCP: discinesia ciliar primaria, Bx: bronquiectasias, FQ: fibrosis quística, A: asma y C: controles sanos

Posteriormente, Shoemark et al emplearon un modelo bicompartimental para la determinación de los niveles de ENO en adultos con discinesia ciliar primaria y bronquiectasias, demostrando que los valores para ambos tipos de pacientes fueron bajos a expensas de $J'aw_{NO}$ (figura 18)¹⁰².

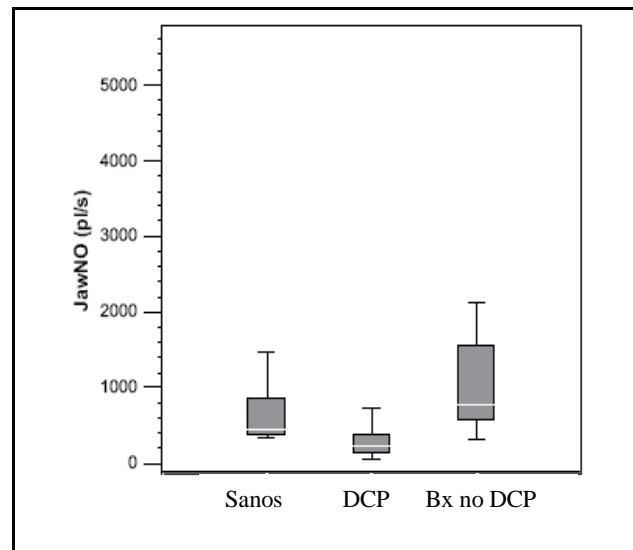


Figura 18. Concentración de NO bronquial en adultos con diferentes enfermedades respiratorias (tomada de Shoemark et al¹⁰²).

Abreviaturas: DCP: discinesia ciliar primaria, Bx: bronquiectasias, J_{awNO} : concentración bronquial de NO.

Estas y otras publicaciones han confirmado valores de NO nasal y exhalado repetida y extraordinariamente bajos en pacientes con discinesia ciliar, por lo que actualmente su determinación se emplea como *screening* en pacientes con sospecha de esta patología, y tras el diagnóstico como control de la actividad de la enfermedad^{73,101,102}.

A raíz del descubrimiento de Alving et al de que las concentraciones de ENO eran significativamente más altas en los pacientes con asma que en los controles sanos¹⁰³, han sido muchas las investigaciones diseñadas para determinar la utilidad de este marcador para monitorizar la enfermedad^{104,105}. Smith y sus colaboradores concluyeron que utilizando las concentraciones de ENO se conseguía controlar el asma con dosis menores de esteroides inhalados que las requeridas cuando se utilizaban los métodos tradicionales (síntomas, requerimientos de β -adrenérgicos de rescate y parámetros de función pulmonar)¹⁰⁶. Sin embargo, otras investigaciones han conducido a conclusiones opuestas¹⁰⁷. Además una revisión sistemática publicada recientemente ha concluido que no se ha demostrado que el control del asma mediante determinaciones de ENO sea útil para mejorar la evolución del proceso, tanto en adultos como en niños¹⁰⁸.

Utilizando el modelo propuesto por Tsoukias y George, Delclaux et al objetivaron niveles superiores de ENO en asmáticos frente a los obtenidos en los controles sanos, debido fundamentalmente a incrementos en J'_{awNO} ¹⁰⁰. Por el contrario, la CA_{NO} era similar en las dos poblaciones^{80,100,109}.

Posteriormente Kerckx y sus colaboradores demostraron que la difusión y transporte axial del NO es determinante para la CA_{NO} . Corrigiendo los valores para tener en cuenta este factor confirmaron que la CA_{NO} era similar en asmáticos y en sujetos sanos⁸².

Los resultados de los investigadores detallados previamente son compatibles con la conclusión de que, en el asma, el proceso inflamatorio activo se localiza en el compartimento bronquial. Sin embargo, la inflamación en vías aéreas distales y alveolos puede ser importante en algunas ocasiones. Así por ejemplo, se ha encontrado que los pacientes con asma refractaria muestran concentraciones alveolares de NO significativamente más altas que las identificadas en individuos con asma leve-moderada (figura 19)¹¹⁰.

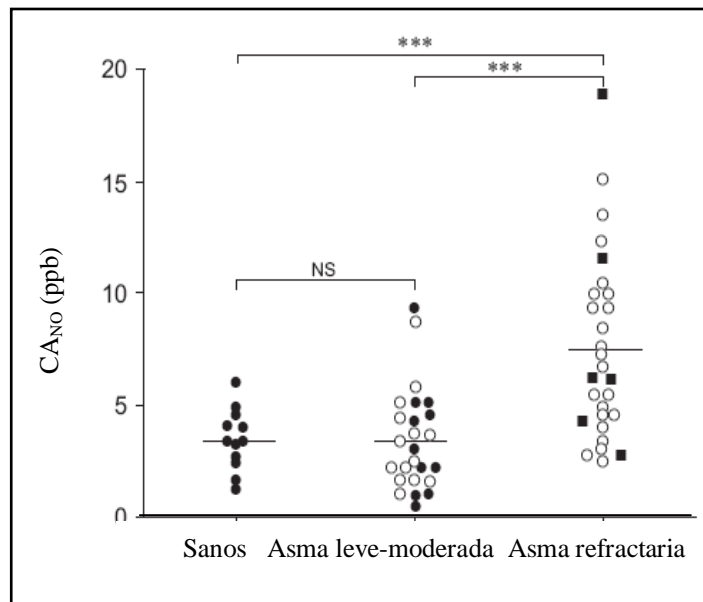


Figura 19. Concentración de NO alveolar en asma leve-moderada y en asma refractaria (tomada de Berry et al¹¹⁰).

Abreviaturas: CA_{NO} : concentración alveolar de NO.

*** $p < 0,0001$

Diferentes estudios han encontrado que los pacientes con **rinitis** alérgica presentan concentraciones de ENO significativamente más elevadas que los sujetos sanos^{104,111,112,113,114}. En consecuencia, parece razonable aceptar que los incrementos de ENO son más una expresión de la presencia de atopia que de asma. Sin embargo, un estudio ha encontrado que cuando se comparan las concentraciones de ENO en pacientes asmáticos y en individuos con rinitis alérgicas sensibilizados al mismo alérgeno, estas eran significativamente más altas en los asmáticos (figura 20)¹¹². Estos resultados sugieren que los mecanismos que conducen a la elevación de las concentraciones de ENO no se limitan solo a la atopia, sino que tienen que ver también con el asma.

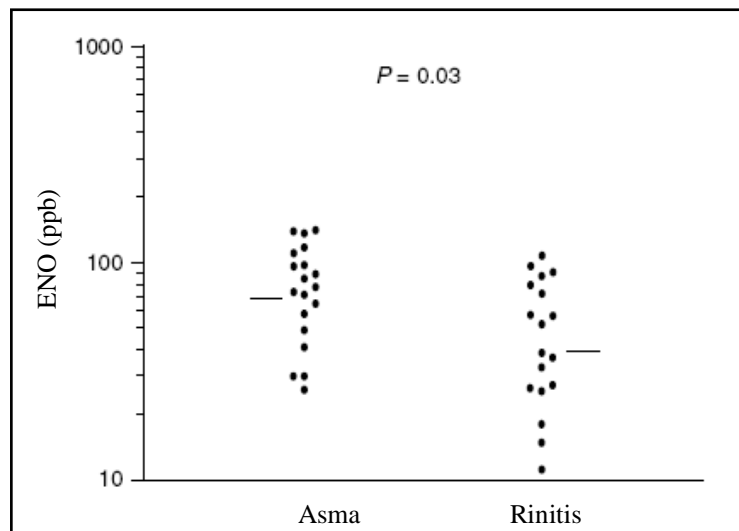


Figura 20. Concentración de ENO en pacientes asmáticos e individuos con rinitis alérgica sensibilizados al mismo alérgeno (tomada de Prieto et al¹¹²).

Sin embargo, los métodos de compartimentalización del ENO no se han utilizado para el estudio de los pacientes con rinitis alérgica, por lo que se desconoce el comportamiento del NO alveolar en esta población de pacientes no asmáticos con rinitis alérgica.

I. 2. e. 1. **Relación entre los marcadores de inflamación e hiperreactividad bronquial y la determinación del óxido nítrico exhalado:**

El estudio del metabolismo del NO ha demostrado su relación con diferentes marcadores de inflamación bronquial y, dado que la **actividad inflamatoria** es una característica fundamental en el asma bronquial, en los últimos años se ha sugerido que la determinación del ENO podría ser útil en el manejo de pacientes asmáticos. Una de las mayores ventajas es la de que se trata de una técnica no invasiva y sencilla, comparada con otros métodos de estudio de la inflamación bronquial como el esputo inducido, la biopsia bronquial o el lavado broncoalveolar^{73,115}.

Diferentes estudios han encontrado una asociación entre el número de eosinófilos o determinados mediadores en **sangre** liberados por los mismos y las concentraciones de ENO en pacientes con asma, mientras que la misma no ha podido detectarse en controles sanos¹¹⁵. La compartimentalización del ENO ha permitido demostrar que esta asociación ocurre fundamentalmente a expensas del J'aw_{NO}⁸⁰.

Otros estudios han identificado una correlación significativa entre el porcentaje de eosinófilos en muestras de **esputo inducido** y la concentración de ENO en pacientes con asma estable (figura 21)¹¹⁶. Esta correlación se ha demostrado también para las proteínas tóxicas derivadas del eosinófilo en muestras de esputo^{115,117}.

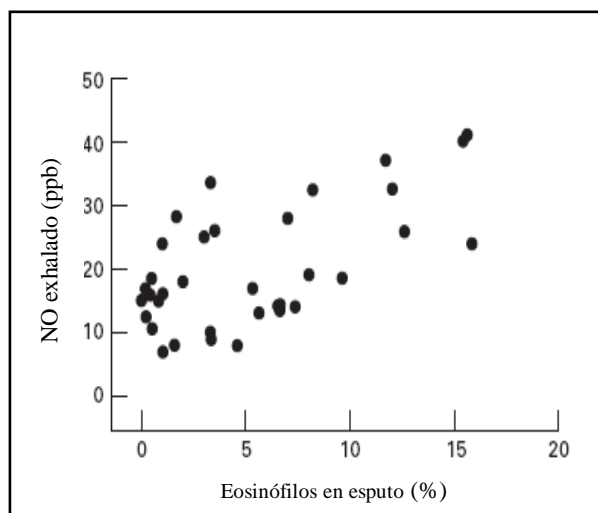


Figura 21. Relación entre ENO y eosinófilos en esputo en pacientes con asma estable (tomada de Jatakanon et al¹¹⁶).

Por otro lado, en estudios de **biopsias bronquiales** de niños con asma resistente al tratamiento, Mahut y sus colaboradores objetivaron una asociación significativa entre la magnitud del infiltrado eosinofílico subepitelial, proteína catiónica eosinofílica o engrosamiento de la membrana basal reticular y la concentración del ENO¹¹⁸. Estos resultados confirmaban evidencias previas^{60,119}.

Sin embargo, los resultados de otros estudios parecen contradecir los referidos previamente. En un estudio realizado sobre pacientes con asma leve-moderada, Lim et al, no fueron capaces de detectar correlación entre las concentraciones de ENO y la intensidad del infiltrado eosinofílico en la mucosa bronquial¹²⁰. Estos resultados sugieren que la concentración de ENO no parece reflejar la intensidad de la inflamación eosinofílica bronquial en los pacientes con asma.

Otro estudio realizado en pacientes no asmáticos con **rinitis** alérgica no ha podido tampoco identificar una relación entre la concentración de ENO y los marcadores de inflamación eosinofílica en **sangre** como el número de eosinófilos y la concentración de proteína catiónica del eosinófilo¹¹³.

Como se ha indicado anteriormente, tradicionalmente se ha considerado que el estudio de la **hiperrespuesta bronquial** en el asma permite identificar la intensidad y consecuencias de la inflamación de la vía aérea. En los últimos años se ha objetivado además que la provocación bronquial con AMP podría ser útil también para este fin.

Además de las investigaciones al respecto de la relación entre la respuesta a AMP y la actividad inflamatoria del asma, se han desarrollado proyectos que han estudiado la asociación de las concentraciones de ENO con la intensidad de la hiperrespuesta bronquial^{25,58}.

Son pocos los estudios publicados hasta la actualidad y sus conclusiones han sido contradictorias. En individuos con asma, algunos investigadores han encontrado una relación significativa entre la sensibilidad bronquial a metacolina y las concentraciones de ENO^{80,116}, mientras que otros han identificado relación únicamente con la sensibilidad bronquial a AMP (figura 22)^{60,112,121}.

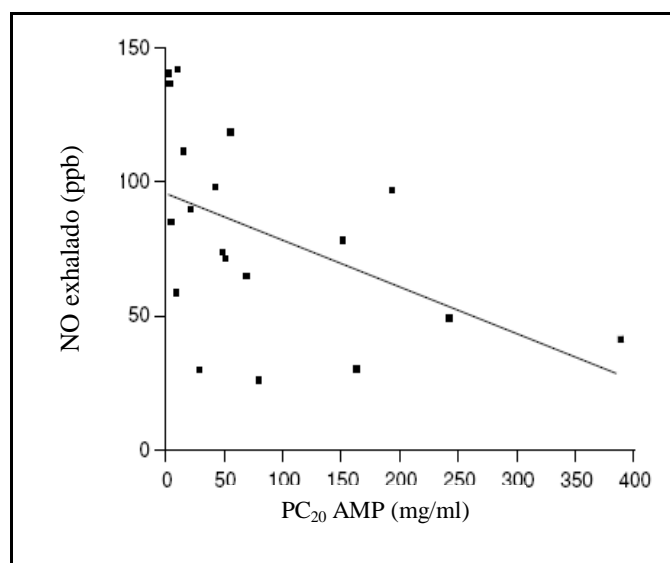


Figura 22. Relación entre ENO y PC₂₀ AMP en pacientes con asma alérgica (tomada de Prieto et al¹¹²).

La discordancia entre los resultados de los estudios publicados y la relación imperfecta, aunque significativa, entre la sensibilidad bronquial a broncoconstrictores directos o indirectos y las concentraciones de ENO parecen indicar que cada una de estas exploraciones aporta información acerca de aspectos diferentes del proceso

inflamatorio y que los resultados obtenidos de las mismas pueden ser complementarios. Estos aspectos necesitan aclararse en futuras investigaciones^{60,122}.

I. 2. e. 2. Efecto del tratamiento con corticosteroides sobre la determinación del óxido nítrico exhalado:

El **tratamiento con corticosteroides** produce una reducción de la expresión de la enzima NO sintasa tipo 2, con la consiguiente reducción de las concentraciones de ENO^{72,73,109,123}. No es sorprendente por tanto, que el tratamiento con corticoides en los pacientes con rinitis asociada o no a asma se asocie con reducciones significativas de las concentraciones de ENO y de NO nasal (figura 23)¹²⁴.

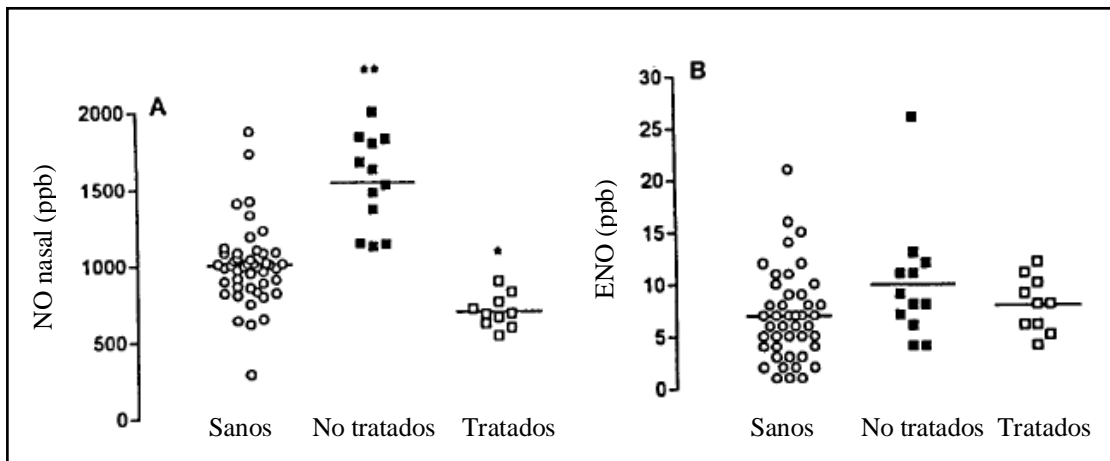


Figura 23. Concentración de NO nasal y exhalado en rinitis asociada o no a asma con y sin tratamiento con corticoides (tomada de Kharitonov et al¹²⁴)

Más recientemente se ha demostrado que, en los pacientes con un episodio agudo de asma a pesar del tratamiento con esteroides inhalados, la adición de corticoides orales inducía reducciones significativas de las concentraciones de ENO¹²⁵.

Investigaciones posteriores demostraron que esta reducción de los valores de ENO tras el tratamiento con corticoides ocurría a expensas del NO bronquial (figura 24)^{80,109}.

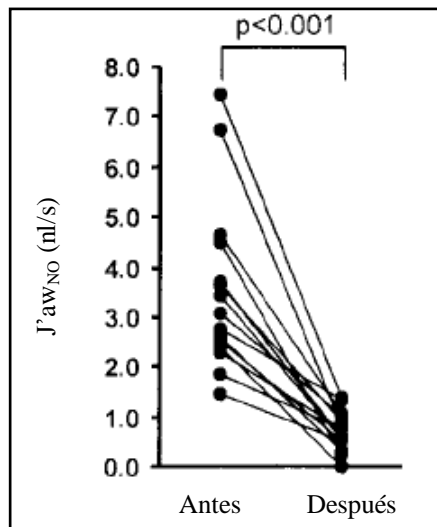


Figura 24. Concentración bronquial de NO en asma antes y después del tratamiento con corticoides (tomada de Lehtimaki et al⁸⁰)

Abreviaturas: J'awNO: óxido nítrico bronquial.

El hecho de que los niveles del ENO sean superiores en sujetos con rinitis acompañada o no de asma y de que disminuyan tras el tratamiento con corticosteroides, parece sugerir que esta determinación podría ser útil para el control del tratamiento con dichos fármacos.

Sin embargo, algunos autores sugieren que la determinación de ENO no debería utilizarse para el control de los pacientes asmáticos tratados con corticoides, pues en ellos los niveles de ENO estarían necesariamente bajos como consecuencia del bloqueo enzimático ejercido por estos fármacos¹⁰⁴.

I. 2. e. 3. Influencia de la sensibilización y de la exposición alérgica sobre la determinación del óxido nítrico exhalado:

Se ha establecido que la **exposición alérgica** es el desencadenante de muchos de los mecanismos fisiopatológicos que inducen la rinitis y asma alérgicas. Por ello Prieto y sus colaboradores evaluaron el efecto de la exposición natural al alérgeno en pacientes con **asma** alérgica polínica. Estos autores observaron incrementos significativos de las concentraciones de ENO durante la estación polínica¹²⁶.

Posteriormente dichos resultados fueron confirmados por Olin et al. Estos investigadores concluyeron que los valores de ENO en pacientes con asma alérgica eran superiores a los identificados en individuos sanos. Sin embargo, los valores volvían a la normalidad cuando los pacientes asmáticos no estaban expuestos a los alérgenos sensibilizantes¹⁰⁴.

Más recientemente se ha confirmado la íntima relación entre la sensibilización y la concentración de ENO. Scott y sus colaboradores estudiaron individuos alérgicos y no alérgicos con diversas manifestaciones. Objetivaron que los valores de ENO en asmáticos no alérgicos eran inferiores a los observados en atópicos sin síntomas de asma, y estos últimos a su vez inferiores a los detectados en pacientes con asma alérgica (figura 25)¹¹⁴.

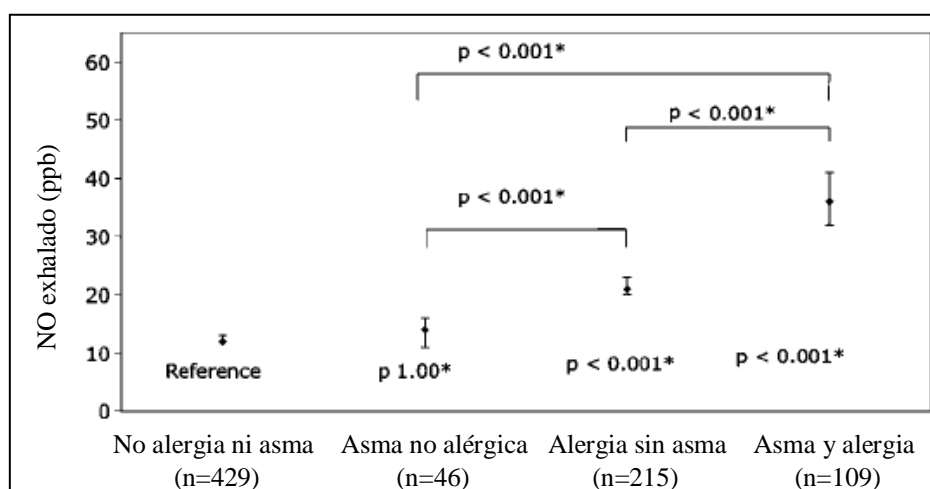


Figura 25. Concentración de ENO dependiente de sensibilización y expresión clínica (tomada de Scott et al¹¹⁴).

En pacientes con **rinitis** alérgica sin asma sensibilizados a pólenes Henriksen et al han observado que las concentraciones de ENO aumentan durante el periodo de exposición natural al alérgeno (figura 26)¹¹¹. Estos resultados han sido confirmados por otros autores posteriormente¹¹³.

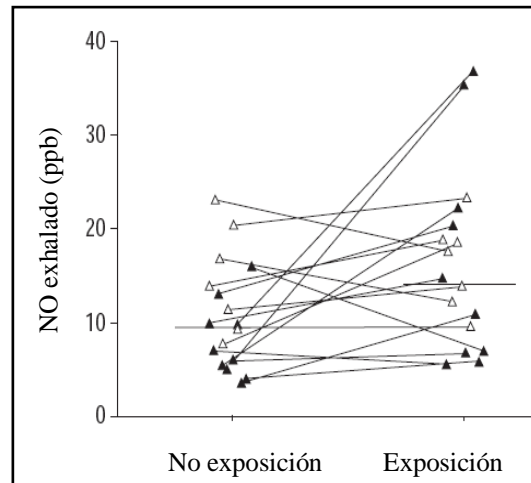


Figura 26. Modificaciones del ENO con la exposición alérgica en pacientes con rinitis alérgica (tomada de Henriksen et al¹¹¹)

Los resultados disponibles en la literatura sugieren que la atopia en sí misma podría ser suficiente para inducir elevación del ENO, incluso en pacientes que nunca han manifestado síntomas de asma bronquial y en aquellos asintomáticos^{105,127,128}, y que este marcador aumenta como consecuencia de la exposición al alérgeno al que el individuo está sensibilizado. Por tanto, aún se desconoce si la determinación del ENO podría ser indicadora exclusivamente de la presencia de atopia en el sujeto evaluado o también de la actividad inflamatoria clínica o subclínica derivada de dicha sensibilización.

Conceptos clave: Óxido nítrico

- ✓ La utilidad del ENO para la evaluación de patologías con afectación de la vía aérea, en particular del asma bronquial alérgica, no está definitivamente clara, pues los estudios publicados hasta la actualidad han obtenido resultados contradictorios.

- ✓ En consecuencia, la utilidad de la determinación del ENO como herramienta para el diagnóstico y tratamiento del asma parece quedar relegada a un mero complemento de los métodos tradicionales.

I. 3. Condensado del aire exhalado

I. 3. a. Generalidades:

Los pulmones tienen una gran superficie y aporte sanguíneo, lo que les convierte en susceptibles al daño tisular por los **fenómenos oxidativos** resultantes de la actividad de células inflamatorias, inmunes y estructurales. Se ha sugerido que la cuantificación de los marcadores de estrés oxidativo presentes en las vías respiratorias podría realizarse de forma sencilla mediante el estudio del condensado del aire exhalado (vapor de agua que satura el aire que sale del pulmón). Dichos marcadores pueden clasificarse de la siguiente manera^{129,130,131,132,133}:

- ✓ **Directos:** moléculas reactivas de oxígeno (peróxido de hidrógeno), especies derivadas de nitrógeno (NO y nitrotirosina), nitrosotioles, etcétera.

- ✓ **Indirectos:** marcadores de peroxidación lipídica o eicosanoides (leucotrienos, prostaglandinas y 8-isoprostano), variaciones en temperatura, flujo sanguíneo y pH, entre otros.

Cada uno de estos productos tiene unas condiciones óptimas de recogida y almacenamiento (unos son inestables a temperaturas altas, otros en estado gaseoso, etcétera) que es fundamental conocer para minimizar la variabilidad de los valores analizados de cada uno de ellos¹³⁴.

I. 3. b. **Recolección del condensado del aire exhalado:**

El condensado (vapor de agua) del aire exhalado puede recogerse utilizando un sistema condensador, en el que una fuente de frío permite que las partículas del fluido aéreo se condensen a modo de gotas en la pared del dispositivo. El aparato está preparado para que el sujeto realice respiraciones a volumen corriente a través de una válvula de doble paso y contra resistencia. Para obtener un volumen de condensado suficiente para su análisis se estiman necesarios entre 5 y 15 minutos. Generalmente el volumen recogido es de 1 ml.

Los sistemas más frecuentemente utilizados para la obtención de muestras de condensado del aire exhalado son^{129,130}:

- ✓ **EcoScreen**, un refrigerador eléctrico modificado y conectado a un aparato de producción de aire frío.

- ✓ Una variante portátil conocida como **RTube**.

Diferentes estudios han concluido que los resultados obtenidos en muestras de condensado obtenidas por cada uno de los dos sistemas anteriores no son equivalentes y que, en consecuencia, los resultados de los estudios realizados con uno u otro sistema pudieran ser al menos parcialmente divergentes^{135,136}.

I. 3. c. **pH del condensado del aire exhalado en individuos sanos:**

En el estudio del pH del condensado del aire exhalado (EBC), y tras deairear la muestra mediante gas Argon, se consideran **normales** valores de 8,0 con un rango de 7,8 a 8,1^{137,138}. El Argon es un gas inerte más pesado que el aire. Hunt propuso que la deaireación de la muestra con dicho gas permitiría eliminar el dióxido de carbono ambiental del volumen recolectado mediante una compensación de gradientes^{137,138}. De esta manera se puede estabilizar la muestra, lo que facilita la reproductibilidad de la determinación del pH de la misma¹³⁹.

Los valores de pH del EBC no parecen verse afectados por las **características antropométricas** de los sujetos evaluados (edad, peso, altura) ni por las maniobras de **broncoconstricción** ni **broncodilatación**, aunque se considera que otros factores pueden afectar a las determinaciones¹³⁷. El consumo de **alimentos** o **bebidas** horas antes de dicha exploración, el **tabaquismo** o la presencia de **infecciones** respiratorias activas son algunos de esos factores^{132,133,137}. Se han demostrado modificaciones variables en los niveles del pH en fumadores en comparación con individuos no fumadores^{140,141}. Algo similar se ha observado tras la administración de tratamiento antibiótico¹⁴².

Los problemas derivados de la **contaminación** ambiental o de la contaminación por productos presentes en las vías aéreas superiores parecen minimizarse utilizando los dispositivos adecuados para inducir una elevación del velo del paladar sin emplear pinza nasal^{132,133}.

Sin embargo existen resultados controvertidos en cuanto a la influencia que puede ejercer la **temperatura** ambiental sobre el pH del EBC. Mientras que algunos investigadores no han objetivado diferencias en sus valores debidas a la temperatura de recolección¹³⁹, Koczulla demostró un incremento del pH del EBC a medida que aumentaba la temperatura ambiental¹⁴³.

I. 3. c. 1. **Influencia de la contaminación salival sobre la determinación del pH del condensado del aire exhalado:**

Múltiples investigaciones han pretendido determinar la influencia de la contaminación salival sobre las determinaciones realizadas en las muestras del condensado del aire exhalado, puesto que la **saliva** es rica en proteínas, fósforo y alfa-amilasa entre otros elementos. Griese y sus colaboradores no pudieron detectar la presencia de fósforo ni alfa-amilasa en las muestras del condensado del aire exhalado, por lo que concluyeron que el condensado no se encontraba contaminado por dichos productos¹⁴⁴. Resultados similares han sido comunicados por Simpson et al¹⁴⁵. Estos autores encontraron que la contaminación salival de las muestras del condensado del aire exhalado era poco relevante.

Por otra parte, Wells et al han comparado las concentraciones de amonio y el pH de las muestras del condensado del aire exhalado obtenidas con diferentes técnicas (intubación orotraqueal, enjuague oral previo con antiséptico, liofilización-resuspensión del exhalado y cambios en la temperatura a la que se obtiene la muestra). Estos autores encontraron que cada una de las intervenciones analizadas tenía una influencia sobre las concentraciones de amonio, pero no sobre el pH de las muestras del condensado¹⁴⁶. Parece evidente por tanto que el amonio se encuentra presente predominantemente en la cavidad oral, pero sus modificaciones no parecen influir en la determinación del pH de las muestras del condensado.

A pesar de todas las experiencias referidas previamente, la contaminación salival se considera un importante factor de confusión a tener en cuenta, por lo que se recomienda precaución al interpretar los resultados de esta exploración¹³³.

I. 3. d. pH del condensado del aire exhalado en el diagnóstico de enfermedades de la vía aérea:

Aunque los primeros estudios acerca del pH de las muestras del condensado del aire exhalado se remontan al año 1980, los resultados de los mismos fueron publicados en revistas de escasa difusión¹⁴⁷, por lo que tuvieron poca repercusión. Sin embargo, durante los últimos años esta determinación ha cobrado vigencia como un método fácil y no invasivo para acceder al estudio de la inflamación bronquial en los pacientes con patología respiratoria. Diferentes investigaciones han constatado que los valores del pH de las muestras del condensado se modifican como consecuencia de variaciones en los componentes ácidos o básicos volátiles^{138,139,148}.

Han sido muchas las **enfermedades respiratorias** en las que se ha identificado una disminución de los valores del pH de las muestras del condensado. Entre estas se incluye la tuberculosis pulmonar activa (figura 27)¹⁴⁹, fibrosis quística¹⁴², enfermedad pulmonar obstructiva crónica^{150,151}, bronquiectasias sobreinfectadas¹⁵².

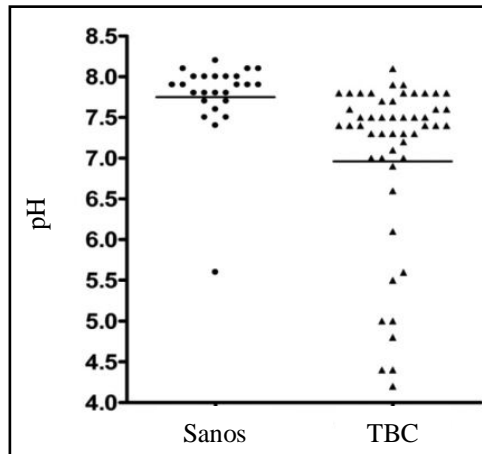


Figura 27. Valores del pH del condensado del aire exhalado en pacientes con tuberculosis e individuos sanos (tomada de Ngamtrakulpanit et al¹⁴⁹).

Abreviaturas: TBC: tuberculosis.

En pacientes con **asma bronquial**, Kostikas y colaboradores han encontrado valores más acidóticos del pH en los individuos con asma moderada que en los pacientes con asma leve. Por el contrario, los valores de este último grupo de asmáticos eran similares a los encontrados en los controles sanos (figura 28)¹⁵².

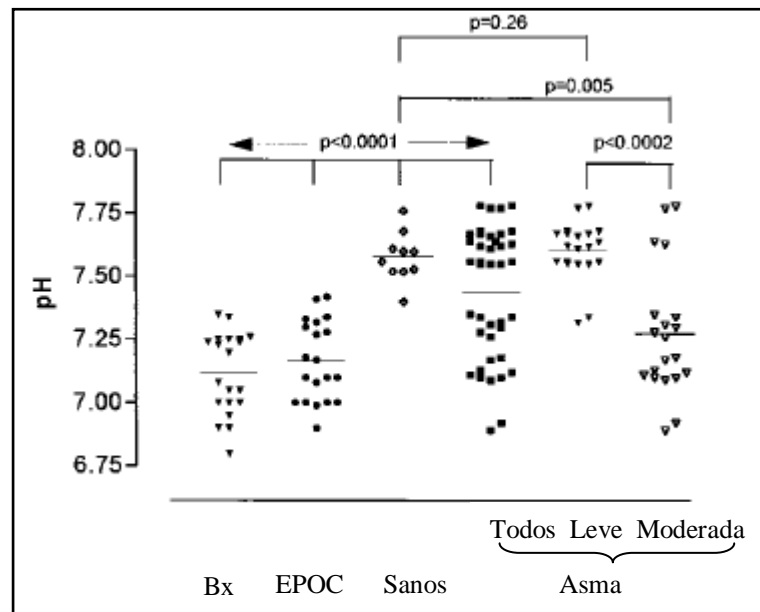


Figura 28. Valores del pH del condensado del aire exhalado en pacientes con bronquiectasias, EPOC y asma y en sujetos sanos (tomada de Kostikas et al¹⁵²).

Abreviaturas: Bx: bronquiectasias, EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Por otra parte, las investigaciones iniciales de Hunt et al¹⁴⁸ y las realizadas por otros autores^{153,154,155} han demostrado valores bajos del pH de las muestras del condensado durante las exacerbaciones del asma (figura 29), mientras que los mismos eran similares en los asmáticos estables y en los sujetos sanos.

