

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**Facultad de Medicina y Odontología**  
**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología**  
**290E PEDIATRÍA**



**HIPERRESPUESTA BRONQUIAL Y  
MARCADORES DE INFLAMACIÓN EN  
AIRE EXHALADO EN PACIENTES CON  
DISCINESIA CILIAR PRIMARIA**

**Memoria para optar al grado de doctor presentada por:**

María Teresa Romero Rubio

Dirigida por:

Prof. Dra. Amparo Escribano Montaner  
Prof. Dr. Miguel Armengot Carceller  
Prof. Dr. Luis Prieto Andrés

**Valencia, 2015**





Amparo Escribano Montaner, Doctora en Medicina y Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICO:

Que la tesis doctoral titulada **“Hiperrespuesta bronquial y marcadores de inflamación en aire exhalado en pacientes con discinesia ciliar primaria”** ha sido realizada íntegramente por María Teresa Romero Rubio bajo mi supervisión. Dicho trabajo está concluido y, en mi criterio, reúne todos los méritos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 15 de octubre de 2015.

Fdo. Prof. Dra. Amparo Escribano Montaner









Jesús Luis Prieto Andrés, Doctor en Medicina y Profesor Titular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICO:

Que la tesis doctoral titulada **“Hiperrespuesta bronquial y marcadores de inflamación en aire exhalado en pacientes con discinesia ciliar primaria”** ha sido realizada íntegramente por María Teresa Romero Rubio bajo mi supervisión. Dicho trabajo está concluido y, en mi criterio, reúne todos los méritos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 15 de octubre de 2015.

Fdo. Prof. Dr. Jesús Luis Prieto Andrés



*A mis padres, porque gracias a ellos he podido llegar hasta aquí.*



## Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de muchas personas a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Dra. Amparo Escribano Montaner: su entrega, ilusión y constancia para integrar labor asistencial e investigadora han sido el espejo en el que mirarme para poder concluir este trabajo. Gracias por las palabras de ánimo en los momentos más difíciles, por el compromiso con el desarrollo de esta tesis y por las experiencias y oportunidades que he vivido a partir de ella.

Al Dr. Miguel Armengot Carceller: por su colaboración en la remisión de pacientes, por sus buenos consejos y por compartir conmigo parte de su conocimiento sobre la discinesia ciliar primaria, siempre con una sonrisa y una palabra amable. Gracias de corazón.

Al Dr. Jesús Luis Prieto Andrés: por su rigor científico y su inestimable apoyo para la elaboración de los resultados estadísticos. A todo el personal del laboratorio del Servicio de Alergia del Hospital Peset, porque gracias a ellos he aprendido que el trabajo en un laboratorio es un engranaje de muchas personas, en el que todas son importantes.

A la enfermera del servicio de Alergia, Rocío Rojas: por explicarme las técnicas, por ayudarme siempre a preparar el material, por hacerme sentir de la familia en un lugar que era ajeno para mí. Allá donde estés: GRACIAS. Esta tesis siempre llevará una parte tuya...

A los pacientes con discinesia ciliar primaria: porque en todo momento han mostrado su plena disposición a colaborar en este estudio, animando incluso a sus familiares y amigos para que intervinieran como voluntarios. Y por supuesto, a todos mis amigos y familiares que han participado de forma desinteresada integrando parte del grupo control.

A Enrique España, documentalista del Hospital de Denia, por facilitarme toda la bibliografía. A mi compañera Soraya Borraz, cuyos consejos y sugerencias han sido imprescindibles para poder finalizar esta tesis.

A mis padres, por ser siempre mi respaldo y apoyo en cada una de las fases de elaboración de este trabajo. A mi hermano y a Isabel por solventar siempre mis dudas informáticas, aunque fuera a horas intempestivas.

Por supuesto a Fran, mi marido: gracias por su apoyo incondicional, por creer siempre en mí, por darme siempre el ánimo que necesito, por su paciencia, su cariño y ayuda constante.

Y gracias a Jaime, mi hijo, que ha vivido sus tres primeros años de vida al compás de esta tesis: por tu sonrisa y tu felicidad contagiosa, por ser mi norte y recordarme siempre qué es lo más importante. Gracias y disculpas por el tiempo que la elaboración de esta tesis te haya podido quitar...

Y por último a todos aquellos que de un modo u otro han colaborado en la elaboración de este trabajo y a los que, involuntariamente, pueda haber olvidado mencionar.

Valencia, septiembre de 2015.

# Índice



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Discinesia ciliar primaria: generalidades .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Concepto, historia e incidencia .....	3
1.1.2. Manifestaciones clínicas .....	8
1.1.3. Diagnóstico .....	18
1.1.3.1. Métodos de despistaje o <i>screening</i> .....	19
1.1.3.2. Métodos diagnósticos de confirmación .....	25
1.1.3.2.1. Microscopía electrónica .....	26
1.1.3.2.2. Función ciliar .....	31
1.1.3.2.3. Genética .....	33
1.1.3.2.4. Limitaciones diagnósticas .....	35
1.1.4. Tratamiento, pronóstico y nuevas perspectivas .....	38
<b>1.2. Hiperrespuesta bronquial .....</b>	<b>41</b>
1.2.1. Generalidades .....	41
1.2.2. Hiperrespuesta bronquial en sujetos sanos .....	45
1.2.3. Hiperrespuesta bronquial en la discinesia ciliar primaria y su relación con bronquiectasias .....	46
<b>1.3. Marcadores de inflamación en vía aérea .....</b>	<b>50</b>
1.3.1. Óxido nítrico exhalado .....	50
1.3.1.1. Generalidades .....	50
1.3.1.2. Óxido nítrico exhalado en la discinesia ciliar primaria .....	58
1.3.2. Condensado de aire exhalado .....	62
1.3.2.1. Generalidades .....	62
1.3.2.2. pH del condensado de aire exhalado en individuos sanos .....	64
1.3.2.3. pH del condensado de aire exhalado en enfermedades respiratorias .....	65
1.3.2.4. Condensado de aire exhalado en la discinesia ciliar primaria .....	66

<b>2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....</b>	<b>71</b>
<b>3. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>75</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>79</b>
<b>4.1. Objetivos primarios .....</b>	<b>79</b>
<b>4.2. Objetivos secundarios .....</b>	<b>79</b>
<b>5. PACIENTES Y MÉTODOS .....</b>	<b>83</b>
<b>5.1. Consideraciones sobre el tamaño de la muestra .....</b>	<b>83</b>
<b>5.2. Pacientes .....</b>	<b>84</b>
5.2.1. Pacientes con discinesia ciliar primaria .....	84
5.2.2. Grupo control .....	86
<b>5.3. Diseño del estudio .....</b>	<b>86</b>
<b>5.4. Métodos .....</b>	<b>89</b>
5.4.1. Pruebas cutáneas con inhalantes .....	89
5.4.2. Espirometría basal .....	90
5.4.3. Pruebas de provocación bronquial .....	91
5.4.3.1. Descripción por pasos de la provocación bronquial con metacolina .....	94
5.4.3.2. Descripción por pasos de la provocación bronquial con adenosina 5'-monofosfato .....	97
5.4.3.3. Expresión de la respuesta .....	101
5.4.4. Determinación de óxido nítrico nasal, alveolar y bronquial .....	102
5.4.5. Obtención de condensado de aire exhalado y determinación del pH .....	106
<b>5.5. Análisis estadístico .....</b>	<b>108</b>
<b>5.6. Aspectos éticos .....</b>	<b>109</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>113</b>
<b>6.1. Características generales de la muestra .....</b>	<b>113</b>
<b>6.2. Pruebas de provocación bronquial .....</b>	<b>117</b>
6.2.1. Situación funcional pulmonar basal antes de la exploración con cada agonista .....	117
6.2.2. Respuesta a la provocación bronquial con metacolina .....	119
6.2.3. Respuesta a la provocación bronquial con AMP .....	121

<b>6.3. Marcadores de inflamación en la vía aérea .....</b>	<b>124</b>
6.3.1. Determinación de óxido nítrico .....	124
6.3.1.1. Vía aérea superior: óxido nítrico nasal ( $\text{NO}_n$ ) .....	124
6.3.1.2. Vía aérea inferior: óxido nítrico exhalado (FENO), bronquial ( $J'_{awNO}$ ) y alveolar ( $CA_{NO}$ ) .....	125
6.3.1.3. Valores de $\text{NO}_n$ , FENO, $J'_{awNO}$ y $CA_{NO}$ en la población no atópica .....	128
6.3.2. Estudio del pH del CAE .....	131
<b>6.4. Correlaciones .....</b>	<b>132</b>
6.4.1. Relación entre respuesta bronquial a agonistas y óxido nítrico .....	133
6.4.2. Relación entre respuesta bronquial a agonistas y pH del CAE .....	137
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>141</b>
<b>7.1. Consideraciones generales de la muestra .....</b>	<b>142</b>
<b>7.2. Hiperrespuesta bronquial en la DCP .....</b>	<b>149</b>
<b>7.3. Marcadores de inflamación en el aire exhalado .....</b>	<b>159</b>
7.3.1. Óxido nítrico .....	159
7.3.1.1. Óxido nítrico nasal .....	159
7.3.1.2. Óxido nítrico alveolar y bronquial .....	161
7.3.2. pH del condensado de aire exhalado .....	168
<b>7.4. Correlación entre HRB y marcadores de inflamación ....</b>	<b>170</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>179</b>
<b>9. TRABAJOS DERIVADOS DE LA PRESENTE</b>	
<b>TESIS DOCTORAL .....</b>	<b>185</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>191</b>



## ABREVIATURAS

<b>DCP:</b>	Discinesia ciliar primaria
<b>ERS:</b>	<i>European Respiratory Society</i>
<b>ATS:</b>	<i>American Thoracic Society</i>
<b>FQ:</b>	Fibrosis quística
<b>FEV<sub>1</sub>:</b>	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
<b>TC:</b>	Tomografía computerizada
<b>LCI:</b>	<i>Lung clearance index</i>
<b>ICSI:</b>	Inyección intracitoplásmica de esperma
<b>DHSV:</b>	<i>Digital high speed video</i>
<b>NO:</b>	Óxido nítrico
<b>NOS:</b>	NO sintasa
<b>NO<sub>n</sub>:</b>	Óxido nítrico nasal
<b>PRMC:</b>	<i>Pulmonary radioaerosol mucociliary clearance</i>
<b>ORL:</b>	Otorrinolaringología
<b>ME:</b>	Microscopía electrónica
<b>HRB:</b>	Hiperrespuesta bronquial
<b>FVC:</b>	Capacidad vital forzada
<b>PC<sub>20</sub>:</b>	Sensibilidad bronquial
<b>AMP:</b>	Adenosina 5'-monofosfato
<b>SENP:</b>	Sociedad Española de Neumología Pediátrica
<b>SEPAR:</b>	Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
<b>FENO:</b>	Fracción exhalada de óxido nítrico
<b>CA<sub>NO</sub>:</b>	Óxido nítrico alveolar
<b>J'aw<sub>NO</sub>:</b>	Óxido nítrico bronquial
<b>CAE:</b>	Condensado de aire exhalado

<b>EPOC:</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>LT:</b>	Leucotrieno
<b>IL:</b>	Interleuquina
<b>IP:</b>	Isoprostano
<b>CRF:</b>	Capacidad residual funcional
<b>CEIC:</b>	Comité de Ética e Investigación Clínica
<b>IR:</b>	Índice de reactividad

# Introducción



## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1. Discinesia ciliar primaria: generalidades

---

#### 1.1.1. Concepto, historia e incidencia

El síndrome de discinesia ciliar primaria (DCP) o síndrome del cilio inmóvil es un trastorno hereditario autosómico recesivo, que se caracteriza por una alteración congénita de la estructura y/o función de los cilios y flagelos móviles, que genera una disminución o ausencia de transporte mucociliar (1). Incluye un grupo de enfermedades en las que se pueden dar varias circunstancias: que los cilios respiratorios sean inmóviles, que el movimiento ciliar sea discinético e ineficaz, o que no haya cilios (aplasia celular), siendo esta última situación muy infrecuente (2).

Todas las alteraciones congénitas ciliares se conocen actualmente como **ciliopatías**. La afectación de los **cilios primarios, inmóviles o sensoriales** se manifiesta en la mayoría de órganos y sistemas, pudiendo producir polidactilia, malformaciones craneofaciales, atresia biliar, alteraciones en sistema nervioso central, retinosis pigmentaria, hipoacusia o riñón poliquistico. La DCP sería la ciliopatía que afecta a los **cilios móviles** (1, 2, 15) y éste es el término habitualmente utilizado por la *European Respiratory Society* (ERS) (1) y la

*American Thoracic Society* (ATS) para referirse a la enfermedad (3). Se caracteriza porque la inmovilidad y la discinesia conducen a una ausencia de transporte mucociliar y estasis de secreciones respiratorias, dando lugar fundamentalmente a infecciones de las vías respiratorias altas y bajas desde el nacimiento. Ciliopatías móviles e inmóviles no se asocian habitualmente en el mismo paciente.

Las consecuencias de la alteración de la motilidad ciliar están presentes ya en la época fetal, pues la disfunción de los **cilios nodales** durante la embriogénesis da lugar a que los órganos internos se sitúen al azar, por lo que hasta el 50% de los pacientes pueden tener distintos grados de heterotaxia y *situs inversus*. Además, la alteración de la motilidad ciliar se manifiesta también en el flagelo de los espermatozoides, los cilios de la trompa de Falopio y de las cavidades del líquido cefalorraquídeo. Consecuentemente, la mayoría de los varones afectos de DCP son infértiles, las mujeres muestran una fertilidad disminuida y en escasos pacientes hay hidrocefalia. En la DCP los problemas respiratorios son los que marcan el pronóstico y calidad de vida de los pacientes (1).

La primera descripción sobre la asociación de *situs inversus* y bronquiectasias fue realizada por Siewert en 1904 (4). En 1933, Kartagener describió un grupo de pacientes que presentaba la asociación de bronquiectasias, sinusitis y *situs inversus* (5). Desde este momento la enfermedad es conocida como “síndrome de Kartagener”. Posteriormente, se describe la relación entre éste y la esterilidad

masculina en varones adultos, y en 1975 Afzelius y Pedersen relacionan sus rasgos clínicos con alteraciones en la ultraestructura de los cilios y espermatozoides (6, 7). Elliasson describe en 1977 un grupo de pacientes que presenta manifestaciones clínicas compatibles con el síndrome (bronquiectasias y esterilidad), junto a una alteración en la ultraestructura de los cilios sin que se asocie *situs inversus* (8). Por ello, a partir de 1980 se propone el término de “síndrome del cilio inmóvil” como vocablo general para hacer referencia a la enfermedad, reservándose el de “síndrome de Kartagener” para definir la tríada de sinusitis, bronquiectasias y *situs inversus*, presente únicamente en un 50% de los pacientes (9, 10).

En 1988, Rossman y Newhouse proponen una nomenclatura más específica para la enfermedad, al demostrar que los síntomas pueden ser debidos no sólo a que los cilios sean completamente inmóviles, sino a que tengan un movimiento discinético e ineficaz. Por ello, empieza a emplearse el término “discinesia ciliar primaria” en lugar de “síndrome del cilio inmóvil” (11).

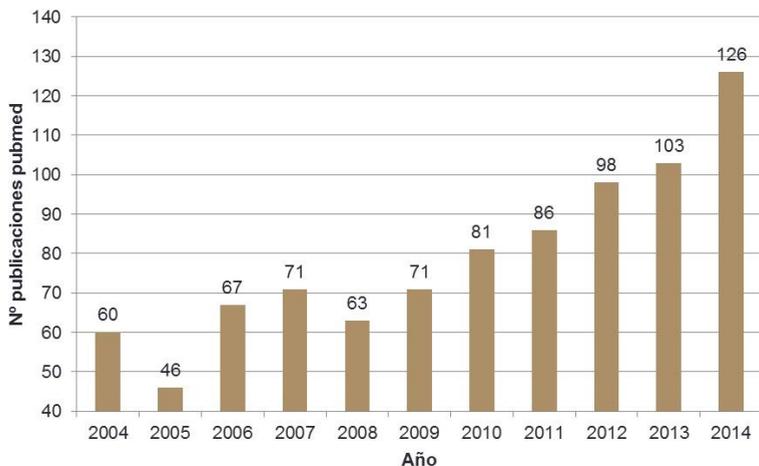
Desde finales de los años 80 se demuestra que el transporte mucociliar en las vías respiratorias puede alterarse no sólo por un defecto ultraestructural de los cilios, sino también por infecciones víricas o bacterianas recurrentes, inhalación de sustancias y por algunos fármacos, dando lugar a un estasis de secreciones que pueden reproducir el cuadro clínico de la DCP (12). Además, la persistencia de infecciones recurrentes puede dar lugar a cambios inflamatorios en

la mucosa respiratoria que acaban alterando de forma transitoria la ultraestructura ciliar (13). Por ello, se comienza a emplear la denominación “discinesia ciliar secundaria” para referirse a la alteración transitoria del transporte mucociliar, en contraposición al de “discinesia ciliar primaria”, que hace referencia a su carácter hereditario y permanente (14).

Recientes avances en videomicroscopía electrónica de alta resolución y especialmente en genética, han abierto aún más el espectro de la enfermedad, por lo que probablemente la denominación DCP quede incompleta para incluir todas las posibles variantes.

En los últimos 10 años se ha producido un extraordinario aumento en la producción científica sobre esta enfermedad. El buscador de artículos médicos más utilizado en la comunidad médica internacional (PubMed) ofrecía, en 2004, tan sólo 60 artículos sobre DCP, mientras que en 2014 se publicaron 126. Es decir, en 10 años se ha duplicado la literatura científica sobre esta entidad (figura 1).

La DCP es una enfermedad hereditaria, de carácter autosómico recesivo, que afecta a ambos sexos y cuya prevalencia real es difícil de estimar, debido al poco conocimiento que existía hasta hace pocos años sobre ella, a los retrasos en su diagnóstico, o a la carencia -en algunos países-, de las técnicas que permiten confirmar el diagnóstico en los casos sospechosos (1).



**Figura 1:** Evolución de las publicaciones sobre DCP (2004-2014).

El estudio de prevalencia más importante en Europa fue realizado por la *European Respiratory Society Task Force* y publicado en 2010 (15). Un total de 223 centros de 26 países europeos recogieron más de 1.000 pacientes diagnosticados de DCP antes de los 20 años de edad. La prevalencia fue muy variable, con frecuencias más altas en Chipre (111 casos por cada millón de habitantes entre 5-14 años, lo que equivale a uno de cada 10.000 niños), Dinamarca (46 casos por millón) o Suiza (47 casos por millón), que corresponden aproximadamente a uno de cada 20.000 niños. En España, la prevalencia estimada fue de 20,5 casos por cada millón de habitantes entre 5-14 años, lo que equivale aproximadamente a 1 de cada 30.000 niños. Por otra parte, en Estados Unidos se estima en 1/20.000-60.000 habitantes (16).

### 1.1.2. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la DCP están presentes desde el nacimiento y se caracterizan por una evolución crónica y expresión multisistémica, ya que afectan a todos los órganos en los que los cilios ejercen su función (tabla 1).

Localización	Signos y síntomas
<b>Pulmón</b>	Distrés respiratorio neonatal Bronquitis recurrentes Bronquiectasias
<b>Oído</b>	Otitis media secretora Otitis media crónica Hipoacusia transmisión
<b>Senos paranasales</b>	Sinusitis Aplasia de senos
<b>Aparato reproductor</b>	Varones: infertilidad, azoospermia Mujeres: infertilidad, embarazos ectópicos
<b>Lateralidad orgánica</b>	<i>Situs inversus</i> Heterotaxia
<b>Otros (raros)</b>	Hidrocefalia Retinosis pigmentaria Riñón poliquístico

**Tabla 1:** Manifestaciones clínicas de la DCP por órganos y sistemas (2).

**a) Vía respiratoria superior:**

Los cilios están presentes a lo largo de toda la mucosa del aparato respiratorio, desde el epitelio nasal, oído medio y trompa de Eustaquio a los bronquiolos terminales. Por tanto, la alteración del aclaramiento mucociliar se manifiesta en todo él y se expresa de forma constante a nivel del tracto respiratorio superior, produciendo:

1. Rinitis, que suele manifestarse desde el nacimiento, inicialmente con hipersecreción mucosa clara, que se torna espesa y purulenta con la sobreinfección.
2. Sinusitis, tanto aguda como crónica, que es frecuente en la niñez tardía, adolescencia y etapa adulta, llegando incluso a producir aplasia o hipoplasia de los senos paranasales y anosmia.
3. Otitis de repetición, que en los niños se expresa como otitis media secretora y se complica con otitis medias agudas recurrentes. Los problemas óticos mejoran con la edad aunque nunca llegan a desaparecer, siendo bastante común en la edad adulta la hipoacusia de transmisión, así como distintas formas clínicas de otitis media crónica (17).
4. Poliposis nasal, que se produce en aproximadamente el 18% de los pacientes (18) y a edades más avanzadas que la fibrosis quística (FQ). Son pólipos de origen neutrofilico y secundarios a la infección crónica.

**b) Vía respiratoria inferior:**

Los síntomas respiratorios de vías bajas comienzan en la época neonatal: hasta un 75% de los pacientes con DCP han tenido distrés respiratorio al nacimiento, con o sin neumonía, de causa no justificada, requiriendo incluso soporte respiratorio y oxigenoterapia (19, 20). Se ha postulado que los cilios tendrían un importante papel en el aclaramiento del líquido amniótico del pulmón del recién nacido, por lo que su alteración podría dar lugar a una taquipnea persistente o a una neumonía neonatal (21). Por ello, la coexistencia de distrés respiratorio neonatal con heterotaxia y *situs inversus* debe hacer sospechar la existencia de una DCP.

En el lactante y niño pequeño, la estasis de secreciones produce infecciones respiratorias de repetición, siendo frecuente que precisen varios ciclos de antibiótico a lo largo del año. La tos productiva crónica suele ser la norma, por lo que tanto la DCP como la bronquitis bacteriana persistente han de ser tenidas en cuenta en el diagnóstico diferencial de una tos crónica que no responde a los tratamientos habituales (22). La persistencia de secreciones podría ocasionar sibilancias recurrentes, lo que puede hacer complicado diferenciar el cuadro de un asma de difícil control (23).

Las infecciones respiratorias recurrentes acaban dando lugar a bronquiectasias que, aunque clásicamente se consideraban propias de estadios evolucionados de la enfermedad en la vida adulta, se ha demostrado que pueden estar presentes en edades tempranas, incluso

antes de los 3 años de edad (24). Por ello es fundamental un elevado índice de sospecha para intentar frenar su progresión.

Las infecciones respiratorias suelen estar causadas por *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. A diferencia de los pacientes con FQ, la infección por *Pseudomonas aeruginosa* es menos frecuente y suele aparecer en la edad adulta, en aquellos que ya tienen bronquiectasias (25). Las infecciones por micobacterias no tuberculosas están presentes en el 10% de los casos (19). La monitorización microbiológica mediante cultivos cadenciales de esputo es fundamental para la detección precoz de estas infecciones, permitiendo la instauración precoz de antibióticos que rompan el círculo vicioso “infección-inflamación”, que es el que conduce al desarrollo de las bronquiectasias.

Los estudios realizados sobre **función pulmonar** en la DCP son limitados y con un escaso número de pacientes. Clásicamente se ha considerado que en la DCP se produce un lento deterioro de la función pulmonar con la edad, aunque más leve que el identificado en la FQ (26), calculándose una pérdida de un 0,8% del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>) por cada año de vida, frente al 3,5% anual en la FQ (19). Sin embargo, en un estudio realizado en 2004 con seguimiento de 74 pacientes durante 30 años y más de 2.000 espirometrías analizadas, se ofrecen datos sorprendentes (27): sólo un 34% de los pacientes mostraba un deterioro de FEV<sub>1</sub> mayor del 10%, mientras que un 57% mantenían valores estables e incluso, en un 10%,

el FEV<sub>1</sub> se incrementaba más del 10%. Frente a esto, en otro estudio más reciente y con mayor número de pacientes (158 niños y adolescentes) se objetiva que el 35% ya tienen un FEV<sub>1</sub> anormal desde su primera espirometría (25). Estos datos, aparentemente discordantes, podrían explicarse por la limitación del tamaño muestral, ya que al tratarse de una enfermedad con baja prevalencia es difícil conseguir muestras amplias, al contrario de lo que ocurre en enfermedades más comunes, como el asma. Es necesario considerar también que el diagnóstico definitivo de la enfermedad es complejo y en algunas series pueden haberse incluido pacientes que realmente no sufren una DCP. En la tabla 2 se resumen los datos de la función pulmonar en niños escolares con DCP publicados hasta el momento.

Estudio	N	Edad media (años)	FVC media (% teórico)	FEV <sub>1</sub> medio (% teórico)
Ellerman, <i>ERJ</i> 1997 (26)	12	9,5	85	72
Hellincks, <i>EJP</i> 1998 (28)	11	15	83	64
Noone, <i>AJRCCM</i> 2004 (19)	31	8	-	85
Santamaria, <i>Chest</i> 2008 (29)	14	11,6	109	103
Marthin, <i>AJRCCM</i> 2010 (27)	10	< 6	-	59-79

**Tabla 2:** Función pulmonar en niños escolares con DCP.

En preescolares los datos son aún más escasos, debido a la difícil cooperación y necesidad de un equipo experimentado. Tan sólo existe una publicación en 2008 en la que se describen tres niños diagnosticados a los 6, 29 y 33 meses, a los que se les realiza una espirometría a los 4 años. Aunque la muestra es muy pequeña, la función pulmonar ya estaba afectada a esta temprana edad (24).