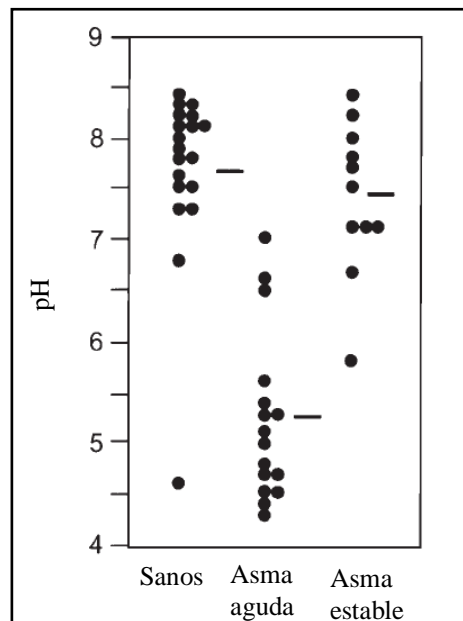


Figura 29. Valores del pH del condensado del aire exhalado en pacientes con asma aguda y asma estable y en sujetos sanos (tomada de Hunt et al¹⁴⁸).

Desgraciadamente, los resultados de los estudios publicados hasta la actualidad sugieren que la determinación de los valores del pH de las muestras del condensado carece de utilidad para establecer el diagnóstico de asma y que los valores del pH del condensado obtenidos de pacientes con asma no muestran relación con la actividad de la enfermedad^{154,155}.

Brunetti y colaboradores han comparado los valores del pH del EBC en niños con asma alérgica y en niños con rinitis alérgica sin manifestaciones de asma¹⁵⁶. Los resultados del estudio demostraron que los individuos no asmáticos con rinitis alérgica mostraban valores del pH del EBC intermedios entre los identificados en asmáticos y en los controles sanos.

Sin embargo, un estudio más reciente no ha conseguido demostrar diferencias en los valores del pH del EBC obtenidos en no fumadores con rinitis alérgica y controles sanos¹⁵⁷.

I. 3. d. 1. **Relación entre los marcadores de inflamación e hiperreactividad bronquial y el pH del condensado del aire exhalado:**

Los productos del estrés oxidativo y la acidificación del pH contribuyen a las **alteraciones inflamatorias** presentes en la vía aérea de los pacientes con asma. En particular, la disminución del pH produce un daño sobre el epitelio bronquial y una disminución de la motilidad ciliar. Estas alteraciones están involucradas en las manifestaciones clínicas de diferentes procesos patológicos y por ello se ha sugerido que la determinación del pH en las muestras del condensado pudiera tener utilidad para el diagnóstico y control evolutivo del asma¹⁵⁸.

La relación entre los valores del pH de las muestras de condensado y el grado de inflamación bronquial ha sido estudiada durante los últimos años. En pacientes con asma, Kostikas y colaboradores han encontrado una correlación significativa y negativa entre el pH de las muestras del condensado del aire exhalado y el número de eosinófilos en **esputo inducido**¹⁵². Por el contrario, Jackson et al no pudieron detectar correlación entre los biomarcadores en condensado y en muestras de **lavado broncoalveolar**¹⁵⁹.

En nuestro conocimiento no existen datos publicados acerca de la relación entre los marcadores de inflamación y el pH de las muestras del condensado del aire exhalado en pacientes no asmáticos con rinitis.

Las investigaciones disponibles en sujetos con asma bronquial no han objetivado relación estadística alguna entre los diferentes parámetros de la curva dosis-respuesta tras la **provocación bronquial** con metacolina o con AMP y los niveles de pH del condensado del aire exhalado^{44,154,160}.

En cuanto a la asociación entre los valores de **ENO** y de pH del condensado, se ha sugerido que el incremento de los nitritos endógenos en asmáticos es el responsable del incremento en los niveles de NO y de la disminución del pH de las vías aéreas. Ambas determinaciones se han considerado marcadores no invasivos de la actividad inflamatoria bronquial¹⁴⁸. A pesar de esto, los resultados de diferentes estudios han sido contradictorios. Algunos investigadores encontraron una correlación negativa significativa entre los niveles de ENO y el pH del condensado¹⁶¹, mientras que otros no han podido confirmarlo^{44,160,162}.

Por tanto, se podría concluir que las modificaciones del pH del condensado del aire exhalado obedecen, al menos en parte, a cambios en la intensidad del proceso inflamatorio bronquial, en los pacientes con asma. Sin embargo, la importancia clínica de esta determinación no está definitivamente establecida.

I. 3. d. 2. Efecto del tratamiento con corticosteroides sobre la determinación del pH del condensado del aire exhalado:

Múltiples investigaciones han demostrado que el efecto antiinflamatorio del tratamiento con **corticosteroides** en pacientes con asma bronquial genera modificaciones en el pH del condensado. Diferentes autores han constatado que los **asmáticos** tratados con corticoides presentan valores de pH más altos que los que no reciben dichos fármacos. Además, estos últimos pacientes experimentan normalizaciones de su pH tras un periodo de tratamiento con dichos fármacos (figura 30)^{148,152,161}. Los resultados de estos estudios sugieren que la determinación del pH de las muestras de condensado pudiera ser un método útil para la dosificación de los corticoides inhalados en el asma. Sin embargo, los resultados de estos estudios preliminares deben confirmarse en futuras investigaciones.

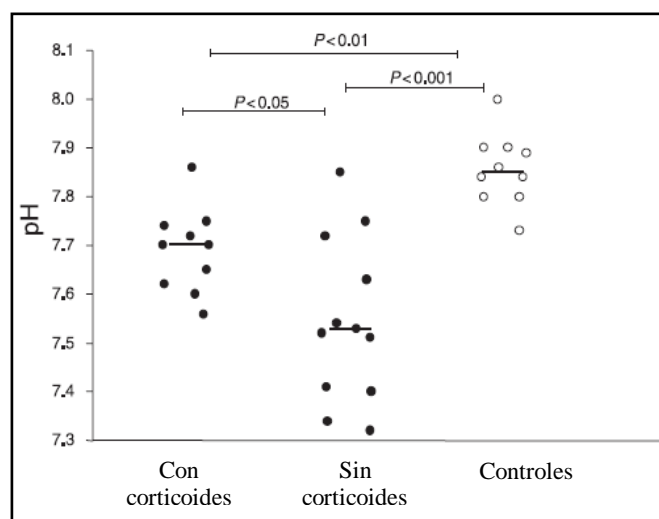


Figura 30. Influencia del tratamiento con corticoides sobre el pH del condensado del aire exhalado (tomada de Carraro et al¹⁶¹).

I. 3. d. 3. **Influencia de la sensibilización alérgica sobre los valores del pH del condensado del aire exhalado:**

La **exposición alérgica** produce modificaciones en los diferentes marcadores de inflamación bronquial, y se ha propuesto que estas modificaciones podrían ser monitorizadas mediante la evaluación de los productos del estrés oxidativo en el condensado del aire exhalado. Ono y sus colaboradores¹⁶³ estudiaron diversos componentes del condensado del aire exhalado en pacientes con asma alérgica y comprobaron que, tras la exposición alérgica, los niveles de leucotrienos y de prostaglandinas aumentaban. Sin embargo no se objetivaron cambios en los valores del pH del condensado del aire exhalado. Estos resultados han sido confirmados por otros investigadores¹⁶⁴.

En pacientes adultos con asma ocupacional, Ferrazzoni y sus colaboradores encontraron que la exposición a isocianatos se asociaba con incrementos del pH de las muestras de EBC¹⁶⁵. Evidentemente, estos resultados son absolutamente paradójicos.

Más recientemente Wan et al¹⁶⁶, investigaron las modificaciones del pH del condensado del aire exhalado en niños alérgicos a ácaros con rinitis aislada o asociada a asma, durante periodos de mayor y menor exposición a dichos alérgenos, circunstancia que se determinó mediante la cuantificación de endotoxinas de los ácaros del polvo doméstico en los domicilios de los pacientes. Objetivaron que durante el periodo de máxima exposición, los valores del pH del condensado del aire exhalado, en los pacientes con rinitis alérgica, disminuían mientras que se alcalinizaban en los periodos de menor exposición. Resultados semejantes se obtuvieron en aquellos individuos que presentaban asma asociada.

A la vista de la escasez de la información al respecto de los efectos de la exposición alérgica sobre el pH del condensado en los pacientes con asma y con rinitis alérgica, parecen necesarios estudios que aclaren ambos aspectos^{167,168}.

Conceptos clave: pH del EBC

- ✓ La interpretación del pH del condensado del aire exhalado es controvertida debido fundamentalmente a elementos técnicos como la falta de estandarización del factor de dilución de la muestra, condiciones óptimas de recogida y almacenamiento, y otros.

- ✓ Debido a esto, los resultados de la determinación del pH de las muestras del condensado del aire exhalado en el asma bronquial y en otras enfermedades respiratorias deben interpretarse con precaución y conjuntamente con los obtenidos mediante los métodos convencionales de control.

II. Hipótesis de trabajo

Los pacientes con asma polínica son un buen modelo para estudiar los efectos de la exposición alérgica sobre la hiperrespuesta bronquial y sobre los marcadores de inflamación bronquial, pues este grupo de pacientes pueden estudiarse durante periodos en los que están y no están expuestos a los alérgenos sensibilizantes. Utilizando este modelo, estudios previos de nuestro grupo han constatado que, tanto en asmáticos⁶⁷ como en pacientes con rinitis alérgica sin asma⁷⁰, la exposición natural al alérgeno se asocia con un incremento de la sensibilidad y de la respuesta máxima a metacolina. Utilizando este mismo modelo, otros estudios han demostrado también incrementos de las concentraciones de ENO durante el periodo de exposición alérgica, tanto en pacientes con asma¹²⁶ como en individuos con rinitis alérgica⁶⁸. Finalmente ha podido constatar que, en este mismo modelo, la exposición natural al alérgeno se asocia con reducciones significativas de la PC₂₀ AMP^{68,126} y del pH del condensado del aire exhalado^{164,166}. Sin embargo, los efectos de la exposición alérgica sobre el grado máximo de broncoconstricción (*plateau*) inducido por AMP y sobre el atrapamiento aéreo inducido por metacolina y AMP no se han estudiado hasta la actualidad. El estudio de estos aspectos puede ser relevante para comprender los mecanismos mediante los que los alérgenos inhalados inducen las modificaciones fisiopatológicas, inflamatorias y estructurales en las vías aéreas de los pacientes sensibilizados a los mismos.

Para el diseño del presente estudio, nuestra **hipótesis de trabajo** ha sido que, en los pacientes sensibilizados al polen, la exposición natural al alérgeno debe asociarse con incrementos del nivel de *plateau* en respuesta a la inhalación de AMP, así como con un incremento de la concentración de ENO y con una acidificación del pH del condensado del aire exhalado. Además, estos incrementos del nivel del *plateau* en respuesta a AMP deberían ser más intensos que los observados con metacolina.

III. Objetivos del estudio

De acuerdo con la hipótesis anterior, el presente estudio se diseñó con el **objetivo principal** de identificar el efecto de la exposición natural al alérgeno sobre la respuesta máxima (*plateau*) a AMP en pacientes con alergia al polen.

Los **objetivos secundarios** fueron:

- Determinar los efectos de la exposición natural al alérgeno sobre la respuesta máxima a metacolina.
- Comparar la intensidad y determinar la relación entre los efectos de la exposición alérgica sobre la PC_{20} y meseta de la respuesta máxima para AMP y para metacolina.
- Comparar la intensidad y determinar la relación entre los efectos de la exposición alérgica sobre el grado de atrapamiento aéreo inducido por AMP y por metacolina.
- Determinar el efecto de la exposición alérgica sobre la CA_{NO} y $J'aw_{NO}$, así como sobre el pH del EBC e identificar la relación entre las modificaciones de estos parámetros.
- Identificar la relación entre las modificaciones de la hiperrespuesta bronquial a cada uno de los agonistas y los cambios en la CA_{NO} , $J'aw_{NO}$ y pH del EBC.
- Comparar el grado de hiperrespuesta bronquial, las concentraciones de óxido nítrico (CA_{NO} y $J'aw_{NO}$) y el pH del EBC entre pacientes con alergia al polen (durante y fuera del periodo de exposición) e individuos sanos.

IV. Pacientes y Métodos

IV.1. Selección de pacientes

Los pacientes fueron **seleccionados** de entre aquellos que acudieron a la Consulta Externa de Alergología del Hospital Universitario Doctor Peset, siendo **incluidos** individuos mayores de 18 años, de ambos sexos y con diagnóstico de rinoconjuntivitis asociada o no a asma bronquial intermitente. Algunos participantes estaban sensibilizados exclusivamente a pólenes relevantes en nuestro medio (olivo, gramíneas y/o parietaria); mientras que otros presentaban sensibilización concomitante a otros alérgenos. Estos individuos sensibilizados también a alérgenos diferentes de los pólenes presentaban síntomas únicamente durante la estación polínica. Todos los pacientes seleccionados presentaban un FEV₁ basal igual o mayor del 70% del valor teórico y una relación FEV₁/FVC mayor del 60% cuando fueron seleccionados.

Fueron **excluidos** los pacientes sometidos a cirugía mayor las 4 semanas previas a la primera visita o a las sucesivas, las mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, y aquellos sujetos incapaces de realizar correctamente los procedimientos de la investigación. Los sujetos incapaces de realizar maniobras de FVC correctas se mantuvieron en el estudio, pero en ellos no se evaluó la capacidad de los broncoconstrictores para producir atrapamiento aéreo. Se excluyeron también los pacientes fumadores activos y aquellos sometidos a tratamiento con corticosteroides sistémicos. En los individuos que habían presentado infecciones respiratorias, la exploración con cada uno de los broncoconstrictores se retrasó un mínimo de 4 semanas. Asimismo no se incluyeron en el estudio los sujetos con otra enfermedad activa y clínicamente significativa (cardiovascular, neurológica, gastrointestinal, psiquiátrica, etcétera) y los que estaban recibiendo tratamiento con β -bloqueantes.

Como grupo **control** fueron estudiados voluntarios mayores de 18 años, no fumadores y sin manifestaciones clínicas de rinoconjuntivitis, asma bronquial, eccema atópico u otros procesos morbosos relevantes.

IV. 2. Diseño del estudio

El presente estudio se realizó entre los meses de enero y junio del año 2009. La estación polínica se identificó a partir de los datos del recuento atmosférico de granos de polen en el aire de Valencia¹⁶⁹. Como puede observarse en la figura 31, los recuentos de granos de polen de gramíneas y de *Olea europea* estuvieron elevados entre los meses de mayo y junio, mientras que los granos de polen de *Urticaceas* (*Parietaria judaica*) estuvieron altos desde los días finales de marzo hasta el comienzo de julio. Estos datos nos fueron facilitados por la Regiduría de Sanidad (sección de Programas de Salud) del Ayuntamiento de Valencia.

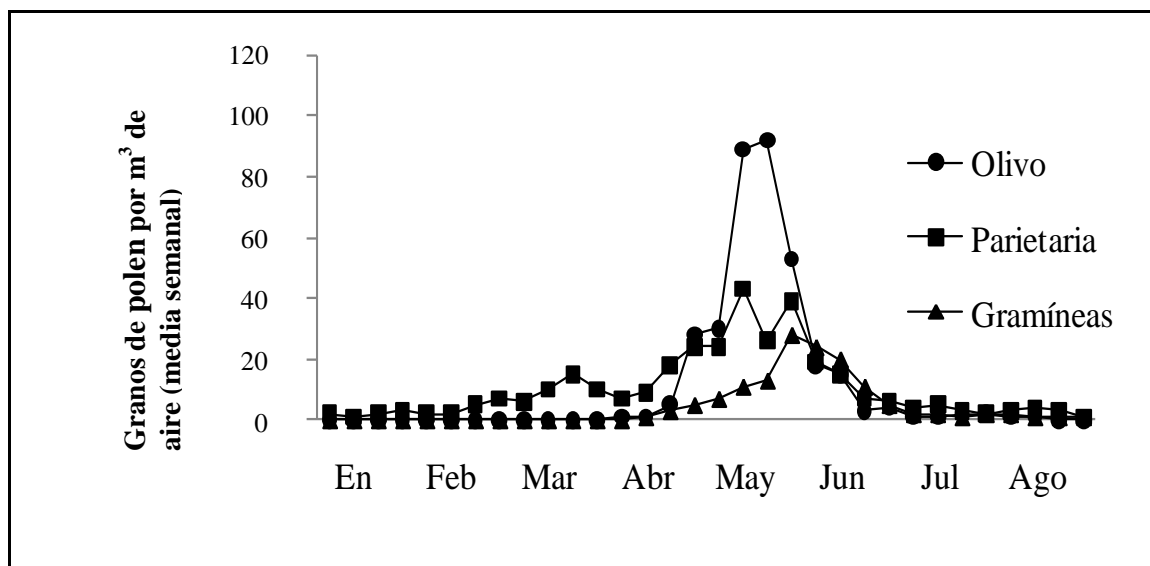


Figura 31. Recuento de granos de polen durante el periodo del estudio.

Los individuos con alergia al polen fueron estudiados en dos ocasiones distintas (figura 32):

- ✓ Durante un periodo de ausencia de exposición al polen (periodo **preestacional**) entre los meses de enero y febrero.
- ✓ Durante un periodo de exposición natural al polen (periodo **estacional**) entre los meses de abril a junio.

Los individuos sanos se estudiaron en un único periodo.

Se realizaron pruebas cutáneas con los alérgenos inhalantes más relevantes en nuestro medio (en caso de no haberse realizado en los 24 meses previos), determinación de las concentraciones de NO alveolar y bronquial, espirometría, determinación del pH del condensado del aire exhalado y prueba de provocación bronquial con concentraciones altas de metacolina y de AMP. La exploración con cada uno de los agonistas broncoconstrictores se realizó en dos días diferentes y aleatorizadamente.

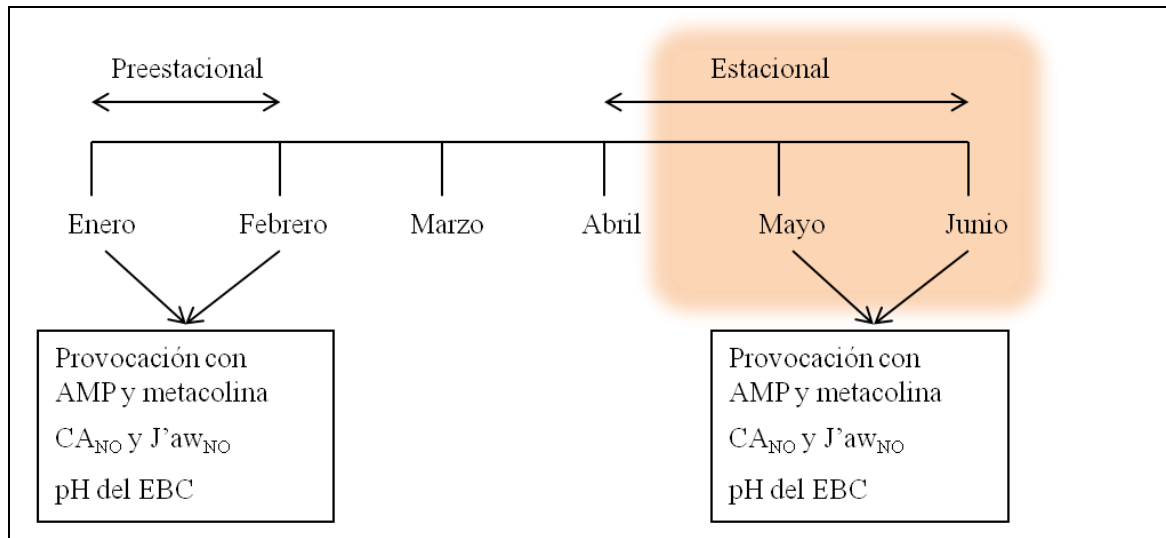


Figura 32. Representación del diseño del estudio.

Se retiraron los antihistamínicos orales y tópicos nasales desde 3 días y 1 día antes de cada visita respectivamente. Los esteroides nasales e inhalados se suspendieron 2 semanas antes de cada visita, mientras que los β -adrenérgicos de acción corta y larga se retiraron desde al menos 6 horas y 24 horas antes de cada visita del estudio.

IV. 3. Aspectos éticos

La parte experimental de la presente tesis se llevó a cabo cumpliendo con las Normas de Buena Práctica Clínica y con los principios éticos que tienen su origen en la declaración de Helsinki.

Los pacientes fueron informados acerca de los objetivos del estudio, así como de las características de las exploraciones y de los posibles riesgos e inconvenientes asociados con las mismas. Todos ellos otorgaron su consentimiento para participar en el estudio.

IV. 4. Métodos

IV. 4. a. Pruebas cutáneas:

La presencia de atopia se determinó mediante la realización de **pruebas cutáneas** en prick con alérgenos comerciales adquiridos a ALK-Abello (Horsholm, Dinamarca) o a BIAL-Aristegui (Bilbao, España). Los **extractos alérgénicos** empleados fueron los habituales en el área de Valencia. Incluían D.pteronysinus, D.farinae, epitelio de perro y gato, polen de platanus orientalis, ciprés arizónica, olea europea, mezcla de gramíneas, cynodon, phragmites, chenopodium álbum, salsola kali, parietaria judaica, artemisia vulgaris, plantago lanceolata, profilina, y esporas de alternaria alternata, aspergillus, cladosporium herbarum y penicilium. El clorhidrato de histamina se utilizó como control positivo, y como control negativo suero salino.

El **personal** responsable de la realización de las pruebas en prick colocaba los extractos alérgénicos sobre la piel de la superficie volar de los antebrazos, correctamente identificados y separados entre sí al menos por 2 cm, para posteriormente introducir cada extracto en la epidermis del paciente mediante la punción con lancetas (Prick Lancet, Stallergenes; Antony, Francia), utilizando tantas lancetas como alérgenos. La lectura se realizó al cabo de 15 a 20 minutos y se consideraron positivas las pruebas que generaban una pápula de diámetro ≥ 3 mm.

IV. 4. b. **Pruebas de función respiratoria:**

La espirometría se realizó utilizando un **neumotacómetro** (Jaeger MasterScope; Erich Jaeger, GmbH; Würzburg, Alemania), que cumplía con los requerimientos técnicos y de linealidad recomendados por la *American Thoracic Society*^{170,171}. El equipo se calibró diariamente y el resultado de la calibración se almacenó en soporte electrónico. Se utilizó pinza nasal.

Inicialmente se verificó que el paciente era capaz de realizar **maniobras** técnicamente correctas¹⁷² y repetibles (variaciones del FEV₁ y de la FVC $\leq 5\%$ y ≤ 100 ml entre las tres mejores). Para el análisis se eligió aquella maniobra que mostraba una mayor suma FEV₁ + FVC. Como valores de referencia se utilizaron los de la Comunidad Europea del Carbón y del Acero (CECA)¹⁷³.

Durante la exploración se hizo énfasis en la necesidad de realizar maniobras de FVC correctas, manteniendo un esfuerzo espiratorio de al menos 6 segundos. Los pacientes incapaces de realizar maniobras de FVC correctas no se incluyeron en el análisis de la capacidad del broncoconstrictor para generar atrapamiento, pero se mantuvieron en el estudio analizándose las restantes determinaciones realizadas.

IV. 4. c. Provocación bronquial con agonistas broncoconstrictores:

IV. 4. c. 1. Provocación bronquial con metacolina:

La exploración se realizó de acuerdo con el método dosimétrico descrito por Chai et al²⁹, con algunas modificaciones. Tanto la solución salina como las diferentes concentraciones de **metacolina** (Sigma-Aldrich Corp; St. Louis, MO, USA) se generaron mediante un **nebulizador Mefar** calibrado (tabla 3), activado por un **dosímetro MEFAR MB3** (Mefar; Brescia, Italia) (fotografía 1). Las características técnicas del dosímetro se modificaron para conseguir una presión de activación de 2 bar, un tiempo de activación de 1 segundo y un tiempo de pausa de 6 segundos. En estas condiciones y con 1 ml de cada concentración en el depósito, el nebulizador muestra un débito de $10 \mu\text{l} \pm 10\%$ tras cada activación de un segundo.



Fotografía 1. Dosímetro MEFAR MB3, nebulizador Mefar y broncoconstrictor a concentraciones dobles.

Tabla 3. Protocolo para la calibración del nebulizador.

1. Se pesa el nebulizador con 1 ml de agua destilada en la cámara de nebulización (peso 1).
2. Se conecta el nebulizador al dosímetro y se realizan 10 inhalaciones.
3. Se pesa de nuevo el nebulizador (peso 2).
4. Se repiten los pasos 1 a 3 (peso 3).
5. Se calcula el volumen liberado en cada inhalación:
 $(\text{Peso 1} - \text{Peso 2}) / 10 = \text{ml/inhalación}$
 $(\text{Peso 2} - \text{Peso 3}) / 10 = \text{ml/inhalación}$
6. Y se obtiene la media de los dos débitos anteriores.

Antes de iniciar la exploración y utilizando suero salino, se procedió al adiestramiento del paciente hasta conseguir que fuese capaz de realizar las **maniobras** de inhalación correctamente. En primer lugar, el paciente realizaba una espiración hasta capacidad residual funcional y, tras adaptar la boca a la boquilla del nebulizador, realizaba una inspiración lenta y profunda hasta capacidad inspiratoria. A continuación, se retiraba el nebulizador de la boca y respiraba aire ambiental normalmente. Este periodo de adiestramiento se utilizó también para ajustar la sensibilidad del termistor del dosímetro, con el fin de que se disparase al inicio de la inspiración. Durante el periodo 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 100 mg/ml (tabla 4). Después de la inhalación de salino y de cada concentración de metacolina se realizaba una única espirometría, a no ser que la maniobra se considerase técnicamente incorrecta o que el paciente sufriese tos durante los dos primeros segundos de la espiración. De esta manera se palió el efecto de las maniobras inspiratorias profundas repetidas sobre el FEV_1 ¹⁷⁴.

La exploración se suspendía tras administrar la concentración de 100 mg/ml o cuando se detectaron deterioros del $FEV_1 \geq 40\%$ tras alguna concentración. En este momento se administraban 200 mcg de salbutamol (Ventolin®) por vía inhalada y se

confirmaba que el FEV₁ había revertido a valores $\geq 90\%$ del basal al cabo de 15 a 20 minutos.

La cronología de la prueba de provocación bronquial se detalla en la figura 33.

Tabla 4. Preparación de las concentraciones de metacolina.

1. Se preparan 10 tubos de laboratorio y se rotulan como: S (suero fisiológico), 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 mg/ml.
2. El vial original de metacolina se diluye a 100 mg/ml y se depositan 2 ml de esta dilución en el vial rotulado como 100 mg/ml.
3. En el resto de los tubos se coloca 1 ml de suero fisiológico.
4. Se realizan diluciones progresivas $\frac{1}{2}$ a partir de la concentración de 100 mg/ml trasladando 1 ml de cada vial al de la concentración inmediatamente inferior.
5. Queda 1 ml restante en el tubo de 0,39 mg/ml que se desecha.

*Las concentraciones se preparan el mismo día en que se realiza la prueba.

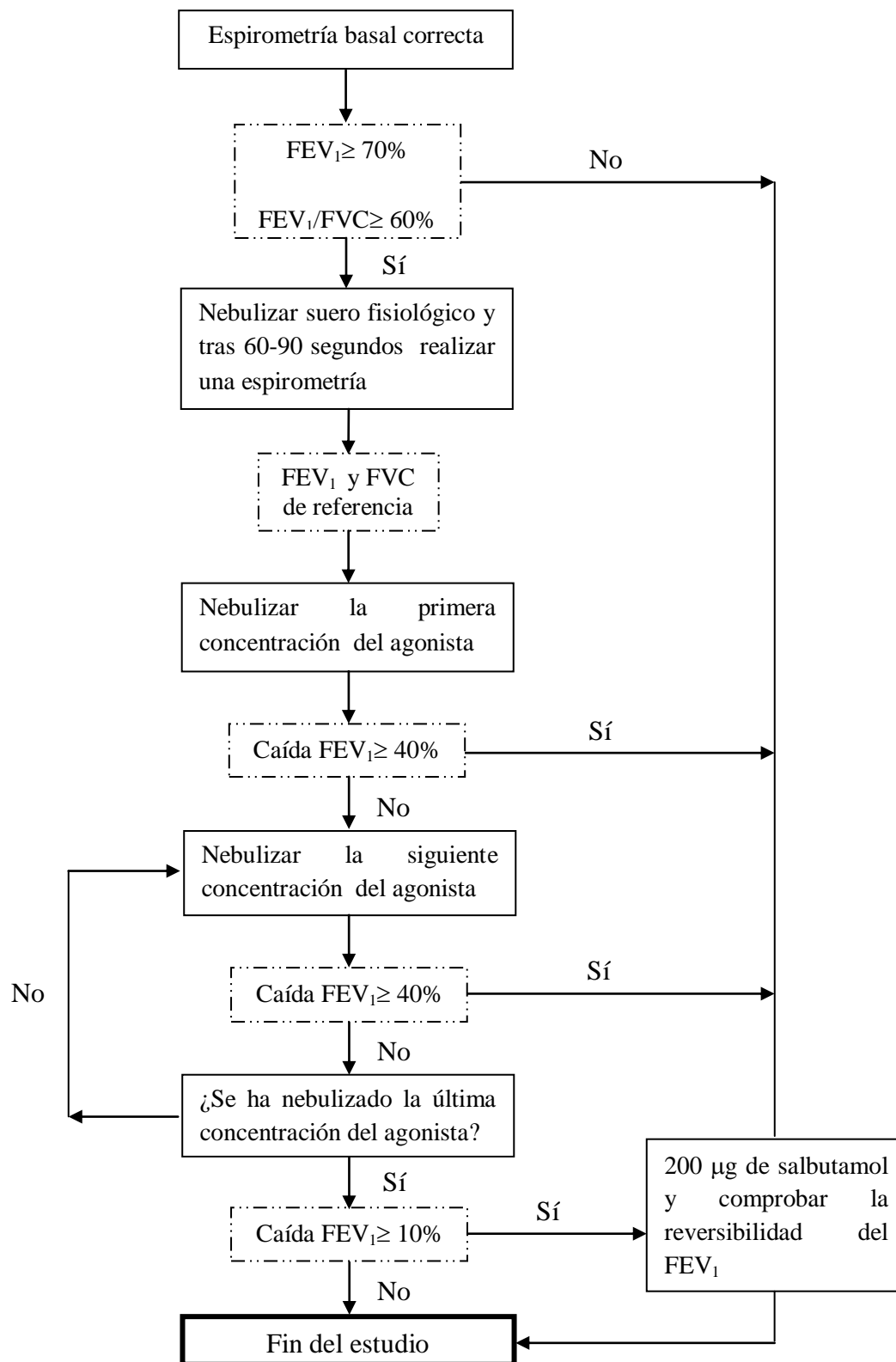


Figura 33. Secuencia de provocación bronquial con agonistas broncoconstrictores (modificada de la referencia 16).

IV. 4. c. 2. **Provocación bronquial con adenosina 5'-monofosfato:**

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 mediante un **nebulizador Mefar** calibrado (tabla 3), activado por un **dosímetro MEFAR MB3** (Mefar, Brescia, Italia). Las condiciones técnicas de activación del dosímetro se modificaron de manera idéntica a la detallada para metacolina. De esta manera, se consiguió que el nebulizador calibrado mostrase un débito de $10 \mu\text{l} \pm 10\%$ tras cada activación de un segundo.

Antes de iniciar la exploración y utilizando suero salino, se adiestró al paciente hasta que fue capaz de realizar correctamente las **maniobras** de inhalación, de manera idéntica a la detallada para metacolina.

Una vez completada la inhalación de salino, los pacientes realizaaban 5 inhalaciones de cada concentración doble de AMP entre 6,25 y 1600 mg/ml (tabla 5). Como en el caso de metacolina tras inhalar salino y cada dosis de AMP se realizaba una única espirometría, a no ser que la misma se considerase técnicamente incorrecta.

Se suspendía la exploración tras administrar la concentración de 1600 mg/ml o cuando se detectaron deterioros del $\text{FEV}_1 \geq 40\%$ con respecto al valor postsalino tras alguna de las concentraciones. En este momento, se administraban 200 mcg de salbutamol (Ventolin®) por vía inhalada y se confirmaba que el FEV_1 había revertido a valores $\geq 90\%$ del basal al cabo de 15 a 20 minutos.

La secuencia de la prueba de provocación bronquial con AMP se detalla en la figura 33.

Tabla 5. Preparación de las concentraciones de AMP.

1. Se preparan 9 tubos de laboratorio y se rotulan como: S (suero fisiológico), 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 y 800** mg/ml.
2. El vial original de AMP tiene 1600 mg y se diluye añadiendo 2 ml de suero fisiológico con lo que se obtienen 800 mg/ml. Se depositan 2 ml de esta dilución en el vial rotulado como 800 mg/ml, interponiendo un filtro millipore de 0,22 μ , para asegurar la esterilidad de la materia prima.
3. En el resto de los tubos se coloca 1 ml de suero fisiológico.
4. Se realizan diluciones progresivas $\frac{1}{2}$ a partir de la concentración de 800 mg/ml trasladando 1 ml de cada vial al de la concentración inmediatamente inferior.
5. El ml retirado del tubo de 6,25 mg/ml es desechado.

*Las concentraciones se preparan el mismo día que se realiza la prueba.

**La concentración de 1600 mg/ml se administra mediante 10 inhalaciones de la dilución de 800 mg/ml.

IV. 4. c. 3. **Expresión de la respuesta:**

La respuesta a metacolina y a AMP se caracterizó mediante los siguientes parámetros:

- ✓ **Sensibilidad bronquial:** este parámetro viene expresado por la PC_{20} (concentración de agonista necesaria para inducir un deterioro del FEV_1 del 20%). Se calculó mediante interpolación logarítmica, utilizando la fórmula¹⁷⁵:

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

Donde:

- C_1 = Concentración de agonista que induce una caída del FEV_1 inmediatamente inferior al 20%.
 - C_2 = Concentración de agonista que induce una caída del FEV_1 inmediatamente superior al 20%.
 - R_1 = Porcentaje de caída del FEV_1 observado tras la concentración C_1 .
 - R_2 = Porcentaje de caída del FEV_1 observado tras la concentración C_2 .
- ✓ **Respuesta máxima o *plateau*:** se consideró que las curvas concentración-respuesta obtenidas con cada agonista presentaban *plateau* cuando los deterioros del FEV_1 inducidos por al menos 3 de las concentraciones más altas del agonista se encontraban en un rango del 5%. El grado de obstrucción al que se detectaba respuesta máxima (nivel de *plateau*) se calculó mediante la media aritmética del porcentaje de caída del FEV_1 en los puntos que integran el mismo¹⁷⁶.
 - ✓ **Grado de atrapamiento aéreo:** este parámetro se identificó mediante el cálculo de la pendiente de la regresión entre los deterioros del FEV_1 y los de la FVC (figura 2) mediante el método de mínimos cuadrados¹⁷⁷.

IV. 4. d. Óxido nítrico exhalado:

La determinación de ENO se realizó mediante un trazador de **quimioluminiscencia** (NiOX, Aerocrine; Solna, Sweden) (fotografía 2), utilizando el método de registro *on-line* y siguiendo las recomendaciones de la *American Thoracic Society*^{74,86,87}. El sistema proporciona un cierto grado de resistencia a la espiración con el fin de que el paciente eleve el velo del paladar, lo que evita la contaminación del aire exhalado por NO procedente de la vía aérea superior, donde las concentraciones son mucho más altas.



Fotografía 2. Trazador de quimioluminiscencia NiOx.

La **maniobra** se iniciaba con una exhalación hasta volumen residual fuera del sistema. A continuación el sujeto inhalaba desde el equipo aire libre de NO hasta capacidad pulmonar total, con lo que se conseguía un lavado de NO de vías aéreas proximales y distales, de manera que el NO detectado en el aire exhalado era exclusivamente el procedente de la difusión del mismo desde los alveolos o pared bronquial hacia la luz. A continuación y sin periodo de apnea, el paciente realizaba una exhalación a un flujo constante, para lo que se ayudaba de un *feedback* visual.

En primer lugar se realizaron al menos 3 determinaciones técnicamente correctas y aceptables a un flujo de 50 ml/s. La fracción de óxido nítrico exhalado (FE_{NO}) se calculó mediante la media de estas tres determinaciones.

Para la **compartimentalización** del NO se utilizó el método de Tsoukias y George⁷⁴. Se obtuvieron al menos dos determinaciones técnicamente correctas y repetibles a tres diferentes flujos (100, 200 y 300 ml/s). A partir de estas determinaciones se calculó el débito de NO en pl/s a cada uno de los tres flujos de muestreo. Mediante la representación en un eje de ordenadas del débito de ENO *versus* el flujo de muestreo se obtuvo una recta de regresión, procediéndose al análisis de la misma mediante el método de mínimos cuadrados. La pendiente de esta recta identifica el CA_{NO}, mientras que la intercepción en el eje Y define el J^{aw}_{NO} (figura 15). Los valores de CA_{NO} se corrigieron para tener en cuenta la morfología en trompeta y la difusión axial de acuerdo con el método propuesto por Condorelli et al⁸¹, para nuestros flujos de muestreo:

$$CA_{NO} \text{ corregido} = CA_{NO} - (J^{aw}_{NO} / 860)$$

La corrección para los valores de J^{aw}_{NO} se realizó multiplicando los valores iniciales por 1,7⁸¹.

Las determinaciones de NO se realizaron antes de la espirometría y de las pruebas de provocación con broncoconstrictores^{86,87}.

IV. 4. e. Condensado del aire exhalado:

Las muestras del condensado del aire exhalado se obtuvieron mediante el sistema **R-Tube** (Respiratory Research, Inc; Charlottesville, Virginia, USA) (fotografía 3). El enfriamiento del aire exhalado se conseguía mediante un cilindro de aluminio que se había mantenido durante al menos 1 hora en un congelador a una temperatura de -20°C .



Fotografía 3. Dispositivo R-Tube para la recolección de condensado del aire exhalado, microdetector de pH y pH-metro.

Los pacientes **respiraban** normalmente dentro del sistema sin oclusión nasal y durante un periodo de 10 minutos. Se explicó a los pacientes la posibilidad de interrumpir el procedimiento para eliminar la saliva acumulada en la boca o para toser. Mediante este método se obtiene un volumen de condensado de aproximadamente 1 ml.

El **pH** del condensado del aire exhalado se determinó utilizando una alícuota del mismo de 0,2 ml, tras deaireación con argón durante 8 minutos. El pH se midió utilizando un pHmetro calibrado que incorpora un sensor con compensación de temperatura (modelo pH-900) con un microelectrodo (Metrohm, AG; Herisau, Switzerland). El sistema muestra una precisión de 0,01.

La muestra del condensado del aire exhalado para determinación de pH se obtuvo antes de la espirometría y de las pruebas de provocación bronquial con broncoconstrictores¹³⁷.

IV. 5. Análisis estadístico

La **variable principal** del estudio fue la modificación del nivel del *plateau* con AMP durante el periodo de exposición alérgica, comparado con la situación durante el periodo de ausencia de exposición alérgica.

Las **variables secundarias** incluían la función pulmonar (FEV₁ y FVC) registrada en cada visita, la PC₂₀ y pendiente de la relación entre FEV₁ y FVC, el nivel del *plateau* con metacolina, el NO en aire exhalado (FE_{NO}, CA_{NO}, J'aw_{NO}) y el pH del condensado del aire exhalado.

Cuando se diseñó el presente estudio, no existían datos en la literatura al respecto de la variabilidad del nivel del *plateau* en respuesta a AMP. Por este motivo, el **tamaño de muestra** se calculó teniendo en cuenta la variabilidad del nivel de *plateau* para metacolina obtenida en estudios previos^{20,42,70}. No obstante, la idoneidad del cálculo del tamaño de muestra se confirmó cuando dispusimos de los resultados del primer estudio en el que se identificó *plateau* con AMP⁴⁴. Aceptando como relevantes cambios en el nivel del *plateau* obtenido con AMP del 7% e incluyendo 21 pacientes analizables, el estudio tiene un poder del 90% con un error α del 5%.

Algunas variables numéricas como la PC₂₀ metacolina, PC₂₀ AMP y FE_{NO} no mostraron distribución normal y fueron transformadas logarítmicamente antes de proceder al análisis. En consecuencia, los valores de estas variables se expresaron como media geométrica e intervalo de confianza del 95% (95% CI). Todas las restantes variables numéricas seguían distribución normal y se expresaron como media aritmética y 95% CI. Los cambios en la PC₂₀ se expresaron como concentraciones dobles, que se calcularon mediante el cociente entre el incremento en el logaritmo de la PC₂₀ y el logaritmo de 2.

Las diferencias en variables numéricas entre los dos grupos de sujetos estudiados (pacientes con alergia al polen e individuos sanos) se analizaron mediante la prueba t de *Student* para muestras independientes. Las modificaciones de las mismas durante el periodo de exposición al polen respecto al periodo preestacional, en los pacientes con

alergia al polen, se analizaron mediante la prueba t de *Student* para observaciones pareadas.

Las variables categóricas se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher.

Las correlaciones entre las diferentes variables numéricas se expresaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La comparación de los valores del FEV₁ y de la FVC en litros antes de la exploración con cada agonista, en cada uno de los dos periodos de estudio, se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) para determinaciones repetidas.

La presencia de **respuesta máxima plateau en respuesta a AMP** pudo identificarse en 29 pacientes polínicos durante el periodo preestacional, en 27 pacientes durante el periodo estacional y en los 11 sujetos sanos. Sin embargo, no se consiguió inducir deterioros significativos ($\geq 5\%$) del FEV₁ en 13 pacientes preestacionalmente, en 9 durante la estación y en 9 controles sanos. En estos individuos, el nivel de *plateau* se estableció en un 5%. Un total de 2 pacientes polínicos durante el periodo preestacional y 4 durante el periodo estacional experimentaron caídas del FEV₁ $\geq 40\%$ sin que pudiese identificarse respuesta máxima. En esta situación, el nivel de *plateau* se hizo equivalente al máximo deterioro del FEV₁ tras la concentración más alta administrada del agonista.

Por otra parte, fue posible identificar con precisión **plateau en las curvas concentración-respuesta obtenidas con metacolina** de 26 polínicos durante el periodo preestacional, de 21 durante el periodo estacional y de 10 individuos sanos, si bien en 3 preestacionalmente, 1 estacionalmente y 3 controles sanos no se observaron deterioros del FEV₁ $\geq 5\%$ durante la exploración. En estos casos, el nivel del *plateau* se fijó en un 5%. Además en un total de 5 pacientes polínicos preestacionalmente, 9 estacionalmente y 1 sujeto sano, se observaron deterioros del FEV₁ $\geq 40\%$ sin evidencia de respuesta máxima. En estos casos, el nivel de *plateau* se hizo equivalente al deterioro del FEV₁ observado tras la concentración más alta del agonista.

En 22 polínicos durante el periodo preestacional, 15 durante el estacional y 10 individuos sanos no se observaron **deterioros del FEV₁ $\geq 20\%$** tras la administración de

alguna de las dosis de **AMP**. Esto ocurrió también en 13 polínicos preestacionalmente, 11 durante la estación y 7 sujetos sanos tras la administración de alguna de las dosis de **metacolina**. En estas situaciones, el valor de la PC_{20} AMP y PC_{20} metacolina se asignó a 1600 mg/ml y 100 mg/ml, respectivamente (valores censurados).

No pudo identificarse una relación lineal entre el débito de NO y los tres flujos de muestreo (100, 200 y 300 ml/s) en 3 polínicos durante el periodo preestacional y 2 durante el estacional. En consecuencia, la CA_{NO} y J'_{awNO} se compararon en 28 pacientes polínicos preestacionalmente, 29 estacionalmente y 11 sujetos sanos. Además, se identificaron valores negativos para la CA_{NO} en 6 polínicos preestacionalmente, 8 estacionalmente y 1 individuo sano. Estos valores se sustituyeron por cero.

Finalmente, un total de 25 pacientes con alergia al polen y 10 sujetos sanos fueron capaces de realizar maniobras de FVC correctas y repetibles. Las diferencias en el grado de **atrapamiento** inducido por los broncoconstrictores y las modificaciones del mismo como consecuencia de la exposición alérgica se analizaron solamente en estos individuos.

V. Resultados

V. 1. Descripción de la muestra

Inicialmente se incluyeron en el estudio 36 **pacientes** con alergia al polen y 11 individuos **sanos**. No obstante, 5 pacientes alérgicos al polen fueron eliminados del estudio debido a retirada del consentimiento informado (2 pacientes), síntomas asmáticos y naso-oculares intensos durante el periodo estacional que obligaron a iniciar tratamiento con esteroides inhalados y tópicos nasales (1 paciente), síntomas durante el periodo preestacional probablemente achacables a la coexistencia de sensibilización a ácaros del polvo doméstico que hasta aquel momento carecía de relevancia clínica (1 paciente) o incapacidad para realizar maniobras espirométricas técnicamente correctas (1 paciente). En consecuencia, se incluyeron en el análisis 31 pacientes con alergia al polen y 11 controles sanos.

Las características basales de las dos poblaciones estudiadas se detallan en la tabla 6. Como puede observarse, los pacientes con alergia al polen presentaban una edad y un índice de masa corporal significativamente más altos que los controles sanos. No se observaron diferencias entre las dos poblaciones en lo que se refiere a otras variables como el género o la función pulmonar basal.

Tabla 6. Características antropométricas, clínicas y funcionales de los participantes.

	Pacientes	Controles sanos	p
Número de sujetos	31	11	---
Género (Masculino/Femenino), n	13/18	5/6	0,99
Edad (años)	48 (44-52)	31 (22-40)	0,0002
Índice de Masa Corporal (kg/m²)	26,7 (25,3-28,2)	23,4 (21,2-25,7)	0,017
Duración de síntomas (años)	15 (11-18)	---	---
Manifestaciones clínicas:			
✓ Rinitis aislada, n	20	---	---
✓ Rinitis y asma, n	11	---	---
FEV₁ basal (% del teórico)	107,1 (101,4-112,7)	108,0 (99,4-116,5)	0,86
FVC basal (% del teórico)	120,9(116,3-125,6)	114,0 (101,4-126,8)	0,28

Datos presentados como media aritmética (95%CI), excepto cuando se indica.

V. 2. Modificación de los parámetros durante la estación polínica y comparación con los controles sanos

V. 2. a. Valores de función pulmonar antes de la exploración con cada agonista:

La capacidad de metacolina (y probablemente también la de AMP) para inducir broncoconstricción se ve decisivamente influenciada por la función pulmonar basal. Por tanto, parecía conveniente constatar que la exploración con cada uno de los broncoconstrictores se había realizado partiendo de una situación funcional basal similar. En la tabla 7 se detallan los valores basales de **FEV₁** y **FVC** antes de la exploración con cada agonista en los pacientes polínicos. Los valores de FEV₁ y FVC antes de cada prueba de provocación bronquial y en ambos periodos de estudio no fueron significativamente diferentes ($p=0,07$).

Tabla 7. Función pulmonar previa a la exploración con agonistas en polínicos.

	No exposición		Exposición	
	Metacolina	AMP	Metacolina	AMP
FEV₁ (L)	3,09 (2,75-3,42)	3,07 (2,74-3,40)	3,04 (2,71-3,37)	2,99 (2,66-3,31)
FVC (L)	4,15 (3,76-4,55)	4,17 (3,79-4,54)	4,10 (3,70-4,49)	4,15 (3,75-4,54)

Valores expresados como media aritmética (95% IC).

En la tabla 8 se indican los valores de FEV₁ y FVC antes de la exploración con metacolina y con AMP en los individuos sanos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de estos parámetros (p=0,19 para el FEV₁ y p=0,41 para el FVC).

Tabla 8. Función pulmonar previa a la exploración con cada agonista en individuos sanos.

	Metacolina	AMP
FEV₁ (L)	3,79 (3,14-4,45)	3,84 (3,17-4,52)
FVC (L)	4,73 (3,94-5,52)	4,77 (3,91-5,63)

Valores expresados como media aritmética (95% IC).

V. 2. b. Respuesta a la provocación bronquial con metacolina:

El grado de deterioro del FEV₁ al que se detectaba respuesta máxima (**nivel del *plateau***) aumentaba significativamente durante la estación polínica, comparado con el identificado antes de la estación ($p < 0,0001$, tabla 9, figura 34). El grado de deterioro del FEV₁ al que se detectaba *plateau* en los pacientes con alergia al polen durante el periodo estacional era significativamente más alto que el observado en individuos sanos ($p = 0,02$, tabla 9, figura 35). Sin embargo, las diferencias en el nivel del *plateau* entre los valores preestacionales de los pacientes polínicos y los controles sanos no alcanzaban la significación estadística ($p = 0,09$, tabla 9, figura 35)

Los valores de **PC₂₀** metacolina de los pacientes con alergia al polen disminuían significativamente durante la estación polínica, comparado con los identificados antes de la misma ($p = 0,008$, tabla 9, figura 36). Además, los valores de PC₂₀ metacolina obtenidos en los pacientes polínicos eran menores que los identificados en sujetos sanos (tabla 9, figura 37), tanto en la exploración realizada durante la estación polínica ($p < 0,0001$) como fuera de la misma ($p = 0,001$).

El grado de atrapamiento aéreo (**pendiente de la regresión de FVC frente a FEV₁**) inducido por metacolina, en los pacientes con alergia al polen ($n = 25$), no se modificaba significativamente como consecuencia de la exposición alérgica ($p = 0,89$, tabla 9, figura 38). No obstante, el grado de atrapamiento aéreo inducido por el broncoconstrictor era significativamente mayor en los pacientes con alergia al polen que en los controles sanos ($n = 10$), tanto en lo que se refiere a determinaciones realizadas fuera de la estación ($p = 0,001$) como a las obtenidas durante la estación polínica ($p = 0,0004$, tabla 9, figura 39).

Tabla 9. Estimación de nivel de *plateau*, PC₂₀ y pendiente de FVC frente a FEV₁ para metacolina en los pacientes alérgicos a polen y controles sanos.

	Pacientes		Controles sanos
	No exposición	Exposición	
Nivel de <i>plateau</i> (%) *	22,8 (17,9-27,7)	28,7 (22,7-34,7)	15,1 (7,6-22,6)
PC₂₀ (mg/ml)**	23,0 (12,5-42,2)	13,9 (6,9-27,9)	72,9 (53,0-100,0)
Pendiente FVC vs FEV₁*	1,00 (0,84-1,16)	0,98 (0,85-1,12)	0,52 (0,29-0,75)

Datos presentados como * media aritmética (95% CI) y ** media geométrica (95% CI).

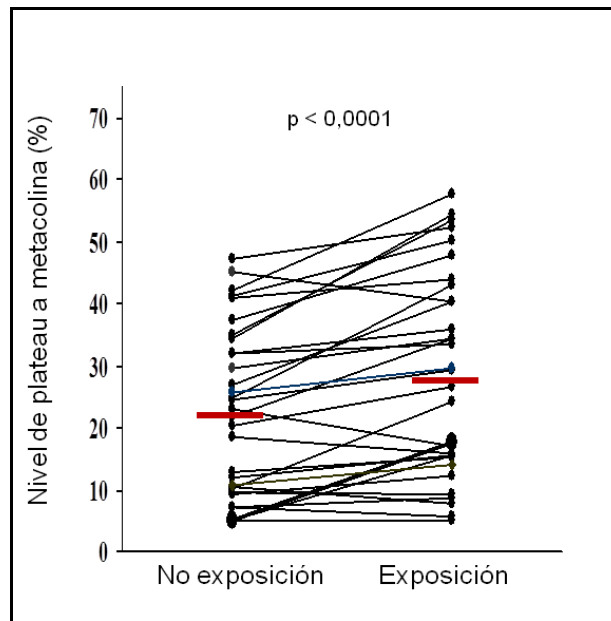


Figura 34. Caída del FEV₁ a la que se observaba respuesta máxima (nivel de *plateau*) a metacolina en pacientes sensibilizados a polen durante ambos periodos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

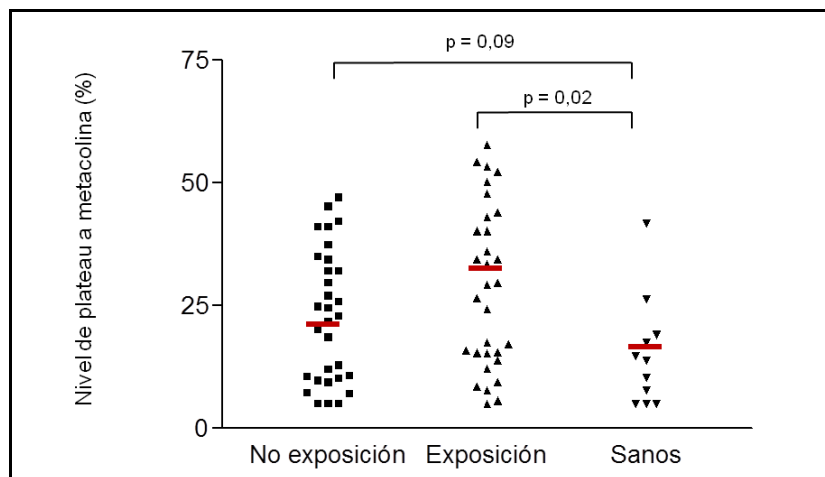


Figura 35. Caída del FEV₁ a la que se observaba respuesta máxima (nivel de *plateau*) a metacolina en pacientes polínicos y sujetos sanos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

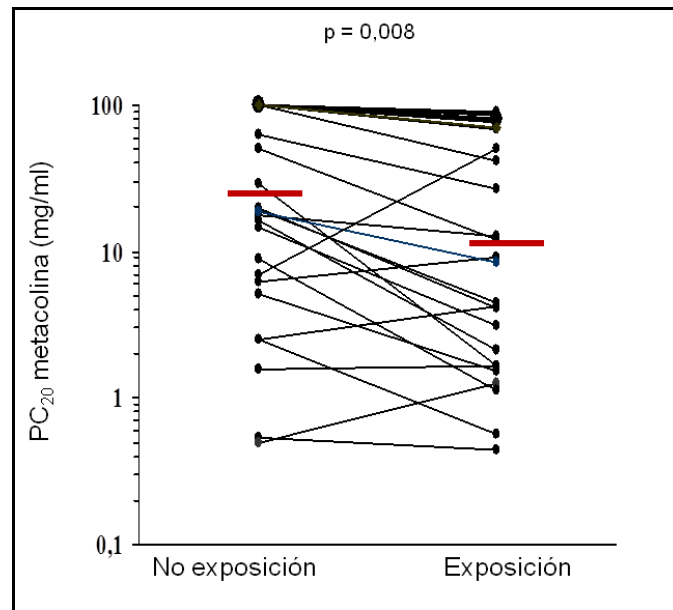


Figura 36. Valores individuales y media geométrica (líneas horizontales) de la PC₂₀ metacolina fuera del periodo de exposición y durante el periodo de exposición al polen.

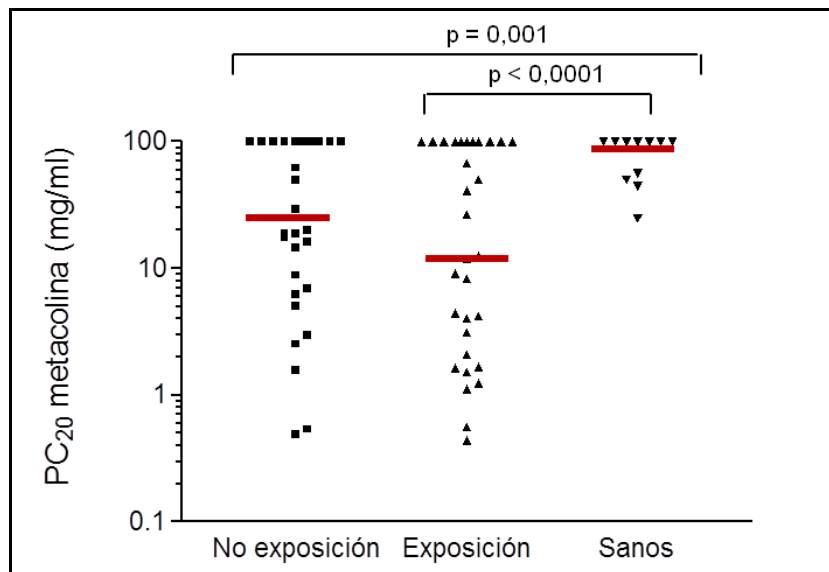


Figura 37. Valores individuales y media geométrica (líneas horizontales) de la PC₂₀ metacolina en los pacientes polínicos y en los controles sanos.

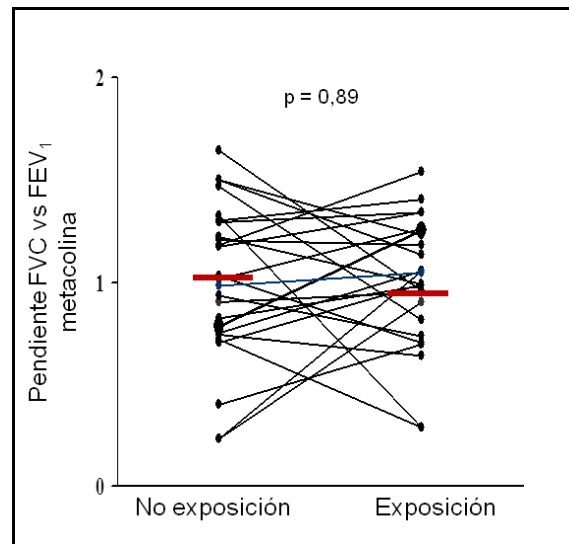


Figura 38. Pendiente de la regresión entre FVC y FEV₁ de metacolina en los pacientes polínicos en periodo de exposición y de ausencia de exposición al polen. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

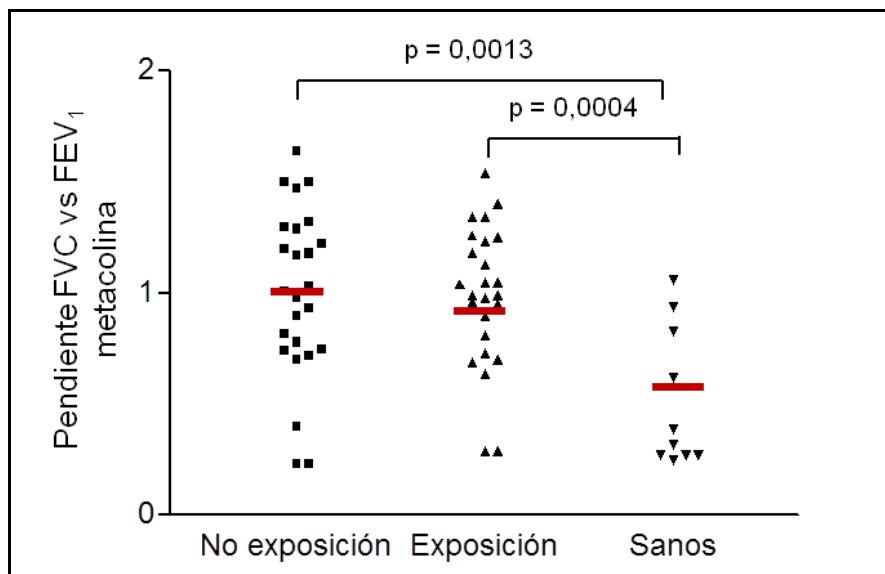


Figura 39. Pendiente de la regresión entre FVC y FEV₁ de metacolina en los pacientes polínicos y en los individuos sanos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

Únicamente con fines exploratorios, hemos comparado los efectos de la exposición alérgica sobre la respuesta a metacolina en los 20 individuos con rinoconjuntivitis aislada y en los 11 que presentaban rinoconjuntivitis asociada a asma. En ambos grupos de pacientes, se observaron incrementos significativos del **nivel de *plateau*** para metacolina durante la estación polínica ($p=0,002$ en asmáticos y $p=0,01$ en rinoconjuntivitis, tabla 10, figura 40). No obstante, los cambios en ambos grupos no fueron significativamente distintos; la media (95% CI) de las diferencias entre el cambio en el nivel de *plateau* en los asmáticos y el cambio en los pacientes con rinoconjuntivitis aislada era de 3,9% (-1,4 a 9,2, $p=0,14$).

En el grupo de pacientes con rinoconjuntivitis asociada a asma, los valores de **PC₂₀** metacolina se reducían significativamente durante la estación polínica ($p=0,03$, tabla 10, figura 41). Algo similar se observaba en los pacientes con rinoconjuntivitis aislada, aunque, en este grupo, las diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p=0,11$). No obstante, los cambios en ambos grupos no fueron significativamente distintos; la media (95% CI) de las diferencias entre el cambio de la PC₂₀ en asmáticos y el cambio en los pacientes con rinoconjuntivitis aislada era de -0.59 concentraciones dobles (-1,69 a 0,5, $p=0,28$).

Por el contrario el grado de atrapamiento aéreo, expresado mediante la **pendiente de la regresión entre los valores de la FVC y del FEV₁**, no se modificó significativamente durante el periodo de exposición al polen, ni en los pacientes con asma ($n=10$, $p=0,99$) ni en los individuos con rinoconjuntivitis aislada ($n=15$, $p=0,46$, tabla 10, figura 42). Los cambios en ambos grupos no fueron significativamente diferentes; la media (95% CI) de las diferencias entre el cambio en asmáticos y en los pacientes con rinoconjuntivitis aislada era de -0,10 (-0,48 a 0,28, $p=0,59$).

Tabla 10. Respuesta a metacolina en pacientes con rinoconjuntivitis asociada a asma y en individuos con rinoconjuntivitis sola durante el periodo de exposición y en ausencia de exposición al polen.

	Asma		Rinitis	
	No Exposición	Exposición	No exposición	Exposición
Nivel de plateau (%) *	31,8 (24,1-39,4)	40,2 (31,9-48,4)	17,9 (12,3-23,5)	22,4 (15,3-29,5)
PC₂₀ (mg/ml)**	6,9 (2,0-24,0)	3,2 (1,0-9,9)	44,6 (26,9-74,1)	31,3 (15,5-62,9)
Pendiente FVC vs FEV₁ *	1,16 (0,99-1,33)	1,16 (1,02-1,30)	0,77 (0,54-1,00)	0,87 (0,70-1,03)

Datos presentados como * media aritmética (95% CI) y ** media geométrica (95% CI).

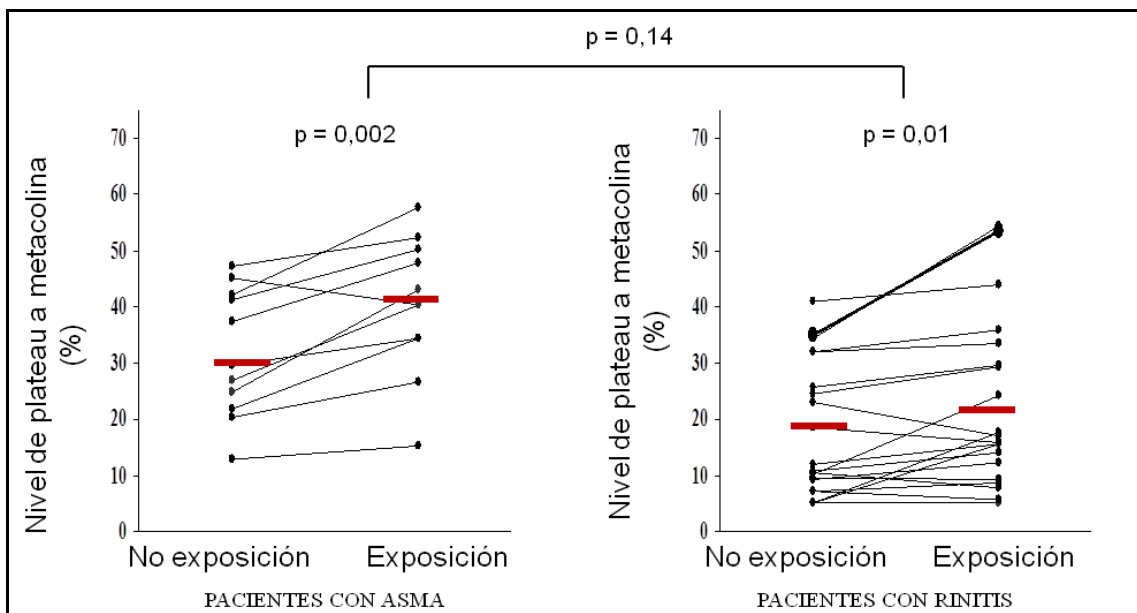


Figura 40. Cambios en el nivel de *plateau* con metacolina en los pacientes polínicos con asma y en aquellos con rinitis alérgica aislada. La línea horizontal representa la media aritmética.

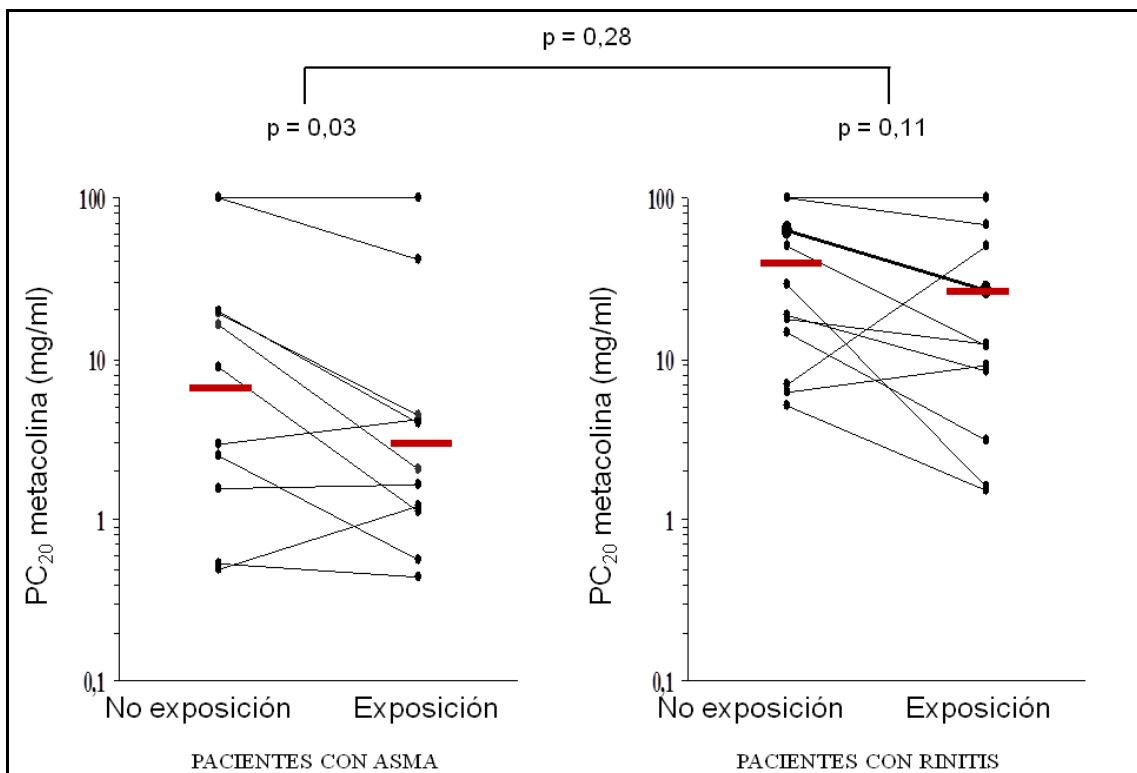


Figura 41. Cambios en la PC₂₀ metacolina durante el periodo de exposición al polen en los pacientes con asma y en aquellos con rinoconjuntivitis aislada. La línea horizontal representa la media geométrica.