Los hallazgos más comúnmente encontrados en la tomografía computerizada de alta resolución torácica (TC) son: atrapamiento aéreo, bronquiectasias, atelectasias, patrón en mosaico y bronquiolitis difusa (30). La región más afectada suele ser el lóbulo medio, seguido de la llingula y lóbulos inferiores. Los lóbulos superiores suelen estar menos afectados, al contrario de lo que ocurre en la FQ. El *pectum excavatum* puede encontrarse hasta en 9% de los pacientes.

Se ha demostrado que la TC torácica puede mostrar alteraciones de la estructura pulmonar de forma muy precoz, incluso en niños con valores espirométricos normales (“falsa sensación de seguridad” del FEV<sub>1</sub>) (31). Por ello, actualmente se considera que la espirometría es insuficiente para valorar la progresión del daño pulmonar. Aunque la realización de una TC de forma periódica (cada 3-5 años) se ha incorporado de forma rutinaria al seguimiento de estos pacientes en los centros de referencia, sería necesario encontrar métodos más inocuos de evaluación de la progresión del daño pulmonar, debido a los problemas de irradiación acumulada que la TC puede originar. En este sentido se está investigando, entre otros, el valor del índice de

aclaramiento pulmonar (*lung clearance index, LCI*), que de forma similar a lo que ocurre en la FQ sería más sensible que el FEV<sub>1</sub> para detectar cambios precoces en la TC torácica (32, 33).

**c) Infertilidad:**

Dado que la ultraestructura del flagelo de los espermatozoides es similar a la de los cilios, la mayoría de varones afectados de DCP tienen el 100% de espermatozoides inmóviles y son infértiles (8). La alteración de la motilidad del epitelio de los conductos deferentes puede producir además azoospermia obstructiva, dificultando aún más la reproducción (34). Asimismo, se han descrito casos de tumores testiculares (seminomas) en pacientes con síndrome de Kartagener (35). Pese a ello, existen casos de paternidad espontánea en varones afectados, ya que es posible que algunos espermatozoides conserven parcialmente su movilidad (36). En cualquier caso, los avances en medicina reproductiva mediante inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) han permitido superar parte de estas dificultades reproductivas (37).

En las mujeres la fertilidad también puede verse afectada por la alteración de la motilidad de los cilios de las trompas de Falopio, que dificulta la implantación del embrión una vez que el óvulo ha sido fecundado (38). La frecuencia de problemas reproductivos no es tan elevada como en los varones, aunque sí que existe riesgo de embarazos ectópicos (39).

#### **d) *Situs inversus y heterotaxia***

La disfunción ciliar durante la embriogénesis ocasiona alteraciones en la disposición de los órganos internos. Se denomina *situs inversus* a la posición anómala “en espejo” que ocurre aproximadamente en 50% de los pacientes con DCP. La heterotaxia es una forma incompleta de *situs inversus* en la que sólo algunos órganos tienen su disposición alterada, siendo el corazón el órgano más frecuentemente afectado. En estos casos, hasta 6% de los pacientes tienen algún tipo de malformación congénita cardiaca asociada (defectos atriales o atrioventriculares, tetralogía de Fallot, coartación de aorta...), por lo que tras el diagnóstico siempre se debe realizar una ecocardiografía comprobatoria (40).

El *situs inversus* no siempre va ligado a patología ciliar; pese a que 50% de los pacientes con DCP lo presentan, sólo 25% de las personas con esta anomalía tienen DCP (18).

La heterotaxia puede afectar también a otros órganos y condicionar malposición del hígado (pudiendo dar lugar a atresia biliar), malrotación intestinal, asplenia, o poliesplenia. La disfunción esplénica puede aumentar el riesgo de infección por microorganismos capsulados (18).

#### **e) *Otros síntomas***

Los cilios móviles no sólo están presentes en el aparato respiratorio y reproductor, sino que se localizan en otros órganos y sistemas dando lugar a unas manifestaciones clínicas distintas, aunque menos frecuentes que las anteriormente descritas. La alteración de la

motilidad ciliar en los plexos coroideos puede ocasionar hidrocefalia en un pequeño porcentaje de pacientes (41, 42). Como ya se ha expresado en líneas precedentes, las ciliopatías “no móviles” pueden también relacionarse con retinosis pigmentaria (43) o enfermedad poliquística renal, siendo frecuente en esta última la coexistencia con bronquiectasias, por alteración a ambos niveles de la funcionalidad ciliar (44).

En la tabla 3 se ofrece un resumen de los síntomas más sugestivos de la DCP según la edad.

Edad	Síntomas
<b>Neonatos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Distrés respiratorio neonatal en recién nacidos a término, sin causa obvia (taquipnea persistente, atelectasias, neumonía neonatal)</li> <li>- Rinorrea persistente desde el nacimiento</li> <li>- <i>Situs inversus</i></li> <li>- Heterotaxia</li> </ul>
<b>Lactantes y escolares</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tos crónica productiva persistente</li> <li>- Atelectasias/bronquiectasias con afectación de lóbulo medio</li> <li>- Asma de difícil control</li> <li>- Otitis media secretora</li> <li>- Otorrea persistente tras timpanotomía</li> </ul>
<b>Adolescentes y adultos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bronquiectasias “idiopáticas”, o no-fibrosis quística</li> <li>- Esputo persistente mucopurulento</li> <li>- Pansinusitis crónica</li> <li>- Hipoacusia de transmisión</li> <li>- Esterilidad</li> </ul>

**Tabla 3:** Manifestaciones clínicas de la DCP por edad.

### 1.1.3. Diagnóstico

Según establece el documento de consenso sobre DCP creado por la *Task Force* de la ERS en 2009 (1), para llegar a un diagnóstico de confirmación es necesaria la existencia de un cuadro clínico compatible combinado con la demostración de la alteración funcional y/o estructural ciliar mediante técnicas diagnósticas específicas: videomicroscopia de alta resolución y velocidad (*digital high speed video -DHSV-*) que mida la batida ciliar y/o microscopía electrónica que valore la ultraestructura ciliar. En los casos dudosos puede ser útil el cultivo celular. En los últimos años está creciendo el interés por el papel de la genética, que posiblemente sea crucial para confirmar el diagnóstico en el futuro.

Aunque los rasgos clínicos de la DCP puedan parecer característicos, sólo la mitad de los casos se diagnostican antes de los 5 años de edad, e incluso un tercio de los pacientes no se diagnostica hasta la vida adulta (15, 45). Las razones de este retraso diagnóstico son multifactoriales: desconocimiento de la enfermedad por muchos pediatras y médicos generales, ausencia de signos y síntomas específicos (la rinorrea y las infecciones recurrentes características de esta enfermedad son también extraordinariamente frecuentes durante la infancia) y dificultad de las técnicas de diagnóstico.

Precisamente porque las pruebas diagnósticas son complejas y no están disponibles en todos los centros, existen métodos de despistaje o *screening* que debido a su alta sensibilidad y elevado valor predictivo

negativo, permitirían seleccionar a los pacientes con más riesgo de padecer la enfermedad y que deberían ser derivados a centros de referencia para confirmar el diagnóstico. De los diferentes métodos existentes el más utilizado es la medición del óxido nítrico nasal ( $\text{NO}_n$ ), que es significativamente bajo en los pacientes con DCP. De cualquier modo, la presencia de un cuadro clínico altamente sugestivo de DCP siempre hará necesario llegar al diagnóstico definitivo mediante la realización de técnicas específicas de confirmación de la enfermedad.

#### 1.1.3.1. Métodos de despistaje o *screening*

##### a) *Óxido nítrico nasal:*

En los últimos 20 años múltiples estudios han demostrado que los valores de  $\text{NO}_n$  son significativamente bajos en los pacientes con DCP, hasta 10 veces menores que los obtenidos en controles sanos (1, 19, 46). La causa de esta disminución de  $\text{NO}_n$  es desconocida, aunque se han propuesto varias posibilidades: disminución de la expresión de la NO sintasa, agenesia de los senos paranasales u obliteración del *sinus ostia* (18). Sin embargo, valores bajos de  $\text{NO}_n$  también han sido descritos en otras entidades como la FQ (47), sinusitis crónica y poliposis nasal (48), panbronquiolitis e incluso en padres de pacientes con DCP (portadores heterocigotos de la enfermedad) (19). Aunque en todos estos casos los valores de  $\text{NO}_n$  son más bajos que en controles sanos, a su vez son más altos que en los pacientes con DCP.

Existen dos métodos para medir el óxido nítrico nasal y exhalado (49): con sistemas fijos (mediante **quimioluminiscencia**) o con sistemas portátiles (método **electroquímico**), como se detalla en la tabla 4.

	Quimioluminiscencia (ej: NIOX®)	Electroquímico (ej: NO Vario®)
<b>Sensibilidad</b>	1,5 ppb	5 ppb
<b>Precisión</b>	0-200 ppb: ± 2,5 ppb 200-1.000 ppb: ± 1%	< 50 ppb: ± 5 ppb ≥ 50 ppb: ± 10 ppb
<b>Rango:</b> <b>Modo clínico</b> <b>Modo investigación</b>	0-200 ppb 0-1.000 ppb	5-300 ppb
<b>Tiempo de demora</b>	< 0,8 sg.	< 2 min.
<b>Frecuencia de muestreo</b>	20 Hz	No especificado

**Tabla 4:** Características de los equipos de medición de óxido nítrico (ppb= partes por billón).

Para la medición del  $\text{NO}_n$  tanto con uno como con otro sistema, se detecta pasivamente la concentración de NO con una oliva nasal colocada en la narina, siendo fundamental que el paciente ocluya el velo del paladar para evitar que haya una mezcla entre el NO de la vía aérea superior e inferior. La forma más habitual de conseguir el cierre palatino es instruir al paciente para que inspire hasta su capacidad pulmonar total, realizando a continuación una espiración lenta y

sostenida contra una resistencia, con un flujo espiratorio fijo. Sin embargo, esta técnica es muy difícil de realizar por niños menores de 5 años por falta de colaboración, con el problema añadido de que es ésta precisamente la población donde más interesa realizar un diagnóstico precoz.

Por todo ello, en los últimos años se han publicado varios estudios que investigan la medición de  $\text{NO}_n$  a volumen corriente, en niños pequeños no colaboradores e incluso en lactantes, sin realizar el cierre del velo del paladar (32, 50, 51). Aunque los estudios se han llevado a cabo en un escaso número de pacientes, los resultados preliminares muestran diferencias estadísticamente significativas entre niños sanos y niños afectados de otras enfermedades respiratorias crónicas, como la FQ. Los datos disponibles indican que con esta técnica los valores obtenidos de  $\text{NO}_n$  serían aún más bajos, debido a que la menor aireación de los senos paranasales en los niños de corta edad conllevaría una disminución fisiológica de su producción. Además, la captación estaría disminuida por un menor tiempo de contacto con la oliva nasal y habría una dilución del  $\text{NO}_n$  de la vía aérea superior con el procedente de la vía aérea inferior, debido a la falta de cierre del velo palatino. Por tanto, esta técnica podría condicionar una mayor tasa de falsos positivos. Sin embargo, la sensibilidad de la prueba tampoco es del 100%, ya que existen casos de pacientes con diagnóstico confirmado de DCP que tienen valores de  $\text{NO}_n$  normales (50).

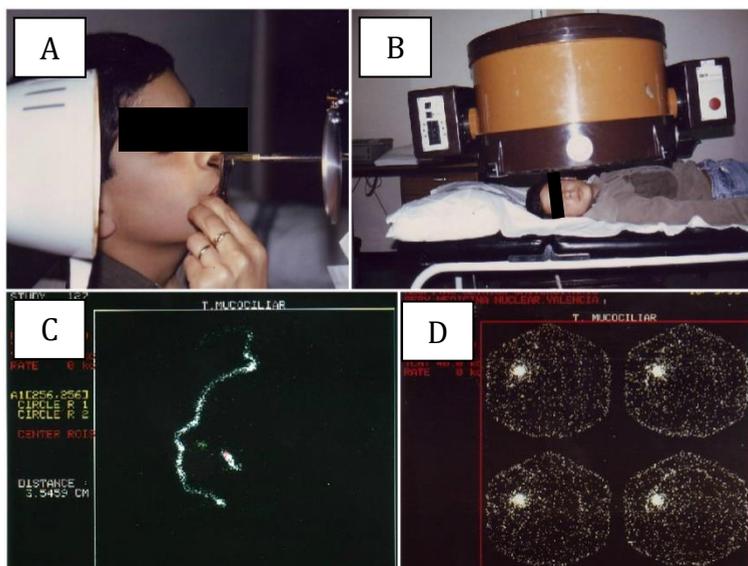
Pese a todas sus ventajas, el  $\text{NO}_n$  no es un recurso disponible en todos los centros y todavía no se utiliza habitualmente en la práctica clínica. Además, no existen métodos de medida estandarizados y los puntos de corte de normalidad pueden variar ampliamente entre 100 y casi 400 partes por billón (ppb), según el método empleado (47, 52). En nuestro país, un estudio realizado en el hospital Vall d'Hebron de Barcelona con medición de  $\text{NO}_n$  mediante quimioluminiscencia, determinó una sensibilidad de 88,9% y una especificidad de 99,1% para diferenciar pacientes con DCP de individuos sanos, utilizando un punto de corte de 112 ppb (53).

Por todo ello es necesaria tanto una estandarización de los métodos de medida como una homogeneización de los valores de referencia (47, 54).

#### *b) Radioisótopos*

La medida del transporte mucociliar nasal utilizando como trazador un radioisótopo (albúmina marcada con  $\text{Tc}^{99}$ ) ha sido un método utilizado durante varios años para el despistaje de DCP (fotografía 1). Es una técnica de medicina nuclear que consiste en depositar una cantidad determinada de trazador (0,01 ml de macroagregados de albúmina marcada con  $\text{Tc}^{99}$ , 1 gota) en la vertiente posterior de la cabeza del cornete nasal inferior, donde el epitelio es normalmente ciliado. A continuación el paciente se coloca en decúbito supino, con la cabeza apoyada sobre la parte no explorada, situando una gammacámara sobre ella que va captando imágenes cada minuto, lo que permite calcular la velocidad de transporte del trazador mediante la fórmula

[velocidad = distancia/tiempo]. Se consideran normales velocidades de transporte de 4 a 10,5 mm/min, estimando que existe estasis mucociliar nasal cuando este valor es menor a 2 mm/min (55-57).



**Fotografía 1:** Medición del transporte mucociliar con albúmina marcada con  $Tc^{99}$ . A) Depósito del trazador en la fosa nasal. B) Posición del niño y de la gammacámara sobre la fosa nasal a explorar. C) Trazado isotópico del perfil de la cara del niño y del desplazamiento del radioisótopo desde donde fue depositado. D) Inmovilidad del trazador en sucesivas imágenes tomadas a lo largo de la exploración, en un niño con cilios inmóviles.

Esta técnica tiene prácticamente un 100% de sensibilidad pero una especificidad muy baja (55%), ya que el aclaramiento mucociliar también se ve disminuido en la **discinesia ciliar secundaria** (18, 58). Su ventaja es el gran valor predictivo negativo, puesto que un transporte normal permite descartar la DCP, incluso en los recién nacidos (59). En aquellos lugares en que no se dispone de gammacámara, esta técnica podría realizarse depositando una pequeña

cantidad de carbón activado en el cornete inferior y visualizando el *cavum* cada 5 minutos, hasta comprobar su aparición (fotografía 2). En niños colaboradores esta valoración puede hacerla el pediatra o el ORL, permitiendo confirmar o descartar la alteración mucociliar y poniendo así en marcha las pruebas diagnósticas definitivas (57).



**Fotografía 2:** Depósito de carbón en cornete nasal inferior (57).

Un método similar, descrito en los últimos 10 años, es la medición del aclaramiento mucociliar con radioaerosoles a nivel pulmonar (*Pulmonary radioaerosol mucociliary clearance -PRMC-*). Consiste en inhalar una dosis establecida de radioisótopo nebulizado y medir el tiempo que tarda en distribuirse en la vía aérea (60-62). Aunque todavía no existen muchos datos publicados, los resultados preliminares parecen ser esperanzadores, tanto como técnica de despistaje como de diagnóstico en pacientes que tienen una DCP “atípica” con ultraestructura ciliar normal (62, 63), pese a que probablemente este método también tenga baja especificidad.

*c) Test de sacarina*

Consiste en la introducción de partículas de sacarina (1-2 mm de diámetro) en el cornete nasal inferior, controlando posteriormente el tiempo que el paciente tarda en percibir el sabor dulce (aproximadamente una hora). Requiere una gran colaboración por parte del sujeto explorado, ya que durante la prueba no puede toser, comer ni beber (64). Su principal problema es que se trata de un método subjetivo que depende de la sensibilidad de cada sujeto y muy difícil de evaluar en niños, ya que hasta una determinada edad no es posible asegurar si saben expresar el momento exacto en que captan el sabor. Tampoco permite distinguir entre una DCP y una discinesia ciliar secundaria. Por ello, aunque es uno de los métodos de diagnóstico más antiguos, actualmente ha quedado obsoleto y su utilización no está recomendada por la ERS (1).

#### 1.1.3.2. Métodos diagnósticos de confirmación

Según el consenso del grupo de trabajo de DCP de la ERS (1), el diagnóstico de discinesia ciliar primaria se basa en la presencia de un cuadro clínico sugestivo y la demostración de la alteración funcional y/o ultraestructural del cilio. La estructura ciliar se estudia mediante **microscopía electrónica**, poniendo de manifiesto las alteraciones morfológicas de la estructura normal del cilio. El estudio de la función ciliar (frecuencia y patrón de batido) se realiza mediante **videomicroscopía electrónica de alta resolución y velocidad**,

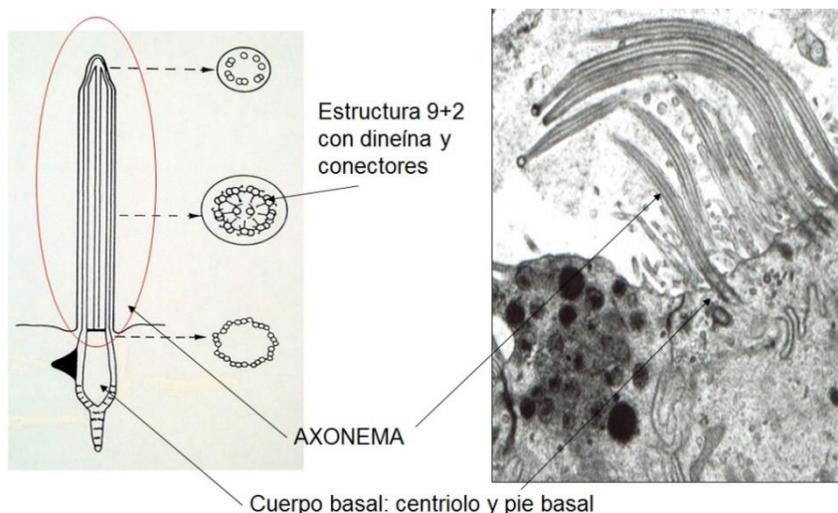
confirmando la alteración de su movilidad. A estos dos métodos diagnósticos “clásicos” cabe añadir el desarrollo en los últimos años de la **genética**, actualmente en plena expansión.

#### ***1.1.3.2.1. Microscopía electrónica***

El estudio de la ultraestructura ciliar mediante **microscopía electrónica** (ME) ha sido durante años el método diagnóstico de elección, al permitir detectar cambios de la arquitectura normal del cilio.

Los cilios son organelas celulares presentes en muchos organismos uni y pluricelulares. Cada célula ciliada madura tiene entre 100 y 200 cilios que baten en la misma dirección. A lo largo de la estructura ciliar encontramos dos zonas diferenciadas, como se observa en la figura 2 (2, 58, 65, 66):

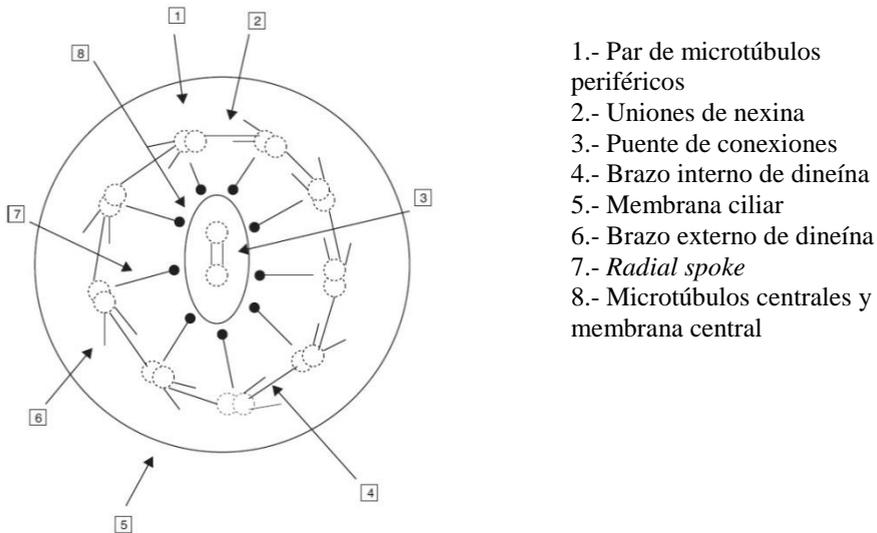
- *cuero basal*, zona clave para la ciliogénesis, constituido por 9 tripletes de microtúbulos periféricos y que está anclado a la superficie de la célula.
- *axonema*, porción que emerge hacia el exterior de la célula, con la clásica estructura «9 + 2»: 9 pares de microtúbulos periféricos rodeando a un par central.



**Figura 2:** Estructura del cilio (58).

El complejo tubular «9 + 2» posee una serie de conectores necesarios para la función ciliar: las uniones de **nexina**, que ensamblan los pares de microtúbulos entre sí y son las que mantienen al cilio intacto; los **brazos radiales**, que enlazan el par central, con su vaina, a los pares periféricos y los brazos de **dineína** (externos e internos), que surgen de cada doblete periférico, deslizan los microtúbulos entre sí y son los responsables de que el cilio se mueva (figura 3).

La función de los cilios respiratorios consiste en realizar un batido coordinado, con una frecuencia y patrón correctos, para lograr el aclaramiento de secreciones y desechos de la vía aérea.



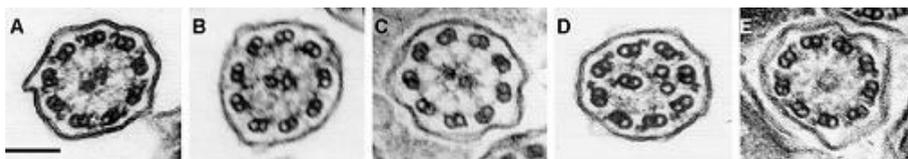
- 1.- Par de microtúbulos periféricos
- 2.- Uniones de nexina
- 3.- Puente de conexiones
- 4.- Brazo interno de dineína
- 5.- Membrana ciliar
- 6.- Brazo externo de dineína
- 7.- *Radial spoke*
- 8.- Microtúbulos centrales y membrana central

**Figura 3:** Corte transversal del cilio [tomado de Busquets *et al* (66)].

Para el estudio de la ultraestructura ciliar se toma una muestra de la mucosa ciliada nasal mediante cepillado o curetaje, se sumerge en glutaraldehído y se procesa para su estudio mediante microscopía electrónica. Se examinan cortes transversales de cilios y se analizan distintos componentes del axonema, siendo necesario analizar entre 10 y 100 cortes por paciente (2).

La DCP es morfológicamente heterogénea, por lo que se pueden encontrar diversas alteraciones congénitas (figura 4). Los defectos ciliares más frecuentes, que afectan al 80-95% de pacientes con DCP, son los déficits de **dineína**: ausencia completa (que se asocia a inmovilidad ciliar) o ausencia parcial de los brazos internos o externos (que se asocia a movimiento discinético). La segunda alteración en orden de frecuencia es la transposición o **ausencia del par central**

(15-40%) y por último, el defecto en los **brazos radiales** (6-10%) (67). Las alteraciones numéricas de los microtúbulos, complejos ciliares, evaginaciones de la membrana ciliar y otras, deben considerarse como secundarias (2).



**Figura 4:** Tipos de defectos en la ultraestructura ciliar: A) cilio normal, B) ausencia de brazos de dineína externos, C) ausencia total de brazos de dineína (externos e internos), D) ausencia de brazos de dineína internos y desorganización y E) ausencia de complejo central (68).

El estudio de la ultraestructura ciliar había sido considerado hasta hace unos años como el patrón oro en el diagnóstico de DCP, pero se ha comprobado que entre un 10 y 20% de los pacientes con DCP muestran una ultraestructura normal (2), llegando hasta el 28% en algunas series (69). Por ello actualmente el diagnóstico definitivo requiere detectar hallazgos patológicos en al menos otra prueba diagnóstica, como es el estudio de la frecuencia/patrón de batido ciliar.

La “normalidad” de la ultraestructura ciliar en pacientes afectados de DCP puede explicarse porque la estructura del cilio cambia según el punto de corte transversal donde se efectúe el estudio y porque pueden existir alteraciones muy sutiles no detectables por microscopía

electrónica (70). Recientemente han sido descritas mutaciones del gen *DNAH11* causantes de DCP, con ME normal (71-73).