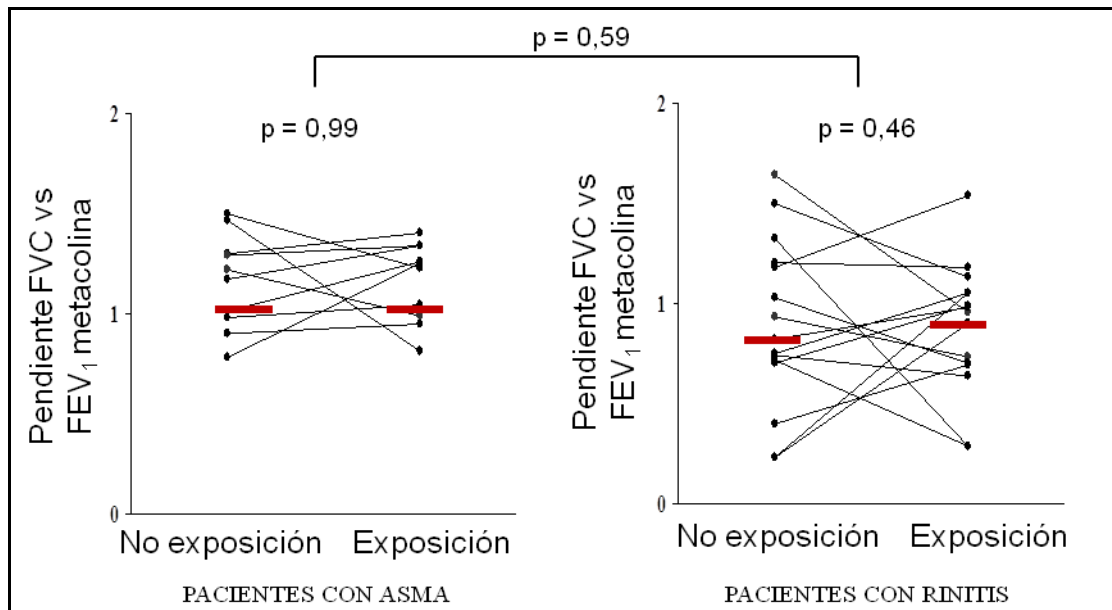


Figura 42. Grado de atrapamiento aéreo inducido por metacolina, expresado mediante la pendiente de la regresión entre los valores de la FVC y del FEV₁ en los pacientes con asma y en los individuos con rinoconjuntivitis aislada. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

V. 2. c. **Respuesta a la provocación bronquial con adenosina 5'-monofosfato:**

El porcentaje de deterioro del FEV₁ que fue necesario inducir para detectar respuesta máxima (**nivel del *plateau***) aumentaba significativamente durante la estación polínica, comparado con el identificado antes de la estación ($p=0,0006$, tabla 11, figura 43). Además, el grado de deterioro del FEV₁ al que se detectaba *plateau* en los pacientes con alergia al polen durante ambos periodos del estudio era significativamente mayor que el identificado en los controles sanos ($p<0,0001$ para el periodo de exposición y $p=0,01$ para el periodo de ausencia de exposición, tabla 11, figura 44).

Los valores de PC₂₀ AMP de los pacientes con alergia al polen disminuían significativamente durante la estación polínica, comparado con los observados antes de la misma ($p=0,002$, tabla 11, figura 45). Además, los valores de PC₂₀ AMP obtenidos en los pacientes polínicos eran menores que los identificados en sujetos sanos (tabla 11, figura 46), tanto en la exploración realizada durante la estación polínica ($p<0,0001$) como fuera de la misma ($p=0,01$).

El grado de atrapamiento aéreo (**pendiente de la regresión de FVC frente a FEV₁**) inducido por AMP, en los pacientes con alergia a polen ($n=25$), no se modificaba significativamente como consecuencia de la exposición alérgica ($p=0,74$, tabla 11, figura 47). No obstante, el grado de atrapamiento aéreo inducido por el broncoconstrictor era significativamente mayor en los pacientes con alergia al polen que en los controles sanos ($n=10$), tanto en lo que se refiere a las determinaciones realizadas fuera de la estación ($p=0,047$) como a las obtenidas durante la estación polínica ($p=0,03$) (tabla 11, figura 48).

Tabla 11. Estimación de nivel de *plateau*, PC₂₀ y pendiente de FVC frente a FEV₁ para AMP en los pacientes alérgicos al polen y los controles sanos.

	Pacientes		Controles sanos
	No exposición	Exposición	
Nivel de <i>plateau</i> (%)*	15,2 (10,1-20,3)	22,9 (16,9-28,9)	7,4 (3,7-11,1)
PC₂₀ (mg/ml)**	769,1 (472,1-1253,1)	298,5 (147,6-602,6)	1479,1 (1241,7-1762,0)
Pendiente FVC vs FEV₁ *	0,75 (0,59-0,92)	0,72 (0,59-0,85)	0,44 (0,15-0,72)

Valores expresados como * media aritmética (95% CI) y como ** media geométrica (95%CI).

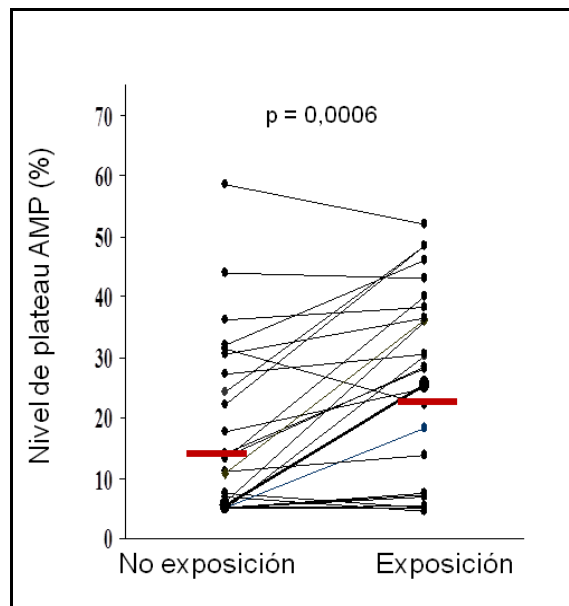


Figura 43. Caída del FEV₁ para identificar respuesta máxima a AMP en los pacientes polínicos durante ambos periodos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

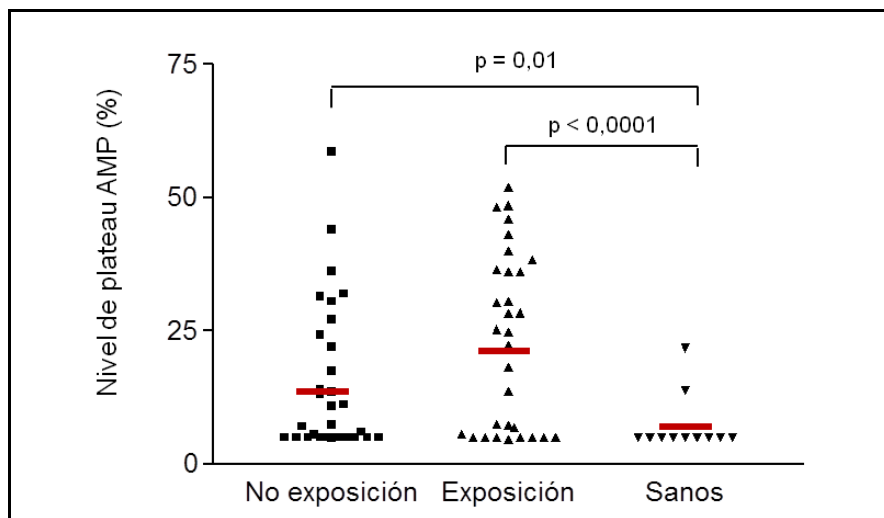


Figura 44. Caída del FEV₁ para identificar *plateau* en los pacientes polínicos y en los controles sanos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

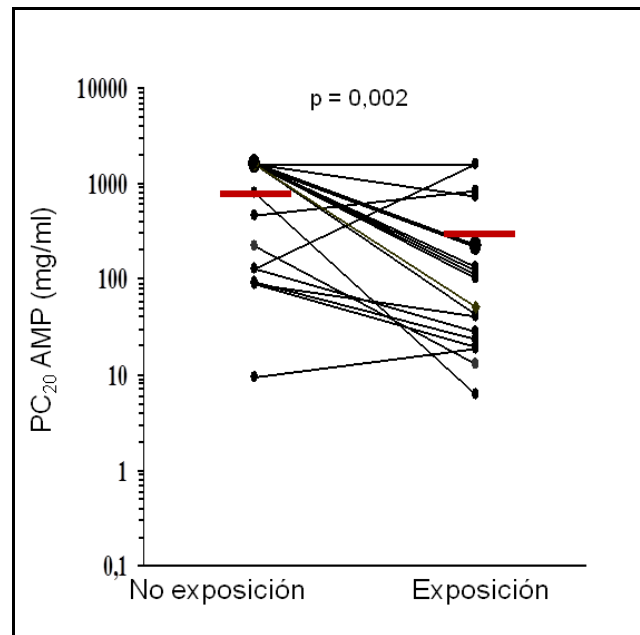


Figura 45. Valores individuales y media geométrica (líneas horizontales) de la PC_{20} AMP fuera del periodo de exposición y durante el periodo de exposición al polen.

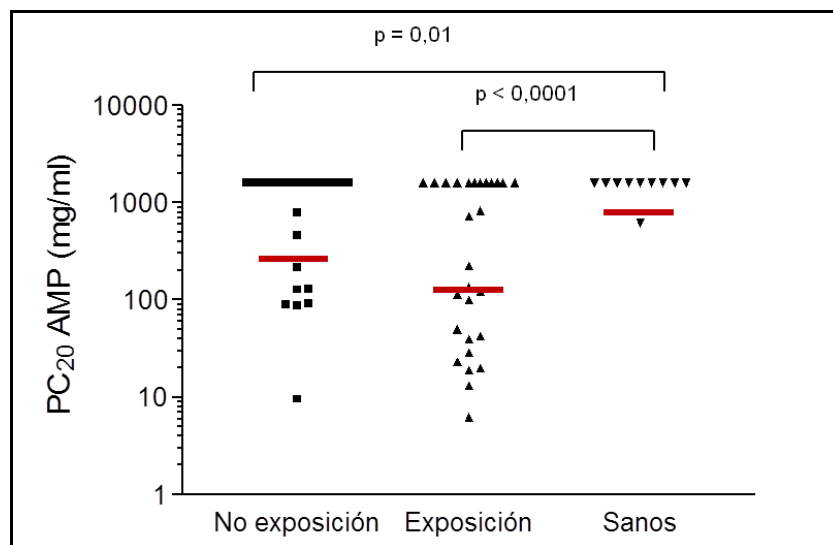


Figura 46. Valores individuales y media geométrica (líneas horizontales) de la PC_{20} AMP en los pacientes polínicos y en los controles sanos.

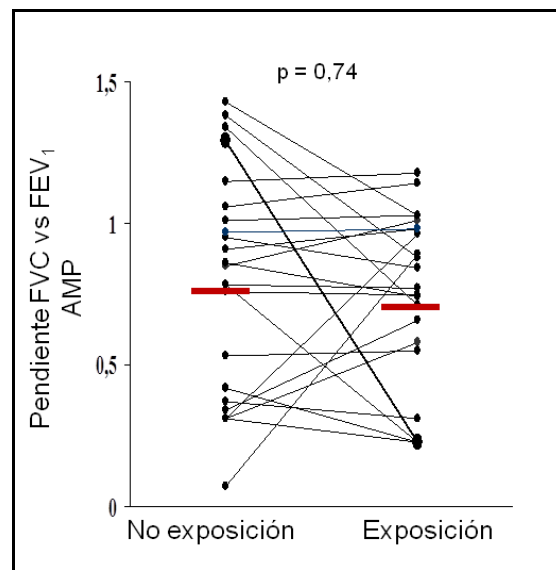


Figura 47. Pendiente de la regresión entre FVC y FEV₁ AMP en los pacientes polínicos en el periodo de exposición y de ausencia de exposición al polen. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

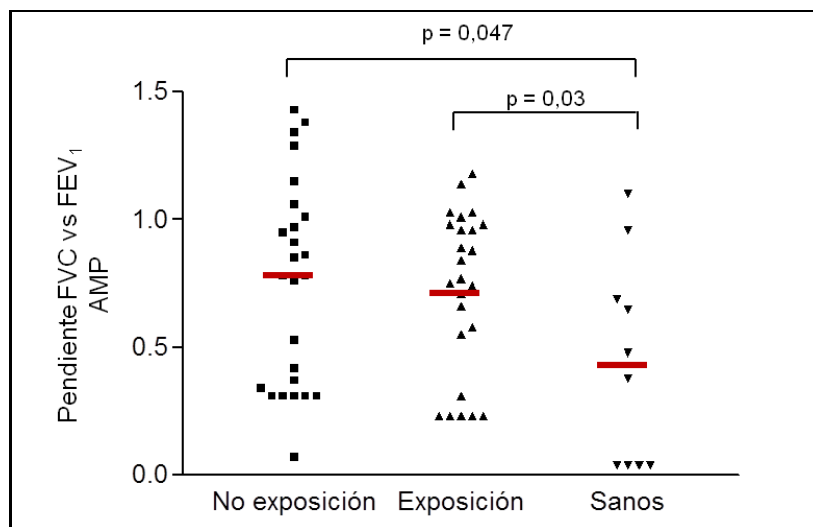


Figura 48. Pendiente de la regresión entre FVC y FEV₁ AMP en los pacientes polínicos y en los individuos sanos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

Con fines exclusivamente exploratorios, como en el caso de la respuesta a metacolina, hemos comparado los efectos de la exposición alérgica sobre la respuesta a AMP en los 20 individuos que presentaban rinoconjuntivitis aislada y en los 11 que presentaban rinoconjuntivitis asociada a asma. En ambos grupos de pacientes, se observaron incrementos significativos del **nivel de *plateau*** para AMP durante la estación polínica ($p=0,01$ en asmáticos y $p=0,02$ en pacientes con rinoconjuntivitis, tabla 12, figura 49). No obstante, los cambios en ambos grupos no fueron significativamente distintos; la media (95% CI) de las diferencias entre el cambio en el nivel del plateau en los asmáticos y el cambio en los pacientes con rinoconjuntivitis aislada era de 7,5% (-2,5 a 17,4, $p=0,12$).

En el grupo de pacientes con rinoconjuntivitis asociada a asma, los valores de **PC₂₀ AMP** se reducían significativamente durante la estación polínica ($p=0,006$, tabla 12, figura 50). Algo similar se observaba en los pacientes con rinoconjuntivitis aislada, pero las diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p=0,12$). Además, los cambios de la PC₂₀ AMP en el grupo con asma fueron significativamente mayores que los observados en el grupo con rinoconjuntivitis aislada; la media (95% CI) de las diferencias entre el cambio de la PC₂₀ en asmáticos y el cambio en los pacientes con rinoconjuntivitis sin asma era de -1,87 (-3,57 a -0,23, $p=0,03$).

Por el contrario, el grado de atrapamiento aéreo inducido por AMP, expresado mediante la **pendiente de la regresión entre los valores de la FVC y del FEV₁**, no se modificaron significativamente durante el periodo de exposición al polen ni en los pacientes con asma ($n=10$, $p=0,71$), ni en los individuos con rinoconjuntivitis aislada ($n=15$, $p=0,80$, tabla 12, figura 51). Los cambios en ambos grupos no fueron significativamente diferentes; la media (95% CI) de las diferencias entre el cambio en asmáticos y en los pacientes con rinoconjuntivitis sin asma era de 0,09 (-0,31 a 0,49, $p=0,63$).

Tabla 12. Respuesta a AMP en pacientes con rinoconjuntivitis asociada a asma y en individuos con rinoconjuntivitis sin asma durante el periodo de exposición y en ausencia de exposición al polen.

	Asma		Rinitis	
	No exposición	Exposición	No exposición	Exposición
Nivel de plateau (%) *	21,2 (9,5-32,9)	33,8 (23,2-44,4)	11,9 (6,9-16,9)	17,0 (10,6-23,4)
PC₂₀ (mg/ml)**	479,7 (151,4-1524,1)	80,9 (21,7-301,3)	995,4 (618,0-1600,0)	610,9 (302,0-1235,4)
Pendiente FVC vs FEV₁ *	0,80 (0,49-1,12)	0,86 (0,67-1,05)	0,64 (0,44-0,84)	0,61 (0,44-0,77)

Los datos se presentan como * media aritmética (95% CI) y como **media geométrica (95% CI).

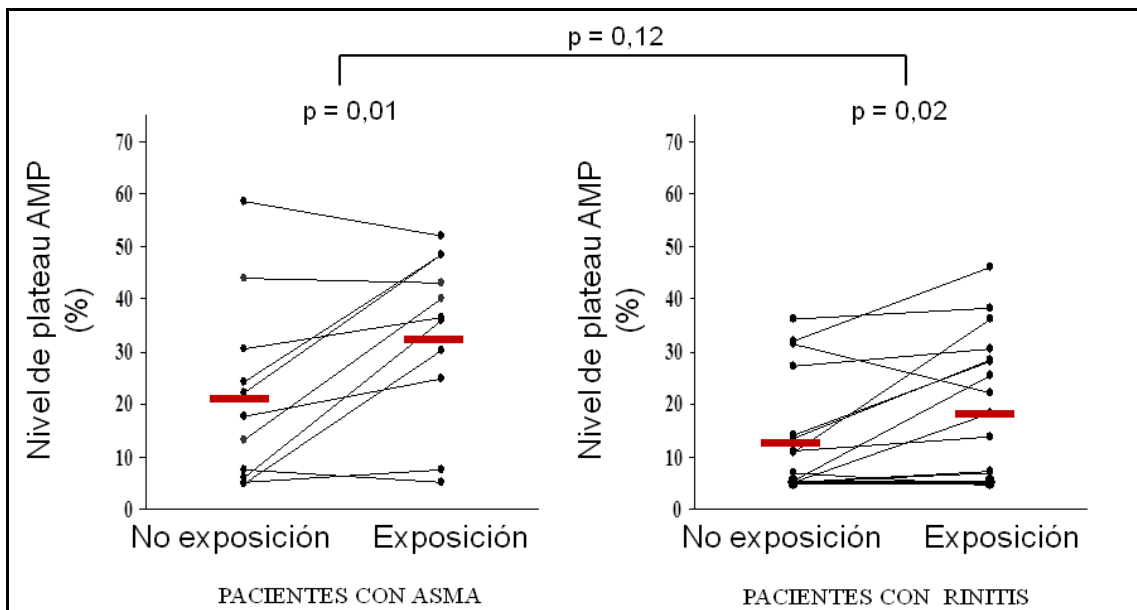


Figura 49. Cambios en el nivel de *plateau* con AMP en los pacientes polínicos con asma y en aquellos con rinitis alérgica aislada. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

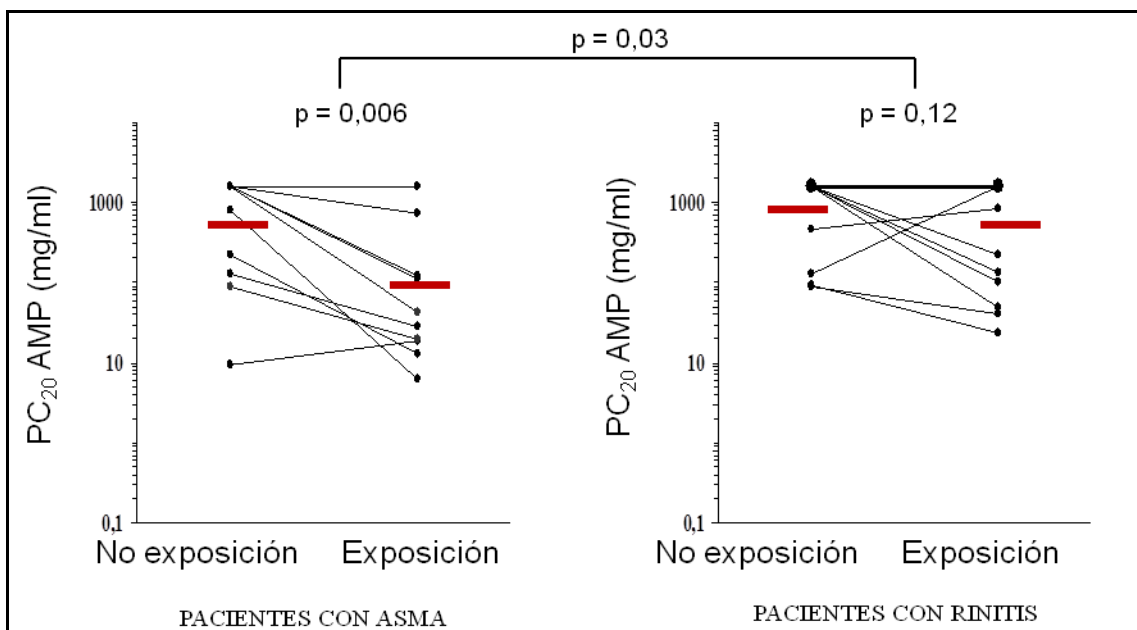


Figura 50. Cambios en la PC₂₀ AMP durante el periodo de exposición al polen en los pacientes con asma y en aquellos con rinoconjuntivitis aislada. Las líneas horizontales representan la media geométrica.

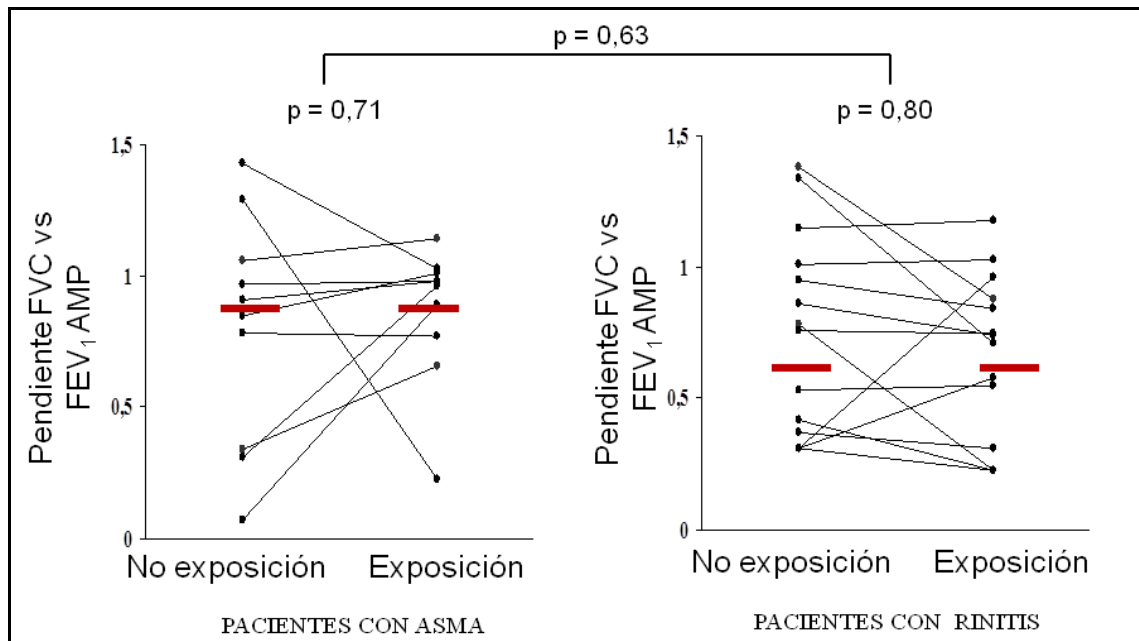


Figura 51. Grado de atrapamiento aéreo inducido por AMP, expresado mediante la pendiente de la regresión entre los valores de la FVC y del FEV₁ en los pacientes con asma y en los individuos con rinoconjuntivitis aislada. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

V. 3. Comparación del efecto de la exposición natural al polen sobre la respuesta bronquial a AMP y a metacolina

Los cambios en la PC₂₀, nivel de *plateau* y pendiente de la regresión entre la FVC y el FEV₁ observados con metacolina y con AMP se indican en la tabla 13. No se observaron diferencias significativas en los efectos de la exposición alérgica sobre la respuesta a cada uno de los broncoconstrictores.

Tabla 13. Cambios en la respuesta a cada broncoconstrictor durante la estación polínica en los pacientes con alergia al polen

	Metacolina	AMP	p
Nivel de <i>plateau</i> (%)	5,90 (3,31-8,48)	7,75 (3,64-11,86)	0,42
PC₂₀ (concentraciones dobles)	0,73 (0,20-1,25)	0,41 (0,16-0,66)	0,25
Pendiente FVC vs FEV₁	-0,01 (-0,19-0,17)	-0,03 (-0,20-0,14)	0,90

Valores expresados como media (95% CI).

V. 4. Óxido nítrico exhalado

En la tabla 14 están detallados los valores de $J'aw_{NO}$ y CA_{NO} en todos los pacientes en que estos parámetros pudieron calcularse. No obstante, solamente en 27 de los individuos con alergia al polen pudimos calcular $J'aw_{NO}$ y CA_{NO} en el periodo de ausencia de exposición y durante el periodo de exposición al polen.

En esta población, la media (95% CI) de los valores de $J'aw_{NO}$ era de 1975 pl/s (1327-2623) durante el periodo de ausencia de exposición y de 2685 pl/s (1965-3405, $p=0,003$, figura 52) durante el periodo de exposición al polen. Los correspondientes valores para CA_{NO} eran de 0,95 ppb (0,58-1,32) durante el periodo de ausencia de exposición y de 0,73 (0,41-1,66, $p=0,12$, figura 54) durante el periodo de exposición al polen. Las concentraciones de $J'aw_{NO}$ identificadas fuera de la estación y durante la estación polínica eran significativamente más altas en los pacientes con alergia al polen que en los controles sanos ($p=0,0001$ para el periodo de ausencia de exposición y $p<0,0001$ para el periodo de exposición, tabla 14, figura 53). Por el contrario, los valores de CA_{NO} eran similares en los polínicos durante ambos periodos de estudio y en los individuos sanos ($p=0,50$ para el periodo de ausencia de exposición y $p=0,17$ para el periodo de exposición, tabla 14, figura 55).

Tabla 14. Valores para $J'aw_{NO}$ y CA_{NO} en polínicos fuera del periodo de exposición y durante la exposición al polen y en individuos sanos.

	Pacientes		Controles sanos (n=11)
	No exposición (n=28)	Exposición (n=29)	
$J'aw_{NO}$ (pl/s)	2004,5 (1378,1-2630,9)	2528,2 (1825,2-3231,2)	599,09 (406,9-791,3)
CA_{NO} (ppb)	0,95 (0,58-1,31)	0,73 (0,41-1,05)	1,19 (0,42-1,96)

Datos mostrados como media aritmética e intervalo de confianza del 95%.

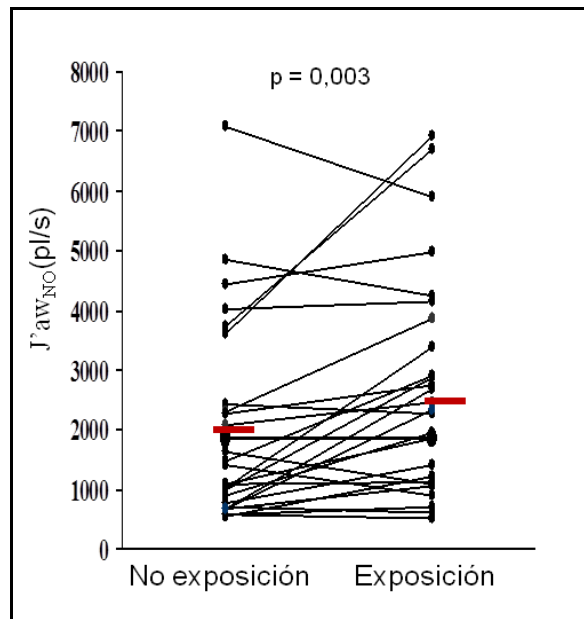


Figura 52. Valores individuales de J'_{awNO} en los pacientes polínicos fuera de la exposición y durante el periodo de exposición natural al polen. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

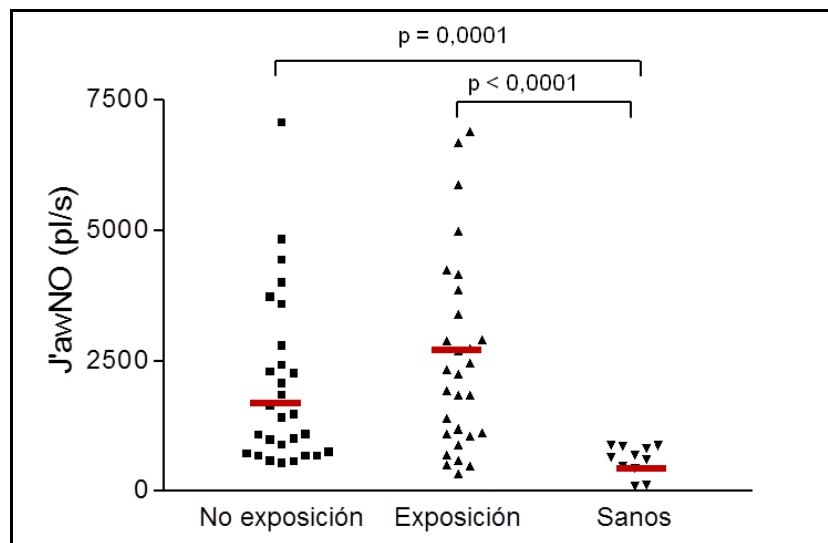


Figura 53. Concentración de J'_{awNO} en los pacientes con alergia al polen durante un periodo de ausencia de exposición y durante la exposición alérgica y en sujetos sanos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

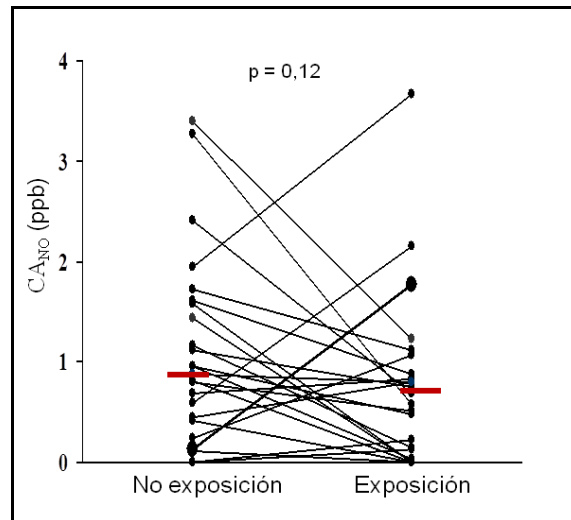


Figura 54. Valores individuales de CA_{NO} en los pacientes polínicos fuera de la exposición y durante un periodo de exposición natural al polen. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

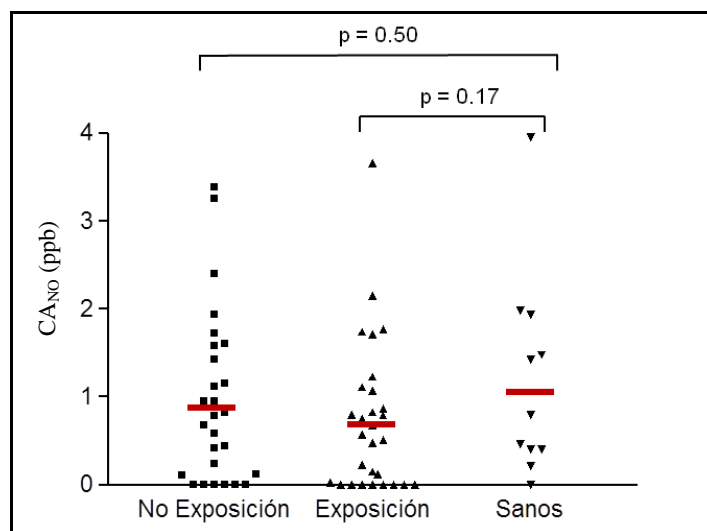


Figura 55. Valores para la CA_{NO} en los pacientes polínicos durante los dos periodos de estudio y en los controles sanos. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

En la tabla 15 se detallan los valores de J'_{awNO} y CA_{NO} durante ambos periodos de estudio en los 9 asmáticos y 18 pacientes con rinoconjuntivitis en los que pudieron calcularse ambos parámetros durante los dos periodos de estudio. En el grupo de pacientes con rinoconjuntivitis, los valores de J'_{awNO} aumentaban significativamente durante el periodo de exposición al polen ($p=0,02$, tabla 15, figura 56). Algo similar se observaba para los valores de J'_{awNO} en los asmáticos, pero las diferencias no alcanzaban la significación estadística ($p=0,07$). No obstante, los cambios de J'_{awNO} fueron cuantitativamente similares en ambos grupos; la media (95% CI) de las diferencias era de 201 pl/s (-753 a 1155, $p=0,66$).

Los valores de CA_{NO} no se modificaron significativamente durante el periodo de exposición al polen, ni en los pacientes asmáticos ($p=0,24$) ni en los individuos con rinitis alérgica aislada ($p=0,36$, tabla 15 y figura 57). Además, los cambios en la CA_{NO} fueron cuantitativamente similares en ambos grupos; la media (95%CI) de las diferencias era de -0,36 ppb (0,55 a -1,26, $p=0,42$).

Tabla 15. Valores de J'_{awNO} y CA_{NO} en los pacientes polínicos con asma y en los que presentaban rinoconjuntivitis aislada durante ambos periodos de estudio.

	Asma (n=9)		Rinitis (n=18)	
	No exposición	Exposición	No exposición	Exposición
J'_{awNO} (pl/s)	2266,8 (1005,1-3528,4)	2847,3 (1412,1-4282,5)	1880,3 (1093,4-2667,3)	2360,3 (1495,8-3224,8)
CA_{NO} (ppb)	1,28 (0,26-2,30)	0,82 (-0,005-1,64)	0,79 (0,46-1,13)	0,69 (0,37-1,01)

Datos presentados como media aritmética (95% CI).

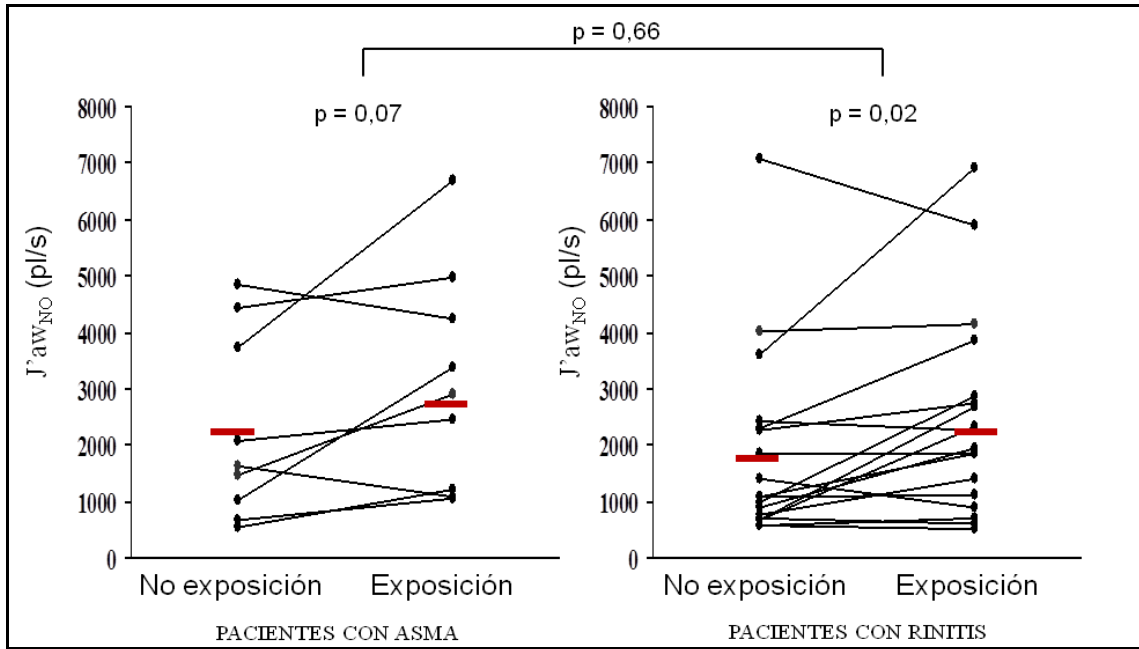


Figura 56. Concentración de J'_{awNO} en los asmáticos y en los pacientes con rinoconjuntivitis aislada durante ambos periodos de estudio. La línea horizontal representa la media aritmética.

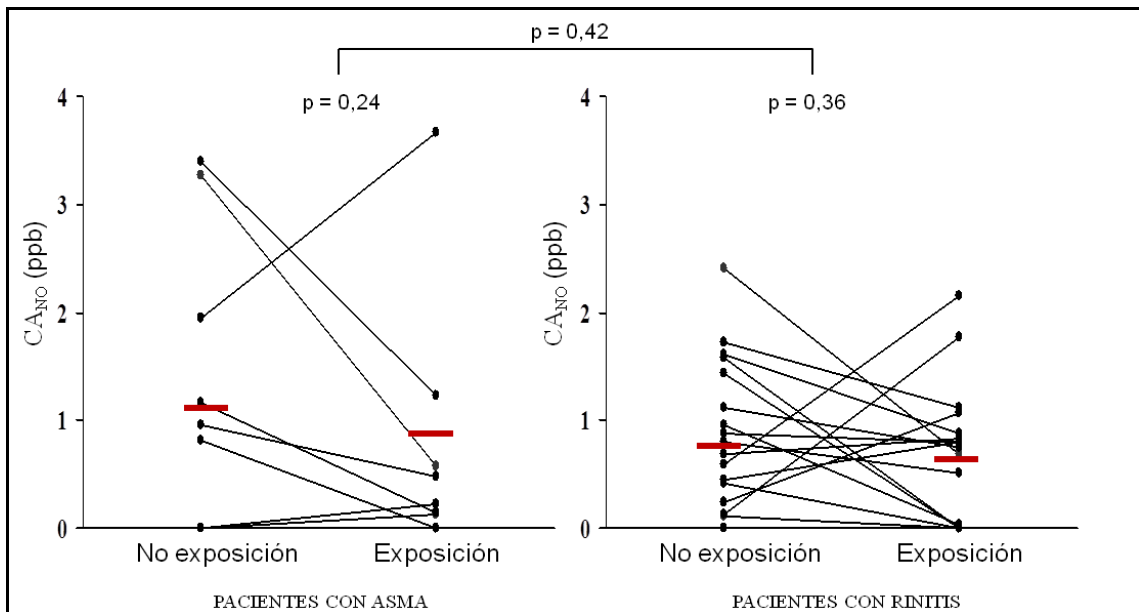


Figura 57. Concentración de CA_{NO} en los asmáticos y en los pacientes con rinoconjuntivitis aislada durante ambos periodos de estudio. La línea horizontal representa la media aritmética.

V. 5. pH del condensado del aire exhalado

En los pacientes con alergia al polen, y de manera paradójica, el pH del condensado del aire exhalado aumentaba significativamente durante el periodo de exposición natural a los alérgenos ($p=0,03$, tabla 16, figura 58). Sin embargo, los valores del pH del condensado no fueron diferentes en los individuos sanos y en los pacientes con alergia al polen (tabla 16, figura 59) tanto en la exploración realizada durante el periodo de exposición ($p=0,17$) como en la efectuada fuera del periodo de exposición al polen ($p=0,97$).

Tabla 16. pH del condensado del aire exhalado en los pacientes con alergia al polen durante los dos periodos del estudio y en los controles sanos.

	Pacientes		Controles sanos
	No exposición	Exposición	
pH deaireado	7,58 (7,34-7,81)	7,90 (7,63-8,17)	7,57 (7,23-7,90)

Valores expresados como media aritmética (95% CI).

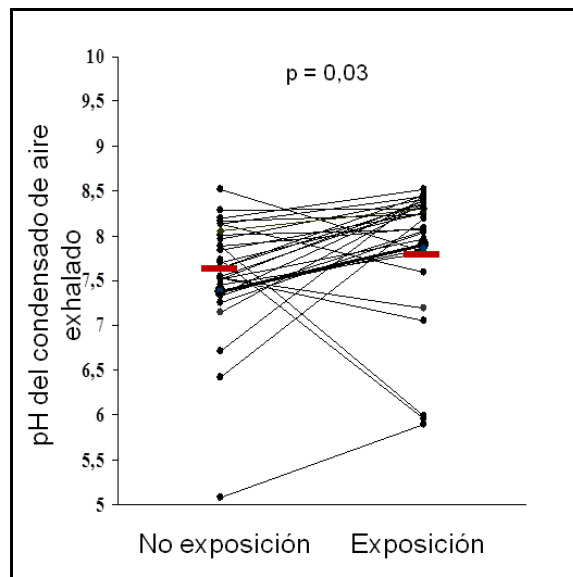


Figura 58. pH del condensado del aire exhalado en los pacientes con alergia al polen durante ambos periodos del estudio. La línea horizontal representa la media aritmética.

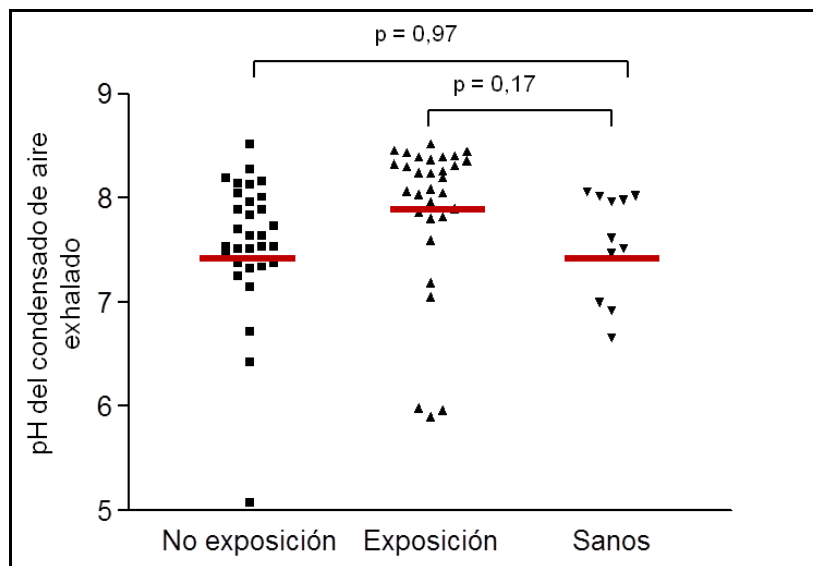


Figura 59. pH del condensado del aire exhalado en los pacientes polínicos durante los dos periodos del estudio y en los individuos sanos. La línea horizontal representa la media aritmética.

Cuando, a título exploratorio, se compararon los efectos de la exposición alérgica sobre el pH del condensado del aire exhalado en los pacientes con alergia al polen y síntomas de asma y en aquellos que presentaban manifestaciones aisladas de rinoconjuntivitis, pudo observarse que el incremento del pH durante el periodo de exposición alérgica alcanzaba la significación estadística en los asmáticos ($p=0,01$, tabla 17, figura 60), pero no en los pacientes con rinoconjuntivitis sin asma ($p=0,87$). No obstante, las diferencias en las modificaciones del pH entre ambos grupos de pacientes no fueron significativas; la media (95% CI) de las diferencias era de 0,55 (-0,21 a 1,30, $p=0,15$).

Tabla 17. Valores del pH del condensado del aire exhalado deaireado en pacientes con alergia al polen y síntomas de asma y en los que presentaban síntomas de rinoconjuntivitis aislada.

	Asma		Rinitis	
	No exposición	Exposición	No exposición	Exposición
pH	7,58(7,20-7,94)	8,17(7,88-8,46)	7,61(7,20-8,03)	7,67(7,18-8,16)

Valores expresados como media aritmética (95% CI).

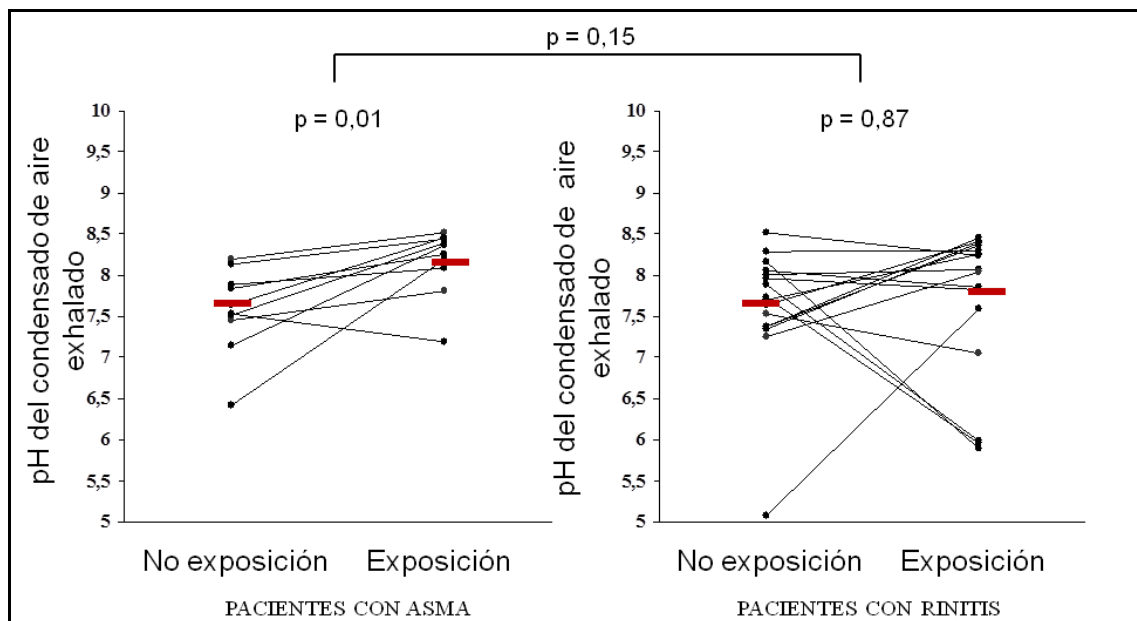


Figura 60. pH del condensado del aire exhalado en los polínicos con asma y en los polínicos con rinoconjuntivitis aislada. La línea horizontal representa la media.

V. 6. Correlaciones

V. 6. a. Correlaciones entre la respuesta a metacolina y a AMP:

En los pacientes con alergia al polen se encontró una correlación significativa entre los valores de la PC₂₀ metacolina y PC₂₀ AMP, tanto durante el periodo preestacional ($r=0,54$, $p=0,002$), como durante el periodo de exposición al polen, si bien la relación entre estos parámetros era claramente superior durante este último periodo ($r=0,64$, $p<0,0001$) (figura 61). Se observó también una correlación entre el deterioro del FEV₁ al que se identificaba *plateau* con uno y otro agonista ($r=0,53$, $p=0,002$ durante el periodo preestacional y $r=0,55$, $p=0,001$ durante el periodo estacional, figura 62). Sin embargo, en los 25 pacientes con alergia a polen que fueron capaces de realizar maniobra de FVC técnicamente correcta, no pudo detectarse correlación entre el grado de atrapamiento (pendiente de la relación FVC vs FEV₁) inducido por los dos agonistas ni durante el periodo preestacional ($r=-0,02$, $p=0,93$) ni durante la estación polínica ($r=0,02$, $p=0,94$). Por otra parte, no pudo identificarse correlación significativa entre los cambios inducidos por la exposición alérgica sobre cada uno de los parámetros anteriores en respuesta a cada uno de los dos agonistas (tabla 18).

Tabla 18. Correlación entre las modificaciones inducidas por la exposición alérgica sobre la respuesta a cada agonista.

	r	p
Δ PC ₂₀ (concentraciones dobles)	0,12	0,53
Δ Nivel <i>plateau</i> (%)	0,08	0,67
Δ Pendiente FVC vs FEV ₁	-0,27	0,19

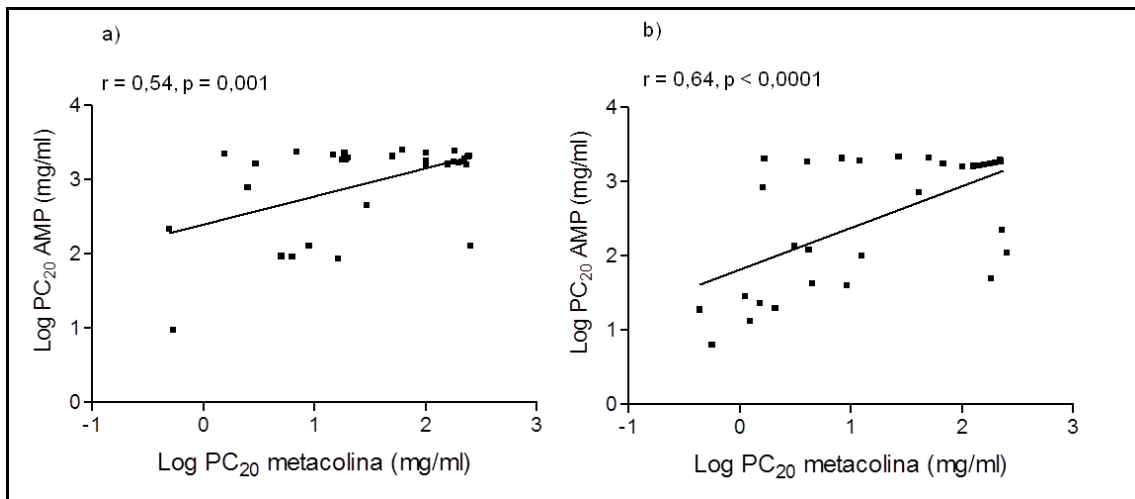


Figura 61. Correlación entre los valores de PC₂₀ metacolina y PC₂₀ AMP (a) durante el periodo preestacional y (b) el periodo estacional en los pacientes con alergia al polen.

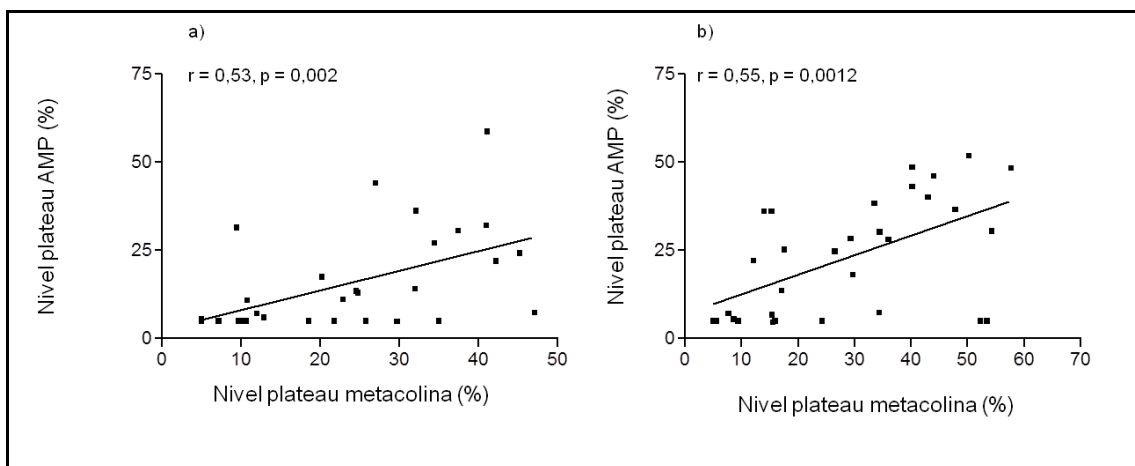


Figura 62. Correlación entre el grado de deterioro del FEV₁ al que se detectaba *plateau* con cada uno de los agonistas broncoconstrictores en los pacientes alérgicos al polen durante (a) el periodo preestacional y (b) el periodo estacional.

V. 6. b. Correlación entre la respuesta a los broncoconstrictores y el óxido nítrico exhalado:

En la tabla 19 se indican las correlaciones entre los parámetros que definen la respuesta a cada agonista broncoconstrictor y los valores de $J'aw_{NO}$ y CA_{NO} en los pacientes con alergia al polen. Puede observarse que las únicas correlaciones observadas fueron las referidas a la sensibilidad (PC_{20}) o a la respuesta máxima a AMP y los valores de $J'aw_{NO}$ (figuras 63 y 64).

Tabla 19. Correlación entre la respuesta a ambos agonistas y los valores de $J'aw_{NO}$ y CA_{NO} en los pacientes con alergia al polen.

		$J'aw_{NO}$		CA_{NO}	
		No exposición	Exposición	No exposición	Exposición
Metacolina	PC_{20}	r= -0,28 p= 0,16	r= -0,22 p= 0,27	r= -0,04 p= 0,82	r= 0,12 p= 0,54
	Nivel de <i>plateau</i>	r= 0,17 p= 0,37	r= 0,19 p= 0,33	r= -0,02 p= 0,92	r= 0,02 p= 0,93
	Pendiente FVC vs FEV_1	r= 0,10 p= 0,63	r= -0,12 p= 0,56	r= 0,16 p= 0,45	r= 0,32 p= 0,13
AMP	PC_{20}	r= -0,56 p= 0,003	r= -0,50 p= 0,008	r= 0,16 p= 0,41	r= 0,17 p= 0,37
	Nivel de <i>plateau</i>	r= 0,54 p= 0,003	r= 0,42 p= 0,03	r= -0,20 p= 0,31	r= -0,01 p= 0,98
	Pendiente FVC vs FEV_1	r= 0,32 p= 0,12	r= 0,33 p= 0,11	r= 0,05 p= 0,83	r= 0,06 p= 0,78

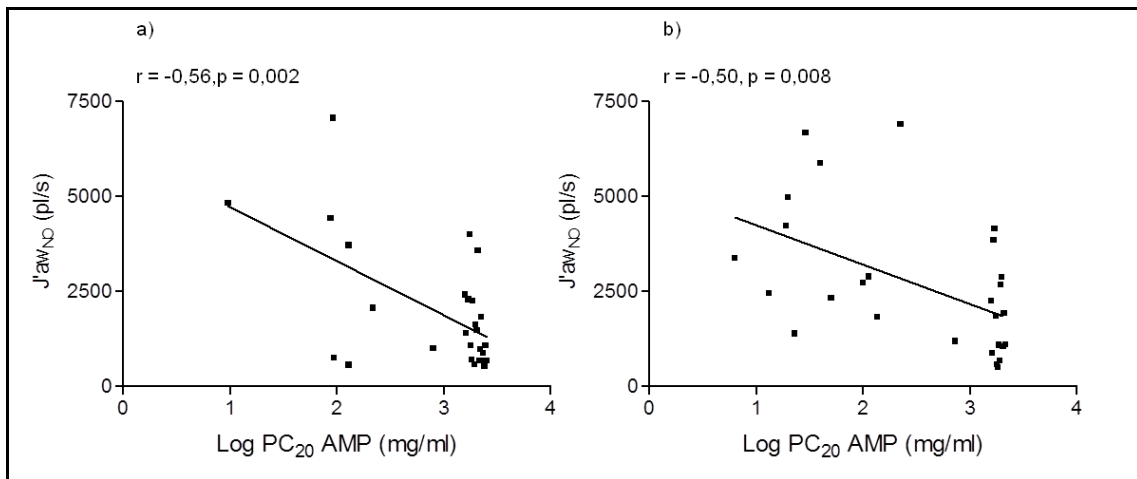


Figura 63. Correlación entre los valores de $J'aw_{NO}$ y la PC_{20} AMP en los pacientes con alergia al polen (a) durante el periodo preestacional y (b) la estación polínica.

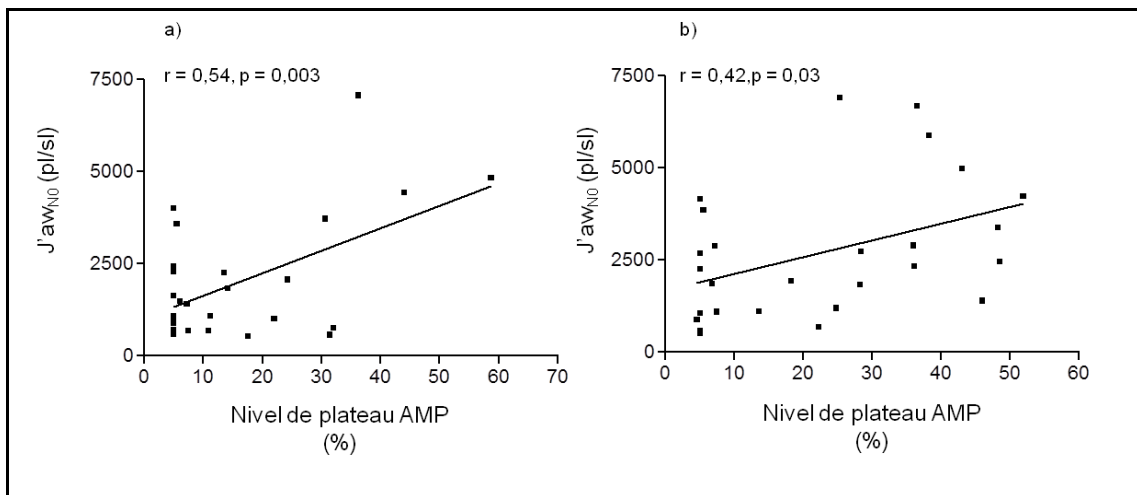


Figura 64. Correlación entre los valores de $J'aw_{NO}$ y el deterioro del FEV_1 al que se detectaba respuesta máxima (nivel de *plateau*) en los pacientes con alergia al polen (a) durante el periodo preestacional y (b) la estación polínica.

Por otra parte, en la tabla 20 se indican las correlaciones entre las modificaciones de la respuesta a los agonistas broncoconstrictores y los cambios en las concentraciones de óxido nítrico exhalado inducidos por la exposición alérgica en los pacientes con asma polínica.

Tabla 20. Correlación entre las modificaciones de la respuesta a ambos agonistas y las modificaciones de $J'aw_{NO}$ y CA_{NO} .

		$\Delta J'aw_{NO}$	ΔCA_{NO}
Metacolina	ΔPC_{20}	r= 0,28 p= 0,16	r= 0,33 p= 0,09
	Δ Nivel de <i>plateau</i>	r= 0,19 p= 0,33	r= 0,34 p= 0,09
	Δ Pendiente FVC vs FEV ₁	r= 0,41 p= 0,06	r= 0,12 p= 0,58
AMP	ΔPC_{20}	r= 0,42 p= 0,03	r= 0,02 p= 0,91
	Δ Nivel de <i>plateau</i>	r= 0,48 p= 0,01	r= -0,06 p= 0,75
	Δ Pendiente FVC vs FEV ₁	r= 0,16 p= 0,46	r= 0,22 p= 0,31

Únicamente pudo detectarse correlación significativa entre las modificaciones de la PC_{20} o el nivel de *plateau* para AMP y las modificaciones correspondientes de $J'aw_{NO}$ (figuras 65 y 66).

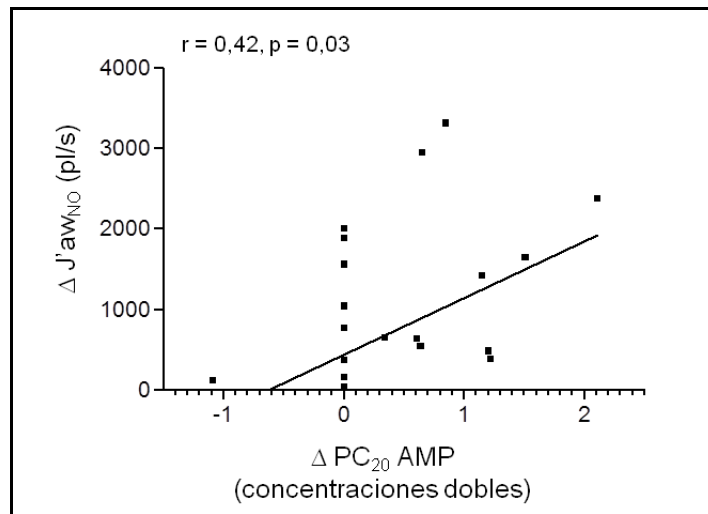


Figura 65. Correlación entre las modificaciones de la PC_{20} AMP y de los valores de $J'aw_{NO}$ inducidas por la exposición alérgica en los pacientes con alergia al polen.

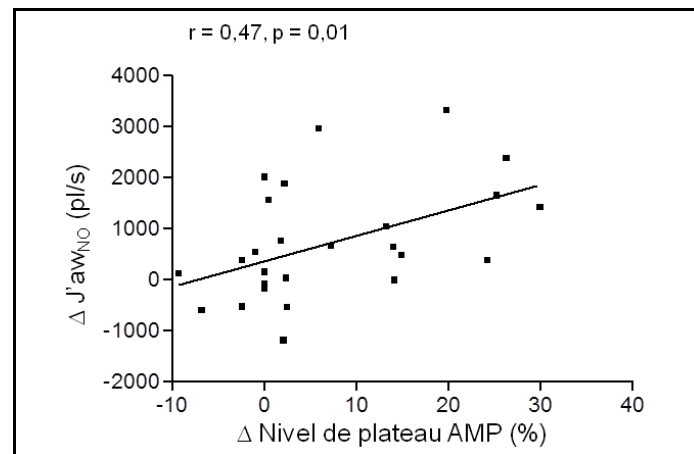


Figura 66. Relación entre las modificaciones del nivel de *plateau* y de los valores de $J'aw_{NO}$ inducidas por la exposición alérgica en los pacientes con alergia al polen.

V. 6. c. **Correlación entre la respuesta a los broncoconstrictores y el pH del condensado del aire exhalado:**

No pudo detectarse correlación significativa entre los valores de la PC₂₀ metacolina o PC₂₀ AMP y el pH del condensado del aire exhalado tanto durante el periodo preestacional ($r=0,24$, $p=0,18$ para metacolina y $r=0,19$, $p=0,29$ para AMP), como durante la estación polínica ($r= -0,22$, $p=0,23$ para metacolina y $r= -0,18$ y $p=0,33$ para AMP). Tampoco pudo identificarse relación entre el nivel de *plateau* para metacolina o para AMP y el pH del condensado, tanto durante el periodo preestacional ($r= -0,06$, $p=0,75$ para metacolina y $r= -0,12$, $p=0,52$ para AMP) como durante la estación polínica ($r=0,27$, $p=0,13$ para metacolina y $r=0,21$, $p=0,25$ para AMP).

En el estudio realizado durante la estación polínica, pudo detectarse una correlación significativa entre la pendiente de la regresión FVC frente a FEV₁ obtenida con metacolina y el pH del condensado ($r=0,66$, $p=0,0003$) aunque la misma era de signo contrario al esperado (figura 67). Los valores de la pendiente de la regresión FVC frente a FEV₁ y del pH durante el periodo preestacional no se correlacionaron significativamente ($r=0,08$, $p=0,68$). Tampoco pudo detectarse correlación entre la pendiente de la regresión FVC frente a FEV₁ para AMP y el pH del condensado del aire exhalado tanto durante el periodo preestacional ($r= -0,13$, $p=0,53$) como durante la estación polínica ($r=0,16$, $p=0,46$).

En la tabla 21 se detalla la relación entre las modificaciones de la respuesta a cada agonista broncoconstrictor y los cambios en el pH del condensado del aire exhalado durante la estación polínica.

Tabla 21. Relación entre los cambios en la respuesta a cada agonista y las modificaciones del pH del condensado del aire exhalado inducidos por la exposición alérgica en pacientes con alergia al polen.

		Δ pH del condensado del aire exhalado
Metacolina	Δ PC ₂₀	r= 0,03 p= 0,87
	Δ Nivel de <i>plateau</i>	r= 0,01 p= 0,99
	Δ Pendiente FVC vs FEV ₁	r= -0,42 p= 0,04
AMP	Δ PC ₂₀	r= -0,16 p= 0,39
	Δ Nivel de <i>plateau</i>	r= -0,14 p= 0,45
	Δ Pendiente FVC vs FEV ₁	r= 0,11 p= 0,60

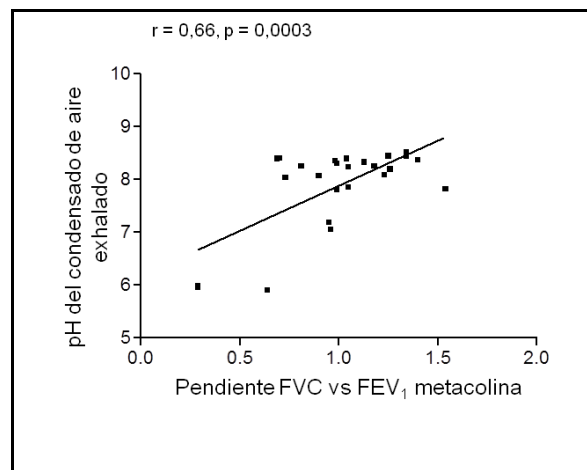


Figura 67. Correlación entre la pendiente de la regresión de FVC frente a FEV₁ para metacolina y el pH del condensado del aire exhalado durante la estación polínica en individuos con alergia al polen.

Únicamente pudo identificarse una débil correlación entre las modificaciones de la pendiente de la regresión FVC frente a FEV₁ para metacolina y los cambios en el pH del condensado del aire exhalado (figura 68).

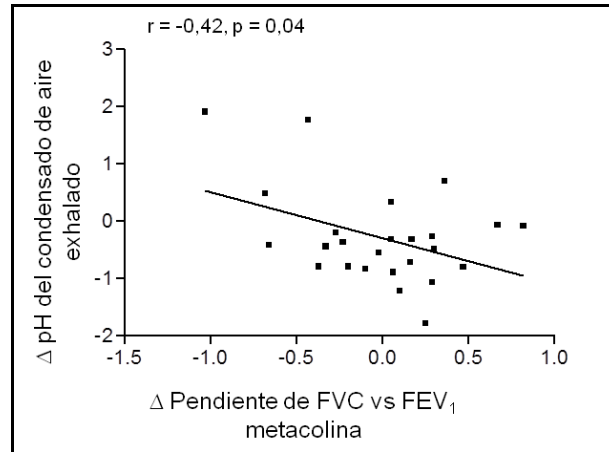


Figura 68. Correlación entre las modificaciones de la pendiente de la regresión de FVC frente a FEV₁ para metacolina y los cambios en el pH del condensado del aire exhalado como consecuencia de la exposición alérgica en los pacientes con alergia al polen.