Se ha intentado establecer una correlación entre las alteraciones ultraestructurales y determinados rasgos clínicos de la enfermedad. Por ejemplo, las alteraciones del par central no se asocian con *situs inversus* (67) y el inicio de los síntomas es más tardío, pero con una mayor gravedad y frecuencia de infecciones respiratorias y bronquiectasias (74, 75). Los rasgos clínicos de los pacientes con DCP y ME normal también han sido recientemente descritos, aunque son necesarios más estudios que correlacionen genotipo y fenotipo (76).

En caso de dudas diagnósticas los cultivos celulares pueden ser útiles, dado que los cilios que se forman *de novo* reproducen las alteraciones ciliares congénitas, pero no las adquiridas (77, 78). El cultivo puede realizarse según varias técnicas: cultivo en suspensión monocapa secuencial, cultivo simplificado con migración y rotación, o cultivo aire-líquido, siendo éste último el que permite obtener una muestra suficiente para una posterior reevaluación de la motilidad y ultraestructura ciliar. Sin embargo, se trata de procedimientos muy laboriosos y complejos con un índice no muy elevado de éxito, que sólo se realizan en centros muy especializados (79).

### 1.1.3.2.2. *Función ciliar*

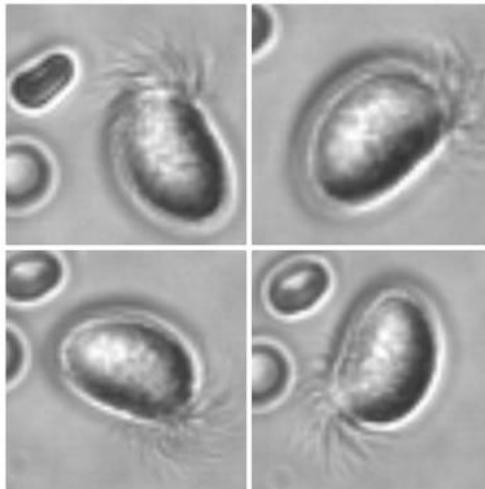
Para realizar esta técnica, en primer lugar se toma una muestra de células ciliadas del epitelio respiratorio de las fosas nasales mediante cepillado o curetaje y se deposita en una solución de cultivo celular, de donde se pueden obtener más muestras para su observación directa en el microscopio. Una cámara digital de alta velocidad -acoplada al microscopio-, permite grabar el movimiento ciliar y analizarlo, determinando (2):

- *Frecuencia de batida ciliar*: aunque cada laboratorio tiene sus valores de referencia, se consideran normales los valores superiores a 9 Hz.
- *Patrón de batida ciliar*: consiste en un estudio preciso, imagen por imagen, para determinar que la batida ciliar es normal en sus dos ciclos característicos: una fase de movimiento eficaz, en la que el cilio se extiende en toda su longitud y otra de recuperación, cuando el cilio se repliega sobre sí mismo y vuelve a su posición inicial para iniciar de nuevo la batida.

Ambas determinaciones son necesarias para comprobar la correcta funcionalidad del cilio, ya que la frecuencia puede ser normal, pero el movimiento discinético.

- *Test de rotación celular* (fotografía 3): consiste en valorar si las células rotan sobre sí mismas en un medio de cultivo, lo que significa que el movimiento ciliar es adecuado. La ausencia de su visualización carece de significado, ya que su presencia solo indicaría que en la muestra existen células

sueltas con un movimiento ciliar normal. Si no es posible obtener células sueltas en la muestra obtenida, se practica un cultivo celular y varias semanas después se añade pronasa para separar las células, observando que las sanas rotan continuamente. Sin embargo, el análisis de la frecuencia y patrón de batida ciliar suelen ser determinante y no es necesario practicar cultivos celulares.



**Fotografía 3:** Captura de imagen del test de rotación celular.  
(Cortesía del Dr. Armengot Carceller).

Ante una frecuencia y patrón de batido ciliar normales, con baja sospecha clínica de DCP, no sería necesario realizar más pruebas complementarias. En caso de observar una frecuencia de batido menor a la establecida como normal, un patrón de batido discinético o si existe una alta sospecha de DCP, se realiza también un estudio de la ultraestructura con microscopio electrónico (79).

### 1.1.3.2.3. *Genética*

La DCP es una enfermedad genética, de herencia autosómica recesiva, sin predominio por sexo o raza. El cilio contiene más de 250 proteínas, por lo que es una enfermedad muy heterogénea que puede estar causada por mutaciones en distintos genes. Los *locus* y genes asociados con la DCP se encuentran en los cromosomas 5p, 7p, 9p, 15q, 16p, 19q y X. En los últimos años se están produciendo grandes avances en su conocimiento y a día de hoy, son más de 30 las mutaciones descritas (20).

Hasta ahora los genes más ampliamente estudiados son el *DNAH5* y *DNAI1* (relacionado con defectos en los brazos externos de dineína) (1); el *DNAH11*, que se relaciona con los casos de DCP con ultraestructura normal (71-73), y el *DNAI2*, *TXNDC3*, *KTU*, *RSPH4A*, *RSPH9*, con los brazos radiales. Los genes *RPGR* (detectados en la retinosis pigmentaria) y *OFD1* tienen un patrón de herencia ligado al cromosoma X (79, 80).

El progresivo conocimiento de la genética ha dado lugar a que se esté intentando establecer una correlación genotipo-fenotipo (tabla 5), permitiendo relacionar determinadas mutaciones con hallazgos concretos de la ultraestructura del cilio, del patrón de batida ciliar e incluso de algunas manifestaciones clínicas (20, 68, 76, 81). Así, las mutaciones *CCDC39* y *CCDC40* causarían una organización anormal del axonema que daría lugar a una frecuencia de batida hipercinética, la *CCDC114* un fenotipo clínico en el que la fertilidad masculina

estaría preservada y las mutaciones *CCNO* se relacionarían con una DCP sin *situs inversus* o heterotaxia (82).

Pese a estos avances, lo cierto es que todavía quedan muchos enigmas por resolver y, dada la heterogeneidad genética, a día de hoy es difícil interpretar correctamente los resultados porque no necesariamente todas las mutaciones encontradas pueden ser patogénicas. Por ello, el estudio genético todavía no es considerado como un *test* diagnóstico de primera línea, sino que debe reservarse únicamente, siempre y cuando esté disponible, para confirmar los casos dudosos (1, 70). En la actualidad se están desarrollando sistemas comerciales de estudio molecular para detectar las mutaciones más frecuentes en los genes *DNAI1* y *DNAH5* (18).

Un complemento del estudio genético es la técnica de **inmunofluorescencia directa** mediante anticuerpos dirigidos a determinados componentes del axonema. Utilizando anticuerpos contra *DNAH5* y *DNAH9* se han podido identificar alteraciones específicas de los brazos de dineína. De momento esta técnica se realiza únicamente en el Hospital Universitario de Freiburg (Alemania), y aunque sus resultados preliminares parecen esperanzadores, todavía no se utiliza de rutina para el diagnóstico de la enfermedad (83).

Mutació	Ultraestructura	Batido ciliar	Clínica
<i>DNHAH5</i>	Brazos externos dineína	Cilios inmóviles	Clásica
<i>DNAI1</i>	Brazos externos dineína	Cilios inmóviles	Clásica
<i>DNAH11</i>	Normal	Movimiento hipercinético	
<i>DNAI2,</i> <i>TXNDC3, KTU,</i> <i>RSPH4A,</i> <i>RSPH9</i>	Brazos radiales		
<i>RPGR, OFD1</i> <i>Cromosoma X</i>			Retinitis pigmentaria
<i>CCDC39</i> y <i>CCDC40</i>	Desorganización axonema	Movimiento hipercinético “ <i>stiff</i> ”	
<i>CCDC114</i>			Fertilidad masculina preservada
<i>CCNO</i>	Citoplasma atípico		Ausencia de <i>situs inversus</i>

**Tabla 5:** Correlación entre genética, ultraestructura, patrón de batida ciliar y cuadro clínico (81).

#### 1.1.3.2.4. *Limitaciones diagnósticas*

Los métodos diagnósticos de confirmación son complejos en cuanto a su realización e interpretación y sólo están disponibles en centros de referencia. El consenso de la ERS especifica que ninguna prueba por sí sola puede considerarse como patrón oro o *gold standard*, sino que

los resultados deben individualizarse de acuerdo al contexto y cuadro clínico de cada paciente (1).

Al igual que ocurría con el cuadro clínico, aunque en teoría pueda parecer un diagnóstico sencillo, hay casos complejos en los que ninguna de las pruebas puede establecer el diagnóstico con plena exactitud. Por un lado, aunque existen anomalías típicas en la estructura del cilio, como las alteraciones de los brazos de dineína o de los pares centrales, hay otras muchas -indetectables por microscopía electrónica- que pueden tener un profundo impacto en la motilidad ciliar (70, 84). Además, hasta un 10-30% de casos con DCP pueden asociar una ultraestructura normal (2), y se han descrito casos de pacientes con ultraestructura y frecuencia ciliar normal, pero con un patrón de batido alterado (82). Por último, recientemente se han publicado controversias entre autores sobre la sensibilidad y especificidad del estudio de la función ciliar como método diagnóstico definitivo (85, 86).

En consecuencia, en determinados casos establecer el diagnóstico de DCP es todo un reto y requiere repetir las pruebas diagnósticas en varias ocasiones. En estos casos difíciles, el estudio genético podría representar la solución ideal, pero la DCP es una condición heterogénea y, pese a los esfuerzos realizados por distintos grupos de investigación, a día de hoy como ya se ha comentado, sólo se conocen unos 30 genes implicados de forma inequívoca en la enfermedad. Por tanto, la genética no se considera hoy un método diagnóstico de

primera línea, sino que debe reservarse como un *test* de confirmación, si está disponible (70).

La revisión más reciente sobre el diagnóstico de la enfermedad, publicada en 2015 por Werner y Omran del grupo Bestcilia (20) considera confirmado un caso de DCP cuando se cumplen los siguientes criterios: a) cuadro clínico altamente sugestivo y b) alteraciones en al menos dos de los siguientes métodos diagnósticos: hallazgos inequívocamente anormales en la frecuencia/patrón de batida ciliar o en la ultraestructura ciliar, valores anormalmente bajos de  $NO_n$  y presencia, en homocigosis, de dos mutaciones conocidas causantes de la enfermedad. En los casos en los que sólo la frecuencia/patrón de batido y el  $NO_n$  estén alterados, el estudio de la función ciliar debe repetirse al menos tres veces y mostrar los mismos resultados anormales cada vez.

Con todo ello, en un escenario en el que la biología molecular y la genética van a tener cada vez más peso, encontrar un único método diagnóstico *gold standard* parece estar todavía muy lejano, tal y como señala una editorial del *European Respiratory Journal*, a finales de 2014 (87). El siguiente paso propuesto es la creación de una nueva *Task Force* en la ERS (2014-2016) que desarrolle un algoritmo diagnóstico basado en la evidencia de la práctica clínica, para clasificar cada caso como “positivo”, “negativo” o “poco concluyente” (88).

#### 1.1.4. Tratamiento, pronóstico y nuevas perspectivas

En la actualidad la DCP no dispone de un tratamiento específico para corregir la disfunción ciliar. La mayoría de recomendaciones surgen de extrapolar los protocolos terapéuticos de la FQ, enfermedad con la que comparte algunos rasgos clínicos (infecciones respiratorias de repetición, mucosidad abundante y bronquiectasias), aunque su patogenia sea completamente distinta y su pronóstico mucho más benigno (89). El tratamiento está dirigido a mejorar el aclaramiento mucociliar, combatir precozmente las infecciones y mantener estable la función respiratoria para evitar la progresión del daño pulmonar y la evolución a bronquiectasias. Recientemente han sido publicadas las recomendaciones de la *European Respiratory Society Task Force* para el seguimiento de estos enfermos (90).

Los pacientes con DCP deben ser seguidos por un equipo multidisciplinar en centros de referencia experimentados, donde se cuente con el seguimiento de al menos 10-15 pacientes y sean valorados tanto por neumólogos como por otorrinolaringólogos. Además, cada vez que un nuevo paciente es diagnosticado, es necesario hacer una evaluación cardiológica para descartar la presencia de cardiopatías congénitas asociadas (18).

La piedra angular del tratamiento es mantener un adecuado aclaramiento de las secreciones, mediante la práctica regular de deportes y ejercicios de fisioterapia respiratoria. Evitar el tabaquismo

pasivo y activo es fundamental, como en cualquier enfermedad respiratoria crónica. La utilización de suero salino hipertónico nebulizado se ha generalizado en los últimos años, dada su demostrada contribución a la mejora del aclaramiento mucociliar. Otros fármacos como la DNAsa no se recomiendan de rutina, y los antitusígenos deben evitarse, ya que contribuyen a mantener la estasis de las secreciones respiratorias.

Los corticoides y broncodilatadores inhalados sólo deben emplearse si se tiene constancia objetiva de una obstrucción reversible del flujo aéreo. Los macrólidos (azitromicina), utilizados como antiinflamatorios e inmunomoduladores pueden tener un papel terapéutico en estos enfermos, en los que predomina la inflamación neutrofílica. Los pacientes deben seguir un programa de inmunización completo, incluyendo la vacuna antigripal y la protección frente a microorganismos capsulados, como el neumococo (91).

Se recomienda la monitorización microbiológica con cultivos cadenciales de esputo, para detectar y tratar precozmente las infecciones. Como parte del seguimiento, se harán también pruebas de función pulmonar para controlar el deterioro del FEV<sub>1</sub>, así como estudios de imagen (radiografía de tórax y TC torácica), al menos cada 5 años, para valorar la progresión del daño pulmonar.

Además debe realizarse de forma periódica una audiometría para detectar precozmente la probable hipoacusia de transmisión. El

tratamiento de la otitis media secretoria es controvertido, aunque en casos de hipoacusia moderada y/o otitis medias de repetición, la colocación de un drenaje transtimpánico está justificada, a pesar de la otorrea prolongada. La rinitis y poliposis pueden ser tratadas con tratamientos sintomáticos, requiriendo cirugía sólo en casos excepcionales.

En cuanto a nuevas perspectivas terapéuticas, un reciente estudio experimental ha demostrado que, utilizando un *lentivirus* como vector, es posible transferir un gen normal o “terapéutico” a las células de la mucosa nasal. La expresión de este gen podría restaurar la ultraestructura normal del cilio, consiguiendo así mejorar la motilidad ciliar. Aunque son necesarios muchos más avances en este sentido, se abre una nueva ventana terapéutica no explorada hasta el momento (92).

---

## 1.2. Hiperrespuesta bronquial

---

### 1.2.1. Generalidades

La hiperrespuesta bronquial (HRB) es la capacidad de las vías aéreas para responder rápida, fácil e intensamente a la estimulación mediante diferentes sustancias no inmunológicas, produciéndose un estrechamiento de la vía aérea, o broncoconstricción. Aunque los mecanismos que originan esta respuesta excesiva no están completamente aclarados, parece que la **inflamación bronquial** es uno de los factores más relevantes en su patogenia (93). Se asume, por tanto, que la presencia de HRB sugiere en la mayoría de los casos una inflamación bronquial subyacente. La HRB es una de las características fisiopatológicas propias del **asma** (94), aunque también se ha descrito en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica del adulto (95), FQ, rinitis alérgica, fracaso cardiaco, infecciones respiratorias, bronquiectasias y en pacientes tratados con beta-bloqueantes (96).

La reactividad bronquial puede estudiarse mediante la determinación de la respuesta a agonistas **broncoconstrictores**. Para ello se realiza en primer lugar una espirometría basal, seguida de otras secuenciales tras la inhalación progresiva de dosis crecientes de estas sustancias que inducen el estrechamiento de la vía aérea, valorando la variación de la capacidad vital forzada (FVC) y del FEV<sub>1</sub>. Con la representación

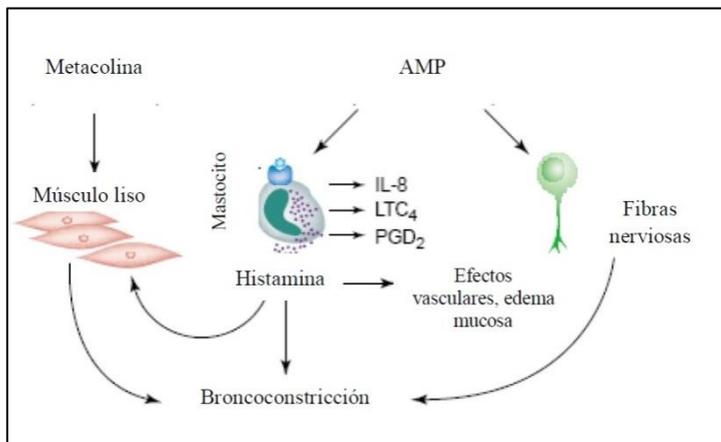
matemática del progresivo deterioro del FEV<sub>1</sub> respecto a cada dosis creciente de broncoconstrictor, se elabora una curva dosis-respuesta en la que pueden identificarse varios parámetros:

- **Sensibilidad bronquial (PC<sub>20</sub>):** indica la concentración de agonista necesaria para inducir un deterioro del FEV<sub>1</sub> del 20%. Este parámetro indica la facilidad con que ocurre la obstrucción (97).
- **Reactividad bronquial:** valora la rapidez con la que ocurre la broncoobstrucción inducida por el agonista y se determina mediante la pendiente de la porción lineal de la curva dosis-respuesta (97).
- **Atrapamiento aéreo:** equivale a la pendiente de la relación lineal entre los deterioros de la FVC y del FEV<sub>1</sub>. La pendiente de la recta obtenida de esta manera se relaciona positivamente con el grado de atrapamiento aéreo inducido, mientras que la intercepción sobre el eje Y se relaciona negativamente con éste. Es decir, un atrapamiento intenso se manifiesta por una pendiente alta y una intercepción baja (98).

Para el estudio de la hiperrespuesta bronquial tradicionalmente se han empleado **broncoconstrictores directos** (metacolina e histamina), que inducen broncoconstricción estimulando directamente los receptores específicos localizados en el músculo liso bronquial, glándulas mucosas y microvascularización, sin involucrar mecanismos intermedios. Por lo tanto, la respuesta a estos broncoconstrictores está

determinada por la presencia de alteraciones persistentes en la estructura de la pared bronquial (99).

Sin embargo, son cada vez más los trabajos que estudian el papel de los agonistas **broncoconstrictores indirectos**, como la adenosina 5'-monofosfato (AMP), que produce broncoconstricción mediante la estimulación de los **mastocitos activados**, con la consiguiente liberación de histamina, leucotrienos, prostaglandinas y otros mediadores inflamatorios (100). También, aunque de forma menos importante, este agente produce vasoconstricción a través de la liberación de neuropéptidos procedentes de terminaciones nerviosas sensoriales (101) (figura 5). Las diferencias entre agonistas directos e indirectos se muestran en la tabla 6.



**Figura 5:** Mecanismo de acción de los broncoconstrictores (100).  
Abreviaturas: IL-8: interleucina 8, LTC<sub>4</sub>: leucotrieno C<sub>4</sub>,  
PGD<sub>2</sub>: prostaglandina D2. Tomado de (102).

	Agonista directo	Agonista indirecto
<b>Mecanismo</b>	Efecto directo en receptores de vía aérea	Mediadores inflamatorios liberados por mastocitos
<b>Ejemplos</b>	Metacolina Histamina	AMP, manitol, suero salino hipertónico, propranolol
<b>Dependiente de:</b>		
○ <b>Músculo liso de la vía aérea</b>	++++	++
○ <b>Calibre de la vía aérea</b>	+++	-
○ <b>Inflamación</b>	++	++++
<b>Dosis</b>	Baja	Alta

**Tabla 6:** Características de los agonistas broncoconstrictores directos e indirectos (99).

### 1.2.2. Hiperrespuesta bronquial en sujetos sanos

La HRB también puede detectarse, de forma transitoria o permanente, acompañando a otras condiciones (exposición a irritantes medioambientales, infecciones víricas del tracto respiratorio, bronquitis crónica, rinitis, sarcoidosis, estenosis mitral, displasia broncopulmonar, etc.) e incluso en sujetos aparentemente sanos. De hecho, los trabajos epidemiológicos llevados a cabo sobre la población general han demostrado su existencia en 16-30% de los niños y 10-16% de los adultos (103). Aunque esto podría hacer pensar que la HRB no constituye una condición patológica *per se*, lo cierto es que la prevalencia de síntomas respiratorios resulta más elevada cuando está presente (104, 105).

El punto de corte para determinar la ausencia de HRB cuando se utilizan **broncoconstrictores directos** como la metacolina se establece en valores de PC<sub>20</sub> superiores a 16 mg/ml (106). La ATS considera que una PC<sub>20</sub> entre 4 y 16 mg/ml puede considerarse como una zona intermedia de hiperrespuesta bronquial “límite”, una PC<sub>20</sub> entre 1 y 4 mg/ml hiperrespuesta bronquial leve, y una PC<sub>20</sub> < 1 mg/ml como hiperrespuesta bronquial moderada a grave. Estos mismos valores (tabla 7) son los que se toman como referencia en el documento de consenso de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), publicado en 2013 (103) y en el de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica (SENP), de 2007 (107).

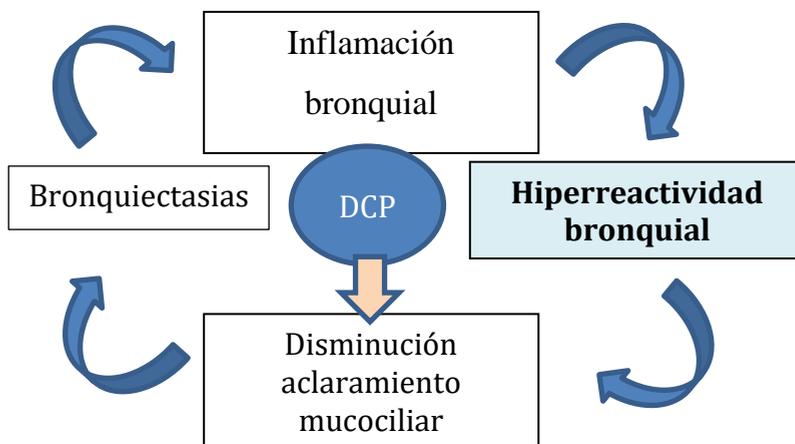
Grado de HRB	PC <sub>20</sub> metacolina (mg/ml)
Normal	>16
Dudosa	4-16
Leve	1-4
Moderada-grave	<1

**Tabla 7:** Clasificación de gravedad de la hiperrespuesta bronquial a la metacolina, en función de la concentración (PC<sub>20</sub>) que provoca una caída del 20% en el FEV<sub>1</sub> (103, 106, 107).

En el caso de los **broncoconstrictores indirectos** como AMP, el punto de corte para la PC<sub>20</sub> más frecuentemente utilizado es el de 400 mg/ml, aunque son necesarios más estudios para poder establecer claramente los límites de normalidad (97, 108).

### 1.2.3. Hiperrespuesta bronquial en la discinesia ciliar primaria y su relación con bronquiectasias

Se ha postulado que la HRB puede jugar un papel importante en la patogenia de las bronquiectasias (109), pues conduce a una reducción de la eficiencia de los mecanismos de aclaramiento mucociliar, con la consiguiente facilitación de la colonización microbiana, perpetuando así el proceso inflamatorio (figura 6). En el caso de la DCP, en la que ya existe una disminución del transporte mucociliar, la presencia de HRB puede ser un **factor de riesgo añadido** que potencie todavía más la disfunción ciliar, acelerando así la aparición de bronquiectasias que en algunos pacientes están presentes desde corta edad (24, 31).



**Figura 6:** Hiperrespuesta bronquial y bronquiectasias en la DCP.

A pesar de ello, los estudios acerca de la prevalencia de HRB en pacientes con bronquiectasias e individuos con DCP han sido escasos. En la tabla 8 se señalan las diferentes publicaciones que han recogido la prevalencia de HRB a agonistas broncoconstrictores directos (histamina o metacolina) en **pacientes con bronquiectasias**.

De acuerdo con estos datos, la prevalencia de HRB en **pacientes con bronquiectasias** varía entre 20-69%. Probablemente, estas importantes diferencias sean debidas a los distintos puntos de corte utilizados en cada estudio y a la diversidad en la metodología utilizada para realizar la exploración con cada broncoconstrictor. Sólo uno de estos estudios se realizó en niños, y en este grupo de edad la prevalencia de HRB a metacolina fue de 43% (110).