VI. Discusión

Los resultados del presente estudio demuestran que los individuos sensibilizados al polen, con manifestaciones clínicas de rinoconjuntivitis aislada o con síntomas de rinoconjuntivitis asociada a asma, presentan un grado de hiperrespuesta bronquial (sensibilidad y grado máximo de obstrucción) frente a agonistas broncoconstrictores directos e indirectos significativamente más alto que los individuos sanos. Además, el estudio demuestra que en el curso de la broncoconstricción inducida experimentalmente, los pacientes alérgicos al polen manifiestan un grado de atrapamiento aéreo significativamente mayor que el observado en los individuos sanos.

Por otra parte, el presente estudio aporta observaciones originales acerca de los efectos de la exposición alérgica sobre la hiperrespuesta bronquial y sobre los marcadores no invasivos de inflamación bronquial en los pacientes con alergia a inhalantes. En concreto, la exposición a los alérgenos sensibilizantes se asocia con incrementos de la sensibilidad bronquial y del grado de respuesta máxima inducido por agonistas broncoconstrictores directos e indirectos, sin modificaciones del grado de atrapamiento aéreo inducido por estos agentes. Además, la exposición alérgica induce incrementos significativos del óxido nítrico bronquial, sin modificaciones concomitantes del óxido nítrico alveolar. Estas observaciones amplían nuestro conocimiento de los mecanismos que generan los efectos pro-inflamatorios de los alérgenos inhalados y permiten una mejor comprensión de la interrelación entre inflamación bronquial e hiperreactividad.

Todos los resultados anteriores sugieren que la sensibilización alérgica se asocia con inflamación bronquial e hiperreactividad, incluso durante periodos de ausencia de exposición alérgica y que los alérgenos inhalados inducen, en los pacientes sensibilizados a los mismos, inflamación localizada en vías aéreas proximales con el consiguiente incremento de la hiperrespuesta bronquial, pero sin modificaciones de la inflamación ni de los mecanismos que generan el cierre de las vías aéreas distales.

VI. 1. Hiperrespuesta bronquial en polínicos y sujetos sanos

VI. 1. a. Sensibilidad bronquial:

Tanto con fines diagnósticos como en estudios de investigación, la hiperrespuesta bronquial se ha simplificado a la identificación de la PC₂₀ (concentración de agonista necesaria para inducir un deterioro del FEV₁ del 20%)¹⁶. No obstante parece evidente actualmente que utilizar exclusivamente la PC₂₀ para identificar el grado de hiperreactividad bronquial es una simplificación excesiva.

En realidad, la hiperreactividad bronquial se define como la tendencia de las vías aéreas para estrecharse demasiado fácilmente y en excesiva cuantía en respuesta a una amplia variedad de estímulos broncoconstrictores. La facilidad con la que ocurre la broncoconstricción se identifica, a partir de las curvas concentración-respuesta obtenidas con broncoconstrictores, mediante la cantidad de agonista necesario para inducir el 50% de la máxima respuesta posible (la denominada EC₅₀)¹⁷⁸.

La información aportada por la PC₂₀ se acerca a la obtenida mediante la EC₅₀, aunque no puede aceptarse que ambos parámetros sean equivalentes. No obstante, mediante la utilización de la PC₂₀ se evitan los riesgos derivados de la broncoconstricción excesiva, que pudiera ocurrir cuando se obtienen curvas completas y seguramente por este motivo se ha aceptado generalmente que la PC₂₀ identifica la sensibilidad bronquial. No obstante, está claro que la determinación de la PC₂₀ no ofrece información alguna acerca de la intensidad o cuantía de la broncoconstricción. Por tanto, esta característica de la hiperrespuesta bronquial debe estudiarse a partir de curvas concentración-respuesta completas, que requieren grados de obstrucción superiores a los convencionales.

Mediante el análisis de la meseta máxima de respuesta (el denominado *plateau*) puede determinarse la intensidad de la broncoconstricción que el agonista puede inducir en cada individuo^{178,179}. Sin embargo, para obtener estas curvas concentración-respuesta completas es necesario inducir deterioros del FEV₁ superiores a los convencionales. Incluso alcanzando deterioros de este parámetro mayores del 50% a 60% no se identifica meseta de respuesta máxima en muchos pacientes con asma^{43,44}, aunque sí en una importante proporción de pacientes no asmáticos con rinitis alérgica^{18,21,50}.

Por este motivo, en nuestro estudio hemos seleccionado pacientes con rinitis alérgica aislada y pacientes con rinitis alérgica asociada a asma leve, pues solo así resulta factible identificar modificaciones y diferencias en el nivel de *plateau* en los sujetos estudiados. De esta manera, ha sido posible identificar respuesta máxima-*plateau* a metacolina y a AMP, durante al menos uno de los dos periodos del estudio, en 26 y 29 de nuestros 31 pacientes respectivamente, lo que nos ha permitido comparar el nivel de *plateau* de nuestros pacientes alérgicos con el observado en sujetos sanos, con suficiente garantía y sin excesivo riesgo de generar un grado peligroso de broncoconstricción durante la exploración. Además, las características de los pacientes seleccionados para nuestro estudio permiten comparar con garantía las modificaciones en la meseta de respuesta máxima, como consecuencia de los efectos pro-inflamatorios de los alérgenos, pues en una importante proporción de individuos pudimos identificar el nivel de *plateau* en al menos uno de los periodos, evitando los valores doblemente censurados (*plateau* con caídas del FEV₁ superiores al máximo grado de obstrucción generada).

Evidentemente, esta importante ventaja práctica supone también una importante limitación para la generalización de los resultados de nuestro estudio. En concreto, los resultados obtenidos en nuestro estudio pueden aplicarse a la población general de pacientes con rinitis alérgica asociada o no a asma de intensidad leve, pero no puede asumirse que nuestras conclusiones puedan hacerse extensivas a pacientes con asma de mayor severidad.

En nuestro grupo de pacientes con alergia al polen, la sensibilidad bronquial (valores de PC₂₀) a metacolina era significativamente más alta que la identificada en los controles sanos, independientemente de que los pacientes fueran estudiados o no durante el periodo de exposición natural al polen. Esto confirma resultados perfectamente conocidos desde hace años⁴¹, algunos de los cuales proceden de estudios previos realizados por nuestro grupo²⁰.

Menos información existe acerca de las diferencias en la sensibilidad bronquial a AMP entre individuos con alergia a inhalantes y sujetos sanos, pero los resultados de diferentes estudios publicados hasta la actualidad sugieren que tanto los pacientes con asma⁴⁶ como los individuos con rinitis alérgica aislada¹⁸ presentan un grado de

sensibilidad bronquial a AMP significativamente mayor que los individuos sanos. En un estudio realizado por Toyran et al¹⁸⁰ en 56 niños y adolescentes asmáticos se compararon los valores de PC₂₀ AMP en estos individuos con los obtenidos en un grupo control de 21 individuos sanos. Encontraron que la PC₂₀ AMP era menor en los pacientes que en los controles sanos, y de forma más evidente en aquellos pacientes con asma persistente. De manera similar nuestro grupo investigó la respuesta a AMP en 28 adultos con rinitis alérgica no asociada a asma bronquial²⁷ y comparó los resultados con los obtenidos en 10 controles sanos. Se objetivó que 10 de los 28 sujetos con rinitis alérgica manifestaron valores de PC₂₀ AMP ≤ 400 mg/ml mientras que ninguno de los controles sanos experimentó hiperrespuesta bronquial a este agonista broncoconstrictor.

En consecuencia, los resultados de nuestro estudio, en lo que se refiere a diferencias en la sensibilidad bronquial a metacolina entre pacientes con alergia a inhalantes y sujetos sanos, son concordantes con los publicados por otros autores en pacientes con rinoconjuntivitis o asma. Sin embargo, nuestros resultados aportan la observación adicional de que la sensibilidad bronquial a cada uno de los dos agonistas broncoconstrictores estaba incrementada en los pacientes alérgicos incluso cuando los mismos no estaban expuestos a los alérgenos sensibilizantes.

Estos resultados demuestran claramente que los efectos de la exposición alérgica sobre la sensibilidad bronquial son permanentes y pueden detectarse meses después de cesar la misma. Además, si se acepta que la sensibilidad a metacolina induce alteraciones estructurales persistentes en las vías aéreas, mientras que la sensibilidad a AMP es consecuencia de procesos inflamatorios agudos en la pared bronquial^{58,59,60}, nuestros resultados sugieren que la exposición alérgica induce tanto inflamación persistente como cambios estructurales en la pared bronquial, que podrían facilitar la broncoconstricción incluso durante periodos de ausencia de exposición.

En nuestra opinión, los resultados comentados previamente contradicen algunas afirmaciones axiomáticas. Por ejemplo, utilizando un modelo de exposición alérgica en el laboratorio (la denominada prueba de provocación bronquial con alérgenos), Cockcroft y colaboradores¹⁸¹, así como otros autores¹⁸², comunicaron incrementos transitorios de la sensibilidad bronquial a metacolina e histamina exclusivamente en aquellos pacientes asmáticos que presentaban una respuesta dual a la provocación

alergénica (respuesta inmediata y tardía), pero no en aquellos que experimentaban una respuesta inmediata aislada. No obstante, muchos de nuestros pacientes sufrían únicamente rinoconjuntivitis y, en esta población, las respuestas duales a la provocación alergénica se observan menos frecuentemente que en el asma. A pesar de ello, nuestros pacientes, como grupo, presentaban un incremento de la sensibilidad a metacolina, incluso tras un periodo prolongado de ausencia de exposición alergénica. Una probable explicación para esta aparente discordancia pudiera ser que la prueba de provocación con el alérgeno en el laboratorio se parece muy poco a la exposición natural. Durante la prueba de provocación bronquial en el laboratorio, el paciente se expone a altas concentraciones alergénicas liberadas directamente a la boca mediante un nebulizador. Por el contrario, durante el periodo de exposición natural al alérgeno, el paciente se expone a concentraciones más pequeñas, pero reiteradas, del estímulo pro-inflamatorio. No debe resultar extraño, por tanto, que los efectos de la exposición alergénica sobre la hiperrespuesta bronquial puedan ser distintos cuando el paciente se expone naturalmente a estos agentes y cuando lo hace de manera artificiosa en el laboratorio durante la prueba de provocación bronquial. La aceptación de la equivalencia de ambas situaciones puede conducir a conclusiones erróneas.

Por ejemplo, los resultados de algunos estudios demostraron que, en los pacientes con asma alérgica, el tratamiento con salmeterol durante un periodo corto de tiempo (6 días) se asociaba con un incremento significativo de la respuesta bronquial a la inhalación del alérgeno en el laboratorio¹⁸³. Además, en otro estudio realizado por el mismo grupo de investigadores, se encontró que el tratamiento regular con salbutamol incrementaba la respuesta asmática tardía a la prueba de provocación bronquial con el alérgeno inhalado en el laboratorio y los aumentos asociados en la reactividad bronquial a agonistas broncoconstrictores directos¹⁸⁴. Como consecuencia de esto, se postuló la hipótesis de que, en los pacientes con asma alérgica, la utilización de β -adrenérgicos inhalados durante los periodos de exposición alergénica podría asociarse con incrementos de la hiperrespuesta bronquial¹⁸⁵. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que ni el tratamiento con salmeterol solo¹²⁶ ni con el fármaco asociado a fluticasona inhalada¹⁸⁶ inducía incrementos relevantes de la hiperrespuesta bronquial a agonistas directos o indirectos, durante los periodos de exposición natural a los alérgenos sensibilizantes. Estos resultados demuestran claramente que el modelo de

exposición alérgica en el laboratorio, durante la prueba de provocación bronquial, no puede utilizarse para predecir las consecuencias de la exposición natural a estos agentes.

Nuestra observación de que los pacientes con alergia a inhalantes con rinoconjuntivitis asociada o no a asma presentan un incremento de la respuesta bronquial a metacolina y a AMP, no solo durante los periodos de exposición alérgica sino incluso al cabo de más de 6 meses sin exposición a estos agentes, demuestra claramente que los efectos pro-inflamatorios de los alérgenos inhalados son persistentes y no necesariamente se asocian con síntomas respiratorios ni con obstrucción al flujo aéreo. Esto permite dudar de la pertinencia de una segunda afirmación universalmente aceptada acerca del papel de los alérgenos en el asma. Se acepta que únicamente aquellos alérgenos cuya presencia se asocia con síntomas de asma, en los pacientes sensibilizados, y con deterioros significativos de la función pulmonar pueden considerarse relevantes en la génesis del proceso en estos individuos. No obstante, ni nuestros pacientes con rinoconjuntivitis aislada ni aquellos que presentaban también asma manifestaban síntomas o deterioro de la función pulmonar durante el periodo de ausencia de exposición alérgica. Sin embargo, incluso en este periodo de ausencia de exposición alérgica podían identificarse incrementos de la respuesta bronquial a agonistas directos e indirectos en muchos de estos individuos. Esto sugiere que la capacidad de los alérgenos inhalados para inducir síntomas de asma y obstrucción al flujo aéreo no tiene relación con los efectos de estos agentes sobre la hiperrespuesta bronquial. Puede dudarse, por tanto, de que la sensibilización alérgica a productos no relacionados con la génesis de síntomas o con el deterioro funcional pueda catalogarse como clínicamente irrelevante.

Las diferencias encontradas en este estudio en la intensidad de la sensibilidad bronquial a metacolina y a AMP entre pacientes con alergia al polen e individuos sanos parecen contradecir los resultados de un estudio previo realizado por nuestro grupo. En el mismo⁶⁸, se compararon los valores de PC₂₀ obtenidos con metacolina y con AMP en 14 pacientes polínicos testados durante un periodo de exposición alérgica y durante un periodo de ausencia de exposición, con los obtenidos en 10 individuos sanos. Los resultados demostraban que la sensibilidad a metacolina y a AMP fuera de la estación polínica era similar en los pacientes con alergia al polen y en los controles sanos. Las causas de las diferencias entre los resultados obtenidos en este estudio previo⁶⁸ y los

identificados en la presente tesis no son evidentes, pero pudieran deberse en gran medida a las diferencias en las características de las poblaciones estudiadas. En nuestro estudio previo se seleccionaron pacientes con rinitis alérgica polínica que presentaban valores de PC₂₀ metacolina < 25 mg/ml y de PC₂₀ AMP < 400 mg/ml en la exploración realizada durante el periodo de exposición alérgica. Por el contrario, en la presente investigación se seleccionaron pacientes con alergia al polen, independientemente de la presencia e intensidad de la respuesta broncoconstrictora a los dos agonistas y de las consecuencias clínicas de la sensibilización (rinoconjuntivitis sola o bien rinoconjuntivitis asociada a asma). Al menos teóricamente, el comportamiento de las poblaciones de pacientes alérgicos seleccionados en cada uno de los estudios pudiera no ser idéntico, pues el incremento de la sensibilidad bronquial en el grupo de pacientes con rinoconjuntivitis asociada a asma pudiera ser más persistente que el identificado en los pacientes con solo rinoconjuntivitis.

Deliberadamente no hemos comparado los valores de PC₂₀ obtenidos en nuestros pacientes con rinoconjuntivitis asociada a asma y en el grupo control sano, pues el número de pacientes con estas características es demasiado pequeño. No obstante, algunos de nuestros resultados no parecen apoyar la hipótesis de una menor reducción del grado de sensibilidad bronquial a los agonistas en el grupo con rinitis asociada a asma, una vez cesa la exposición alérgica. Cuando hemos comparado la intensidad de la reducción de la sensibilidad bronquial a metacolina en el grupo de pacientes con rinoconjuntivitis aislada y en aquellos en los que la afectación naso-ocular se asociaba a asma (tabla 10 y figura 41), no hemos podido identificar diferencias de comportamiento entre los dos grupos de pacientes. Sin embargo, el incremento de los valores de PC₂₀ AMP (reducción de la sensibilidad bronquial) tras cesar la exposición alérgica era significativamente mayor en el grupo de pacientes con rinoconjuntivitis alérgica asociada a asma que en aquellos que presentaban rinoconjuntivitis aislada (tabla 12 y figura 50). Indirectamente, estas observaciones sugieren que los efectos de la exposición alérgica sobre la hiperrespuesta bronquial a agonistas broncoconstrictores directos son más persistentes que los observados sobre la respuesta a agonistas indirectos. Este hallazgo es perfectamente concordante con el concepto de que el incremento de la respuesta bronquial a metacolina (un broncoconstrictor directo) es consecuencia de alteraciones persistentes de la estructura bronquial, mientras que la respuesta a AMP

está generada por cambios inflamatorios más agudos y menos persistentes a lo largo del tiempo.

VI. 1. b. Respuesta máxima:

Las diferencias en el grado de respuesta máxima a metacolina entre pacientes sensibilizados a inhalantes e individuos sanos se identificaron hace ya algunos años. Diferentes estudios demostraron que los pacientes asmáticos solo excepcionalmente muestran meseta de respuesta máxima (*plateau*) cuando son estimulados con concentraciones altas de metacolina inhalada^{49,176,187, 188}. Por el contrario, esta meseta de respuesta máxima se detecta más frecuentemente, aunque no sistemáticamente, en los individuos no asmáticos con rinitis alérgica^{69,188}. Además, en los pacientes no asmáticos con rinitis alérgica, el grado de obstrucción que es necesario inducir para identificar *plateau* es intermedio entre el que se observa en los asmáticos y en los sujetos sanos^{20,50}.

Nuestros resultados confirman todos estos hallazgos. Adicionalmente, en nuestros pacientes alérgicos al polen, estas diferencias en el nivel de *plateau* en respuesta a metacolina con respecto a los sujetos sanos, eran evidentes durante el periodo de exposición alérgica, pero no alcanzaban la significación estadística ($p=0,09$) fuera de la exposición alérgica. Este hallazgo puede ser consecuencia de un error estadístico tipo II (pequeño número de sujetos estudiados), pues el tamaño de muestra se calculó para que el estudio tuviese suficiente poder para identificar modificaciones en el nivel de *plateau* durante el periodo de exposición alérgica, pero no para detectar diferencias en el nivel de *plateau* entre diferentes poblaciones de sujetos.

No obstante, independientemente de la causa para explicar esta ausencia de diferencias en el nivel de *plateau* entre controles sanos y sujetos alérgicos estudiados durante un periodo de ausencia de exposición alérgica, nuestros resultados sugieren que la meseta de respuesta máxima, obtenida mediante la inhalación de agonistas broncoconstrictores directos, tiende a normalizarse tras cesar la exposición alérgica en mayor medida que la sensibilidad.

Los mecanismos que incrementan la sensibilidad bronquial (pre-yuncionales) y los que aumentan el nivel de respuesta máxima (post-yuncionales) no están definitivamente establecidos¹⁷⁸. No obstante, independientemente de los mecanismos

que generan cada uno de estos dos tipos de alteraciones de la hiperrespuesta bronquial, nuestros resultados sugieren que los mismos son al menos parcialmente independientes.

Además, parece evidente que los efectos pro-inflamatorios y las alteraciones estructurales generadas por los alérgenos inhalados se traducen en modificaciones de los mecanismos pre y post-yuncionales involucrados en la génesis de la hiperrespuesta bronquial, pero que los cambios en las alteraciones post-yuncionales son menos persistentes. Sin embargo, nuestro estudio no fue diseñado para investigar los mecanismos que generan cada uno de estos componentes de la hiperrespuesta bronquial y la interpretación del origen de estas diferencias en su comportamiento, tras cesar el estímulo pro-inflamatorio deben confirmarse en futuros estudios.

Las características de la meseta de respuesta máxima a los agonistas broncoconstrictores indirectos, en los pacientes con alergia a inhalantes, han recibido una menor atención. En nuestro estudio, hemos demostrado que puede identificarse *plateau* en las curvas concentración-respuesta obtenidas con AMP en una proporción de pacientes alérgicos a inhalantes similar a la detectada con metacolina. Sin embargo, algunos pacientes presentaban *plateau* en las curvas dosis-respuesta obtenidas con un agonista, pero no en las generadas con el otro. Estos hallazgos confirman observaciones previas de nuestro grupo que constataban que el *plateau* en respuesta a metacolina y a AMP no se identificaba exactamente en los mismos pacientes⁴⁴.

En nuestros pacientes con alergia a inhalantes, el grado de deterioro del FEV₁ necesario para identificar *plateau* con AMP era significativamente mayor que el requerido en los controles sanos, tanto en la exploración realizada durante el periodo de exposición alérgica como fuera del periodo de exposición. La posibilidad de identificar *plateau* en las curvas concentración-respuesta obtenidas con AMP ha sido descrita previamente⁴⁴, pero este es el primer estudio en el que se ha comparado el grado de obstrucción al que se detecta *plateau* en pacientes alérgicos testados durante un periodo de exposición alérgica y al finalizar el mismo, con el requerido para identificar esta meseta de respuesta máxima en los sujetos sanos. Nuestros resultados claramente demuestran diferencias en el nivel de *plateau* entre las dos poblaciones, independientemente de la exposición alérgica.

Además, estas diferencias en el *plateau* obtenido con AMP entre población alérgica e individuos sanos parecían más persistentes que las observadas con metacolina pues eran evidentes durante el periodo de ausencia de exposición alérgica.

Todo esto parece sugerir que los mecanismos que generan la respuesta máxima a cada uno de los dos agonistas no necesariamente son idénticos. Más concretamente, la respuesta broncoconstrictora a metacolina está mediada por un efecto directo del agonista sobre los receptores muscarínicos localizados en el músculo liso bronquial^{25,26}, mientras que la respuesta broncoconstrictora a AMP es consecuencia de los efectos del agonista sobre receptores A2b localizados en mastocitos, con la consiguiente activación de dichas células y la liberación de agonistas broncoconstrictores, como histamina, prostaglandinas y leucotrienos, que generan la broncoconstricción^{53,54,55}.

El comportamiento parcialmente diferente de las modificaciones de la respuesta máxima inducidas por cada uno de los dos agonistas, tras cesar el estímulo pro-inflamatorio, sugiere que los dos broncoconstrictores no están necesariamente identificando alteraciones idénticas en la pared bronquial. Sin embargo, esto debe estudiarse mediante estudios que bloqueen la respuesta a AMP a diferentes niveles, desde la estimulación mastocitaria (β -adrenérgicos inhalados) hasta los efectos de los diversos broncoconstrictores liberados (antihistamínicos, antagonistas del receptor para cisteinil-leucotrienos).

VI. 1. c. **Atrapamiento aéreo:**

Como se ha indicado previamente, los agonistas broncoconstrictores inducen obstrucción al flujo aéreo progresivamente creciente y, como consecuencia de la misma, se generan incrementos del volumen residual²³. Este incremento del volumen residual ocurre como consecuencia del cierre de las vías aéreas distales¹⁷⁷ y se denomina atrapamiento aéreo.

Evidentemente, los incrementos del volumen residual, en el curso de la broncoconstricción aguda, se asocian con reducciones proporcionales de la FVC y, asumiendo que durante la broncoconstricción inducida experimentalmente en el laboratorio la capacidad pulmonar permanece constante¹⁷⁷, el atrapamiento aéreo puede estimarse cuantitativamente mediante los descensos de la FVC.

Se ha postulado que los cambios en la FVC pueden representar un método indirecto para identificar la meseta de respuesta máxima^{21,22}, pero los resultados de un estudio reciente no han podido confirmarlo¹⁸⁹. Independientemente de la relación entre los deterioros de la FVC inducidos por los broncoconstrictores inhalados y el nivel del *plateau* obtenido con los mismos, parece claro que la identificación de la capacidad de los broncoconstrictores para inducir atrapamiento aéreo puede aportar información complementaria a la obtenida midiendo exclusivamente los deterioros del FEV₁ inducidos por estos agentes²⁴. Por este motivo, en el presente estudio no solo hemos estudiado los efectos de cada uno de los agonistas sobre el FEV₁, sino también sobre la FVC.

Nuestros resultados demuestran que, como era de esperar, los dos agonistas inhalados inducían un mayor grado de atrapamiento aéreo en los pacientes sensibilizados a inhalantes que en los sujetos sanos. Además, estas diferencias en el grado de atrapamiento aéreo inducido por los dos agentes eran significativas tanto para la exploración realizada durante el periodo de exposición alérgica como en la practicada durante el periodo de ausencia de exposición a los alérgenos. Como se ha indicado, estas diferencias se observaban con cada uno de los dos agonistas, pero eran más evidentes en el caso de la metacolina. Indudablemente, esto puede deberse a que la metacolina inducía una obstrucción (deterioro del FEV₁) significativamente mayor que AMP en los pacientes polínicos.

VI. 2. **Modificaciones de la hiperrespuesta bronquial inducidas por la exposición alérgica**

Una de las mayores dificultades metodológicas para atribuir las modificaciones de la hiperrespuesta bronquial a una intervención concreta reside en la necesidad de que la función pulmonar basal sea similar en cada uno de los momentos en que se realiza la exploración con el agonista broncoconstrictor. De otra manera, los cambios atribuidos a la intervención pudieran deberse, al menos en parte, a las modificaciones de la función pulmonar^{190,191}.

Este aspecto se ha cuidado especialmente en nuestro estudio y ha sido uno de los motivos fundamentales para seleccionar pacientes no asmáticos o individuos con asma muy leve. De esta manera hemos conseguido que los dos parámetros funcionales utilizados para evaluar la respuesta a los broncoconstrictores en nuestros pacientes (FEV₁ y FVC) fueran similares durante los dos periodos de estudio.

Sin duda, este es uno de los puntos más cruciales del diseño del presente estudio, pues permite afirmar que las diferencias en la respuesta a los agonistas, encontradas en los dos periodos de estudio, son consecuencia de la intervención (en nuestro caso, la exposición alérgica) y no se deben a factores de confusión como los cambios en los valores basales del FEV₁ u otros más fácilmente controlables, como las infecciones respiratorias o los cambios en el tratamiento de la enfermedad. Estos últimos factores de confusión tampoco estuvieron presentes en la población de pacientes alérgicos estudiada.

VI. 2. a. Modificaciones de la sensibilidad bronquial:

Los efectos de la exposición natural a los alérgenos sobre la sensibilidad bronquial a metacolina y a AMP se conocen con bastante detalle. Diferentes estudios han demostrado que, en pacientes con rinitis alérgica asociada o no a asma, la exposición natural al alérgeno se asocia con incrementos significativos de la sensibilidad bronquial a metacolina⁵² y a AMP^{64,68}. Nuestros resultados confirman todas estas observaciones y aportan información original acerca de las diferencias en la modificación de este parámetro entre pacientes con únicamente rinoconjuntivitis y aquellos que presentan asma asociada.

En nuestros pacientes con rinoconjuntivitis asociada a asma, la exposición natural al alérgeno inducía incrementos significativos de la sensibilidad bronquial a metacolina, mientras que los cambios no alcanzaban la significación estadística en el grupo de pacientes con rinoconjuntivitis alérgica sin asma. Sin embargo, las modificaciones de la sensibilidad bronquial a metacolina no fueron significativamente diferentes en ambos grupos de pacientes, lo que parece sugerir que el menor grado de incremento de la sensibilidad en el grupo de pacientes con rinoconjuntivitis aislada pudiera ser consecuencia del alto número de individuos de esta población que presentaba valores censurados de PC₂₀ en ambos periodos. Esta interpretación se ve apoyada experimentalmente por los resultados de un estudio previo que demostraba que los pacientes con rinoconjuntivitis polínica sin asma, que no presentaban valores censurados de PC₂₀ en la exploración realizada durante la estación del polen, presentaban incrementos significativos de la sensibilidad bronquial a metacolina durante el periodo de exposición alérgica⁶⁸.

Por otra parte, y de manera similar a lo observado con metacolina, nuestros pacientes asmáticos con rinoconjuntivitis asociada presentaban incrementos significativos de la sensibilidad bronquial a AMP durante el periodo de exposición alérgica, mientras que los mismos no alcanzaban la significación estadística en el grupo de pacientes que presentaba rinoconjuntivitis pero no asma. Como en el caso de la metacolina, estos resultados pueden deberse a un error estadístico tipo II o a la importante proporción de pacientes con rinoconjuntivitis aislada que presentaba valores censurados para la PC₂₀ AMP. Con este broncoconstrictor al contrario de lo observado con metacolina, las modificaciones de la sensibilidad bronquial eran significativamente

mayores en los pacientes asmáticos que en los individuos con rinoconjuntivitis aislada. Estos resultados son concordantes con observaciones previas que sugerían una mayor capacidad de AMP para identificar incrementos de la inflamación bronquial aguda^{58,59,60}, pero los mismos deben confirmarse mediante estudios similares al nuestro, comparando los efectos de la exposición alérgica en una población de pacientes con asma asociada a rinoconjuntivitis y en otra con rinoconjuntivitis sin asma, pero con incrementos de la sensibilidad bronquial.

VI. 2. b. **Modificaciones de la respuesta máxima:**

Como se ha indicado previamente, los mecanismos que generan los incrementos de la sensibilidad bronquial a los agonistas broncoconstrictores (pre-yuncionales) y los que inducen los aumentos de la meseta de respuesta máxima a los mismos agentes (post-yuncionales) son, al menos parcialmente, diferentes. Por este motivo resulta especialmente interesante identificar las alteraciones post-yuncionales inducidas por los estímulos pro-inflamatorios, como la exposición alérgica.

En nuestros pacientes alérgicos al polen, el grado de deterioro del FEV₁ que era necesario inducir para identificar *plateau* era significativamente mayor durante el periodo de exposición alérgica que en ausencia de exposición ambiental a los alérgenos. Además, estos incrementos en el nivel de *plateau* se observaban tanto para metacolina como para AMP. Estos resultados sugieren que la exposición alérgica induce modificaciones significativas de las alteraciones estructurales relacionadas con la generación de los cambios post-yuncionales de la hiperrespuesta bronquial.

Los incrementos en el nivel de *plateau* a metacolina durante la exposición alérgica, observados en el presente estudio, confirman los obtenidos en estudios previos realizados en nuestro centro. Tanto en pacientes con asma²⁰ como en individuos con rinitis alérgica^{69,70} por polen, la exposición natural a estos alérgenos se asociaba con incrementos significativos del grado de deterioro del FEV₁ que era necesario inducir para identificar respuesta máxima.

Sin embargo, no existe información en la literatura acerca de los efectos de la exposición alérgica sobre la meseta de respuesta máxima a AMP. Nuestros resultados demuestran que las modificaciones del nivel de *plateau* observadas para este último agonista broncoconstrictor son similares a las identificadas para metacolina. Estos hallazgos parecen bastante coherentes con el concepto generalmente aceptado de que las alteraciones post-yuncionales (modificaciones de la interrelación entre vías aéreas y parénquima circundante) dependen de la acción directa de mediadores broncoconstrictores (histamina, leucotrienos) sobre receptores específicos localizados en el músculo liso bronquial, pero no de la estimulación de células inflamatorias.

Por otra parte, los cambios en el nivel de *plateau* detectados con metacolina y con AMP eran de magnitud similar en los asmáticos y en los pacientes con rinoconjuntivitis sin asma. Esta observación es concordante con la hipótesis de que los mecanismos que regulan la intensidad de esta respuesta máxima dependen más de la inflamación activa y de las alteraciones estructurales presentes en las vías aéreas de cada paciente (con el consiguiente desequilibrio en la interrelación pared bronquial-parénquima) que de mecanismos pre-yuncionales, como la capacidad del broncoconstrictor para alcanzar los lugares de acción o de la permeabilidad selectiva del epitelio bronquial para cada agonista.

VI. 2. c. **Modificaciones del atrapamiento aéreo:**

En el presente estudio se ha analizado el efecto de la exposición natural al alérgeno sobre el grado de atrapamiento aéreo inducido por cada agonista broncoconstrictor. Nuestros resultados demuestran claramente que la exposición natural a los alérgenos no se asocia con modificaciones del grado de atrapamiento aéreo inducido por metacolina o por AMP. Estos hallazgos confirman y amplían los obtenidos en investigaciones previas que demostraron que, en pacientes con rinitis alérgica estacional, el cambio medio en la relación FEV₁/FVC con la concentración más alta de metacolina no era significativamente diferente durante la estación polínica y fuera de la estación²¹.

Sin embargo, este es el primer estudio en el que se ha investigado el efecto de la exposición alérgica sobre el atrapamiento aéreo inducido por AMP. Nuestros resultados demuestran que, de manera similar a lo que se observa con metacolina, la exposición natural a los alérgenos no se asocia con modificaciones significativas en el atrapamiento aéreo inducido por AMP.

Los mecanismos que regulan el grado de atrapamiento aéreo inducido por los broncoconstrictores inhalados no están definitivamente establecidos. No obstante, parece lógico aceptar que los efectos de la exposición alérgica sobre el atrapamiento inducido por metacolina y por AMP ocurren como consecuencia del incremento del grado de inflamación inducido por estos agentes. En consecuencia, cabría esperar que la exposición alérgica se asociase con aumentos significativos del grado de atrapamiento aéreo inducido por los agonistas broncoconstrictores, de manera similar a lo que se observa con el grado de sensibilidad bronquial y con el grado de obstrucción que es necesario inducir para identificar respuesta máxima. Esta creencia viene apoyada además por los resultados de estudios previos que demostraban que los fármacos antiinflamatorios, como los esteroides inhalados, inducían reducciones significativas en el grado de atrapamiento aéreo inducido por metacolina¹⁷⁷ y que los pacientes asmáticos tratados con esteroides inhalados presentaban un grado de atrapamiento en respuesta a metacolina significativamente menor que el observado en los asmáticos no tratados con estos fármacos²⁴.