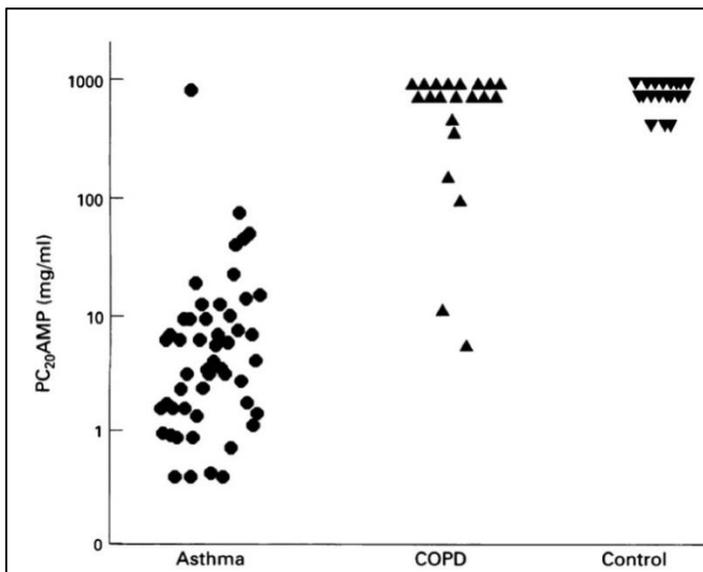
Autor	Año	Agonista	Punto de corte (PC <sub>20</sub> )	Número pacientes	Prevalencia
Bahous (111)	1984	Metacolina	16 mg/ml	29	69%
Pang (112)	1989	Metacolina	6 µmol	30	20%
		Histamina	5 µmol	30	23%
Ip (113)	1991	Metacolina	8 mg/ml	36	45%
Koh (110)	1997	Metacolina	25 mg/ml	63	43%

**Tabla 8:** Prevalencia de HRB a agonistas directos en pacientes con bronquiectasias.

Hay muy pocos datos en la literatura acerca de la prevalencia de **HRB a metacolina en pacientes con DCP**. Un estudio no controlado ha comunicado su existencia en 5 de 6 pacientes adultos con la enfermedad (114). Otro trabajo ha encontrado una prevalencia de 37% en un grupo de 19 niños con DCP, utilizando un punto de corte para la PC<sub>20</sub> de 25 mg/ml. Sin embargo, la prevalencia era de 26% cuando se utilizaba el punto de corte -más convencional- de 16 mg/ml (115).

Del mismo modo, apenas existen datos publicados respecto a la prevalencia de **HRB frente a agonistas indirectos** en pacientes con DCP. Únicamente hemos encontrado un estudio de 1995 en el que, dentro de la población total evaluada con patología respiratoria

crónica, se incluyeron cuatro niños con DCP (116). En este estudio se estableció la diferente respuesta a la metacolina y AMP en tres grupos de niños: sujetos sanos, asmáticos y un grupo heterogéneo con diversas enfermedades respiratorias crónicas: FQ, bronquiolitis obliterante, bronquiectasias y DCP. El estudio concluye que la respuesta a AMP es capaz de distinguir, con mayor sensibilidad y especificidad, a los niños con asma de aquellos con otras enfermedades respiratorias crónicas. Sin embargo no se especifica cuál es el comportamiento del subgrupo de niños con DCP, sino que sus resultados se engloban dentro del total de pacientes con enfermedades respiratorias diferentes del asma (figura 7).



**Figura 7:** Valores individuales de PC<sub>20</sub> AMP en tres grupos de niños: 1) asmáticos 2) enfermedades respiratorias crónicas diferentes del asma (incluyendo 4 niños con DCP) y 3) controles sanos (116).

## 1.3. Marcadores de inflamación en vía aérea

### 1.3.1. Óxido nítrico exhalado

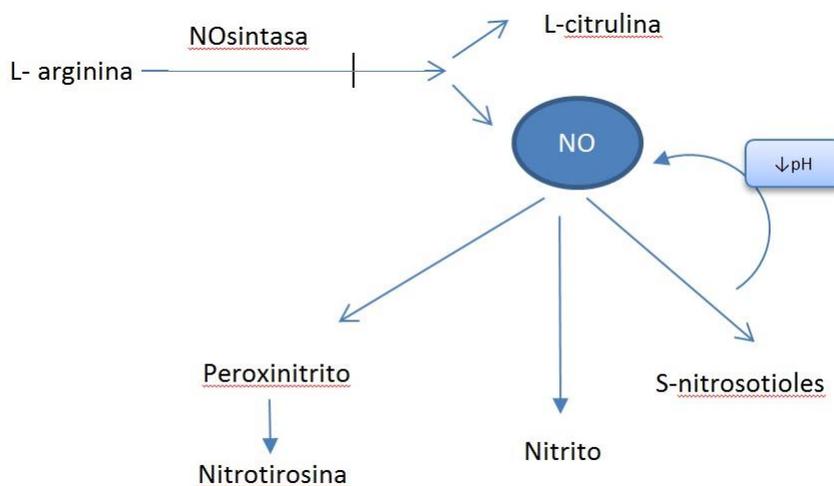
#### 1.3.1.1. Generalidades

Uno de los retos más recientes en el estudio de las enfermedades respiratorias ha sido la identificación precoz de la inflamación bronquial utilizando métodos no invasivos. Entre todos ellos, el más estudiado hasta el momento es el **óxido nítrico exhalado** (fracción exhalada de óxido nítrico, FENO).

Desde que hace más de 20 años Gustaffson *et al* identificaron por primera vez este marcador en el aire exhalado, demostrando que sus niveles estaban incrementados en el asma atópica (117), se han publicado cientos de artículos sobre este mediador, estudiando su papel no sólo en el asma sino también en otras enfermedades respiratorias como bronquiectasias, fibrosis pulmonar, tuberculosis o infecciones respiratorias víricas (118). El óxido nítrico (NO) está involucrado en la regulación del tono vascular y bronquial, en la inflamación y en la neurotransmisión (119).

El NO es producido a lo largo de todo el árbol respiratorio, desde la nariz al epitelio alveolar. Para poder conocer su implicación en los procesos inflamatorios respiratorios es fundamental comprender su metabolismo dentro de la vía aérea.

El NO se sintetiza a partir de la L-arginina a través de la enzima NO sintasa, produciendo como metabolito intermedio L-citrulina. Si la concentración de arginina es menor o la necesidad de sustrato se incrementa, se generan radicales libres y se producen peroxinitritos, nitritos y S-nitrosotioles. Estos últimos participan en un mecanismo de retro-alimentación negativa sobre la síntesis de NO (figura 8).



**Figura 8:** Síntesis de NO en las vías aéreas [tomado de Pérez (120)].

Se han descrito tres isoformas de la enzima NO sintasa (119):

- **Tipo 1**, o constitutiva neuronal (nNOS o NOS1): se localiza en los nervios colinérgicos, células epiteliales y neumocitos tipo I de la pared de la vía aérea. Requiere la activación por iones de calcio para la obtención de pequeñas cantidades de NO (121).
- **Tipo 2**, o inducible (iNOS o NOS2): se ubica en las células epiteliales, endotelio, músculo liso de la vía aérea y vascular,

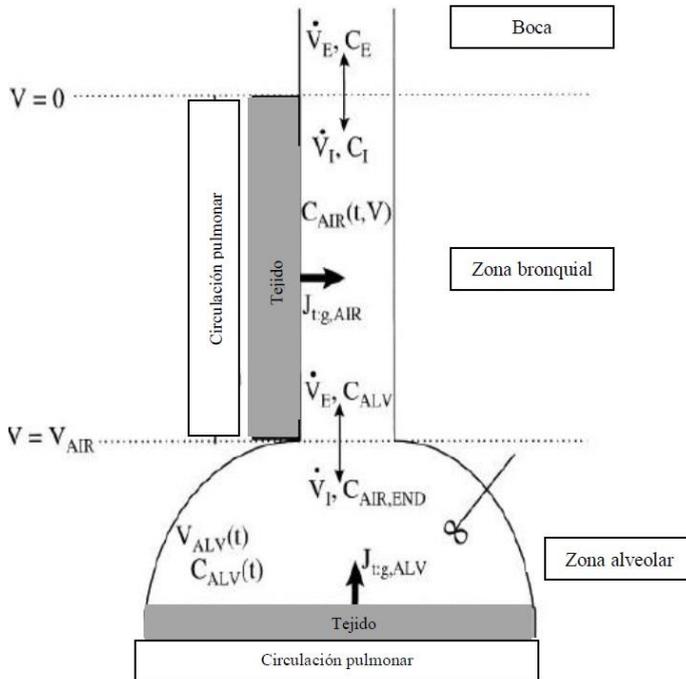
fibroblastos, mastocitos y neutrófilos. Obtiene cantidades mayores de NO, independientemente de los iones de calcio, en respuesta a mediadores inflamatorios (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , interferon  $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-13), alérgenos, agentes infecciosos y contaminantes ambientales. Es la que encontramos predominantemente en el compartimento bronquial, cerca del epitelio ciliado (122).

- **Tipo 3**, o constitutiva endotelial (eNOS o NOS3): se expresa en las células endoteliales de los bronquios, alveolos y circulación pulmonar. Es calcio-dependiente y sintetiza pequeñas cantidades de la molécula (123).

La dinámica de intercambio del NO en la vía aérea es diferente a la de otros gases como el oxígeno, el nitrógeno o el monóxido de carbono. Por ello, los clásicos modelos **unicompartimentales**, que consideran a la vía aérea como un “todo único” no son válidos para poder estudiarlo, debido a que es un radical libre reactivo frente a sustancias endógenas y después de formarse se une ávida e irreversiblemente al grupo hemo (124). Se han desarrollado diversos modelos matemáticos para explicar su dinámica en las vías respiratorias. En 1998 Tsoukias y George (124) desarrollaron un modelo **bicompartimental** en el que se definen dos zonas principales en la vía aérea (figura 9):

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

- **Zona alveolar o acinar:** un compartimento flexible, expansible en función del tiempo, que está rodeado de membrana alveolar y circulación pulmonar.



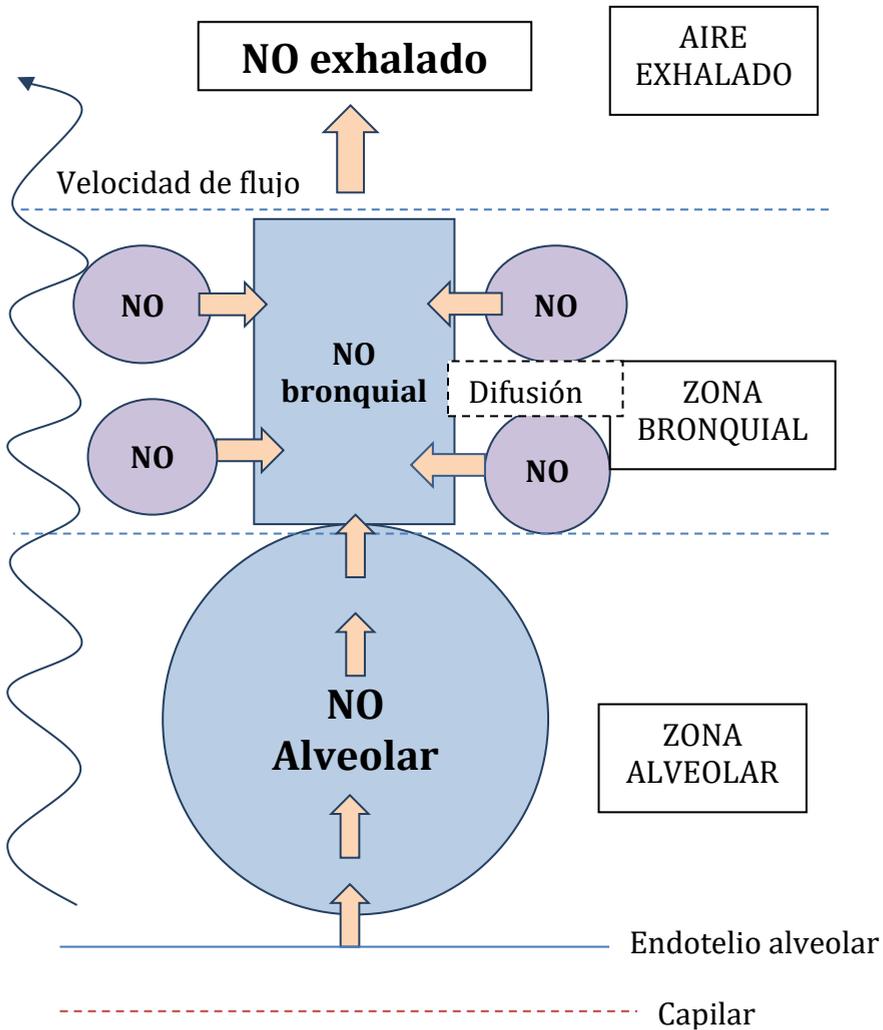
**Figura 9:** Modelo bicompartimental de Tsoukias y George (124). Abreviaturas:  $V$ : volumen,  $V_{air}$ : volumen de la vía aérea,  $V_{alv}$ : volumen alveolar,  $V_E$ : volumen espiratorio,  $V_I$ : volumen inspiratorio,  $C_{air}$ : concentración de la vía aérea,  $C_{alv}$ : concentración alveolar,  $C_E$ : concentración espiratoria,  $C_I$ : concentración inspiratoria,  $J_{tg,air}$ : flujo de óxido nítrico total del tejido a la vía aérea,  $J_{tg,alv}$ : flujo de óxido nítrico total del tejido al alveolo. [Imagen tomada de López Calatayud (102)].

El NO sintetizado en la vía aérea puede seguir tres caminos: ser consumido por los propios tejidos, difundir hacia la pared bronquial o hacerlo hacia la luz de la vía aérea. Durante la espiración, el NO del

aire alveolar es transportado a través de las vías aéreas donde se enriquecerá con el NO procedente de la difusión a través de la pared bronquial.

Esta difusión se realiza de acuerdo a la ley de Fick, por la diferencia de gradiente entre la concentración de NO de la pared y la columna de aire procedente del alveolo. De esta manera, en cada punto de la luz bronquial la concentración de NO en el aire exhalado dependerá (figura 10):

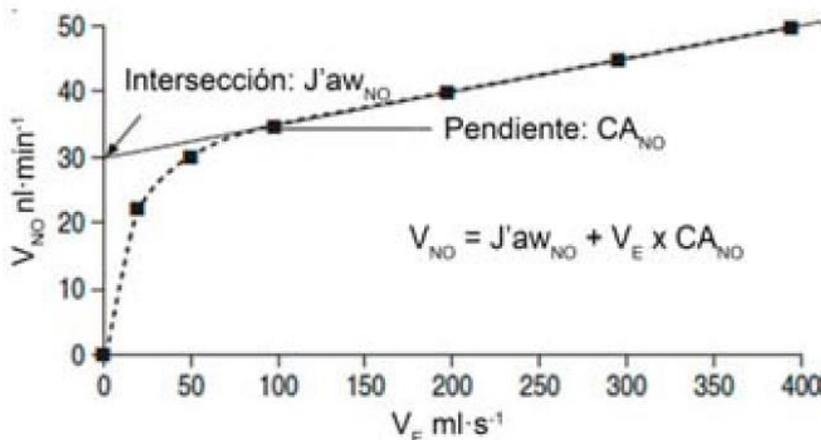
- a) *del flujo del aire exhalado desde el alveolo a la luz bronquial.* Así, a flujos espiratorios altos el tiempo para que el NO difunda hacia la columna de aire disminuye, predominando el NO alveolar, mientras que a flujos menores el tiempo de contacto entre la columna de aire y la superficie de la pared aumenta, por lo que la difusión del NO a través de la pared bronquial será mayor.
  
- b) *de la capacidad de difusión del NO desde la pared bronquial hasta la luz,* que dependerá del grosor de la pared bronquial y de todas aquellas circunstancias que alteren la superficie de difusión. Por ejemplo, los agentes broncoconstrictores directos como la histamina la disminuyen.



**Figura 10:** Modelo bicompartimental para el intercambio de NO alveolar y bronquial.

El cálculo del NO en dichos modelos bicompartimentales se realiza midiendo el NO exhalado a múltiples flujos, de tal forma que la representación del débito de NO con respecto a cada uno de los flujos en los que se realiza la determinación, es una recta de regresión (125).

La pendiente de la misma es la concentración alveolar de NO ( $CA_{NO}$ ), mientras que su intercepción en el eje Y representa el óxido nítrico bronquial ( $J'aw_{NO}$ ) (figura 11).

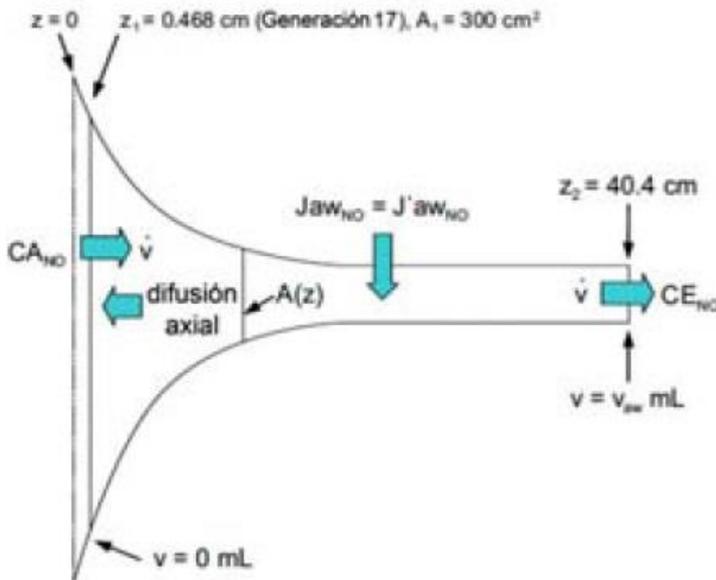


**Figura 11:** Aplicación del modelo bicompartmental para el cálculo de la concentración alveolar y bronquial de NO. Abreviaturas:  $V_{NO}$ : concentración de NO para cada flujo utilizado.  $J'aw_{NO}$ : concentración bronquial de NO.  $CA_{NO}$ : concentración alveolar de NO.  $V_E$ : flujo espiratorio (125).

Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que incluso los modelos bicompartmentales pueden ser demasiado sencillos para predecir la dinámica del NO en la vía aérea. Condorelli *et al* incorporan el **factor de difusión axial** (126), que tiene en cuenta no sólo el flujo de NO del alveolo hacia la luz bronquial, sino también el flujo inverso, desde la vía aérea hacia el alveolo y contraria a la dirección de la espiración, y que da lugar a una disminución por dilución del NO exhalado. Si no se tuviera en cuenta este factor, podría existir una subestimación del flujo máximo de NO en la vía

aérea, con valores falsamente elevados de  $CA_{NO}$  e infraestimados de  $J'aw_{NO}$ . Para tener en cuenta la difusión axial se añade un factor de corrección matemático a la hora de analizar los resultados (127), que es diferente dependiendo de los flujos que se utilicen para el muestreo.

En este modelo, a diferencia de los anteriores, la vía aérea se representa con una morfología “en trompeta”, con una sección transversal que disminuye con la proximidad al área orofaríngea (figura 12).



**Figura 12:** Modelo bicompartimental-axial de Condorelli (126). 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,  $J'aw_{NO}$ : concentración bronquial de óxido nítrico.

Recientemente se han propuesto modelos **multicompartimentales** que tienen también en cuenta las asimetrías de los acinos bronquiolares, que podrían afectar a la difusión y transporte del NO (128).

En consecuencia, el progresivo perfeccionamiento de los modelos matemáticos y experimentales podrá permitir una mejora en el conocimiento del intercambio dinámico de NO en la vía aérea.

#### 1.3.1.2. Óxido nítrico exhalado en la discinesia ciliar primaria

El óxido nítrico exhalado (FENO) ha sido ampliamente estudiado en el asma como marcador de inflamación bronquial, donde valores elevados se relacionan con la presencia de inflamación de origen eosinofílico (129). Sin embargo, su papel en otras enfermedades respiratorias crónicas como FQ, bronquiectasias o DCP, está menos establecido.

Como ya se ha comentado anteriormente, en la DCP el  $\text{NO}_n$  es significativamente más bajo que en controles sanos y pacientes afectos de otras patologías crónicas, por lo que su medición ha sido propuesta como método de *screening* de la enfermedad (1). El valor de la FENO, aunque también es bajo en los pacientes con DCP, es menos específico para diferenciarlos de los controles sanos, por lo que no puede utilizarse actualmente como método de despistaje (130).

El NO es producido por varios tipos de células, incluyendo epiteliales, fibroblastos, macrófagos, terminaciones nerviosas y células musculares lisas. Además de las funciones de neurotransmisión, broncodilatación y vasodilatación, se le atribuyen otras importantes **funciones en relación con la DCP:**

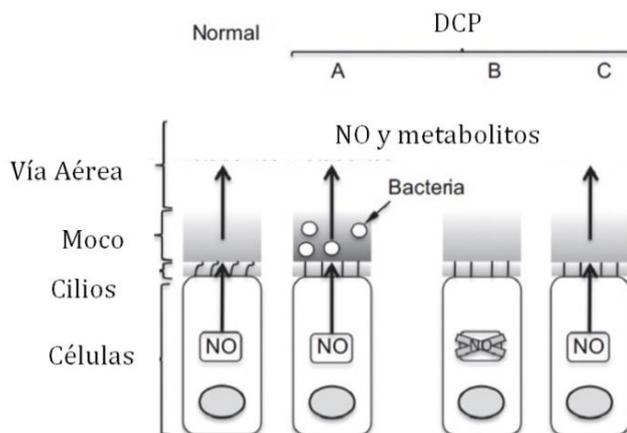
- a) modulación de la función ciliar: estudios *in vivo* e *in vitro* realizados sobre epitelio ciliado respiratorio de animales y humanos, demuestran que la inducción de síntesis de NO incrementa la frecuencia de batida ciliar (131).
- b) inmunomodulación y protección frente a infecciones: se ha demostrado su poder bacteriostático y bactericida frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Burkholderia cepacea* (132).

Las causas que explican los valores anormalmente bajos de NO siguen siendo una incógnita, puesto que en la DCP existe una inflamación crónica que, en teoría, debería dar lugar a valores de NO elevados. Existen varias hipótesis (130) que se han formulado para explicar esta situación (figura 13):

- a) aumento del consumo de NO y sus metabolitos en la vía aérea por la colonización bacteriana.
- b) reducción de la biosíntesis de NO por distintas causas: disminución de la expresión de isoenzimas de NO sintasa por

la disfunción de la motilidad ciliar y disminución de metabolitos necesarios para la síntesis de la molécula.

- c) reducción de la producción, por obliteración y/o hipoplasia de los senos paranasales.



**Figura 13:** Hipótesis que explican los bajos niveles de NO en DCP. A) Aumento del consumo por colonización bacteriana. B) Reducción de la biosíntesis de NO por alteraciones en NO sintasa. C) Producción normal de NO pero atrapamiento y obliteración en senos paranasales. [Tomado de Walker *et al* (130)].

Se ha postulado que un mejor conocimiento del metabolismo del NO en la vía aérea de los pacientes con DCP podría propiciar su papel como **marcador no invasivo** para conocer la progresión de la enfermedad e incluso, ayudar a desarrollar nuevas dianas terapéuticas (133). Por ello, sería muy interesante poder establecer la contribución relativa de las diferentes áreas pulmonares (bronquial y alveolar) al NO exhalado total, ya que permitiría profundizar en el origen, hasta ahora incierto, de la fisiopatología subyacente. Hasta la actualidad han

sido publicados tan sólo cuatro artículos en los que se mide la  $CA_{NO}$  y  $J'_{awNO}$  en pacientes con DCP mediante el modelo bicompartimental anteriormente descrito (124), pero en ninguno se ha tenido en cuenta el factor de difusión axial. Todos los autores coinciden en que, en los pacientes con DCP, los valores de NO bronquial son más bajos que en el grupo control y que en otras enfermedades respiratorias crónicas. Sin embargo, los valores de NO alveolar son variables. El resumen de los resultados se expone en la tabla 9.

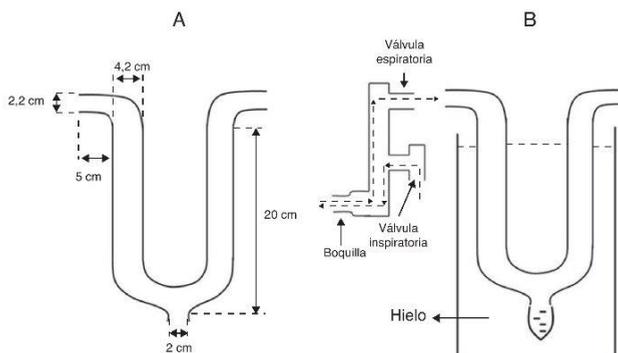
Autor y año (referencia)	N (rango o edad media)	Grupos	$J'_{awNO}$	$CA_{NO}$
Mahut 2006 (134)	17 (11-23)	2 (DCP/control)	↓↓↓	↓↓↓
Paraskasis 2007 (135)	24 (8-16)	2 (DCP/control)	↓↓↓	Sin diferencias
Shoemark 2008 (136)	20 (32-45)	3 (DCP/bronquiectasias no-FQ/control)	↓↓↓	Sin diferencias
Walker 2013 (133)	14 (12,8)	4 (DCP/FQ/asma/control)	↓↓↓	↓↓↓

**Tabla 9:** Estudios del NO alveolar y bronquial en DCP.

### 1.3.2. Condensado de aire exhalado

#### 1.3.2.1. Generalidades

El análisis del **condensado del aire exhalado (CAE)** es un procedimiento muy sencillo, seguro y no invasivo, que se ha sugerido como método indirecto para valorar el grado de inflamación pulmonar (137). Se basa en el enfriamiento y condensación del aire espirado mediante un sistema de frío, que permite que las partículas del fluido aéreo se condensen -a modo de gotas- en la pared del dispositivo. El procedimiento es muy bien tolerado, incluso en niños de corta edad. Para recoger el condensado, el paciente respira a volumen corriente a través de una válvula que separa el aire inspirado del espirado (figura 14). El aire espirado se hace circular por un circuito cerrado y refrigerado a temperatura de  $-20^{\circ}$ , lo que permite recoger el vapor de agua condensado del aire. La prueba tarda unos 10-15 minutos en realizarse, con lo que puede obtenerse 1-2 ml de condensado (138).