¿Cómo puede explicarse que la exposición natural a los alérgenos se asocie con incrementos significativos de la sensibilidad bronquial y del nivel de *plateau* en respuesta a agonistas broncoconstrictores directos e indirectos, sin cambios concomitantes en el grado de atrapamiento aéreo inducido por cada agonista? La respuesta a esta pregunta no es evidente, pero pueden proponerse algunas hipótesis. Se ha postulado que los cambios inflamatorios en las vías aéreas son más importantes en la modulación del calibre de las vías aéreas distales que de las centrales¹⁹². Además, en los individuos con función pulmonar normal, como los incluidos en el presente estudio, el FEV₁ refleja el flujo espiratorio a volúmenes pulmonares altos o intermedios, que están probablemente determinados por el calibre de las vías aéreas relativamente grandes, mientras que el RV (y la reducción consiguiente de la FVC) está probablemente determinado por el cierre de las vías aéreas distales¹⁷⁷. Si estos postulados son correctos, los resultados del presente estudio parecen sugerir que las consecuencias de la exposición natural a los alérgenos se expresan predominantemente en las vías aéreas grandes. Esta conclusión es concordante con los cambios identificados en el óxido nítrico exhalado (como marcador de inflamación) en los pacientes estudiados. Como se analizará posteriormente, nuestros pacientes sensibilizados a alérgenos polínicos experimentaban incrementos significativos del óxido nítrico bronquial durante el periodo de exposición alérgica, pero no mostraban modificaciones del óxido nítrico alveolar durante el mismo periodo. Todo esto es concordante con un efecto pro-inflamatorio selectivo de los alérgenos sobre las vías aéreas proximales.

Indudablemente, el efecto pro-inflamatorio selectivamente proximal de la exposición alérgica, identificada en los pacientes polínicos, pudiera no ser generalizable para otros alérgenos como los procedentes de ácaros o de epitelios animales o para otros alérgenos perennes. En todas estas situaciones, la exposición alérgica es mucho más prolongada que en el caso del polen y el tamaño de las partículas alérgicas inhaladas puede ser más pequeño. Por tanto, no es posible descartar que alérgenos diferentes de los pólenes puedan inducir alteraciones en vías aéreas distales, con el consiguiente cierre precoz de las mismas e incremento del grado de atrapamiento aéreo inducido por los agonistas broncoconstrictores. Estos aspectos deben aclararse en futuros estudios.

Por otra parte, se ha sugerido que los cambios en la FVC pueden representar un método indirecto para identificar la respuesta máxima^{21,22,193}, sin el riesgo inherente a la necesidad de inducir los grados intensos de obstrucción requeridos a menudo para medir directamente la misma. El fundamento teórico de esta relación entre el deterioro de la FVC y la respuesta máxima a los agonistas broncoconstrictores reside en la observación de que el volumen pulmonar al que se mide la broncoconstricción afecta de manera decisiva a la curva dosis-respuesta obtenida con metacolina. Más concretamente, el estrechamiento de la vía aérea es mayor a volúmenes pulmonares bajos, mientras que a volúmenes pulmonares altos, el estrechamiento de la vía aérea es menor que el valor correspondiente a la capacidad residual funcional¹⁹⁴.

Por otra parte, el fundamento experimental de la capacidad de los cambios en la FVC para determinar de manera indirecta el nivel del *plateau* proviene de un estudio realizado en niños con asma, en el que los autores encontraron una relación significativa entre el nivel del *plateau* identificado con metacolina y la reducción de la FVC inducida por el agente broncoconstrictor¹⁹⁵. Sin embargo, los resultados de un estudio reciente parecen contradecir esta postulada relación entre los deterioros de la FVC inducidos por los agonistas broncoconstrictores y el nivel al que se identifica *plateau* en respuesta a los mismos. En este estudio¹⁸⁹, se analizó la relación entre la respuesta máxima a metacolina o a AMP y el grado de atrapamiento aéreo inducido por cada agonista, identificado mediante los deterioros de la FVC, en un grupo de 41 pacientes con asma intermitente y 26 pacientes no asmáticos con rinitis alérgica. Además se estudió el efecto de la exposición natural al alérgeno sobre el atrapamiento aéreo y sobre el nivel del *plateau* a metacolina y a AMP en 18 pacientes con sensibilización alérgica a pólenes y manifestaciones de rinitis asociada o no a asma. Los resultados demostraban claramente que los cambios en la FVC inducidos por metacolina o por AMP no se correlacionaban significativamente con el nivel del *plateau* identificado con cada agonista. Además, y de manera similar a lo que se observó en la presente tesis doctoral, la exposición natural al alérgeno inducía incrementos significativos en el nivel del *plateau*, sin modificaciones concomitantes del grado de atrapamiento aéreo inducido por el agonista.

Los resultados del presente estudio confirman los obtenidos previamente por nuestro grupo¹⁸⁹ y sugieren que los cambios en la FVC inducidos por un agonista

broncoconstrictor directo o indirecto no pueden utilizarse con garantías para identificar la presencia o el grado de obstrucción al que se detecta la respuesta máxima.

Estos resultados contradicen los obtenidos previamente por Yu y colaboradores¹⁹⁵ y pueden aportarse varias explicaciones para explicar esta discordancia. Una de ellas pudiera ser la diferencia en las características de los pacientes estudiados. En nuestro estudio se seleccionaron pacientes adultos con rinitis alérgica asociada o no a asma intermitente y, como se ha indicado previamente, estos criterios de selección se utilizaron con la finalidad de facilitar la identificación de respuesta máxima en una proporción alta de los pacientes estudiados y de obtener suficiente variación de los valores del nivel del *plateau*. Por el contrario, Yu et al¹⁹⁵ estudiaron niños con asma. Sin embargo, no parece que este aspecto pueda ser relevante para explicar las diferencias entre los resultados obtenidos en cada uno de los estudios, pues los hallazgos fueron idénticos cuando únicamente analizamos los obtenidos en nuestros pacientes con asma. Otras razones para explicar las discrepancias entre los resultados obtenidos por Yu et al¹⁹⁵ y los nuestros pudieran ser las diferencias en el grado de actividad de la enfermedad en los pacientes estudiados. Nuestros pacientes parecían tener asma de menor severidad que los estudiados por Yu et al¹⁹⁵.

Independientemente de los motivos para explicar estos resultados discordantes, nuestro estudio aporta hallazgos similares para la relación entre el deterioro de la FVC y el nivel del *plateau* tanto para metacolina como para AMP. Esto confiere mayor consistencia a nuestros datos y demuestra claramente que esta diferencia en el comportamiento del atrapamiento aéreo y del nivel del *plateau* en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio es una característica de la población de pacientes con alergia a inhalantes y no una consecuencia del mecanismo mediante el que cada uno de los agonistas induce broncoconstricción. Sin embargo, para poder generalizar las conclusiones del presente estudio al respecto de los mecanismos que generan el atrapamiento aéreo y su relación con la respuesta máxima, los resultados del presente estudio deben confirmarse en pacientes sensibilizados a alérgenos diferentes de los pólenes.

VI. 2. d. **Diferencias en los efectos de la exposición alérgica sobre la respuesta a cada broncoconstrictor:**

En nuestro grupo de pacientes con alergia al polen, hemos comparado los efectos de la exposición natural a los alérgenos sobre la respuesta a metacolina con los observados sobre la respuesta a AMP.

Los resultados demuestran, por primera vez, que los cambios en la respuesta a los dos agonistas, inducidos por la exposición alérgica, son de magnitud similar tanto en lo que se refiere a la sensibilidad bronquial como al atrapamiento aéreo y a la meseta de respuesta máxima. Estos resultados sugieren que los dos broncoconstrictores son similarmente sensibles a los efectos de un estímulo pro-inflamatorio agudo y parecen sugerir que ambos tienen una sensibilidad similar para identificar inflamación aguda. Aparentemente esto parece discordante con la creencia de que AMP es un broncoconstrictor más sensible para identificar inflamación aguda que metacolina^{15,55}. Sin embargo, nuestro estudio no fue diseñado para identificar diferencias en el comportamiento de la respuesta a cada agonista tras el estímulo alérgico y, por este motivo, estos hallazgos no deben considerarse como definitivamente establecidos.

Por otra parte, otros datos obtenidos en el presente estudio sugieren que los dos broncoconstrictores no identifican exactamente las mismas alteraciones en las vías aéreas o en la relación entre las mismas y el parénquima pulmonar. Tanto en la exploración realizada durante la estación polínica como en la llevada a cabo en ausencia de exposición alérgica, se ha encontrado una correlación significativa entre los valores de PC₂₀ y de la meseta de respuesta máxima, obtenidos con cada agonista. Sin embargo, no pudo detectarse relación entre los deterioros de la FVC inducidos por cada broncoconstrictor en ninguno de los dos periodos del estudio. Además, los efectos de la exposición alérgica sobre la PC₂₀, nivel del *plateau* y valores de la pendiente de la FVC vs FEV₁, obtenidos con cada agonista, no estaban relacionados. Estos resultados sugieren que los cambios inducidos por el estímulo inflamatorio en la sensibilidad bronquial, límite para la broncoconstricción y atrapamiento en respuesta a agonistas directos son diferentes a los observados con un broncoconstrictor indirecto. En consecuencia, la información aportada por ambos tipos de broncoconstrictores no es redundante y puede ser complementaria.

VI. 3. Óxido nítrico exhalado

La identificación de alteraciones en los valores de óxido nítrico exhalado en diferentes procesos respiratorios representó una revolución y desde hace años se ha recomendado utilizar este parámetro para ampliar la información obtenida por otros métodos en pacientes con diferentes patologías respiratorias^{104,105}. En el caso del asma, diferentes estudios han encontrado concentraciones de óxido nítrico exhalado significativamente más altas que las obtenidas en población sana^{101,103}.

Los estudios iniciales se realizaron utilizando un flujo espiratorio de 50 ml/segundo, lo que aportaba información acerca de la concentración total de óxido nítrico generado en las vías aéreas intrapulmonares, pero no permitía identificar si este marcador en el aire exhalado procedía de los segmentos proximales del pulmón (vías aéreas proximales) o de la porción más distal del mismo (alveolos). Utilizando un modelo bicompartimental y cálculos matemáticos relativamente complejos es posible obtener una estimación de la concentración de óxido nítrico bronquial (J'_{awNO}) y del óxido nítrico alveolar (CA_{NO})^{74,81,83,84}.

Algunos datos experimentales sugieren que el óxido nítrico es un marcador de inflamación bronquial^{80,116}, mientras que otros no han podido confirmarlo¹²⁰. A pesar de esta discordancia, generalmente se acepta que la concentración de óxido nítrico en el aire exhalado es un reflejo directo del grado de inflamación bronquial. Al menos teóricamente, la determinación de la concentración de óxido nítrico bronquial y alveolar permitiría conocer la localización del proceso inflamatorio.

Estudios previos han encontrado que tanto los pacientes no asmáticos con rinitis alérgica polínica, como los individuos con rinitis polínica asociada a asma presentan concentraciones de óxido nítrico exhalado significativamente más elevadas que los sujetos sanos, cuando las determinaciones se realizan durante un periodo de exposición alérgica^{111,128,196,197} o bien en ausencia de exposición a los alérgenos^{111,196}. Nuestros resultados confirman estas observaciones. Además, nuestro estudio aporta la observación original de que los incrementos de óxido nítrico exhalado en esta población de pacientes polínicos ocurren como consecuencia del óxido nítrico generado en las vías

aéreas proximales, sin contribución del generado en las vías aéreas más distales y en los alveolos.

La presencia de concentraciones elevadas de óxido nítrico bronquial en nuestros pacientes con alergia al polen, incluso durante periodos de ausencia de exposición alérgica, sugiere que la información bronquial está presente incluso cuando los pacientes no están expuestos a los alérgenos relevantes. No obstante, nuestro estudio tiene algunas limitaciones que es necesario tener en cuenta. En primer lugar, nuestros pacientes con alergia al polen tenían una edad significativamente mayor que los controles sanos. Recientemente se ha comunicado¹⁹⁸ que la concentración de óxido nítrico exhalado medido a 50 ml/segundo y la concentración alveolar de óxido nítrico, pero no el óxido nítrico bronquial, aumentan a partir de la edad de 60 años en los individuos sanos. Por tanto, las diferencias en la concentración de óxido nítrico bronquial entre pacientes con alergia al polen y controles sanos no parecen deberse a las diferencias en la edad de las dos poblaciones. En segundo lugar, nuestro grupo control estaba integrado por individuos sanos. Es posible que la inclusión de un grupo control de sujetos no atópicos con asma o rinitis pudiera haber aumentado la relevancia de nuestras observaciones. Esto debe investigarse en futuros estudios. Finalmente, nuestros individuos sanos fueron estudiados en una única ocasión y, por este motivo, la reproductibilidad de nuestros resultados en esta población es desconocida.

La información obtenida en el presente estudio acerca de los efectos de la exposición natural a los alérgenos sobre el óxido nítrico bronquial y alveolar es absolutamente original y demuestra que la exposición natural a los alérgenos se asocia con un aumento selectivo en el óxido nítrico de origen bronquial. Además, aunque los cambios en la concentración de óxido nítrico bronquial se detectaban tanto en los pacientes con rinitis alérgica aislada como en aquellos que presentaban también asma, solo alcanzaron la significación estadística en el primer grupo de pacientes. Indudablemente, este resultado puede explicarse por un error tipo II, pues el grupo de pacientes con rinitis alérgica asociada a asma estuvo integrado por solo 9 individuos. Independientemente de esto, puesto que se ha hipotetizado que el óxido nítrico exhalado puede ser un marcador de inflamación bronquial¹⁹⁹, el aumento del óxido nítrico bronquial inducido por la exposición alérgica puede deberse al incremento de mediadores inflamatorios asociados con el aumento de la expresión de la sintasa del

óxido nítrico inducible. Por tanto, los resultados de nuestro estudio sugieren que el efecto pro-inflamatorio de la exposición alérgica en los pacientes sensibilizados se expresa predominantemente en las vías aéreas y que los aumentos de la intensidad de la inflamación bronquial inducidos por el alérgeno no son suficientes por sí mismos para inducir síntomas de asma.

Por otra parte, se ha sugerido que el modelo bicompartimental original desarrollado por Tsoukias y George⁷⁴ para identificar el origen alveolar y bronquial del óxido nítrico exhalado puede llevar a una sobreestimación de los valores de óxido nítrico alveolar. Por este motivo, los valores de óxido nítrico alveolar obtenidos en nuestro estudio se corrigieron utilizando el factor de corrección recomendado por Condorelli et al⁸¹ para los flujos utilizados. No obstante, durante el periodo de exposición al polen, el factor de corrección para la difusión axial retrógrada del óxido nítrico puede ser más pequeño debido a la broncoconstricción inducida por la exposición alérgica²⁰⁰ con la consiguiente reducción del área transversal disponible para la difusión retrógrada de óxido nítrico. Esto pudiera asociarse con una subestimación de las concentraciones de óxido nítrico alveolar durante la estación polínica y en consecuencia, con una mayor diferencia entre los dos periodos de estudio. Sin embargo, no creemos que nuestros hallazgos puedan haberse visto influidos por este factor técnico, pues los valores basales del FEV₁ en nuestros pacientes fueron similares durante los dos periodos de estudio.

Por otra parte, el análisis de la relación entre las concentraciones de óxido nítrico alveolar o bronquial y los diferentes parámetros que constituyen la hiperrespuesta bronquial, ha aportado algunos hallazgos particularmente relevantes y la posibilidad de aventurar algunas hipótesis. En el caso de metacolina, no ha podido identificarse ninguna relación entre la concentración de óxido nítrico bronquial ni alveolar y la sensibilidad bronquial, meseta de respuesta máxima o grado de atrapamiento aéreo inducido por el broncoconstrictor. Similares hallazgos se han obtenido cuando se ha analizado la relación entre el óxido nítrico alveolar y las características de la hiperrespuesta bronquial a AMP enumeradas previamente. Sin embargo, la concentración de óxido nítrico bronquial se correlacionaba negativamente con los valores de PC₂₀ AMP y positivamente con el grado de obstrucción al que se identificaba respuesta máxima, pero no con la intensidad del atrapamiento aéreo inducido por el

agonista. Estas correlaciones eran además (tabla 19, figuras 63 y 64) de magnitud similar en los dos periodos de estudio.

La relación significativa entre el óxido nítrico bronquial y la sensibilidad bronquial a AMP sugiere que este agonista identifica más fielmente que metacolina las alteraciones inflamatorias agudas. Esto confirma resultados comunicados previamente por otros autores^{60,112,121}. Sin embargo, la observación de una relación directa entre el óxido nítrico bronquial y el nivel de *plateau* obtenido con AMP es absolutamente original y aporta un argumento adicional para apoyar la hipótesis de que la respuesta a AMP está más directamente relacionada con la intensidad de la inflamación aguda que la respuesta a metacolina^{53,54,55}.

La ausencia de relación entre el óxido nítrico bronquial y el grado de atrapamiento aéreo inducido por AMP parece consistente con el mecanismo que induce las alteraciones fisiopatológicas que conducen a este último y que fundamentalmente consiste en un cierre precoz de las vías aéreas distales. Parece por tanto lógico que la intensidad de la inflamación de las vías aéreas proximales (identificadas mediante la concentración de óxido nítrico bronquial) tenga poco que ver con el grado de atrapamiento aéreo inducido por el agonista broncoconstrictor. Por el contrario, si la concentración de óxido nítrico alveolar es un reflejo de la intensidad de la inflamación localizada en las vías aéreas distales, parecería lógico esperar una correlación significativa entre los valores de óxido nítrico alveolar y el grado de atrapamiento aéreo inducido por AMP. Nuestro estudio demuestra que ambos parámetros no están relacionados y por tanto, parece razonable postular que la magnitud del atrapamiento aéreo inducido por los broncoconstrictores directos e indirectos no depende de la intensidad del proceso inflamatorio, sino que pudiera ser una característica intrínseca de las vías aéreas de cada paciente, sin relación con influencias ambientales evidentes.

Los resultados obtenidos del análisis de la relación entre las modificaciones del óxido nítrico y de la respuesta a los broncoconstrictores, inducidas por la exposición natural a los alérgenos, confirman la hipótesis de que la respuesta a AMP se relaciona más estrechamente con la intensidad de la inflamación bronquial que la respuesta a metacolina. En nuestros pacientes con alergia al polen se observó una correlación significativa entre los cambios inducidos por la exposición alérgica en el óxido nítrico

bronquial y en la sensibilidad bronquial y respuesta máxima a AMP. Por el contrario, ninguna de estas correlaciones era estadísticamente significativa para metacolina.

Además, y de forma parecida a lo que se observaba en el análisis transversal, no pudo demostrarse relación alguna entre las modificaciones del óxido nítrico alveolar o bronquial inducidas por la exposición alérgica y los cambios en la intensidad del atrapamiento aéreo inducido por los agonistas.

VI. 4. pH del condensado del aire exhalado

La determinación del pH de las muestras de condensado del aire exhalado se ha considerado también un marcador indirecto de la intensidad de la inflamación bronquial²⁰¹, pues este parámetro se correlaciona con el grado de inflamación eosinofílica de los pacientes con asma¹⁵².

En el presente estudio, no se ha conseguido identificar diferencias en el pH de las muestras de condensado del aire exhalado entre pacientes alérgicos al polen y sujetos sanos. Estos resultados son concordantes con los comunicados previamente por otros autores que indicaban que los individuos con asma leve presentaban valores del pH del condensado del aire exhalado similares a los detectados en individuos sanos^{148,152}. Por el contrario, el pH del condensado del aire exhalado obtenido en pacientes asmáticos que sufrían una exacerbación era significativamente más acidótico que el encontrado en los controles sanos¹⁴⁸. Parece por tanto, que la acidificación del pH del condensado del aire exhalado se observa durante las exacerbaciones del asma, pero que esta acidificación del pH no es una característica del asma en situación estable ni de la sensibilización a inhalantes.

Diferentes estudios han comunicado que, en los individuos con asma alérgica, las concentraciones de cisteinil-leucotrienos, prostaglandina D₂ y 8-isoprostano en el condensado del aire exhalado aumentan significativamente como consecuencia de la exposición alérgica en el laboratorio (prueba de provocación bronquial)^{163,202}. Muy recientemente Wan y colaboradores¹⁶⁶ objetivaron reducciones en los valores del pH del condensado del aire exhalado durante periodos de máxima exposición natural a ácaros del polvo doméstico, en pacientes sensibilizados a los mismos.

La identificación del pH del condensado del aire exhalado se ha propuesto como un marcador de inflamación bronquial^{148,152}. Además, los individuos alérgicos a inhalantes presentan incrementos del grado de inflamación bronquial cuando se encuentran expuestos a los alérgenos responsables^{203,204}. En consecuencia, parecía lógico postular que, en nuestros pacientes con alergia al polen, la exposición a los alérgenos responsables debería asociarse con una reducción significativa de los valores del pH del condensado del aire exhalado, como consecuencia del incremento del grado

de inflamación bronquial. Sin embargo, los resultados de dos estudios han coincidido en la observación de que, en pacientes con asma alérgica, la exposición al alérgeno relevante en el laboratorio (prueba de provocación bronquial) no inducía una acidificación significativa de los muestras de condensado del aire exhalado^{163,164}. En nuestro estudio hemos encontrado que, en los pacientes sensibilizados a inhalantes, la exposición natural a los alérgenos responsables se asociaba con incrementos significativos del pH del condensado del aire exhalado. Además, este incremento del pH del condensado como consecuencia de la exposición alérgica se observaba en los pacientes asmáticos, pero no en los individuos con rinitis alérgica sin asma. Estos resultados parecen evidentemente paradójicos, pero son concordantes con los encontrados por otros autores. En un grupo de pacientes con sospecha de asma ocupacional, Ferrazzoni y colaboradores¹⁶⁵, encontraron que el pH de las muestras de condensado del aire exhalado aumentaba significativamente durante la prueba de provocación bronquial con el alérgeno responsable (isocianatos); similares aumentos se observaron también tras una prueba de provocación simulada con aire. Indudablemente, estos hallazgos sugieren que los cambios en el pH del condensado del aire exhalado pudieran ser consecuencia de factores técnicos no controlados. Además, debe recordarse que los mecanismos que regulan el pH bronquial no están definitivamente claros y que la interpretación de los valores del pH de las muestras de condensado del aire exhalado es controvertida debido a dificultades técnicas^{205,206}. Más concretamente, existe un serio debate acerca de la posibilidad de que el pH del condensado del aire exhalado refleje el grado de acidificación de los bronquios o pueda estar decisivamente influido por las concentraciones de ácidos volátiles en la boca¹³⁸.

Resultados paradójicos fueron observados también en otro estudio realizado en nuestro centro y cuyos resultados se publicaron recientemente¹⁶⁰. En un grupo de pacientes con rinitis alérgica asociada o no a asma, sensibilizados al alérgeno mayor de *Alternaria alternata* (Alt a1), la inmunoterapia subcutánea con este alérgeno mayor se asociaba, al contrario de lo esperado, con una acidificación significativa de las muestras del condensado del aire exhalado, únicamente en el grupo tratado activamente. Además estos descensos significativos del pH de las muestras de condensado se observaban solo al cabo de 6 meses de tratamiento activo, pero no se mantenían al cabo de un año. Estos resultados parecen orientar también hacia factores técnicos (tiempo de procesado de las muestras, temperatura ambiental, contaminación por ácidos volátiles provenientes de la

boca o algún otro) no controlados que pueden estar influyendo decisivamente en el pH de las muestras. En el mismo sentido parecen hablar también algunas relaciones paradójicas o inconsistentes, que se han observado en nuestro estudio, entre el pH de las muestras o su modificación como consecuencia de la exposición alérgica y los cambios en los parámetros que identifican la hiperrespuesta bronquial a los agonistas directos o indirectos.

VII. Conclusiones

1. Los resultados de la presente tesis doctoral confirman que los pacientes con rinoconjuntivitis alérgica polínica asociada o no a asma presentan un incremento de la sensibilidad bronquial y de la respuesta máxima a agonistas directos e indirectos, cuando se comparan con individuos sanos. Además, el estudio aporta la observación original de un incremento del grado de atrapamiento aéreo inducido por ambos agonistas en los pacientes alérgicos.
2. Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que la exposición natural a los alérgenos inhalados, en los pacientes sensibilizados a los mismos, se asocia no solo con incrementos significativos de la sensibilidad bronquial a metacolina y a AMP, sino también con similares incrementos del límite para la broncoconstricción excesiva.
3. La exposición natural a los alérgenos inhalados no induce incrementos del grado de atrapamiento aéreo generado por los agonistas broncoconstrictores. Esto sugiere que los mecanismos que regulan la intensidad del atrapamiento aéreo en el curso de la broncoconstricción aguda son independientes de la inflamación generada por la exposición a los alérgenos inhalados.
4. La exposición natural a los alérgenos induce, en los pacientes sensibilizados a los mismos, una inflamación aguda localizada predominantemente en las vías aéreas proximales, más que en las vías aéreas distales del pulmón y zonas de intercambio gaseoso.
5. Los efectos de la exposición alérgica sobre el pH de las muestras de condensado del aire exhalado son inconsistentes y probablemente debidas, en gran medida, a la influencia de factores técnicos poco conocidos y mal controlados.

**VIII. Publicaciones y
comunicaciones a congresos
generadas por la presente Tesis
doctoral**

- ✓ Lopez V, Prieto L, Perez-Frances C, Barato D, Marin J. Natural pollen exposure increases the response plateau to adenosine 5'-monophosphate and bronchial but not alveolar nitric oxide in sensitized subjects. *Respiration*. **2012**. 83: 225-232.
- ✓ Lopez V, Prieto L, Perez C, Barato D, Marin J. Effects of allergen exposure on methacholine and AMP-induced air trapping in pollen-sensitive subjects. *Respiratory Medicine*. **2011**. 105: 856-863.
- ✓ Prieto L, Lopez V, Perez-Frances C, Barato D, Lucas A. The effect of natural allergen exposure on the maximal response plateau to adenosine 5'-monophosphate and on exhaled nitric oxide of alveolar and bronchial origin in subjects with pollen allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2010**. 125 (2): AB115.
- ✓ Lopez V, Prieto L, Perez-Frances C, Barato D, Lucas A. Allergen-induced changes in the level of plateau to adenosine 5'-monophosphate and alveolar and bronchial exhaled nitric oxide in subjects with pollen allergy. *Allergy*. **2010**. 65 (92): 545.
- ✓ Lopez V, Prieto L, Perez-Frances C, Barato D, Lucas A. Differences in the effect of natural pollen exposure on the maximal response plateau to adenosine 5'-monophosphate and on flow-independent nitric oxide exchange parameters between pollen-sensitive subjects with allergic rhinitis and subjects with allergic rhinitis plus asthma. *Allergy*. **2010**. 65 (92): 546.

IX. Bibliografía

1. Pawankar R, Baena-Cagnani CE, Bousquet J. State of world allergy report 2008: allergy and chronic respiratory diseases. *WAO journal*. **2008**. 1 (S6): S4-17.
2. Beasley R, Keil U, Von Mutius E. ISAAC steering committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet*. **1998**. 351: 1225-1232.
3. Bjorksten B. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC, phases 1 and 3 repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. **2006**. 368: 733-743.
4. Burney PG, Luczynska C, Chinn S, Jarvis D. The European Community Respiratory Health Survey. *European Respiratory Journal*. **1994**. 7: 954-960.
5. Quirce S. Asthma in Alergológica 2005. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. **2009**. 19(s2): 14-20.
6. Navarro A, Colas C, Antón E, Conde J, Dávila I, Dordal MT, Fernández-Parre B, Ibáñez MD, Lluch-Bernal M, Matheu V, Montoro J, Rondón C, Sánchez MC, Valero A. Epidemiology of allergic rhinitis in allergy consultations in Spain: Alergológica 2005. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. **2009**. 19 (s2): 7-13.
7. Ibáñez MD, Garde JM. Allergy in patients under fourteen years of age in Alergológica 2005. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. **2009**. 19 (s2): 61-68.
8. American Thoracic Society: Chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *American Review of Respiratory Disease*. **1962**. 85: 762-768.
9. World Health Organization. Epidemiology of chronic nonespecific respiratory diseases. *Bulletion of World Health Organization*. **1975**. 52: 251-259.
10. American Thoracic Society. Standarization of spirometry. *American Review of Respiratory Diseases*. **1987**. 136: 1285-1298.
11. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for asthma management and prevention. 2010. <http://www.ginasthma.org>
12. Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA). 2009. <http://www.gemasma.com/>
13. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA. Allergic Rhinitis and its impact in asthma (ARIA) 2008 update. *Allergy*. **2008**. 63(s86): 8-160.

14. Cockcroft DW. Bronchoprovocation methods. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. **2003**. 24 (1): 19-26.
15. Van Schoor J, Joos GF, Pauwells RA. Indirect bronchial hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, pharmacology and implications for clinical research. *European Respiratory Journal*. **2000**. 16: 514-533.
16. American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2000**. 161: 309-329.
17. European Respiratory Society Task Force. Indirect airway challenges. *European Respiratory Journal*. **2003**. 21: 1050–1068.
18. Prieto L, Gutiérrez V, Marín J. Relationship between airway sensitivity to adenosine 5' monophosphate and the shape of the concentration-response curve to methacholine in subjects with allergic rhinitis. *Respiratory Medicine*. **2001**. 95: 457-463.
19. Moore BJ, King GG, D'Yachkova Y, Ahmad HR, Paré PD. Mechanism of methacholine dose-response plateaus in normal subjects. *American Journal of Respiratory and Critical Care of Medicine*. **1998**. 158: 666-669.
20. Prieto L, Gutiérrez V, Morales C, Marín J. Differences in sensitivity, maximal response and position of the concentration-response curve to methacholine between asthmatics, patients with allergic rhinitis and healthy subjects. *Respiratory Medicine*. **1998**. 92: 88-94.
21. Boulet LP, Turcotte H, Carrier G, Boutet M, Laviolette. Increased maximal airway response to methacholine during seasonal allergic rhinitis in nonasthmatic subjects: relationships with airway wall thickness and inflammation. *European Respiratory Journal*. **1995**. 8: 913-921.
22. Busacker A, Newell JD, Keefe T, Hoffman EA, Granroth JC, Castro M, Fain S, Wenzel S. A multivariate analysis of risk factors for the air-trapping asthmatic phenotype as measured by quantitative CT analysis. *Chest*. **2009**. 135: 48-56.
23. Sorkness RL, Bleecker ER, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Curran-Everett D, Erzurum SC, Gaston BM, Israel E, Jarjour NN, Moore WC, Peters SP, Teague WG, Wenzel SE. Lung function in adults with stable but severe asthma: air trapping and incomplete reversal of obstruction with broncodilatation. *Journal of Applied Physiology*. **2008**. 104: 394-403.

24. Prieto L, López V, Catalán P, Barato D, Marín J. Modifications in forced vital capacity during adenosine monophosphate-induced bronchoconstriction in asthma: relationship with the response to methacholine and the effect of inhaled corticosteroids. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. **2009**. *102*: 393-399.
25. Cockcroft DW, Davis B. Direct and indirect challenges in the clinical assessment of asthma. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. **2009**. *103*: 363-370.
26. Spicuzza L, Bonfiglio C, Polosa R. Research applications and implications of adenosine in diseased airways. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. **2003**. *24* (8): 409-413.
27. Prieto L, Gutiérrez V, Liñana J, Marín J. Bronchoconstriction induced by inhaled AMP in subjects with allergic rhinitis. *European Respiratory Journal*. **2001**. *17*: 64-70.
28. Van Schoor J, Pauwels R, Joos G. Indirect bronchial hyper-responsiveness: the coming of age of a specific group of bronchial challenges. *Clinical and Experimental Allergy*. **2005**. *35*: 250-261.
29. Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR, Sheffer AL, Spector SL, Townley RG. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **1975**. *56*: 323-327.
30. Ryan G, Dolovich MB, Roberts RS, Frith PA, Juniper EF, Hargreave FE, Newhouse MT. Standardization of inhalation provocation tests: two techniques of aerosol generation and inhalation compared. *American Review of Respiratory Disease*. **1981**. *123*: 195-199.
31. Wubbel C, Asmus MJ, Stevens G, Chesrown SE, Hendeles L. Comparison of two American Thoracic Society-recommended methods. *Chest*. **2004**. *125*(2): 453-458.
32. Cockcroft DW, Marciniuk DD, Hurst TS, Cotton DJ, Laframboise KF, McNab BD, Skomro RP. Methacholine challenge: test shortening procedures. *Chest*. **2001**. *120*: 1857-1860.
33. Cockcroft DW, Davis BE, Todd DC, Smycniuk AJ. Methacholine challenge: comparison of two methods. *Chest*. **2005**. *127*: 839-844.
34. Todd DC, Davis BE, Hurst TS, Cockcroft DW. Dosimeter methacholine challenge: comparison of maximal vs. submaximal inhalations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2004**. *114*: 517-519.