**Figura 14:** Ejemplo de dispositivo condensador para recogida de CAE. [Tomado de Alves *et al* (139)].

En el CAE se encuentran moléculas, mediadores y metabolitos derivados de la cavidad oral, orofaringe, árbol traqueobronquial y alveolos, aunque la contribución proporcional de cada uno de estos compartimentos no es completamente conocida. Se ha demostrado que hay una buena correlación entre los valores de dióxido de carbono y oxígeno en el líquido condensado y el aire espirado (140), por lo que se asume que la composición del CAE puede reflejar la composición del recubrimiento extracelular broncoalveolar.

En el CAE pueden valorarse diversos marcadores de estrés oxidativo presentes en las vías respiratorias, que se clasifican en (141):

- *Directos*: metabolitos derivados del oxígeno (peróxido de hidrógeno), del nitrógeno (óxido nítrico, tirosina, nitritos y nitratos) o nitrosotioles.
- *Indirectos*: marcadores de peroxidación lipídica (leucotrienos, prostaglandinas y 8-isoprostano), así como temperatura del aire espirado y pH.

Cada uno de estos metabolitos tiene unas condiciones específicas de recogida y almacenamiento, ya que algunos son inestables a temperaturas altas, por lo que es fundamental estandarizar el método de recogida para evitar errores. Además, varias investigaciones han tratado de determinar la influencia de la contaminación con saliva, que al ser rica en proteínas, fósforo y amilasa, puede ser un importante factor de confusión a tener en cuenta (142-144).

### 1.3.2.2. pH del condensado de aire exhalado en individuos sanos

Una de las formas indirectas de medir el estrés oxidativo de la vía aérea es la determinación del pH del condensado de aire exhalado. Para ello, es necesario *deairear* la muestra recogida con gas argón, un gas inerte muy pesado que mediante una compensación de gradientes es capaz de eliminar el dióxido de carbono ambiental presente en el condensado (145). Con ello se estabiliza la muestra y se propicia la reproductibilidad de la determinación del pH. En individuos sanos se consideran normales valores de **8,0**, con un rango de **7,8** a **8,1** (146).

El valor del pH del CAE no es afectado por las características antropométricas de la población estudiada, ni tampoco por las maniobras de broncoconstricción y broncodilatación (146). Sí que parece haber diferencias por el consumo de determinados alimentos o bebidas estimulantes antes de la exploración, por el tabaquismo (147), presencia de infecciones respiratorias activas y tratamiento previo con antibióticos (148). Más controvertido es el papel de la temperatura ambiental a la que se recoge la muestra, ya que mientras algunos autores no han encontrado diferencias (149), otros han demostrado más recientemente un incremento de pH proporcional al aumento de la temperatura ambiental (150).

### 1.3.2.3. pH del condensado de aire exhalado en enfermedades respiratorias

Las primeras publicaciones sobre el estudio del CAE datan de hace más de 30 años, pero ha sido en los últimos 10 cuando la determinación del pH como método de estudio de inflamación bronquial se ha desarrollado ampliamente, y son múltiples los estudios que valoran su papel en diversas patologías de la vía aérea:

- *Asma*: es sin duda, la entidad más estudiada hasta el momento, tanto en niños como en adultos. Son varios los trabajos que demuestran que el pH del CAE es más ácido en pacientes con asma moderada que en controles sanos (137, 151). También existe una acidificación del pH durante las exacerbaciones del asma en niños (152), por lo que se ha llegado a postular su papel como marcador no invasivo con capacidad para anticipar la posibilidad de reagudización y de esta forma guiar el tratamiento.
- *Tuberculosis*: la infección tuberculosa activa acidifica también el pH del CAE (153).
- *Fibrosis quística*: los datos son contradictorios; algunos trabajos demuestran una disminución del pH en pacientes con FQ comparados con controles sanos (148), mientras que en un estudio más reciente, no se aprecian diferencias (154). Estas discordancias podrían explicarse por el tamaño muestral, los diferentes métodos de medida y el tipo de tratamiento de base

que siguen los pacientes, ya que el uso de antibióticos puede modificar el valor del pH del CAE(148).

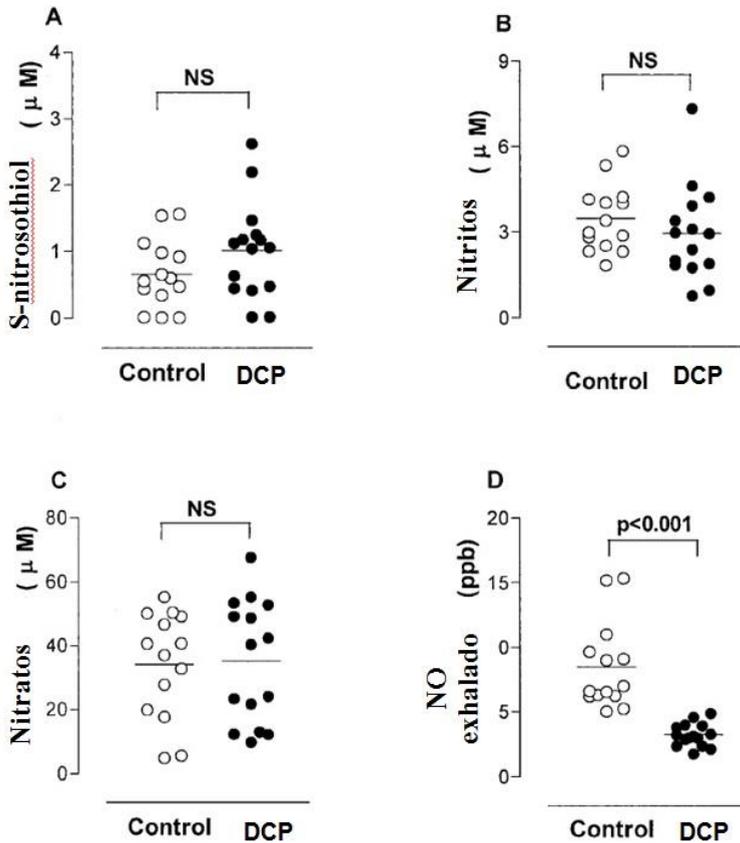
En **adultos**, cada vez son más los estudios sobre el valor del pH del CAE en diversas patologías como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquiectasias-no FQ (155) e incluso el cáncer de pulmón (156). En **niños**, el asma y la FQ son sus principales áreas de estudio.

#### 1.3.2.4. Condensado de aire exhalado en la discinesia ciliar primaria

Únicamente dos estudios han abordado la identificación de marcadores de inflamación y estrés oxidativo en muestras de condensado de aire exhalado obtenidas de pacientes con DCP.

En el estudio de Csoma *et al* (157) se recogen muestras de CAE en 15 niños con DCP y 14 controles sanos, comparando la concentración de nitritos, nitratos y S-nitrosothiol. Partiendo de la base de que el NO exhalado es muy bajo en pacientes con DCP, cabría esperar que las concentraciones de estos metabolitos derivados del NO también estuvieran significativamente bajos en el CAE. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre enfermos y controles. Estos resultados sugerirían que la actividad de la NO sintasa no estaría tan afectada como cabría esperar, y habría que buscar otras causas para

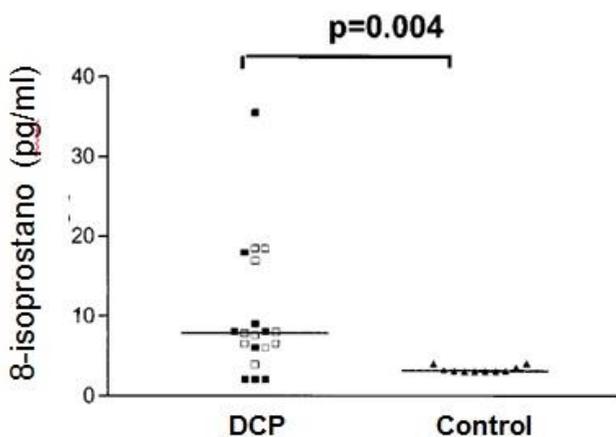
explicar esta reducción del NO exhalado, característica de la DCP. En este estudio no se recoge el valor del pH del CAE (figura 15).



**Figura 15:** A-C) Diferencias en la concentración de S-nitrosothiol, nitritos y nitratos en CAE de controles y niños con DCP. D) Diferencia de NO exhalado entre controles y niños con DCP. [Tomado de Csoma *et al* (157)].

Por otro lado, en el trabajo de Zihlif *et al* (158) se estudian otros marcadores relacionados con la inflamación neutrofílica y el estrés oxidativo: leucotrieno (LT) B<sub>4</sub>, IL-8, y 8-isoprostano (8-IP). Para ello se recogen muestras de CAE en 23 niños con DCP y 11 sanos. Los

resultados demuestran que el 8-IP, marcador de estrés oxidativo, es significativamente más alto en los niños con DCP (figura 16). Sin embargo, no se identificaron diferencias entre las dos poblaciones en las concentraciones de  $LTB_4$  (marcador de inflamación neutrofílica) en el CAE, a pesar de que el número de neutrófilos era significativamente mayor en las muestras de esputo inducido obtenidas de niños con DCP que en las de sanos. La IL-8 resultó indetectable en ambos grupos. En este estudio tampoco se hace referencia al valor del pH del CAE en los pacientes estudiados.



**Figura 16:** Diferencias en la concentración de 8-isoprostano en el CAE de niños con DCP y controles sanos. [Tomado de Zihlif *et al* (158)].

# **Justificación del estudio**



## 2.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Como se ha analizado en la introducción, parece que la hiperrespuesta bronquial (HRB) representa un factor de riesgo para el desarrollo de bronquiectasias (109). En consecuencia, el estudio de la HRB a agonistas directos e indirectos pudiera tener interés pronóstico en los pacientes con DCP y representar una línea de investigación no explorada hasta la actualidad en los pacientes con esta patología.

Dado que la metacolina (broncoconstrictor directo) y el AMP (broncoconstrictor indirecto) actúan a través de mecanismos patogénicos diferentes, explorar la hiperrespuesta a cada uno de ellos medida mediante el deterioro del FEV<sub>1</sub> (índice de reactividad) y FVC (atrapamiento aéreo), podría aportar nuevos datos sobre los factores añadidos a la disfunción ciliar que podrían intervenir el desarrollo de bronquiectasias.

Además, puesto que el espectro clínico de la DCP es tan amplio (con gran heterogeneidad genética, distintos tipos de alteración en la ultraestructura ciliar, múltiples patrones de batida ciliar, y una base etiopatogénica no completamente aclarada), el estudio de los marcadores de inflamación bronquial podría aportar nuevos datos que mejoren el conocimiento de los mecanismos de inflamación bronquial que participan en la enfermedad.

Finalmente, la correlación entre los parámetros de hiperrespuesta bronquial y los marcadores de inflamación de la vía aérea que pueden ser medidos en la práctica clínica (NO bronquial, NO alveolar y pH del CAE), podría contribuir al posterior desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico, seguimiento y tratamiento de estos enfermos.

# **Hipótesis de trabajo**



### 3.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los pacientes con DCP suelen presentar bronquiectasias y otras alteraciones persistentes de la vía aérea debido a la disfunción ciliar e infecciones de repetición. Sin embargo, no parecen sufrir incremento en el número de mastocitos activados como ocurre en el asma. Por tanto, la capacidad de los broncoconstrictores directos como metacolina para inducir deterioro del FEV<sub>1</sub> y atrapamiento aéreo, -identificado mediante el descenso de la FVC-, debería ser mayor que la de los agonistas indirectos, como el AMP.

Por otra parte, dado que el NO es uno de los marcadores de inflamación de vía aérea, su concentración debería ser mayor en aquellos individuos con mayor respuesta a agonistas indirectos (AMP), pudiendo establecer una relación significativa entre la FENO y J<sub>awNO</sub> y la respuesta bronquial a este agonista, que no se encontrarían con la metacolina. Sin embargo, la baja concentración de NO en aire exhalado característica de los pacientes con DCP hace difícil poder predecir los resultados.

Finalmente, dado que los enfermos con DCP presentan una inflamación crónica de la vía aérea debido a las infecciones recurrentes ocasionadas por la alteración de la motilidad ciliar, cabría esperar que el pH del condensado de aire exhalado fuera significativamente inferior al de los individuos sanos.



# Objetivos



## 4.- OBJETIVOS

### 4.1. Objetivos primarios

---

1. Determinar las diferencias en la prevalencia de hiperrespuesta bronquial al AMP ( $PC_{20} \leq 400$  mg/ml) y en la sensibilidad bronquial (medida mediante el índice de reactividad) a este agonista, entre pacientes con DCP y controles sanos.
2. Determinar las diferencias en la capacidad de la metacolina y del AMP para inducir atrapamiento aéreo en los pacientes con DCP comparados con individuos sanos.
3. Identificar la relación entre óxido nítrico ( $NO_n$ , FENO,  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$ ) y respuesta a la estimulación bronquial con metacolina y AMP en los pacientes con DCP.

### 4.2. Objetivos secundarios

---

4. Identificar las diferencias en la concentración de óxido nítrico entre pacientes con DCP y controles sanos: óxido nítrico nasal ( $NO_n$ ), exhalado (FENO), bronquial ( $J'aw_{NO}$ ) y alveolar ( $CA_{NO}$ ).

5. Identificar las diferencias en el valor del pH del CAE entre los enfermos con DCP y los individuos sanos.
  
6. Identificar la relación entre la sensibilidad bronquial y el grado de atrapamiento aéreo inducido por cada agonista y el pH del CAE, en los pacientes con DCP.

## **Pacientes y métodos**



## 5.- PACIENTES Y MÉTODOS.

### 5.1. Consideraciones sobre el tamaño de la muestra

---

El objetivo principal de este estudio fue identificar las diferencias en la prevalencia de hiperrespuesta bronquial a AMP entre pacientes con DCP y controles sanos, así como su relación con la concentración de NO alveolar y bronquial.

La **variable principal** fue la prevalencia de HRB frente al AMP ( $PC_{20} \leq 400$  mg/ml) en pacientes con DCP y en controles sanos. Para calcular el tamaño muestral, la respuesta bronquial al AMP se consideró como una variable categórica (presencia o ausencia de broncoconstricción; es decir, caída del  $FEV_1 \geq 20\%$  con una concentración de AMP  $\leq 400$ mg/ml).

Al no existir datos en la literatura acerca de la prevalencia de HRB al AMP en pacientes con DCP, se asumió una prevalencia similar a la publicada en dos estudios para metacolina, que fue de 26% cuando se utilizó un punto de corte de 16 mg/ml (114, 115). En cuanto al grupo control, la prevalencia de HRB al AMP en individuos sanos incluidos en estudios previos es menor del 5% (98, 108). Se consideró clínicamente relevante una diferencia del 24% en la prevalencia de HRB al AMP entre pacientes con DCP y controles sanos.

Con estas premisas, se calculó que eran necesarios 29 individuos por grupo para que el estudio mostrara un poder del 80% con un error  $\alpha$  de 0,05 (dos colas).

## 5.2. Pacientes

### 5.2.1. Pacientes con discinesia ciliar primaria

Para conseguir los pacientes necesarios para la muestra en una enfermedad de tan baja prevalencia (15), se incluyeron individuos de ambos sexos, tanto de población pediátrica como adultos (entre 7 y 60 años), que hubiesen sido diagnosticados de discinesia ciliar primaria de acuerdo a los siguientes criterios, siendo necesario cumplir ambos para ser incluido en el estudio:

- a) Clínica sugestiva o compatible: distrés o neumonía neonatal no filiada, rinorrea crónica, otitis de repetición, sinusitis, bronquitis recurrentes, neumonías repetidas, “asma” de difícil control, bronquiectasias de etiología no definida o de origen postinfeccioso, en pacientes con o sin *situs inversus*.
- b) Movilidad ciliar ausente o discinética en muestras de epitelio nasal o bronquial, determinada mediante un método de videoanálisis de alta velocidad y precisión (159). Aunque la mayoría de pacientes tenían también realizado estudio de ultraestructura ciliar, se consideró como condición indispensable para ser diagnosticado de DCP la alteración funcional del cilio. Se consideraron patrones

diagnósticos de DCP: a) inmovilidad ciliar; b) movimiento ciliar en una sola fase, vibrátil y c) movimiento ciliar incoordinado y de baja frecuencia.

Los pacientes fueron **seleccionados** a partir de la base de datos de pacientes con DCP del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital General Universitario de Valencia y de la Unidad de Neumología Infantil del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Para poder ser **incluidos** en el estudio los pacientes debían tener un FEV<sub>1</sub> basal igual o mayor del 60% del valor teórico y no haber presentado exacerbaciones graves durante los 3 meses previos, definidas como necesidad de tratamiento por síntomas respiratorios o ingreso hospitalario por agudización.

Se **excluyeron** los individuos fumadores y los ex-fumadores que hubiesen abandonado el hábito tabáquico menos de 6 meses antes, así como aquellos que tuvieran una enfermedad pulmonar activa diferente de la DCP, como asma, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, o cualquier alteración pulmonar aguda o crónica documentada a través de la historia o exploración clínica. También se excluyeron los pacientes que hubiesen sufrido una enfermedad activa y clínicamente significativa del sistema gastrointestinal, cardiovascular, hepático, neurológico, renal, genitourinario o hematológico, o que padecieran hipertensión arterial

no controlada. Se excluyeron también las mujeres embarazadas y madres lactantes, así como aquellos pacientes en los que hubiera algún factor añadido que pudiese limitar la capacidad de colaboración.

### 5.2.2. Grupo control

Como **grupo control** se estudiaron individuos sanos, entre 7 y 60 años, reclutados de forma voluntaria entre los familiares de los pacientes y/o personal del hospital, de edades lo más pareadas posible a las del grupo de enfermos. Los integrantes del grupo control debían ser no fumadores, sin antecedentes de rinoconjuntivitis, asma, broncoespasmo inducido por ejercicio, eccema atópico, manifestaciones respiratorias crónicas, u otros procesos morbosos relevantes. Los criterios de exclusión fueron idénticos a los del grupo de pacientes con DCP.

## 5.3. Diseño del estudio

---

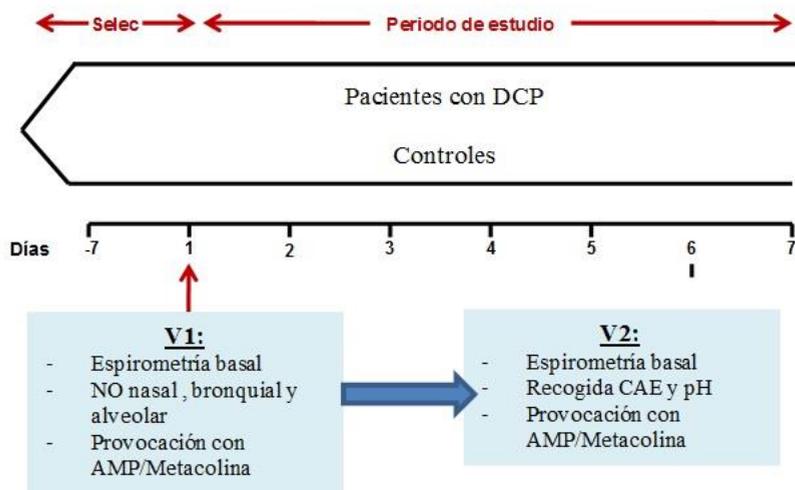
Nuestro estudio es observacional, prospectivo, analítico, abierto y aleatorizado, con dos grupos: pacientes diagnosticados de DCP y controles sanos.

En el **grupo de enfermos**, inicialmente se estableció contacto telefónico solicitando su participación y se completó un cuestionario con los criterios de selección. Cuando el paciente contactado era seleccionable para el estudio, se solicitaba su aceptación para

participar en el mismo pidiéndole que firmara un consentimiento informado (a los padres o representantes legales en el caso de menores de edad), donde se explicaba por escrito tanto los objetivos del estudio como los métodos a utilizar en él.

Para el **grupo control**, se elaboró un cuestionario con el fin de comprobar la ausencia de factores de exclusión y se pidió la firma de consentimiento informado, del mismo modo que a los pacientes (a los padres o representantes legales en el caso de menores de edad).

El estudio se completó con dos visitas a cada uno de los participantes (figura 17). Los procedimientos realizados en cada una de ellas se detallan en la tabla 10. Todas las exploraciones se realizaron de forma ambulatoria en el laboratorio de función pulmonar del Servicio de Alergología del Hospital Doctor Peset de Valencia, entre octubre de 2013 y julio de 2015.



**Figura 17:** Representación del diseño del estudio.

A todos los pacientes y controles que cumplieron los criterios de inclusión/exclusión se les practicaron las siguientes exploraciones:

1. *Procedimientos realizados durante la Visita 1 (V<sub>1</sub>):* pruebas cutáneas con inhalantes (si no se habían realizado en los 2 años previos); determinación de NO nasal, bronquial y alveolar; espirometría basal y prueba de provocación con metacolina o AMP (la que hubiera correspondido por aleatorización).
2. *Procedimientos realizados durante la Visita 2 (V<sub>2</sub>, al cabo de 1 a 7 días de la visita 1):* recogida de CAE y medición del pH, espirometría basal y prueba de provocación con metacolina o AMP (la que no se hubiera realizado en la visita 1).

Visita	Selección	V1	V2
Criterios inclusión/exclusión	X		
Cuestionario clínico		X	
Espirometría basal		X	X
Determinación de NO nasal		X	
Determinación de FENO, J'aw <sub>NO</sub> y CA <sub>NO</sub>		X	
Test cutáneos <sup>1</sup>		X	
PC <sub>20</sub> metacolina <sup>2</sup>		X	
PC <sub>20</sub> AMP <sup>2</sup>			X
pH CAE			X
Informe con resultados			X

**Tabla 10:** Procedimientos practicados en cada visita.<sup>1</sup> Si no se habían realizado en los 2 años previos.<sup>2</sup> Las exploraciones con metacolina y con AMP se efectuaron con un intervalo de 1-7 días. El orden de las exploraciones fue aleatorizado.

Tras haber realizado todas las exploraciones, se entregó a cada paciente o control un informe con los resultados de las pruebas realizadas.

## 5.4.Métodos

---

### 5.4.1. Pruebas cutáneas con inhalantes

Las pruebas cutáneas se realizaron mediante la técnica del *prick-test*, utilizando la batería de alérgenos más relevantes en nuestro medio (*alérgenos comerciales de ALK-Abelló*). Los **extractos alérgénicos** incluyeron *D.pteronyssinus*, *D.farinae*, epitelio de perro y gato, polen de *platanus orientalis*, ciprés arizónica, *olea* europea, mezcla de gramíneas, *cynodon*, *phragmites*, *chenopodiumalbum*, *salsolakali*, *parietaria judaica*, *artemisia vulgaris*, *plantago lanceolata*, profilina, y esporas de *alternaría alternata*, *aspergillus*, *cladosporium herbarum* y *penicilium*. El clorhidrato de histamina se utilizó como control positivo, y como control negativo suero salino.

Para realizar los test cutáneos se depositó una gota de cada extracto antigénico en 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 punción con lancetas (*PrickLancet*, *Stallergenes*; *Antony*, *Francia*), utilizando tantas lancetas como alérgenos. La lectura se hizo a los 15-20 minutos y se consideraron positivas las pruebas que generaban una pápula de

diámetro  $\geq 3$  mm, en ausencia de respuesta al diluyente. Las pruebas cutáneas se completaron únicamente en aquellos pacientes con DCP que no hubieran sido sometidos a esta exploración en los dos años previos o en los que no se dispusiera de resultados de la misma, y en todos los sujetos sanos.

#### 5.4.2. Espirometría basal

La espirometría se realizó utilizando un **neumotacómetro** (*Jaeger Master Scope, Erich Jaeger, GmbH, Würzburg, Alemania*), que cumplía con los requerimientos técnicos y de linealidad recomendados por la ATS (160). El equipo se calibró diariamente antes de cada determinación, y el resultado de la calibración se almacenó en soporte electrónico. Se utilizó una pinza nasal tanto en los niños como en los adultos.

Se determinó la función pulmonar basal hasta obtener tres maniobras espirométricas repetibles (variaciones menores del 5% en el FEV1 y  $\leq 100$  ml entre las tres mejores) y técnicamente satisfactorias (tiempo espiratorio de -al menos- 6 segundos en adultos y 4 segundos en niños) (161). Para el análisis se utilizó la maniobra con la mayor suma FEV<sub>1</sub>+FVC. En el caso de los niños se siguieron las recomendaciones para la evaluación de la función pulmonar de la SENP (162). En los niños más pequeños se utilizaron animaciones en la pantalla para adiestramiento y obtención de maniobras correctas.

### 5.4.3. Pruebas de provocación bronquial

Las pruebas de provocación bronquial con metacolina y AMP se realizaron mediante el *método dosimétrico* descrito por Chai *et al* (163), siguiendo las recomendaciones de la ATS (106). Previamente a efectuar la provocación bronquial los pacientes retiraron los fármacos que utilizaban con los períodos que se detallan en la tabla 11.