35. Cockcroft DW, Davis BE. The bronchoprotective effect of inhaling methacholine by using total lung capacity inspirations has a marked influence on the interpretation of the test result. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2006**. *117*: 1244-1248.
36. Prieto, L, López V, Llusar R, Rojas R, Marín J. Differences in the response to methacholine between the tidal breathing and dosimeter methods: influence of the dose of bronchoconstrictor agent delivered to the mouth. *Chest*. **2008**. *134*: 699-703.
37. Prieto, L, Ferrer A, Domenech J, Pérez-Francés C. Effect of challenge method on sensitivity, reactivity, and maximal response to methacholine. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. **2006**. *97*: 175-181.
38. Segura C, Prieto, L, López V, Barato D, Pérez C, Marín J. Effect of challenge method on methacholine-induced changes in sensitivity and air trapping. *Respiratory Medicine*. **2011**. *105*: 37-43.
39. Piccillo G, Caponnetto P, Barton S, Russo C, Origlio A, Bonaccorsi A, Di Maria A, Oliveri C, Polosa R. Changes in airway hyperresponsiveness following smoking cessation: comparisons between methacholine and AMP. *Respiratory Medicine*. **2008**. *102*: 256-265.
40. Rutgers SR, Koeter GH, Van der Mark TW, Postma DS. Short-term treatment with budesonida does not improve hyperresponsiveness to adenosine 5'-monophosphate in COPD. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **1998**. *157*: 880-886.
41. Avital A, Springer C, Bar-Yishay E, Godfrey S. Adenosine, methacholine, and exercise challenges in children with asthma or pediatric chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. **1995**. *50*: 511-516.
42. Prieto L, Berto JM, Gutiérrez V, Tornero C. Effect of inhaled budesonide on seasonal changes in sensitivity and maximal response to methacholine in pollen-sensitive asthmatic subjects. *European Respiratory Journal*. **1994**. *7*: 1845-1851.
43. Prieto L, Gutiérrez V, Morales C. Maximal response plateau to methacholine as a reliable index for reducing inhaled budesonide in moderate asthma. *European Respiratory Journal*. **1999**. *13*: 1236-1244.
44. Prieto L, Esnal S, López V, Barato D, Rojas R, Marín J. Maximal response plateau to adenosine 5'-monophosphate in asthma. Relationship with the response to

- methacholine exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate ph. *Chest*. **2009**. *135*: 1521-1526.
45. Yoo Y, Kim DK, Yu J, Choi SH, Kim CK, Koh YY. Relationships of methacholine and AMP responsiveness with peak expiratory flow variability in children with asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. **2007**. *37*: 1158-1164.
46. Ribeiro M, Pereira CAC, Nery LE, Beppu OS, Silva COS. Methacholine vs. adenosine on intra and extrathoracic airway hyperresponsiveness in patients with cough variant asthma. *Allergy*. **2008**. *63*: 527-532.
47. Lougheed MD, Pearce-Pinto G, Klerk NH, Ryan G, Musk AW, James A. Variability of the plateau response to methacholine in subjects without respiratory symptoms. *Thorax*. **1993**. *48*: 512-517.
48. Moore BJ, Hilliam CC, Verburgt LM, Wiggs BR, Vedal S, Paré PD. Shape and position of the complete dose-response curve for inhaled methacholine in normal subjects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **1996**. *154*: 642-648.
49. James A, Lougheed D, Pearce-Pinto G, Ryan G, Musk B. Maximal airway narrowing in a general population. *American Review of Respiratory Disease*. **1992**. *146*: 895-899.
50. Alvarez MJ, Olaguibel JM, García BE, Rodríguez A, Tabar AI. Airway inflammation in asthma and perennial allergic rhinitis. Relationship with nonspecific bronchial responsiveness and maximal airway narrowing. *Allergy*. **2000**. *55*: 355-362.
51. Polosa R, Ciamarra I, Mangano G, Prosperini G, Pistorio MP, Vancheri C, Crimi N. Bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation markers in nonasthmatics with allergic rhinitis. *European Respiratory Journal*. **2000**. *15*: 30-35.
52. 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. *International Archives of Allergy and Immunology*. **2003**. *132*: 76-81.
53. Caruso M, Holgate ST, Polosa R. Adenosine signalling in airways. *Current Opinion in Pharmacology*. **2006**. *6*: 251-256.

54. Polosa R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*. **2002**. 20: 488–496.
55. Holgate ST. The identification of the adenosine A2b receptor as a novel therapeutic target in asthma. *British Journal of Pharmacology*. **2005**. 145: 1009-1015.
56. De Meer G, Heederik D, Postma DS. Bronchial responsiveness to AMP and methacholine differ in their relationship with airway allergy and baseline FEV1. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2002**. 165: 327-331.
57. Choi SH, Kim DK, Yu J, Yoo Y, Koh YY. Bronchial responsiveness to methacholine and adenosine 5'-monophosphate in young children with asthma: their relationship with blood eosinophils and serum eosinophil cation protein. *Allergy*. **2007**. 62: 1119-1124.
58. Van den Berge M, Meijer RJ, Kerstjens HAM, Reus DM, Koeter GH, Kauffman HF, Postma DS. PC20 adenosine 5'-monophosphate is more closely associated with airway inflammation in asthma than PC20 methacholine. *American Journal of Respiratory and Critical Care of Medicine*. **2001**. 163: 1546-1550.
59. Van den Berge M, Kerstjens HAM, Reus DM, Koeter GH, Kauffman HF, Postma DS. Provocation with adenosine 5'-monophosphate, but not methacholine, induces sputum eosinophilia. *Clinical and Experimental Allergy*. **2004**. 34. 71-76.
60. 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. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2001**. 164: 2107–2113.
61. Prosperini G, Rajakulasingam K, Cacciola RR, Spicuzza L, Rorke S, Holgate ST, Di Maria GU, Polosa R. Changes in sputum counts and airway hyperresponsiveness after budesonide: monitoring anti-inflammatory response on the basis of surrogate markers of airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2002**. 110(6): 855-861.
62. Van den Berge M, Kerstjens HAM, Meijer RJ, De Reus DM, Koeter GH, Kauffman HF, Postma DS. 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. *American Journal of Respiratory and Critical Care of Medicine*. **2001**. 164: 1127-1132.

-
63. Taylor DA, Jensen MW, Kanabar V, Engelstatter R, Steinijs VW, Barnes PJ, O'Connor BJ. A dose-dependent effect of the novel inhaled corticosteroid ciclesonide on airway responsiveness to AMP in asthmatic patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care of Medicine*. **1999**. *160*: 237-243.
64. Van Velzen E, Van den Bos JW, Benckhuijsen AW. 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*: 582-584.
65. Grootendorst DC, Dahlen SE, Van den Bos JW, Duiverman EJ, Veselic-Charvat M, Vrijlandt EJLE, O'Sullivan S, Kumlin M, Sterk PJ, Roldaan AC. Benefits of high altitude allergen avoidance in atopic adolescents with moderate to severe asthma, over and above treatment with high dose inhaled steroids. *Clinical and Experimental Allergy*. **2001**. *31*: 400-408.
66. Kim DK, Choi SH, Yu J, Yoo Y, Koh YY. Bronchial responsiveness to methacholine and AMP in atopic and non-atopic preschool children with recurrent wheezing. *Clinical and Experimental Allergy*. **2007**. *37*: 15-21.
67. Prieto L, Berto JM, Lopez M, Peris A. Modifications of PC20 and maximal degree of airway narrowing to methacholine after pollen season in pollen sensitive asthmatic patients. *Clinical Experimental Allergy*. **1993**. *23*: 172-178.
68. Prieto L, Uixera S, Gutiérrez V, Bruno L. Modifications of airway responsiveness to AMP and ENO concentrations after pollen season in subjects with pollen induced rhinitis. *Chest*. **2002**. *122*: 940-947.
69. Prieto L, Gutiérrez V, Berto JM, Camps B. Sensitivity and maximal response to methacholine in perennial and seasonal allergic rhinitis. *Clinical Experimental Allergy*. **1996**. *26*: 61-67.
70. Prieto L, López M, Bertó JM, Peris A. Modification of concentration-response curves to inhaled methacholine after the pollen season in subjects with pollen induced rinitis. *Thorax*. **1994**. *49*: 711-713.
71. Duarte J, Espinosa RF, Díaz S, Sánchez G, Lee Eng VE, Mijangos J, Barragán JA. Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. *Medicina Interna de Méjico*. **2008**. *24* (6): 397-406.
72. Stewart L, Katial R. Exhaled nitric oxide. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. **2007**. *27*: 571-586.

-
73. Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasemann H, Pavord ID, Ratjen F, Silkoff PE, Taylor DR, Zamel N. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. *Chest*. **2010**. *138*: 682-692.
 74. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *Journal of Applied Physiology*. **1998**. *85*: 653-666.
 75. Hemmingsson T, Linnarsson D, Gambert R. Novel hand-held device for exhaled nitric oxide-analysis in research and clinical applications. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*. **2004**. *18*: 379-387.
 76. Alving K, Janson C, Nordvall L. Performance of a new hand-held device for exhaled nitric oxide measurement in adults and children. *Respiratory Research*. **2006**. *7*: 67-74.
 77. Chen W, Purohit A, Barning C, Casset A, Blay F. Niox and Niox Mino: comparison of exhaled NO in grass pollen allergic adult volunteers. *Allergy*. **2007**. *62*: 571-572.
 78. Menzies D, Nair A, Lipworth BJ. Portable exhaled nitric oxide measurement: comparison with the “gold standard” technique. *Chest*. **2007**. *131*: 410-414.
 79. George SC, Hogman M, Permutt S, Silkoff PE. Modeling pulmonary nitric oxide Exchange. *Journal of Applied Physiology*. **2004**. *96*: 831-839.
 80. Lehtimäki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, Hahtola P, Jarvenpää R, Koivula T, Turjanmaa V, Moilanen E. Extended exhaled NO measurement differentiates between alveolar and bronchial inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2001**. *163*: 1557-1561.
 81. Condorelli P, Shin HW, Aledia AS, Silkoff PE, and George SC. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant flow exhalations and an axial diffusion model. *Journal of Applied Physiology*. **2007**. *102*: 417-425.
 82. Kerckx Y, Michilis A, Van Muylem A. Airway contribution to alveolar nitric oxide in healthy subjects and stable asthma patients. *Journal of Applied Physiology*. **2008**. *104*: 918-924.
 83. Verbanck S, Kerckx Y, Schuermans D, Bisschop C, Guernard H, Naeije R, Vincken W, Van Muylem A. The effect of posture-induced changes in peripheral nitric oxide uptake on exhaled nitric oxide. *Journal of Applied Physiology*. **2009**. *106*: 1494-1498.

-
84. Kerckx Y, Van Muylem A. Axial distribution heterogeneity of nitric oxide airway production in healthy adults. *Journal of Applied Physiology*. **2009**. *106*: 1832-1839.
 85. Caballero Martínez F, Plaza V, Quirce Gancedo S, Fernández Benítez M, Gómez Ruíz F, López Viña A, Molina París J, Quintano Jiménez JA, Soler Vilarrasa R, Villa Asensi JR, Balmes Estrada S. Valoración externa de las recomendaciones de la GEMA2009 por un panel multiprofesional de expertos en asma. *Archivos de bronconeumología*. **2010**. *46* (8): 411-419.
 86. Official statement of the American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children—1999. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **1999**. *160*: 2104–2117.
 87. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2005**. *171*: 912–930.
 88. Malinovsky A, Janson C, Holm L, Nordvall L, Alving K. Basal and induced NO formation in the pharyngo-oral tract influences estimates of alveolar NO levels. *Journal of Applied Physiology*. **2009**. *106*: 513-519.
 89. Malinovsky A, Janson C, Holmkvist T, Norback D, Merilainen P, Hogman M. Effect of smoking on exhaled nitric oxide and flow-independent nitric oxide exchange parameters. *European Respiratory Journal*. **2006**. *28*. 339-345.
 90. Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *European Respiratory Journal*. **1995**. *8*: 295–297.
 91. Deykin A, Massano AF, Coulston E, Reason JM, Israel E. Exhaled nitric oxide following repeated spirometry or repeated plethysmography in healthy individuals. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2000**. *161*: 1237-1240.
 92. Silkoff PE, Wakita S, Chatkin J, Ansarin K, Gutiérrez C, Caramori M, McClean P, Slutsky AS, Zamel N, Chapman KR. Exhaled nitric oxide after β 2-agonist inhalation and spirometry in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **1999**, *159*: 940-944.

93. Gabriele C, Pijneburg MWH, Mousti F, Hop W, Bakker ME, de Jouge JC. The effect of spirometry and exercise on exhaled nitric oxide in asthmatic children. *Pediatric Allergy Immunology*. **2005**. 16: 243-247.
94. Tee AKH, Hui KP. Effect of spirometric maneuver, nasal clip and submaximal inspiratory effort on measurement of exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Chest*. **2005**. 127: 131-134.
95. Garriga T, Labrador-Horrillo M, Guillem M, Luengo O, Eserverri JL, Guilarte M, Marin AM, Cardona V. Spirometric maneuvers and inhaled salbutamol do not affect exhaled nitric oxide measurements among patients with allergic asthma. *Respiration*. **2012**. 83: 239-244.
96. Kisson N, Duckworth LJ, Blake KV, Murphy SP, Lima JJ. Effect of β 2-agonist treatment and spirometry on exhaled nitric oxide in healthy children and children with asthma. *Pediatric Pulmonology*. **2002**. 34: 203-208.
97. Prieto L, Ruiz-Jiménez L, Marin J. The effect of spirometry on bronchial and alveolar nitric oxide in subjects with asthma. *Journal of Astma*. **2013**. 50: 623-628.
98. Pendharkar S, Mehta S. The clinical significance of exhaled nitric oxide. *Canadian Respiratory Journal*. **2008**. 15 (2): 99-106.
99. Girgis RE, Gugnani MK, Abrams J, Mayes MD. Partitioning of alveolar and conducting airway nitric oxide in scleroderma lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2002**. 165: 1587-1591.
100. Delclaux C, Mahut B, Zerah-Lancner F, Delacourt C, Laoud S, Cherqui D, Duvoux C, Mallat A, Harf A. Increased nitric oxide output from alveolar origin during liver cirrhosis versus bronchial source during asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2002**. 165: 332-337.
101. Narang I, Ersu R, Wilson NM, Bush A. Nitric oxide in chronic airway inflammation in children: diagnostic use and pathophysiological significance. *Thorax*. **2002**. 57: 586-589.
102. Shoemark A, Wilson R. Bronchial and peripheral airway nitric oxide in primary ciliary dyskinesia and bronchiectasis. *Respiratory Medicine*. **2009**. 103: 700-706.
103. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *European Respiratory Journal*. **1993**. 6: 1368-1370.
104. Olin AC, Alving K, Toren K. Exhaled nitric oxide: relation to sensitization and respiratory symptoms. *Clinical and Experimental Allergy*. **2004**. 34: 221-226.

105. Ekroos H, Rouhos A, Pallasaho P, Karjalainen J, Sarna S, Sovijarvi ARA. Equally elevated concentrations of exhaled nitric oxide in nonatopic and low-sensitized atopic asthmatics. *Respiratory Medicine*. **2009**. *103*: 152-158.
106. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *The New England Journal of Medicine*. **2005**. *352* (21): 2163-2173.
107. Szeffler SJ, Mitchell H, Sorkness CA et al. Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for innercity adolescents and young adults: a randomized controlled trial. *Lancet*. **2008**. *372*: 1065-1072.
108. Petsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ, Li AM, Turner C, Kynaston JA, Chang AB. A systematic review and meta-analysis: Tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax*. **2012**. *67*: 199-208.
109. Lehtimäki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, Turjanmaa V, Moilanen E. Inhaled fluticasone decreases bronchial but not alveolar nitric oxide output asthma. *European Respiratory Journal*. **2001**. *18*: 635-639.
110. Berry M, Hargadon B, Morgan A, Shelley M, Richter J, Shaw D, Green R.H, Brightling C, Wardlaw AJ, Pavord ID. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. *European Respiratory Journal*. **2005**. *25*: 986-991.
111. Henriksen AH, Sue-Chu M, Lingaas Holmen T, Langhammer A, Bjermer L. Exhaled and nasal NO levels in allergic rhinitis: relation to sensitization, pollen season and bronchial hyperresponsiveness. *European Respiratory Journal*. **1999**. *13*: 301-306.
112. Prieto L, Gutiérrez V, Uixera S, Bruno L. Concentrations of exhaled nitric oxide in asthmatics and subjects with allergic rhinitis sensitized to the same pollen allergen. *Clinical and Experimental Allergy*. **2002**. *32*: 1728-1733.
113. Bergmann-Hug K, Wirth R, Henseler M, Helbing A, Pichler WJ, Schnyder B. Effect of natural seasonal pollen exposure and repeated nasal allergen provocations on elevation of exhaled nitric oxide. *Allergy*. **2009**. *64*: 1629-1634.
114. Scott M, Raza A, Karmaus W, Mitchell F, Grundy J, Kurukulaaratchy RJ, Arshad SH, Roberts G. Influence of atopy and asthma on exhaled nitric oxide in an unselected birth cohort study. *Thorax*. **2010**. *65*: 258-262.

-
115. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *European Respiratory Journal*. **2000**. *16*: 1008-1015.
116. 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*: 91-95.
117. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, Taylor R. Diagnosing asthma, comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2004**. *169*: 473–478.
118. Mahut B, Delclaux C, Tillie-Leblond I, Gosset P, Delacourt C, Zerah-Lancner F, Harf A, Blic J. Both inflammation and remodeling influence nitric oxide output in children with refractory asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2004**. *113*: 252-256.
119. Payne DNR, Adcock IM, Wilson NM, Oates T, Scallan M, Bush A. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2001**. *164*: 1376–1381.
120. Lim S, Jatakanon A, Meah S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderate severe asthma. *Thorax*. **2000**. *55*: 184-188.
121. Van den Toorn LM, Prins JB, Overbeek SE, Hoogsteden HC, Jongste JC. Adolescents in clinical remission of atopic asthma have elevated exhaled nitric oxide levels and bronchial hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2000**. *162*: 953–957.
122. Singh D, Richards D, Knowles RG, Schwartz S, Woodcock A, Langley S, O'Connor BJ. Selective inducible nitric oxide synthase inhibition has no effect on allergen challenge in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2007**. *176*: 988–993.
123. Dupont LJ, Rochette F, Demedts MG, Verleden GM. Exhaled nitric oxide correlates with airway hyperresponsiveness in steroid-naive patients with asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **1998**. *157*: 894-898.

124. 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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **1997**. 99 (1): 58-64.
125. Khoo SM, Lim TK. Effects of inhaled versus systemic corticosteroids on exhaled nitric oxide in severe acute asthma. *Respiratory Medicine*. **2009**. 103: 614-620.
126. 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: 798-805.
127. Horvath I, Barnes PJ. Exhaled monoxides in asymptomatic atopic subjects. *Clinical and Experimental Allergy*. **1999**. 29: 1276-1280.
128. Martin U, Bryden K, Devoy M, Howarth P. Increased levels on exhaled nitric oxide during nasal and oral breathing in subjects with seasonal rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **1996**. 97 (3): 768-772.
129. Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2002**. 110 (1): 28-34.
130. Kharitonov SA. Exhaled markers of inflammatory lung disease: ready for routine monitoring? *Swiss Med WKLY*. **2004**. 134: 175-192.
131. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest*. **2006**. 130: 1541-1546.
132. Liu J, Thomas PS. Exhaled breath condensate as a method of sampling airway nitric oxide and other markers of inflammation. *Medical Science Monitor*. **2005**. 11: 53-62.
133. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ. ATS/ERS Task Force. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *European Respiratory Journal*. **2005**. 26: 523-548.
134. Balbi B, Pignatti P, Corradi M, Baiardi P, Bianchi L, Brunetti G, Radaeli A, Moscato G, Mutti A, Spanevello A, Malerba M. Bronchoalveolar lavage, sputum and exhaled clinically relevant inflammatory markers: values in healthy adults. *European Respiratory Journal*. **2007**. 30: 769-781.
135. Soyer OU, Dizdar EA, Keskin O, Lilly C, Kalayci O. Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. *Allergy*. **2006**. 61: 1016-1018.

-
136. Prieto L, Ferrer A, Palop J, Domenech J, Llusar R, Rojas R. Differences in EBC pH measurements between samples obtained with two commercial devices. *Respiratory Medicine*. **2007**. *101*: 1715-1720.
 137. Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A, Bunyan D, Hom S, Nguyen A, Hunt JF. Normative data for pH of EBC. *Chest*. **2006**. *129*: 426-430.
 138. Effros RM, Casaburi R, Su J, Dunning M, Torday J, Biller J, Shaker R. The effects of volatile salivary acids and bases on exhaled breath condensate pH. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2006**. *173*: 386-392.
 139. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, Nguyen TA, Smith A, Urban P, Hom S, Gaston B, Hunt J. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *European Respiratory Journal*. **2003**. *22*: 889-894.
 140. Calušić AL, Varnai VM, Macan J. Acute effects of smoking and food consumption on breath condensate pH in healthy adults. *Experimental Lung Research*. **2011**. *37*(2): 92-100.
 141. Papaioannou AI, Koutsokera A, Tanou K, Kiropoulos TS, Tsilioni I, Oikonomidi S, Liadaki K, Pournaras S, Gourgoulianis KI, Kostikas K. The acute effect of smoking in healthy and asthmatic smokers. *European Journal of Clinical Investigation*. **2010**. *40* (2): 103-109.
 142. Bodini A, D'Orazio C, Peroni DG, Corradi M, Zerman L, Folesani G, Assael BM, Boner AL, Piacentini GL. IL-8 and pH values in exhaled condensate after antibiotics in cystic fibrosis children. *International Journal of Immunopathology Pharmacology*. **2007**. *20* (3): 467-472.
 143. Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Dette F, Pinkenburg O, Schmid S, Jorres RA, Vogelmeier C, Bals R. Ambient temperature impacts on pH of exhaled breath condensate. *Respirology*. **2010**. *15*: 155-159.
 144. Griese M, Noss J, Von Bredow C. Protein pattern of exhaled breath condensate and saliva. *Proteomics*. **2002**. *2*: 690-696.
 145. Simpson JL, Wood LG, Gibson PG. Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva. *Clinical and Experimental Allergy*. **2005**. *35*: 1180-1185.

146. Wells K, Vaughan J, Pajewski TN, Hom S, Ngamtrakulpanit L, Smith A, Nguyen A, Turner R, Hunt J. Exhaled breath condensate pH assays are not influenced by oral ammonia. *Thorax*. **2005**. *60*: 27-31.
147. Sidorenko GI, Zborovskii EI, Levina DI. Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function). *Terapevticheskii Arkhiv Journal*. **1980**. *52*: 65–68.
148. Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TAE, Gaston B. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2000**. *161*: 694-699.
149. Ngamtrakulpanit L, Yu Y, Adjei A, Amoah G, Gaston B, Hunt J. Identification of intrinsic airway acidification in pulmonary tuberculosis. *Global Journal of Health Science*. **2010**. *2*(1): 106-110.
150. Macnee W, Rennard SI, Hunt JF, Edwards LD, Miller BE, Locantore NW, Tal-Singer R. Evaluation of exhaled breath condensate pH as a biomarker for COPD. *Respiratory Medicine*. **2011**. *105* (7): 1037-1045.
151. Antus B, Barta I, Kullmann T, Lazar Z, Valyon M, Horvath I, Csiszer E. Assessment of exhaled breath condensate pH in exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a longitudinal study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2010**. *182* (12):1492-1497.
152. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2002**. *165*: 1364-1370.
153. Coop C, Hagan LL, Dice JP. Exhaled breath condensate pH in the evaluation of asthma. *Allergy and Asthma Proceedings*. **2008**. *29*: 51-54.
154. Nicolau NC, Lowe LA, Murray CS, Woodcock A, Simpson A, Custovic A. Exhaled breath condensate pH and childhood asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2006**. *174*: 254-259.
155. Kostikas K, Papaioannou AI, Tanou K, Giouleka P, Koutsokera A, Minas M, Papiris S, Gourgoulis KI, Taylor DR, Loukides S. Exhaled NO and exhaled breath condensate pH in the evaluation of asthma control. *Respiratory Medicine*. **2011**. *105* (4): 526-32.

-
156. Brunetti L, Francavilla R, Tesse R, Strippoli A, Polimeno L, Loforese A, Miniello VL, Armenio L. Exhaled breath condensate pH measurement in children with asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology*. **2006**. *17*: 422-427.
157. Tanou K, Koutsokera A, Kiropoulos TS, Maniati M, Papaioannou AI, Georga K, Zarogiannis S, Gourgoulialis KI, Kostikas K. Inflammatory and oxidative stress biomarkers in allergic rhinitis: the effect of smoking. *Clinical and Experimental Allergy*. **2009**. *39*: 345-353.
158. Hunt J. Exhaled breath condensate pH. Reflecting acidification of the airway at all levels. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2006**. *173*: 366-367.
159. Jackson AS, Sandrini A, Campbell C, Chow S, Thomas PS, Yates DH. Comparison of biomarkers in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2007**. *175*: 222-227.
160. Prieto L, Palacios R, Aldana D, Ferrer A, Pérez-Francés C, López V, Rojas R. Effect of allergen-specific immunotherapy with purified Alt a1 on AMP responsiveness, exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate pH: a randomized double blind study. *Allergy Asthma and Clinical Immunology*. **2010**. *6*: 27-38.
161. Carraro S, Folesani G, Corradi M, Zanconato S, Gaston B, Baraldi E. Acid-base equilibrium in exhaled breath condensate of allergic asthmatic children. *Allergy*. **2005**. *60*: 476-481.
162. Ojoo JC, Mulrennan SA, Kastelik JA, Morice AH, Redington AE. Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and cystic fibrosis. *Thorax*. **2005**. *60*: 22-26.
163. Ono E, Mita H, Taniguchi M, Higashi N, Tsuburai T, Hasegawa M, Miyazaki E, Kumamoto T, Akiyama K. Increase in inflammatory mediator concentrations in exhaled breath condensate after allergen inhalation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2008**. *122*: 768-773.
164. Rolla G, Malinovsky A, Badiu I, Heffler E, Petrarulo M, Bucca C, Brussino L. The increase in exhaled NO following allergen challenge is not associated with

- airway acidification. *European Journal of Clinical Investigation*. **2011**. 41 (4): 411-416.
165. Ferrazzoni S, Scarpa MC, Guarnieri G, Corradi M, Mutti A, Maestrelli P. Exhaled nitric oxide and breath condensate pH in asthmatic reactions induced by isocyanates. *Chest*. **2009**. 136: 155-162.
166. Wan GH, Yan DC, Tung TH, Tang CS, Liu CH. Seasonal changes in endotoxin exposure and its relationship to exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate pH levels in atopic and healthy children. *Plos One*. **2013**. 8 (6): e66785.
167. Cap P, Maly M, Pehal F, Pelikan Z. Exhaled leukotrienes and bronchial responsiveness to methacholine in patients with seasonal allergic rhinitis. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. **2009**. 102: 103-109.
168. Leung TF, Wong GWK, Ko FWS, Lam CWK, Fok TF. Clinical and atopic parameters and airway inflammatory markers in childhood asthma: a factor analysis. *Thorax*. **2005**. 60: 822-826.
169. Ayuntamiento de Valencia, Regiduría de Sanidad, Servicio de Sanidad. Calendario polínico de Valencia. <http://www.valencia.es/ayuntamiento/aerobiologia.nsf>.
170. American Thoracic Society. Quality assurance in pulmonary function laboratories. *American Review Respiratory Disease*. **1986**. 134: 625-627.
171. American Thoracic Society. Standardization of spirometry. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*. **1995**. 152: 1107-1136.
172. American Thoracic Society. Standardization of spirometry. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*. **1987**. 137: 1285-1294.
173. Quanjer PH, editor. Standardized lung function testing. *Bull European Physiopathology Respiration*. **1983**. 19 (suppl 5): 1-95.
174. Prieto L, Marin J. Methacholine inhalation challenge: practical consequences of using duplicate spiograms after each concentration. *Annals Allergy*. **1993**. 70: 487-490.
175. Cockcroft DK, Murdock KY, Mink JT. Determination of histamine PC20: comparison of linear and logarithmic interpolation. *Chest*. **1983**. 84: 505-506.
176. Sterk PJ, Daniel EF, Zamel N, Hargreave FE. Limited bronchoconstriction to methacholine using partial flow-volume curves in nonasthmatic subjects. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*. **1985**. 132: 272-277.

-
177. Corsico A, Pellegrino R, Zoia MC, Barbaro L, Brasasco V, Cerveri I. Effects of inhaled steroids on methacholine-induced bronchoconstriction and gas trapping in mild asthma. *European Respiratory Journal*. **2000**. *15*: 687-692.
178. Sterk PJ, Bel EH. Bronchial hyperresponsiveness: the need for a distinction between hypersensitivity and excessive airway narrowing. *European Respiratory Journal*. **1989**. *2*: 267-274.
179. Moreno RH, Hogg JC, Pare PP. Mechanics of airway narrowing. *American Review of Respiratory Disease*. **1986**. *133*: 1171-1180.
180. Toyran M, Bakirtas A, Dogruman F, Turktas I. Airway inflammation and bronchial hyperreactivity in steroid naïve children with intermittent and mild persistent asthma. *Pediatric Pulmonology*. **2013**. DOI: 10.1002/ppul.22810.
181. Cockcroft DW, Ruffin RE, Dolovich J, Hargreave FE. Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clinical and Experimental Allergy*. **1977**. *7*: 503-513.
182. Cartier A, Thomson NC, Frith PA, Roberts R, Hargreave FE. Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway caliber. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **1982**. *70*: 170-177.
183. Cockcroft DW, Swystun VA, Bhagat R, Kalra S. Salmeterol and airway response to allergen. *Canadian Respiratory Journal*. **1997**. *4*: 37-40.
184. Cockcroft DW, O'Byrne PM, Swystun VA, Bhagat R. Regular use of inhaled albuterol and the allergen-induced late asthmatic response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **1995**. *96*: 44-49.
185. Van Schayck CP, Closserman SGM, Hofland ID, Van Herwaarden CL, Van Weel C. How detrimental is chronic use of bronchodilators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease?. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **1995**. *151*: 1317-1319.
186. Prieto L, Gutierrez V, Pérez-Francés C, Badiola C, Lanuza A, Bruno L, Ferrer A. Effect of fluticasone propionate-salmeterol therapy on seasonal changes in airway responsiveness and exhaled nitric oxide levels in patients with pollen-induced asthma. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. **2005**. *95*: 452-461.

187. Woolcock AJ, Salome CM, You K. The slope of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects. *American Review of Respiratory Disease*. **1984**. *130*: 71-75.
188. Towuley RG, Ryo UY, Kolotkin BM, Kang B. Bronchial sensitivity to methacholine in current and former asthmatic and allergic rhinitis patients and control subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **1975**. *56*: 429-442.
189. Prieto L, López V, Pérez-Francés C, Marín J. Maximal degree of airway narrowing induced by methacholine and adenosine monophosphate: relationship with the decrease in forced vital capacity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. **2010**. *105*: 418-424.
190. Mullen JB, Wiggs BR, Wright JL, Hogg JC, Pare PD. Nonspecific airway reactivity in cigarette smokers. Relationship to airway pathology and baseline lung function. *American Review of Respiratory Disease*. **1986**. *133*: 120-125.
191. Lim TK, Ang SM. Excessive bronchoconstriction induced by histamine and effects of volume history in patients with bronchial asthma. *Respirology*. **1997**. *2*: 107-112.
192. Macklem PT. A theoretical analysis of the effect of airway smooth muscle load on airway narrowing. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **1996**. *153*: 83-89.
193. Gibbons WJ, Sharma A, Loughheed D, Macklem PT. Detection of excessive bronchoconstriction in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **1996**. *153*: 582-589.
194. Ding DJ, Martin JG, Macklem PT. Effects of lung volume on maximal methacholine-induced bronchoconstriction in normal humans. *Journal of Applied Physiology*. **1987**. *62*: 1324-1330.
195. Yu J, Yoo Y, Kim DK, Koh YY. The relationship between Δ FVC (% fall in FVC at the PC20 dose of methacholine) and the maximal airway response in mild asthmatics. *Allergy and Asthma Proceedings*. **2005**. *26*: 366-372.
196. Gratziou C, Rovina N, Lignos M, Vogiatzis I, Roussos C. Exhaled nitric oxide in seasonal allergic rhinitis: influence of pollen season and therapy. *Clinical and Experimental Allergy*. **2001**. *31*: 409-416.

-
197. Gratziou C, Lignos M, Dassiou M, Roussos C. Influence of atopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. *European Respiratory Journal*. **1999**. *14*: 897-901.
 198. Gelb AF, George SC, Camacho F, Fraser C, Taylor CF, Shakkottai S. Increased nitric oxide concentrations in the small airway of normal subjects. *Chest*. **2011**. *139*: 368-375.
 199. Barnes PJ, Kharitonov SA. Exhaled nitric oxide: a new lung function test. *Thorax*. **1996**. *51*: 233-237.
 200. Verbanck S, Kerckx Y, Schuermans D, Vincken M, Paira M, Van Muylem A. Effect of airways constriction on exhaled nitric oxide. *Journal of Applied Physiology*. **2008**. *104*: 909-911.
 201. Kostikas K, Koutsokera A, Papiris S, Gourgoulianis KI, Loukides S. Exhaled breath condensate in patients with asthma: implications for application in clinical practice. *Clinical and Experimental Allergy*. **2008**. *38*: 557-565.
 202. Brussino L, Badiu I, Sciascia S, Bugiani M, Heffler E, Guida G, Malinovschi A, Bucca C, Rolla G. Oxidative stress and airway inflammation after allergen challenge evaluated by exhaled breath condensate analysis. *Clinical and Experimental Allergy*. **2010**. *40*: 1642-1647.
 203. Sulakvelidze I, Inman MD, Rerecich T, O'Byrne PM. Increases in airway eosinophils and interleukin-5 with minimal bronchoconstriction during repeated low-dose allergen challenge in atopic asthmatics. *European Respiratory Journal*. **1998**. *11*: 821-827.
 204. Chakir J, Laviolette M, Turcotte H, Boutet M, Boulet LP. Cytokine expression in the lower airways of nonasthmatic subjects with allergic rhinitis: influence of natural allergen exposure. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2000**. *106*: 904-910.
 205. Kullmann T, Barta I, Lazar Z, Szili B, Barat E, Valyon M, Kollai M, Horvath I. Exhaled breath condensate pH standardized for CO₂ partial pressure. *European Respiratory Journal*. **2007**. *29*: 496-501.
 206. Kullmann T, Barta I, Antus B, Valyon M, Horvath I. Environmental temperature and relative humidity influence exhaled breath condensate pH. *European Respiratory Journal*. **2008**. *31*: 474-475.