FÁRMACO	PERÍODO RETIRADA
Esteroides inhalados	4 semanas
Montelukast o zafirlukast	2 semanas
Esteroides sistémicos	4 semanas
Beta-adrenérgicos de acción larga	3 días
Anticolinérgicos	3 días
Antihistamínicos H <sub>1</sub> orales	3 días
Salino hipertónico nebulizado	24 horas
Cromoglicato disódico o nedocromil sódico	2 semanas
Beta-adrenérgicos de acción corta	6 horas
Esteroides nasales tópicos	Dosis constantes
Antihistamínicos H <sub>1</sub> tópicos	Dosis constantes
Antihistamínicos en colirio	No cambios
Cromoglicato en colirio	No cambios
Esteroides en colirio	No cambios

**Tabla 11:** Período de retirada de distintos tratamientos antes de la realización de las pruebas de provocación.

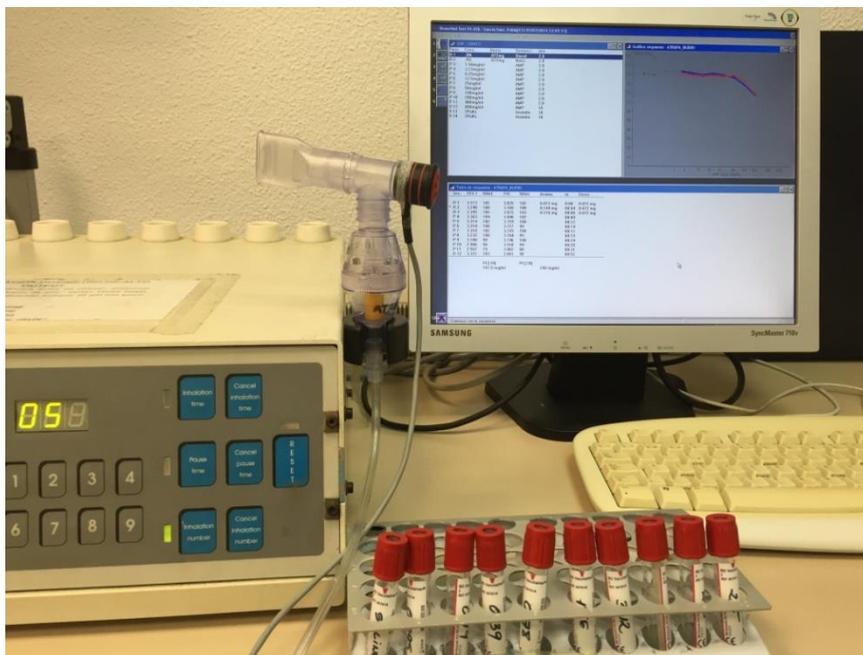
Las soluciones de metacolina (*Provocholine, Diater SA, Madrid*) y de AMP (*Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA*) se prepararon con salino al 0,9 % y se administraron a temperatura ambiente, utilizando un **nebulizador** Mefar calibrado (fotografía 4), activado por un **dosímetro** (*Mefar MB3, Brescia, Italia*). El protocolo que se siguió para calibrar el nebulizador se detalla en la tabla 12.

<p>1- Preparar el dosímetro MEFAR para que se dispare automáticamente con la inspiración, ajustando la sensibilidad del termistor.</p> <p>2- Prefijar las siguientes variables de nebulización:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Número de inhalaciones = 10</li> <li>-Tiempo de pausa = 6 seg</li> <li>-Tiempo de nebulización = 1.5 segundos</li> </ul> <p>3- Colocar 2 ml de agua destilada en el nebulizador.</p> <p>4- Pesar el nebulizador y anotar el resultado en mg (<i>Peso 1</i>).</p> <p>5- Conectar el nebulizador al dosímetro y realizar 10 inhalaciones.</p> <p>6- Pesar de nuevo el nebulizador y anotar el resultado en mg (<i>Peso 2</i>).</p> <p>7- Repetir los pasos 5 y 6 (<i>Peso 3</i>).</p> <p>8- Calcular el volumen liberado en cada inhalación mediante:</p> $(\text{Peso 1} - \text{Peso 2}) / 10 = \text{ml/inhalación}$ $(\text{Peso 2} - \text{Peso 3}) / 10 = \text{ml/inhalación}$ <p>9- Transformar los resultados de los dos cálculos anteriores a <math>\mu\text{l}</math> multiplicando por 1.000.</p> <p>10- Dividir por 2 el resultado de la suma de los dos valores anteriores, para obtener la media.</p> <p><i>El débito del nebulizador calibrado debe ser de <math>18 \mu\text{l} \pm 10\%</math>. Si es superior o inferior, debe probarse otro nebulizador.</i></p>
---

**Tabla 12:** Protocolo de calibración del dosímetro MEFAR.

Las características técnicas del dosímetro se modificaron para conseguir un tiempo de nebulización de 1,5 segundos y un tiempo de pausa de 6 segundos. En estas condiciones y con 2 ml de solución en

la cámara de nebulización, el nebulizador muestra un débito de 18 microlitros por activación.



**Fotografía 4:** Dosímetro MEFAR MB3, nebulizador Mefar y diluciones de metacolina.

Los pacientes realizaron 5 inhalaciones de solución salina y de cada concentración del broncoconstrictor, con un intervalo entre las dosis de 90 a 120 segundos. La primera solución administrada con uno y otro broncoconstrictor fue suero salino al 0,9%, y los valores del FEV<sub>1</sub> y FVC post-salino se consideraron como basales para calcular los deterioros en ambos parámetros tras cada concentración de agonista. A continuación se inhalaban concentraciones dobles (5 inhalaciones) de metacolina, o de AMP, realizando una única espirometría (a no ser

que la maniobra espirométrica se considerara como técnicamente incorrecta), tras la inhalación de cada una de las concentraciones. De esta forma se palió el efecto broncodilatador de las maniobras espirométricas forzadas sobre el FEV<sub>1</sub>(164).

La concentración inicial de metacolina fue de 0,39 mg/ml, y la de AMP de 6,25 mg/ml. El test se interrumpió cuando se observaron deterioros del FEV<sub>1</sub> de al menos un 20%, o tras administrar la concentración máxima de agonista (25 mg/ml de metacolina o 800 mg/ml de AMP). La concentración de 800 mg/ml de AMP se administró mediante 10 inhalaciones de la concentración de 400 mg/ml. De esta manera, se administraron concentraciones equipotentes, sobre una base molar, de ambos broncoconstrictores.

#### 5.4.3.1. Descripción por pasos de la provocación bronquial con metacolina

La preparación de las diluciones de este agonista se detalla en la tabla 13.

1. Se completó el cuestionario acerca de la situación clínica basal y del cumplimiento de los períodos de supresión de fármacos.
2. Se realizaron -al menos- tres maniobras espirométricas basales correctas y repetibles. La repetitividad estuvo definida por una

variabilidad del  $FEV_1$  y de la  $FVC \leq 5\%$  o  $\leq 100$  ml entre las tres maniobras mejores.

3. Se confirmó que la función pulmonar basal era aceptable ( $FEV_1 \geq 60\%$  teórico y  $\geq 1,3$  L).
4. Se adiestró al paciente sobre las maniobras de inhalación a efectuar mediante el dosímetro:
  - Para evitar la respiración nasal, el paciente se colocó una pinza nasal.
  - Se explicó cómo debía respirar: vaciar el pecho hasta la CRF (capacidad residual funcional); adaptar la boca a la boquilla del nebulizador; inspirar lenta y profundamente hasta la máxima capacidad inspiratoria.
5. Se adaptó la sensibilidad del *termistor* a la capacidad inspiratoria del paciente, de manera que se disparara automáticamente al inicio de la inspiración. Tras cada inhalación, el paciente retiraba el nebulizador de la boca y respiraba del exterior normalmente.
6. En el nebulizador se colocaron 2 ml de salino y de cada una de las concentraciones del broncoconstrictor a administrar.
7. Se inició la exploración realizando 5 inhalaciones de suero fisiológico y, al cabo de 60 a 90 segundos, una espirometría. Los valores post-salinos del  $FEV_1$  y de la  $FVC$  se consideraron los de referencia, y se compararon con los obtenidos tras cada concentración del agonista.

8. Tras ello, se administró la primera concentración de metacolina (5 inhalaciones), realizando una espirometría con el mismo intervalo de tiempo (60-90 segundos). Se calculó el porcentaje de caída del FEV<sub>1</sub> y de la FVC con respecto al valor post-salino mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ caída FEV}_1 = (\text{FEV}_1 \text{ post-salino} - \text{FEV}_1 \text{ post-metacolina}) / (\text{FEV}_1 \text{ post-salino}) \times 100$$

$$\% \text{ caída FVC} = (\text{FVC post-salino} - \text{FVC post-metacolina}) / (\text{FVC post-salino}) \times 100$$

9. Se continuaron administrando de forma progresiva las sucesivas concentraciones de metacolina, de manera idéntica a lo expuesto en el punto 8. Tras cada concentración de metacolina se realizó una única maniobra (a no ser que la misma se considerara técnicamente incorrecta), con el fin de evitar el efecto acumulativo de las inspiraciones forzadas repetidas sobre el FEV<sub>1</sub> (164).
10. La exploración finalizó tras administrar la concentración de 25 mg/ml, o cuando se detectó un descenso del FEV<sub>1</sub>  $\geq$  20% tras alguna concentración.
11. En caso de deterioro del FEV<sub>1</sub>  $\geq$  20% se administraron 200  $\mu$ g de salbutamol (2 inhalaciones de Ventolin®) y se confirmó

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

#### **PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE METACOLINA**

- Se preparan 8 tubos de laboratorio vacutainer® vacíos y se rotulan de la siguiente manera: S (salino), 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 y 25 mg/ml.
- Se colocan los tubos rotulados en una gradilla, ordenados de izquierda a derecha y de menor a mayor concentración.
- El vial de metacolina (PROVOCHOLINE®) tiene 100 mg; se diluye con 4 ml de suero fisiológico, con lo que se obtiene una concentración de 25 mg/ml.
- Se toman los 4 ml del vial original mediante una jeringa y se depositan en el tubo rotulado como 25 mg/ml.
- Se añaden 2 ml de suero fisiológico a cada uno de los restantes tubos.
- Se realizan diluciones progresivas  $\frac{1}{2}$  a partir de la concentración de 25 mg/ml, para lo que basta trasladar 2 ml de cada vial al de la concentración inmediatamente inferior.
- Los 2 ml retirados del vial de 0,39 mg/ml se desechan.

**Tabla 13:** Preparación de las diluciones de metacolina.

#### 5.4.3.2. Descripción por pasos de la provocación bronquial con adenosina 5'-monofosfato

La prueba de provocación bronquial con AMP se realizó de forma análoga a descrita para metacolina, salvo algunos cambios en la preparación de las diluciones que se recogen en la tabla 14.

A continuación se describe de forma detallada la provocación con AMP:

1. Se completó el cuestionario acerca de la situación clínica basal y del cumplimiento de los períodos de supresión de fármacos.
2. Se realizaron -al menos- tres maniobras espirométricas basales correctas y repetibles. La repetitividad estuvo definida por una variabilidad del FEV<sub>1</sub> y de la FVC  $\leq 5\%$  ó  $\leq 100$  ml entre las tres maniobras mejores.
3. Se confirmó que la función pulmonar basal era aceptable (FEV<sub>1</sub>  $\geq 60\%$  teórico y  $\geq 1,3$  L).
4. Se adiestró al paciente en las maniobras de inhalación a realizar mediante el dosímetro:
  - Para evitar la respiración nasal, el paciente se colocó una pinza nasal.
  - Se explicó cómo debía respirar: vaciar el pecho hasta la CRF, adaptar la boca a la boquilla del nebulizador, e inspirar lenta y profundamente hasta la capacidad inspiratoria máxima.
5. Se adaptó la sensibilidad del termistor a la capacidad inspiratoria del paciente, de manera que se disparara automáticamente al inicio de la inspiración. Tras cada inhalación, el paciente retiró el nebulizador de la boca y respiró del exterior normalmente.
6. En el nebulizador se colocaron 2 ml de salino y de cada una de las concentraciones del broncoconstrictor a administrar.

7. Se inició la exploración efectuando 5 inhalaciones de suero fisiológico y realizando una espirometría al cabo de 60 a 90 segundos. Los valores post-salino del FEV<sub>1</sub> y de la FVC se consideraron los de referencia, y con ellos se compararon los obtenidos tras cada una de las concentraciones del agonista.
8. A continuación se comenzó a administrar la primera concentración de AMP (5 inhalaciones), realizando una espirometría con el mismo intervalo de tiempo (60-90 segundos). Se calculó el porcentaje de caída del FEV<sub>1</sub> y de la FVC con respecto al valor obtenido tras el salino mediante las siguientes fórmulas:

**% caída FEV<sub>1</sub>** = (FEV<sub>1</sub> post-salino – FEV<sub>1</sub> post-AMP) / (FEV<sub>1</sub> post-salino) x 100

**% caída FVC** = (FVC post-salino – FVC post-AMP) / (FVC post-salino) x 100

9. Se continuaron administrando de forma progresiva las sucesivas concentraciones de AMP, de manera idéntica a lo explicado en el punto 8. Se realizó una única maniobra tras cada concentración de AMP (a no ser que la misma se considerara técnicamente incorrecta), con el fin de evitar el efecto acumulativo de las inspiraciones forzadas repetidas sobre el FEV<sub>1</sub>(164).

10. La exploración finalizó tras administrar la concentración de 800 mg/ml o cuando se identificó un descenso del FEV<sub>1</sub>  $\geq 20\%$  tras alguna de las concentraciones recibidas.
11. En caso de observar un deterioro de FEV<sub>1</sub>  $\geq 20\%$  se administraron 200  $\mu\text{g}$  de salbutamol (2 inhalaciones de Ventolin®) y se confirmó que, al cabo de 15–20 minutos, el FEV<sub>1</sub> había revertido a valores  $\geq 90\%$  del basal.

#### PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE AMP

- Se preparan 9 tubos vacutainer® vacíos y rotulados de la siguiente manera: S (salino), 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 y 400 mg/ml.
- Se colocan los tubos rotulados en una gradilla, ordenados de izquierda a derecha y de menor a mayor concentración.
- El vial de AMP tiene 1600 mg. Se diluye con 4 ml de suero fisiológico, con lo que se obtiene una concentración de 400 mg/ml. El AMP es menos soluble que metacolina y, tras añadir el suero fisiológico, el vial debe agitarse (manualmente o mediante agitador de bandeja) durante 3 a 4 minutos, hasta que desaparezcan los grumos.
- Se toman los 4 ml del vial original mediante una jeringa e, interponiendo un filtro millipore de 0.22  $\mu$  se depositan en el tubo rotulado como 400 mg/ml. Es importante e imprescindible filtrar la solución, pues el fabricante no da garantía de la esterilidad de la materia prima original.
- Se añaden 2 ml de suero fisiológico a cada uno de los restantes tubos.
- Se realizan diluciones progresivas  $\frac{1}{2}$  a partir de la concentración de 400 mg/ml, para lo que basta trasladar 2 ml de cada vial al de la concentración inmediatamente inferior.
- Los 2 ml retirados del vial de 3.12 mg/ml se desechan.

*\*Las diluciones deben prepararse el mismo día en que se realiza la prueba.*

*\*\*La concentración de 800 mg/ml se consigue administrando 10 inhalaciones de la dilución 400 mg/ml*

**Tabla 14:** Preparación de las diluciones de AMP.

#### 5.4.3.3. Expresión de la respuesta

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

- **Sensibilidad bronquial:** este parámetro se expresa a través de la PC<sub>20</sub>, que es la concentración necesaria para inducir un deterioro del FEV<sub>1</sub> del 20%. Se calculó mediante interpolación logarítmica, utilizando la siguiente fórmula:

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

Donde:

- C<sub>1</sub> = Concentración de agonista que induce una caída del FEV<sub>1</sub> inmediatamente inferior al 20%.
  - C<sub>2</sub> = Concentración de agonista que induce una caída del FEV<sub>1</sub> inmediatamente superior al 20%.
  - R<sub>1</sub> = Porcentaje de caída del FEV<sub>1</sub> obtenido tras la concentración C<sub>1</sub>.
  - R<sub>2</sub> = Porcentaje de caída del FEV<sub>1</sub> obtenido tras la concentración C<sub>2</sub>.
- **Índice de reactividad bronquial (IR):** este índice permite expresar numéricamente la respuesta a metacolina y AMP, incluso en pacientes que no han sufrido un deterioro de FEV<sub>1</sub> igual o superior al 20%. Se utilizó el método propuesto por Burrows *et al* (165), con la siguiente fórmula:

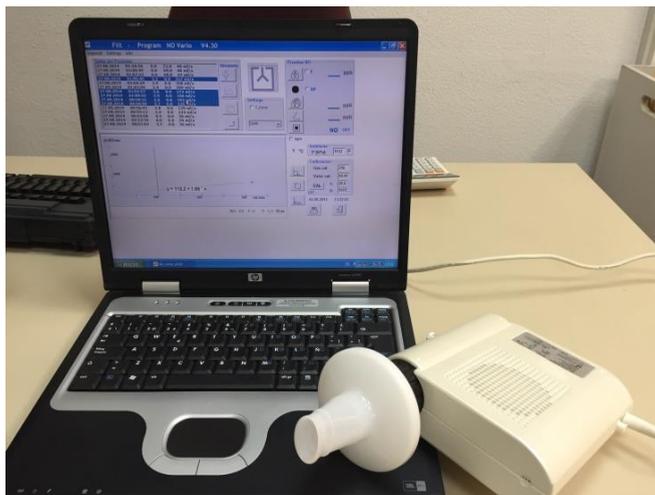
$$\mathbf{IR} = \frac{\text{Caída máxima FEV}_1 (\%)}{\text{Log última concentración administrada (mg/dl)}}$$

- **Atrapamiento aéreo:** este parámetro se estimó mediante una regresión lineal de los valores de FVC detectados en cada etapa de la provocación, frente a los cambios correspondientes en el FEV<sub>1</sub>. En esta regresión se calculó la pendiente y la intercepción. La *pendiente* de la recta obtenida de este modo se relaciona positivamente con el grado de atrapamiento aéreo inducido, mientras que la *intercepción* sobre el eje Y se relaciona negativamente con éste. Es decir, un atrapamiento intenso se manifiesta por una pendiente alta y una intercepción baja (98). En este análisis, tanto los valores del FEV<sub>1</sub> como los de la FVC se expresaron en litros.

#### 5.4.4. Determinación de óxido nítrico nasal, bronquial y alveolar

La determinación de NO nasal, bronquial y alveolar se realizó utilizando un analizador **electroquímico** (*NO-VARIO Analyser, Filt; Berlín, Germany*, fotografía 5), siguiendo las recomendaciones de la ATS y ERS (49).

El sistema proporciona un cierto grado de resistencia a la espiración con el objetivo de que el paciente eleve y cierre el velo del paladar, evitando así la contaminación del aire exhalado por NO procedente de la vía aérea superior, donde las concentraciones son mucho más altas.



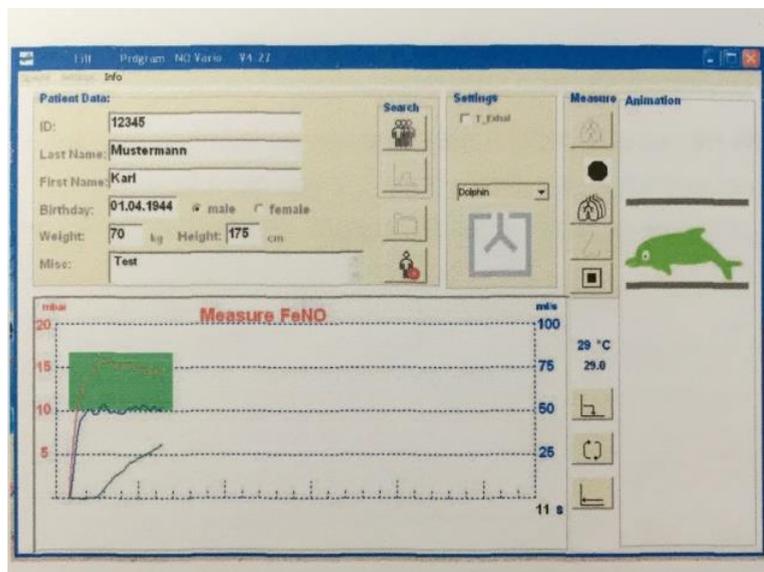
**Fotografía 5:** Sistema electroquímico de determinación de óxido nítrico NO VARIO®.

El paciente fue instruido para inspirar oralmente hasta capacidad pulmonar total e inmediatamente exhalar el aire a través de la boca, contra una resistencia fija, manteniendo un flujo constante utilizando un estímulo *feedback* en la pantalla del ordenador. De esta forma se midieron:

- **Fración exhalada del óxido nítrico (FENO):** se prefijó un flujo de 50 ml/s con una exhalación de 10 segundos y una meseta o *plateau* de, al menos, 3 segundos. Se exigieron tres maniobras aceptables y el valor de la FENO se calculó con la

media aritmética de los tres valores, expresadas en partes por billón (ppb).

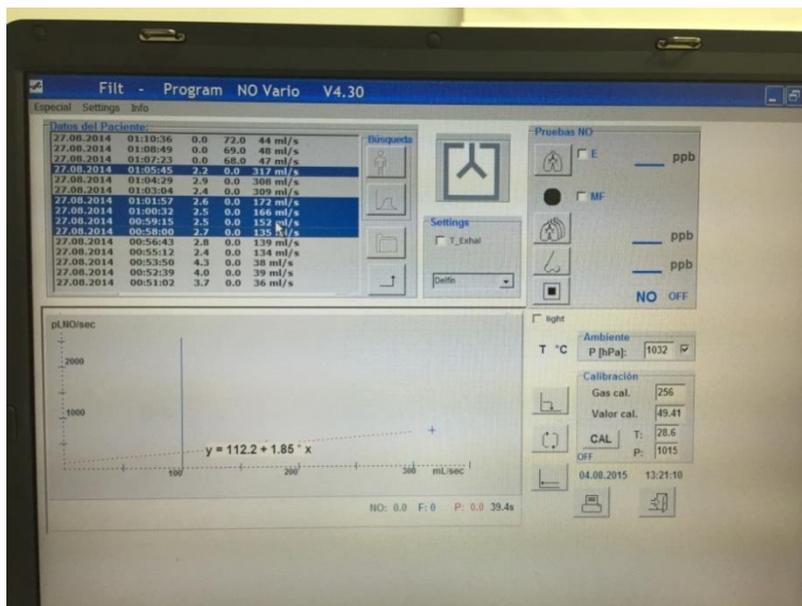
- **Concentración bronquial ( $J'_{awNO}$ ) y alveolar ( $CA_{NO}$ ) de óxido nítrico:** se determinaron mediante la medición de NO en tres tramos de flujos, siguiendo el modelo bicompartimental de Tsoukias y George (124). Esto se consiguió con un incentivador visual en la pantalla del ordenador (fotografías 6 y 7), obteniendo -al menos- dos determinaciones correctas y repetibles de cada uno de los tramos: de 75 a 140 ml/s, de 141 a 220 ml/s y de 221 a 330 ml/s.



**Fotografía 6:** Incentivador visual del NO VARIO® para conseguir distintos flujos espiratorios.

A partir de los valores de NO (medidos en ppb), obtenidos en cada flujo de muestreo, se calculó el débito de NO en pl/s, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Débito o output de NO (pl/s)} = \text{NO (en ppb)} \times \text{flujo (en ml/s)} \times 0,6$$



**Fotografía 7:** Medición de NO a distintos flujos espiratorios en NO VARIO®.

Mediante la representación en un eje de ordenadas del débito de NO (pl/s) respecto al flujo de muestreo (ml/s), se obtuvo una recta de regresión que se analizó mediante el método de mínimos cuadrados. La pendiente de esta recta corresponde al  $CA_{NO}$ , mientras que la intercepción en el eje Y corresponde al  $J'aw_{NO}$  (figura 11, página 56).

Una vez obtenidos los valores de  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$ , se aplicaron fórmulas de corrección para tener en cuenta la morfología en trompeta y la difusión axial, de acuerdo con el método propuesto por Condorelli *et al* (126). Con los flujos de muestreo utilizados por nosotros, la ecuación aplicada fue la siguiente:

$$CA_{NO} \text{ corregido} = CalvNO \text{ (ppb)} - [J'awNO \text{ (pl/s)} / 860]$$

$$J'aw_{NO} \text{ corregido} = J'awNO \times 1,7$$

- **Determinación del  $NO_n$ :** la maniobra se realizó de forma idéntica a la de determinación de la FENO, pero durante la misma el sistema realizó una toma pasiva de aire nasal mediante la colocación de una oliva desechable en la narina. El tamaño de esta oliva se eligió en función del tamaño del orificio nasal de cada paciente. Se realizaron, al menos, tres determinaciones y el valor del NO fue la media aritmética de las mismas.

#### 5.4.5. Obtención de condensado de aire exhalado y determinación del pH

El condensado del aire exhalado se obtuvo utilizando un condensador de aire (*Ecoscreen, Erich Jaeger, Hoechberg,*

*Germany*; fotografía 8). Cada sujeto respiró a volumen corriente, durante 10 minutos, dentro del sistema. Tras esto, se tomó una alícuota de 200  $\mu$ l de CAE y se midió el pH directamente mediante un pHmetro calibrado, que incorpora un sensor con compensación de temperatura (modelo pH-900) con un microelectrodo (*Matrohm, AG; Herisau, Switzerland*).

A continuación, la muestra se *deaireó* haciendo burbujear argón a través de la misma durante 8 minutos. Tras ello, se determinó nuevamente el pH y la muestra restante de condensado se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Fotografía 8:** Condensador de aire *Ecoscreen* para la obtención del CAE.

En todos los casos la muestra de CAE se obtuvo antes de la espirometría y de las pruebas de provocación bronquial con broncoconstrictores.

## 5.5. Análisis estadístico

---

Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico InStat para Windows versión 3.01 (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

Los datos se resumieron con respecto a las características demográficas y basales, así como a las evaluaciones experimentales. Se realizó un análisis descriptivo que para las variables continuas incluyó: número de observaciones, media (o media geométrica) e intervalo de confianza del 95% para la media. Para las variables discretas incluyó frecuencias y porcentajes por grupo.

Las diferencias entre los dos grupos de estudio se analizaron mediante la prueba *t de Student* para muestras independientes, o la prueba exacta de *Fisher*, según procediera. Las estadísticas inferenciales y los gráficos se utilizaron para comparar los grupos. La relación entre las diferentes variables numéricas se exploró mediante la correlación de *Pearson* o *Spearman*, según procediera.

Algunas de las variables del estudio como  $NO_n$  y FENO se transformaron logarítmicamente con el fin de homogeneizar su varianza. En consecuencia, estas variables se expresaron en forma de media geométrica e intervalo de confianza del 95%. Otras variables

numéricas se analizaron sin transformación y se expresaron mediante media aritmética e intervalo de confianza del 95%. Cuando no se consiguió homogeneizar la varianza tras transformación logarítmica, el resultado se expresó como mediana y rango y el análisis se realizó mediante estadística no paramétrica (prueba de *Mann-Whitney*). Esto ocurrió únicamente con el IR para AMP.

Las poblaciones que se utilizaron para evaluar las diferencias en el FEV<sub>1</sub>, atrapamiento inducido por cada broncoconstrictor y restantes variables en el exhalado fueron las integradas por pacientes con DCP (población de estudio) y controles sanos (población control).

## 5.6. Aspectos éticos

---

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital General de Valencia y del Hospital Clínico Universitario de Valencia, centros de los cuales proceden los pacientes participantes en el estudio.

Los pacientes y controles firmaron un consentimiento informado aceptando su participación. En el caso de los menores de edad este consentimiento fue firmado por sus representantes legales.

La parte experimental de esta 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.



# Resultados



## 6.- RESULTADOS

### 6.1. Características generales de la muestra

---

La muestra estuvo constituida por 32 enfermos de DCP y 32 controles, sin diferencias significativas entre los mismos en cuanto a edad o características antropométricas. Sin embargo, la proporción de mujeres en el grupo de controles fue significativamente mayor que en los enfermos ( $p=0,04$ , tabla 15). La población pediátrica (menores de 18 años) constituyó un 53,1% del total. Aunque inicialmente estaba previsto incluir 35 individuos en cada grupo, hubo 3 enfermos que no pudieron completar todas las pruebas por abandono o pérdida de seguimiento, por lo que la muestra final fue de 64 sujetos (32 por grupo). Sus características basales se detallan en la tabla 15.

En el caso de los pacientes, se recogieron diferentes datos relacionados con la enfermedad: edad al diagnóstico, tiempo de evolución hasta la realización de este estudio, manifestaciones clínicas, presencia de bronquiectasias, resultados de la ultraestructura ciliar y patrón/frecuencia de la batida ciliar. Estos datos se recogen en la tabla 16.

	DCP	Controles	p
<b>Número de sujetos</b>	32	32	-
<b>Género (masculino/femenino)</b>	19/13	10/22	0,04
<b>Edad (años)</b>	24 (7-54)	21 (7-48)	0,39
<b>Niños (7-17 años)</b>	17 (53,1)	18 (56,2)	n.s.
<b>Adultos (18-60 años)</b>	15 (46,8)	14 (43,7)	n.s.
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	22,2 (20,4-24)	20,74 (19,5-21,9)	0,16
<b>Atopia</b>	7 (21,8)	13 (40,6)	0,17

**Tabla 15:** Características basales de los enfermos y controles participantes en el estudio. Datos presentados como número (%), excepto para la edad que está expresada como media (rango) y para el IMC que está expresada como media (95% IC).

Características (n=32)	Resultados
<b>Edad media en el momento del diagnóstico (años)</b>	12 (1 - 46)
<b>Tiempo de evolución de diagnóstico</b>	12,1 (7,9 - 16,2)
<b>Manifestaciones clínicas:</b>	
- Tos crónica/rinorrea	30 (93,7)
- Neumonías de repetición	23 (72,0)
- Distrés respiratorio neonatal	22 (68,7)
- Otitis de repetición	15 (46,8)
- Sinusitis	11 (34,3)
- Asma de difícil control	7 (21,8)
<b>Situs inversus</b>	7 (22)

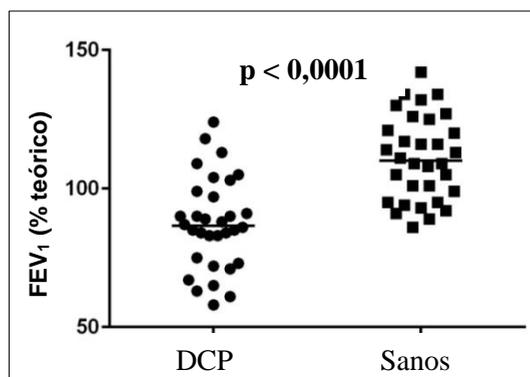
Características (n=32)	Resultados
<b>Resultados de la TC torácica:</b>	
- No realizado	5 (15,6)
- Realizado	27 (84,3)
o Bronquiectasias	26 (81,2)
o No bronquiectasias	1 (3,12)
- Pacientes < 18 años con bronquiectasias	14 (82,3)
<b>Localización de bronquiectasias</b>	
- Varias localizaciones	23 (88,4)
- LII	2 (7,6)
- LM	1 (3,8)
<b>Microscopia electrónica:</b>	
- No realizada	14 (43,7)
- Realizada	18 (56,2)
<b>Resultados microscopia electrónica:</b>	
- Normal	4 (22,2)
- No concluyente	2 (11,1)
- Déficit parcial de dineína	3 (16,6)
- Ausencia total de dineína	8 (44,4)
- Alteraciones en microtúbulos periféricos	1 (5,5)
<b>Patrón de batida ciliar:</b>	
- Cilios inmóviles	7 (21,8)
- Movimiento incoordinado y de baja frecuencia (< 10 Hz)	25 (78,1)

**Tabla 16:** Características clínicas de los pacientes con DCP. Resultados expresados como número de pacientes (%), excepto para la edad en el momento del diagnóstico y el tiempo de evolución, que están expresados como media (rango) y como media (95% IC), respectivamente.

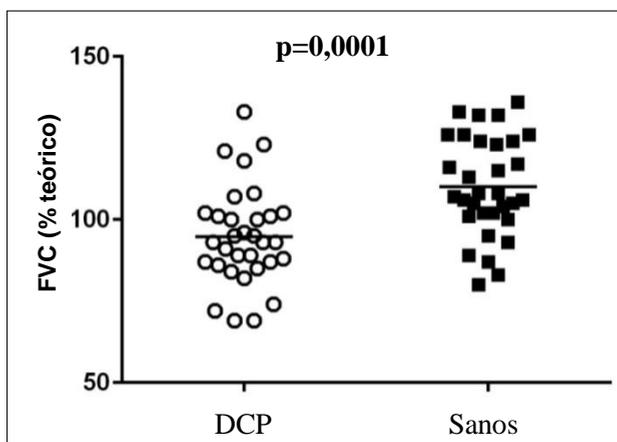
La función pulmonar basal estaba significativamente deteriorada en los pacientes con DCP comparado con los sujetos sanos, tanto en lo que se refiere a los valores del FEV<sub>1</sub> como de la FVC (tabla 17 y figuras 18 y 19).

Parámetro	DCP	Sanos	p
<b>FEV<sub>1</sub></b> (% teórico)	87,2 (81,2-93,2)	110,9 (105,4-116,4)	< 0,0001
<b>FVC</b> (% teórico)	94,8 (89,3-100,2)	110,1 (104,6-115,6)	0,0001
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC (%)</b>	77,64 (74,4-80,8)	86,52 (83,9-89,1)	< 0,0001

**Tabla 17:** Función pulmonar basal en pacientes con DCP y controles. Datos presentados como media aritmética (95% IC).



**Figura 18:** Valores individuales del FEV<sub>1</sub> en % del valor teórico en los dos grupos de estudio. Las líneas horizontales representan la media aritmética.



**Figura 19:** Valores individuales de la FVC en % del valor teórico en los dos grupos de estudio. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

## 6.2. Pruebas de provocación bronquial

### 6.2.1. Situación funcional pulmonar basal antes de la exploración con cada agonista

Puesto que la capacidad broncoconstrictora de la metacolina (y posiblemente también del AMP) depende en gran medida de la situación funcional basal, es conveniente constatar que la función pulmonar al inicio de cada exploración mostró ciertas diferencias. En las tablas 18 y 19 se detallan los valores basales del  $FEV_1$  y FVC antes de la exploración con cada agonista en ambos grupos. En los pacientes con DCP no se encontraron diferencias significativas en el  $FEV_1$  y FVC previos a la exploración con cada agonista (tabla 18). Por el

contrario, ambos parámetros funcionales estaban significativamente más deteriorados en los individuos sanos el día que se realizó la exploración con AMP (tabla 19).

Situación basal de los enfermos			
Parámetro	Metacolina	AMP	p
<b>FEV<sub>1</sub> (L)</b>	2,47 (2,16-2,78)	2,46 (2,14-2,77)	0,74
<b>FVC (L)</b>	3,21 (2,82-3,59)	3,28 (2,88-3,68)	0,12

**Tabla 18:** Función pulmonar basal previa a la exploración con cada agonista en los enfermos. Datos presentados como media aritmética (95% IC).

Situación basal de los controles			
Parámetro	Metacolina	AMP	p
<b>FEV<sub>1</sub> (L)</b>	3,17 (2,83-3,50)	3,05 (2,72-3,39)	0,005
<b>FVC (L)</b>	3,72 (3,29-4,14)	3,61 (3,18-4,04)	0,008

**Tabla 19:** Función pulmonar basal previa a la exploración con cada agonista en los individuos sanos. Datos presentados como media aritmética (95% IC).

### 6.2.2. Respuesta a la provocación bronquial con metacolina:

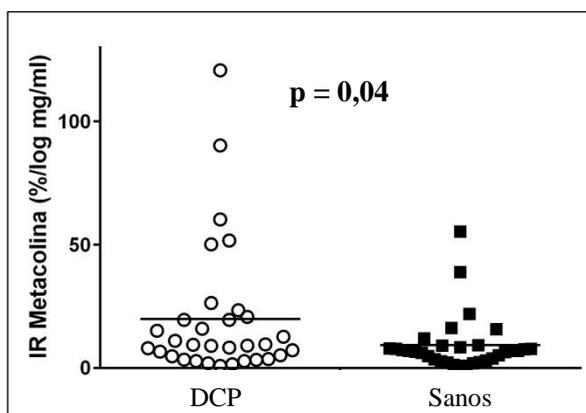
Se encontró una **hiperrespuesta bronquial** a metacolina ( $PC_{20} < 16$  mg/ml) en 10 de los enfermos, frente a sólo 3 casos positivos en el grupo control ( $p=0,06$ ). Con el objetivo de poder analizar la respuesta a este agonista cuantitativamente en todos los individuos, y no sólo de forma categórica en aquellos en los que la prueba fue positiva, se analizó el **índice de reactividad** (IR) de cada sujeto. Como puede observarse en la tabla 20, los pacientes con DCP mostraban valores para el IR significativamente más altos (y por tanto, mayor grado de sensibilidad bronquial) que los sujetos sanos ( $p = 0,04$ ).

El estudio de la respuesta a la metacolina se completó con el análisis del grado de **atrapamiento aéreo** inducido por el agonista. Nuestros pacientes con DCP presentaban valores de la pendiente  $FVC$  vs  $FEV_1$  significativamente más altos e intercepciones significativamente más bajas que los sujetos sanos (tabla 20). Estos resultados claramente sugieren que la inhalación de un agonista broncoconstrictor directo induce un mayor grado de atrapamiento aéreo en los pacientes con DCP que en los individuos sanos.

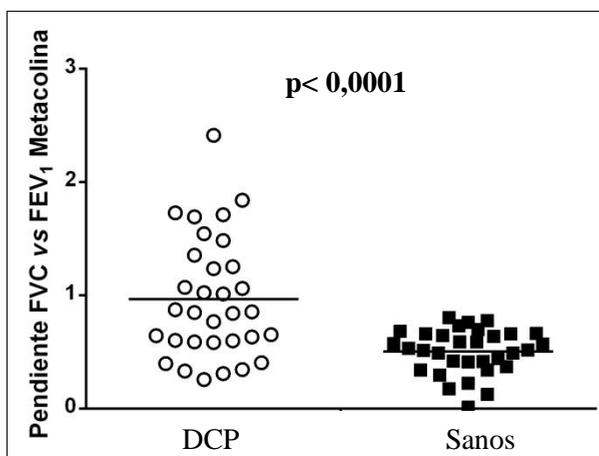
HRB a metacolina			
	DCP	Sanos	p
<b>Casos con PC<sub>20</sub> &lt; 16 mg/ml</b>	10 (31,2%)	3 (9,3%)	0,06
<b>IR (%/ log mg/ml)</b>	19,8 (10,0-29,6)	9,3 (5,2-13,3)	0,04
<b>Pendiente FVC vs FEV<sub>1</sub></b>	0,9 (0,8-1,1)	0,5 (0,4-0,6)	< 0,0001
<b>Intercepción FVC vs FEV<sub>1</sub></b>	0,7 (0,3-1,2)	2,1 (1,7-2,6)	< 0,0001

**Tabla 20:** Prevalencia de HRB, índice de reactividad (IR) y grado de atrapamiento aéreo (pendiente e intercepción FVC vs FEV<sub>1</sub>) con la metacolina en cada grupo de estudio. Datos presentados como media aritmética.

En la figura 20 se representan los valores individuales para el IR a la metacolina en cada una de las poblaciones y en la figura 21, la pendiente FVC vs FEV<sub>1</sub> en cada uno de los grupos.



**Figura 20:** Valores individuales para el IR a la metacolina en ambas poblaciones. Las líneas horizontales representan la media aritmética.



**Figura 21:** Valores individuales de la pendiente FVC vs FEV<sub>1</sub> para metacolina en las dos poblaciones. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

### 6.2.3. Respuesta a la provocación bronquial con AMP

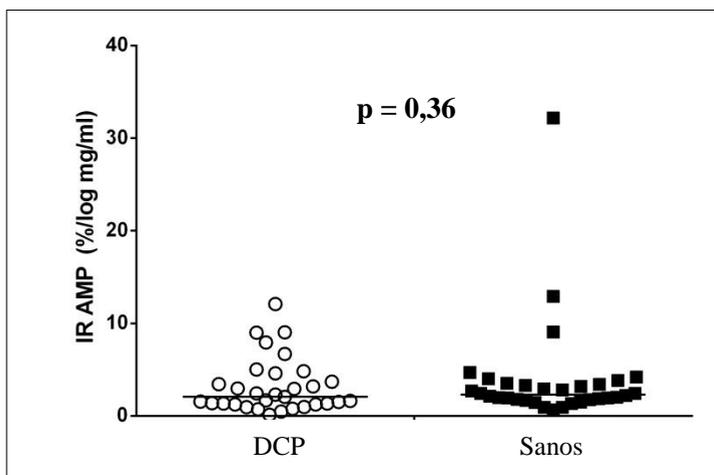
Se encontró una **hiperrespuesta bronquial** al AMP ( $PC_{20} < 400$  mg/ml) en 4 de los enfermos, frente a 3 casos positivos en el grupo control, por lo que no hubo diferencias significativas en la prevalencia de HRB a este agonista en nuestra muestra ( $p = 1,0$ ). Del mismo modo que con la metacolina y con el objetivo de poder analizar la respuesta a AMP como una variable cuantitativa y no sólo de forma categórica, se analizó el **índice de reactividad** (IR) de cada sujeto. Al contrario de lo que se observaba con metacolina, no hemos podido identificar diferencias en el grado de sensibilidad bronquial a AMP entre las dos poblaciones estudiadas ( $p = 0,36$ , tabla 21).

El estudio de la respuesta a AMP se completó con el análisis del grado de **atrapamiento aéreo**, mediante la regresión de la FVC frente al FEV<sub>1</sub>. En nuestro estudio no se encontraron diferencias en la intercepción ( $p = 0,18$ ), pero la pendiente tendía a ser más alta en los pacientes con DCP que en los sujetos sanos, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística ( $p = 0,07$ , tabla 21).

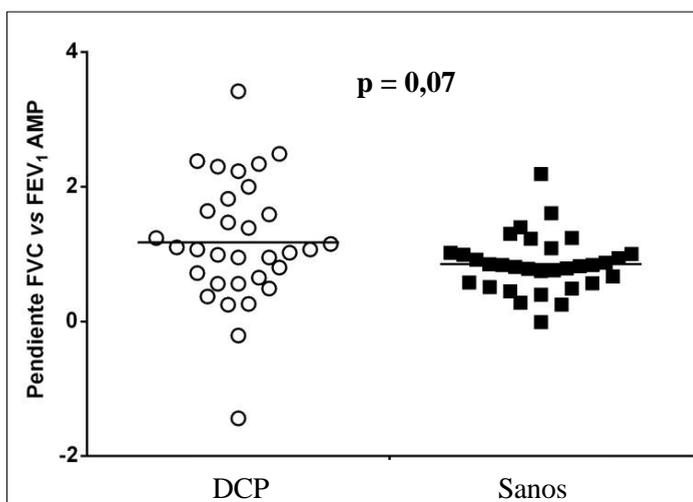
HRB a AMP			
	DCP	Sanos	p
<b>Casos con PC<sub>20</sub>&lt; 400mg/ml</b>	4 (12,5%)	3 (9,3%)	1,00
<b>IR (%/ log mg/ml)*</b>	1,9 (-1,9-12,1)	2,3 (0,6-32,1)	0,36
<b>Pendiente FVC vs FEV<sub>1</sub>**</b>	1,2 (0,8-1,5)	0,8 (0,7-1,0)	0,07
<b>Intercepción FVC vs FEV<sub>1</sub>**</b>	0,2 (-0,6-1,1)	0,9 (0,4-1,5)	0,18

**Tabla 21:** Prevalencia de HRB, índice de reactividad (IR) y grado de atrapamiento aéreo (pendiente e intercepción FVC vs FEV<sub>1</sub>) con AMP en cada grupo de estudio. Datos presentados como número (%), mediana (rango)\* y como media aritmética \*\* (95% IC).

En las figuras 22 y 23 se reflejan, de forma análoga a como se ha hecho con metacolina, los valores del IR y pendiente de intercepción FVC vs FEV<sub>1</sub> al AMP en ambos grupos.



**Figura 22:** Valores individuales para el IR al AMP en ambas poblaciones. Las líneas horizontales representan la mediana.



**Figura 23:** Valores individuales para la pendiente FVC vs FEV<sub>1</sub> a AMP en ambas poblaciones. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

## 6.3. Marcadores de inflamación en la vía aérea

### 6.3.1. Determinación de óxido nítrico

#### 6.3.1.1. Vía aérea superior: óxido nítrico nasal (NO<sub>n</sub>)

Como parte del estudio del metabolismo del NO en la vía aérea, se determinó en primer lugar el valor de NO nasal en ambos grupos, encontrando diferencias significativas (161,4 vs 2.338,8 ppb;  $p < 0,0001$ ), siendo este parámetro claramente menor en el grupo de enfermos con DCP (tabla 22 y figura 24). Es necesario resaltar que 6 pacientes con DCP (18,7% del total) presentaron valores de NO<sub>n</sub> similares a los encontrados en la población sana (figura 24). Cinco de estos seis pacientes (83,3%) fueron niños. Por tanto, 5 de los 17 niños con DCP (29,4%) presentaron valores de NO<sub>n</sub> que podrían haber sido considerados normales.

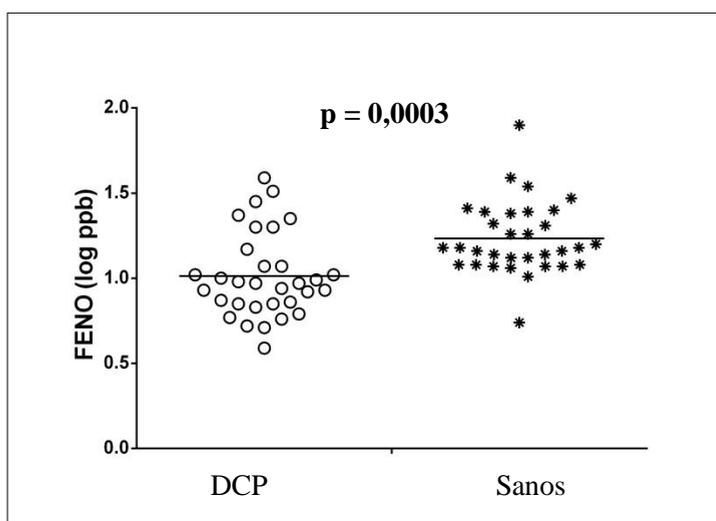
NO nasal			
	DCP	Sanos	p
<b>n</b>	32	32	-
<b>NO<sub>n</sub> *</b> <b>(ppb)</b>	161,4 (85,3-305,5)	2.338,8 (2.118,4-2.588,2)	< 0,0001

**Tabla 22:** Valores de NO<sub>n</sub> (ppb) en ambas poblaciones, expresados como media geométrica (95% IC)\*.



FENO			
	DCP	Sanos	p
<b>n</b>	32	32	-
<b>FENO (ppb)*</b>	10,3 (8,4-12,6)	17,1 (14,3-20,4)	0,0003

**Tabla 23:** Valores de la FENO en ambas poblaciones. \*Media geométrica (95% IC).



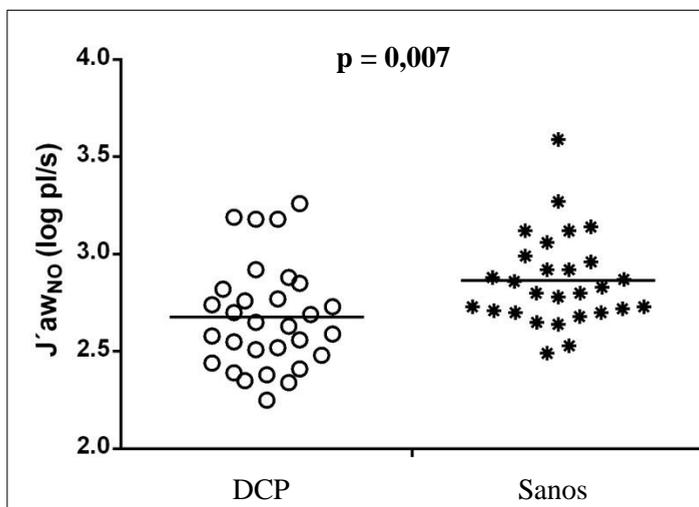
**Figura 25:** Valores logarítmicos individuales de FENO en las dos poblaciones estudiadas. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

La determinación de NO exhalado a distintos flujos para el cálculo del NO bronquial y alveolar ( $J'_{awNO}$  y  $CA_{NO}$ ) sólo pudo realizarse en 30 pacientes y 28 controles (tabla 24), ya que se excluyeron aquellos individuos que no fueron capaces de realizar la técnica correctamente, en concreto 2 pacientes de 9 años y 4 controles entre 7 y 9 años.

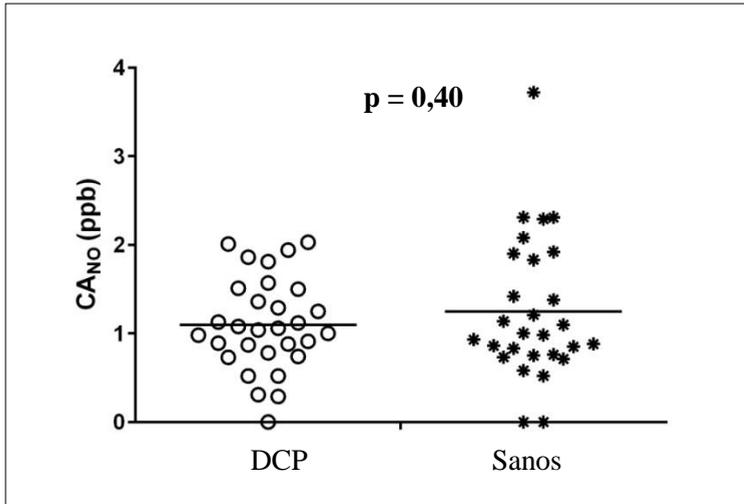
El  $J'_{awNO}$  fue significativamente más bajo en los enfermos de DCP que en los controles sanos ( $p=0,007$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias respecto al  $CA_{NO}$  entre los dos grupos ( $p = 0,4$ ). Los valores individuales se muestran en las figuras 26 y 27.

$J'_{awNO}$ y $CA_{NO}$			
	DCP	Sanos	p
<b>n</b>	30	28	-
<b><math>J'_{awNO}</math> (pl/s)*</b>	475,3 (376,7-599,8)	731,1 (591,5-901,6)	0,007
<b><math>CA_{NO}</math> (ppb)**</b>	1,09 (0,90-1,29)	1,25 (0,93-1,56)	0,4

**Tabla 24:** Valores de  $J'_{awNO}$  y  $CA_{NO}$  en ambas poblaciones. \*Media geométrica (95% IC). \*\*Media aritmética (95% IC).



**Figura 26:** Valores individuales para  $J'_{awNO}$  (expresado en log pl/s) en ambas poblaciones. Las líneas horizontales representan la media aritmética.



**Figura 27:** Valores individuales de CA<sub>NO</sub> en ambas poblaciones. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

### 6.3.1.3. Valores de NO<sub>n</sub>, FENO, J´aw<sub>NO</sub> y CA<sub>NO</sub> en la población no atópica

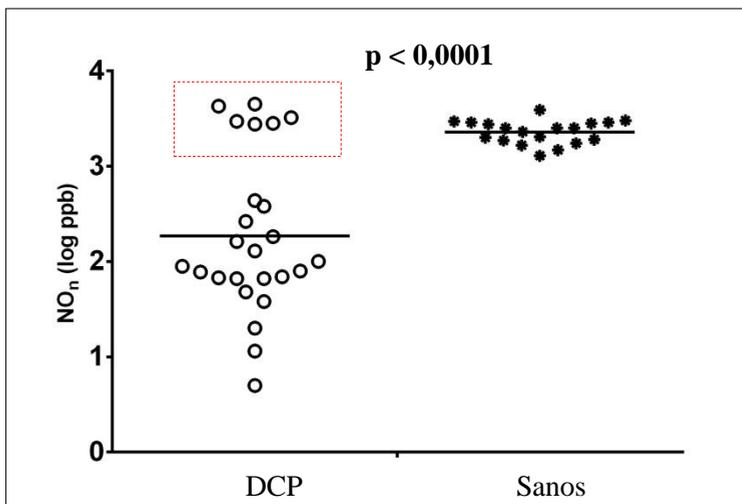
Dado que la atopia puede relacionarse con valores de NO más elevados, se procedió a analizar los resultados de NO<sub>n</sub>, FENO, J´aw<sub>NO</sub> y CA<sub>NO</sub> únicamente en los pacientes no atópicos de cada grupo (pruebas cutáneas negativas), para tratar de determinar si su presencia pudiera haber sido un factor de confusión que afectara la significación de los resultados obtenidos en la población global.

El NO<sub>n</sub> continuó siendo más bajo en el grupo de enfermos no atópicos respecto a los controles de la misma condición ( $p < 0,0001$ ), como se refleja en la tabla 25.

NO <sub>n</sub> en individuos NO ATÓPICOS			
	DCP	Sanos	p
<b>n</b>	25	19	-
<b>NO<sub>n</sub> (ppb)*</b>	186,2 (84,13-411,4)	2.280,3 (1.990,67-2.618,2)	< 0,0001

**Tabla 25:** Valores de NO<sub>n</sub> (ppb) en los individuos no atópicos de ambas poblaciones, expresados como media geométrica (95% IC)\*.

Además, tras excluir a los individuos atópicos, en el grupo de enfermos continuó habiendo 6 pacientes con valores de NO<sub>n</sub> muy similares a los del grupo control (figura 28).



**Figura 28:** Valores individuales de NO<sub>n</sub> (expresado en log ppb) en las dos poblaciones de individuos no atópicos. Las líneas horizontales representan la media aritmética. En rojo se han resaltado pacientes con NO<sub>n</sub> similar a la población sana.

Del mismo modo, la FENO se mantuvo significativamente más baja en el grupo de enfermos que en los controles, aunque con menores diferencias que en la muestra global ( $p = 0,01$ ; tabla 26)

FENO en NO ATÓPICOS			
	DCP	Sanos	p
<b>n</b>	25	19	-
<b>FENO (ppb)*</b>	10,6 (8,3-13,4)	15,3 (12,6-18,4)	0,01

**Tabla 26:** Valores de la FENO en ambas poblaciones de los individuos no atópicos, expresados como media geométrica (95% IC)\*.

Por otra parte, las diferencias encontradas en el valor de  $J'aw_{NO}$  entre afectados de DCP y controles también se mantuvieron tras eliminar del análisis a los individuos atópicos ( $p=0,04$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los valores de  $CA_{NO}$  de ambos grupos (tabla 27,  $p = 0,43$ )

$J'aw_{NO}$ y $CA_{NO}$ en NO ATÓPICOS			
	DCP	Sanos	p
<b>n</b>	24	17	-
<b><math>J'aw_{NO}</math>(pl/s)*</b>	478,6 (360,5-636,8)	645,6 (528,4-788,8)	0,04
<b><math>CA_{NO}</math>(ppb)*</b>	1,01 (0,80-1,26)	1,15 (0,87-1,51)	0,43

**Tabla 27:** Valores de  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$  en los individuos no atópicos de ambas poblaciones. \*Media aritmética (95% IC).

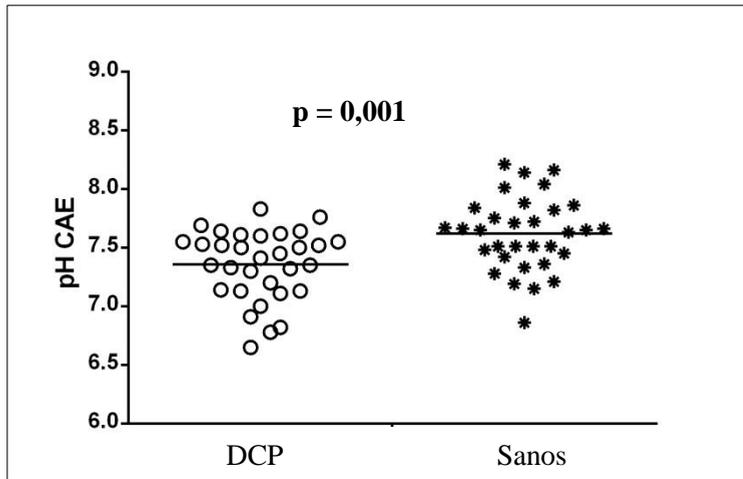
Es decir, tras excluir a los individuos atópicos de la muestra las diferencias entre los valores de FENO y J´awNO entre ambos grupos fueron menores, aunque continuaron siendo significativas. Por lo tanto, en nuestra muestra, la presencia de **atopia** (pruebas cutáneas positivas) no fue un factor que modificara sustancialmente las diferencias encontradas en los valores de NO entre los pacientes afectados de DCP y los individuos sanos.

### 6.3.2 Estudio del pH del CAE

Como parte del estudio de los marcadores de inflamación de la vía aérea, se midió el pH del CAE obtenido de cada paciente tras la *deaireación* de la muestra con argón. Se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos, con un pH más ácido en el grupo de enfermos con DCP que en los individuos sanos ( $p = 0,001$ ). Estos resultados se muestran en la tabla 28 y figura 29.

pH del CAE			
	DCP	Sanos	p
<b>n</b>	32	32	-
<b>pH*</b>	7,358 (7,250-7,465)	7,620 (7,507-7,733)	0,001

**Tabla 28:** Valores del pH del CAE en ambas poblaciones. \*Media aritmética (95% IC).



**Figura 29:** Valores individuales del pH del condensado del aire exhalado (CAE) en las dos poblaciones. Las líneas horizontales representan la media aritmética.

## 6.4. Correlaciones

Con el objetivo de valorar la relación entre la respuesta bronquial a los agonistas directos e indirectos y los marcadores de inflamación en la vía aérea en los enfermos de DCP, se estudió la correlación entre las variables que definen cada una de ellas:

- La **respuesta bronquial** a la metacolina y al AMP se estudió mediante el deterioro del  $FEV_1$  (índice de reactividad, IR) y el atrapamiento aéreo (pendiente e intercepción de la regresión  $FVC$  vs  $FEV_1$ ).
- Los **marcadores de inflamación** fueron:
  - Óxido nítrico:  $NO_n$ , FENO,  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$
  - pH del condensado de aire exhalado

### 6.4.1. Relación entre respuesta bronquial a agonistas y óxido nítrico

En la tabla 29 se indican las correlaciones entre los parámetros que definen la respuesta a cada agonista broncoconstrictor y los valores del  $\text{NO}_n$ . No se observó ninguna correlación significativa entre ninguno de estos indicadores en los enfermos con DCP.

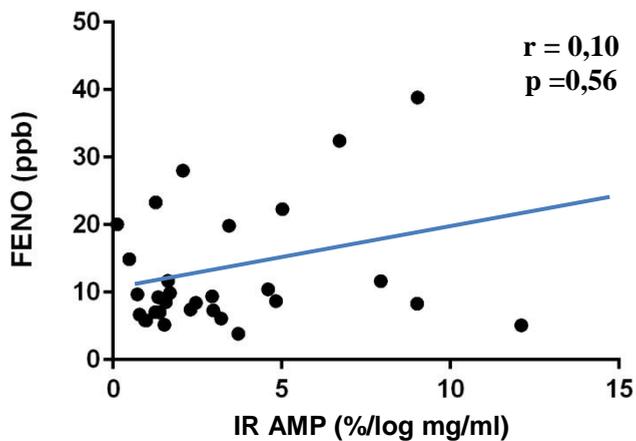
$\text{NO}_n$ en DCP		
<b>Metacolina</b>	IR (%/ log mg/ml)	r= 0,12 p= 0,50
	Pendiente FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= -0,24 p= 0,18
	Intercepción FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= 0,05 p= 0,78
<b>AMP</b>	IR (%/ log mg/ml)	r= -0,08 p= 0,66
	Pendiente FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= -0,12 p= 0,50
	Intercepción FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= 0,07 p= 0,68

**Tabla 29:** Correlación entre la respuesta a ambos agonistas y los valores de  $\text{NO}_n$  en pacientes con DCP.

En cuanto a la **FENO**, tampoco se encontró ninguna correlación significativa entre este marcador de inflamación bronquial y la hiperrespuesta bronquial a la metacolina ni al AMP (tabla 30). La correlación entre la FENO de los enfermos y su IR a AMP fue muy débil y no significativa (figura 30).

FENO en DCP		
<b>Metacolina</b>	IR (%/ log mg/ml)	r= -0,03 p= 0,84
	Pendiente FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= -0,22 p= 0,22
	Intercepción FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= 0,14 p= 0,42
<b>AMP</b>	IR (%/ log mg/ml)	r= 0,10 p= 0,56
	Pendiente FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= -0,14 p= 0,43
	Intercepción FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= 0,09 p= 0,61

**Tabla 30:** Correlación entre la respuesta a ambos agonistas y valores de la FENO en pacientes con DCP.

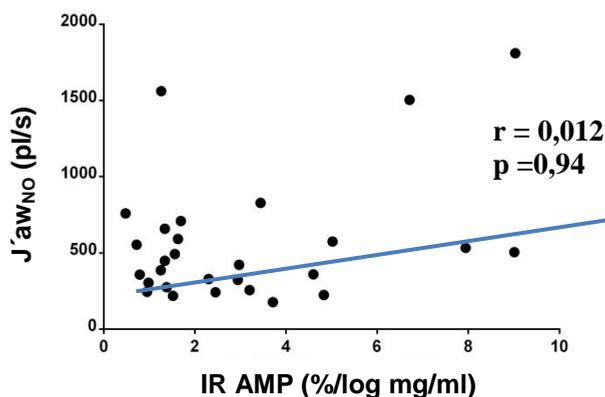


**Figura 30:** Correlación entre el IR al AMP y FENO en enfermos con DCP.

Del mismo modo, tampoco se observó correlación entre los valores de  $J'aw_{NO}$  y la hiperrespuesta bronquial a uno y otro agonista (tabla 31). La correlación de este marcador de inflamación bronquial y el IR a AMP fue aún más débil que con la FENO (figura 31).

$J'aw_{NO}$ en DCP		
<b>Metacolina</b>	IR (%/ log mg/ml)	r= -0,004 p= 0,98
	Pendiente FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= -0,18 p=0,33
	Intercepción FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= 0,18 p=0,33
<b>AMP</b>	IR (%/ log mg/ml)	r= 0,012 p= 0,94
	Pendiente FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= -0,02 p= 0,90
	Intercepción FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= -0,01 p= 0,94

**Tabla 31:** Correlación entre la respuesta a ambos agonistas y los valores de  $J'aw_{NO}$  en pacientes con DCP.

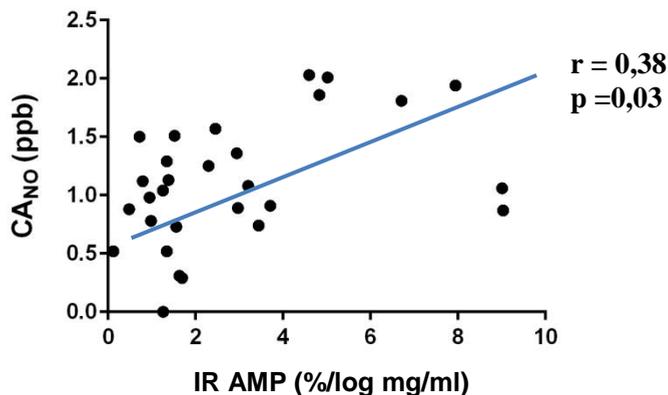


**Figura 31:** Correlación entre el IR al AMP y  $J'aw_{NO}$  en enfermos con DCP.

En cuanto a la  $CA_{NO}$ , no se observó ninguna correlación con la respuesta a la metacolina (tabla 32). Sin embargo, sí se encontró una relación significativa entre la sensibilidad al AMP (IR) y la  $CA_{NO}$  en nuestra población de enfermos con DCP (figura 32).

$CA_{NO}$ en DCP		
Metacolina	IR (%/ log mg/ml)	$r = 0,007$ $p = 0,97$
	Pendiente FVC vs $FEV_1$	$r = 0,06$ $p = 0,72$
	Intercepción FVC vs $FEV_1$	$r = 0,04$ $p = 0,8$
AMP	IR (%/ log mg/ml)	<b><math>r = 0,38</math></b> <b><math>p = 0,03</math></b>
	Pendiente FVC vs $FEV_1$	$r = -0,16$ $p = 0,40$
	Intercepción FVC vs $FEV_1$	$r = 0,18$ $p = 0,34$

**Tabla 32:** Correlación entre la respuesta a ambos agonistas y los valores del  $CA_{NO}$  en pacientes con DCP. En negrita se señalan las correlaciones significativas.



**Figura 32:** Correlación entre el IR al AMP y el  $CA_{NO}$  en enfermos con DCP.

### 6.4.2. Relación entre respuesta bronquial a agonistas y pH del CAE

No pudo detectarse correlación significativa entre los parámetros de hiperrespuesta bronquial a ninguno de los dos agonistas y los valores de pH del condensado del aire exhalado en el grupo de enfermos. Los resultados se resumen en la tabla 33.

pH en DCP		
<b>Metacolina</b>	IR (%/ log mg/ml)	r= 0,27 p= 0,13
	Pendiente FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= 0,33 p=0,06
	Intercepción FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= -0,27 p= 0,13
<b>AMP</b>	IR (%/ log mg/ml)	r= 0,18 p= 0,30
	Pendiente FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= -0,16 p= 0,36
	Intercepción FVC vs FEV <sub>1</sub>	r= 0,19 p= 0,28

**Tabla 33:** Correlación entre la respuesta a ambos agonistas y los valores de pH del condensado de aire exhalado en los pacientes con DCP.



# Discusión



## 7.- DISCUSIÓN

Nuestros resultados confirman que los pacientes con DCP presentan un grado de HRB a agonistas broncoconstrictores directos, como metacolina, significativamente más elevado que los sujetos sanos. Por el contrario, la respuesta a broncoconstrictores indirectos, como AMP, es similar en ambas poblaciones. Estos resultados sugieren que en la génesis de la HRB detectada en los pacientes con DCP, participan más directamente las alteraciones persistentes de la geometría de las vías aéreas que los cambios inflamatorios agudos. Esta interpretación de nuestros resultados es concordante con la ausencia de relación entre los presuntos marcadores de inflamación bronquial activa (FENO, J'aw<sub>NO</sub>) y la intensidad de la respuesta bronquial a cada uno de los dos agonistas.

Por otra parte, este trabajo aporta nuevos datos sobre marcadores de inflamación de la vía aérea, que hasta ahora habían sido escasamente estudiados en pacientes con DCP y que ofrecían resultados contradictorios (NO alveolar y bronquial), así como datos originales de los que no se tenía conocimiento hasta el momento (pH de condensado de aire exhalado).

Los resultados obtenidos demuestran que la concentración de NO bronquial es significativamente más baja en los pacientes con DCP que en los sujetos sanos, mientras que las diferencias en los valores de NO alveolar entre las dos poblaciones no son significativas.

Finalmente, se ha comprobado que el pH del CAE es significativamente más ácido en los pacientes con DCP, lo que sugiere un cierto grado de actividad inflamatoria bronquial en esta población.

### 7.1. Consideraciones generales de la muestra

---

El número de pacientes estudiado ha sido pequeño, como una consecuencia lógica de la baja prevalencia de DCP en la población. Por tanto, cabe preguntarse si los resultados son aplicables a la población general de pacientes con DCP.

Debido a la escasa prevalencia de la DCP (aproximadamente 1/30.000) (15), la mayoría de estudios publicados analizan series de no más de 40 pacientes (incluyendo niños y adultos). Sólo los estudios retrospectivos y multicéntricos incluyen un número de pacientes mayor (166). Por otro lado, aunque es posible realizar pruebas de función pulmonar en preescolares (167, 168), las pruebas de provocación bronquial son más laboriosas y requieren la máxima colaboración del paciente para asegurar la reproductibilidad de los

resultados, por lo que en nuestro protocolo se excluyeron a los enfermos de DCP menores de 7 años.

Por otra parte, entre los criterios de exclusión en el grupo control se incluyó el diagnóstico previo de asma, dermatitis atópica o rinitis alérgica, ya que traducirían una base inflamatoria que podría dar lugar a una mayor prevalencia de HRB y valores de óxido nítrico más elevados. De hecho, varios estudios han demostrado la presencia de una elevada prevalencia (incluso superior al 30%) de HRB a la metacolina en individuos con dermatitis atópica sin asma bronquial (169, 170). Pese a que 40,6% de los individuos sanos presentaron pruebas cutáneas positivas, ninguno de ellos tenía dermatitis atópica ni había tenido manifestaciones clínicas de asma o rinitis, por lo que no se excluyeron del estudio. Además, la prevalencia de atopia en las dos poblaciones estudiadas fue similar.

En el grupo de enfermos con DCP la edad media al diagnóstico fue de 12 años, una edad llamativamente tardía. Sin embargo, hay que recordar que sólo se incluyeron pacientes a partir de los 7 años de edad, y que algunos procedían del servicio de ORL del Hospital General de Valencia, en los cuales el diagnóstico se había establecido en la vida adulta. El Grupo de trabajo de Discinesia Ciliar Primaria de Valencia controla, hasta el momento actual, 72 pacientes con esta enfermedad. En un trabajo previamente publicado por este grupo (171) se han establecido dos picos de edad al diagnóstico: un 14,8% en la etapa neonatal y lactante (< 12 meses), y un 40% entre los 5-7

años. Estos datos sí son similares a la media europea (5,3 años) y a la media española (6,1 años) (15).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes a partir de las que se sospechó la enfermedad en nuestro grupo de enfermos, fueron en este orden: tos crónica y/o rinorrea, neumonías de repetición, distrés respiratorio neonatal, otitis de repetición, sinusitis y “asma” de difícil control. Los rasgos clínicos de nuestra muestra son similares a los ya publicados (tabla 34), si bien es cierto que en los estudios realizados en el ámbito de ORL se da más relevancia a la clínica de la vía aérea superior (otitis, sinusitis), mientras que en las publicaciones pediátricas se evalúan más los síntomas de la vía aérea inferior (neumonía, asma de difícil control) (18, 166). Es llamativo que sólo 22% de los pacientes tuvieran *situs inversus*, cuando el porcentaje de enfermos que asocia este rasgo en nuestro propio grupo de trabajo es de 38,3% (171), similar a la media europea (44%) (15). Cabría preguntarse si esta diferencia puede ser debida a los criterios de inclusión, ya que sólo se incluyeron pacientes con un FEV<sub>1</sub> basal superior al 60% del teórico y existen evidencias de que los pacientes que asocian *situs inversus* tienen un mayor deterioro respiratorio (18).

En nuestra muestra, el 81,2% de los pacientes presentaban bronquiectasias (88,4 % en varias localizaciones pulmonares), que además estaban presentes en el 82,3% de los menores de 18 años.

Los trabajos publicados demuestran que la prevalencia de bronquiectasias en la DCP es muy variable. Mientras que en un

estudio inglés de 2007, con datos de 89 niños, ésta era del 22% (172), en otro trabajo publicado en 2004 en EEUU, con 78 pacientes (tanto niños como adultos), la frecuencia era mucho mayor, llegando al 83% (19).

La elevada prevalencia de bronquiectasias en nuestra población pediátrica es similar a la publicada en otros trabajos en niños, como el de Wolter *et al*, con 61% (173), Pruliere-Escabase *et al* con 71% (174) y Montella *et al* con 92%, (175) de lo que podría inferirse que deben existir otros factores que favorezcan su aparición, no siendo un suceso exclusivamente secundario al paso del tiempo. En cualquier caso, hay que recordar de nuevo que nuestra muestra no incluye a pacientes diagnosticados de DCP menores de 7 años de edad, por lo que la elevada prevalencia de bronquiectasias en el grupo de niños puede estar artefactualmente elevada.

País (año)	Especialidad	Pacientes Número	Rinitis	Otitis	Tos crónica	Sinusitis crónica	<i>Situs inversus</i>	Distrés respiratorio neonatal	BQ	Neumonía recurrente
Francia (2015)	Neumología Pediátrica (51)	Niños (49)		92%		92%	45%	67%	67%	
Australia (2015)	Neumología Pediátrica (176)	Niños (84)	71%	49%	81%	71%	31%	57%	32%	
Bélgica (2014)	Neumología Pediátrica (76)	Niños y adultos (168)		48,8%	47%	66,1%	41,1%	44,6%	67%	
Arabia Saudí (2012)	Pediatría (177)	Niños (22)	32%	73%	36%	23%				
Turquía (2012)	Neumología Pediátrica (178)	Niños /adultos jóvenes (29)	28%	62%	100%					
Canadá (2012)	ORL (173)	Niños (31)	13%	87%			42%	84%	61%	
Francia (2011)	Neumología Pediátrica (179)	Niños (17)				58%	24%	40%	46%	6%
Francia (2010)	ORL (174)	Niños y adultos jóvenes (58)		64%					71%	

País (año)	Especialidad	Pacientes Número	Rinitis	Otitis	Tos crónica	Sinusitis crónica	<i>Situs inversus</i>	Distrés respiratorio neonatal	BQ	Neumonía recurrente
Alemania (2011)	ORL (180)	Todas las edades (44)	59%	82%		59%				
Austria (2009)	Pediatría (181)	Niños (13)	100%	23%	23%	31%			54%	92%
Italia (2009)	Pediatría (175)	Niños y adultos jóvenes (13)			46%			15%	92%	31%
Chile (2007)	ORL (182)	Niños y adultos jóvenes (30)	83%	63%		83%				60%
Gran Bretaña (2007)	Pediatría (172)	Niños (89)	85%				49%	43%	21%	55%
USA (2004)	Pediatría (19)	Todas las edades (78)	100%	95%	100%	54%	54%	73%	83%	
Suiza (2000)	Neumología Pediátrica (183)	Niños (30)	100%	77%	100%	100%	33%	30%	17%	
Arabia Saudí (1997)	ORL (184)	Todas las edades (16)		100%					50%	100%

**Tabla 34:** Prevalencia de síntomas característicos de DCP en series de más de 10 pacientes, publicados entre 1990-2015(166). BQ = bronquiectasias.

Por otro lado, en nuestra población la **función pulmonar** estuvo globalmente más afectada en los enfermos que en los controles sanos, tanto en lo que se refiere al FEV<sub>1</sub> como a la FVC. Aunque se han publicado varios trabajos en los que se demuestra un lento deterioro de la función pulmonar con los años (25-27, 185), ninguno de ellos compara los resultados obtenidos con un grupo control de forma paralela (ver tabla 2 en el apartado de introducción). Si bien nuestro estudio es transversal, es llamativa la gran heterogeneidad de estos parámetros, con pacientes que presentan una importante afectación pulmonar desde edades tempranas mientras que otros tienen valores espirométricos normales incluso varios años después del diagnóstico de la enfermedad.

Aunque en cada individuo sólo se realizaron dos espirometrías basales (una previa a cada prueba de broncoprovocación), en ambas el paciente se encontraba estable y no había sufrido reagudizaciones respiratorias recientes. Cuatro pacientes de 52, 48, 34 y 18 años, respectivamente, no pudieron ser incluidos en el estudio dada su importante afectación pulmonar (FEV<sub>1</sub> < 60%), sin que ninguno de ellos tuviera una reagudización u otra enfermedad concomitante añadida a la DCP que pudiera justificar tal deterioro. Dado que el criterio de inclusión común a todos los pacientes del estudio (tanto niños como adultos), fue la alteración de la frecuencia y/o patrón de batido ciliar, es razonable pensar que existan otros mecanismos añadidos a la disfunción ciliar que puedan dar lugar a estas diferencias en su función pulmonar basal.

En cuanto a los hallazgos de la **microscopía electrónica**, el defecto más frecuentemente encontrado fue la alteración en la dineína (61% entre déficit parcial y ausencia total). Sin embargo, 22% de los pacientes presentó una ultraestructura ciliar normal, porcentaje similar a los ya publicados (2, 69). Nuestros datos refrendan que la microscopía electrónica no sea considerada actualmente por sí sola como criterio suficiente para establecer el diagnóstico de la enfermedad (87).

En resumen, nuestra muestra de pacientes con DCP presenta características similares a las series publicadas hasta la fecha, por lo que consideramos que los resultados obtenidos en este estudio pueden ser representativos de la enfermedad.

## 7.2. Hiperrespuesta bronquial en la DCP

---

La **hiperrespuesta bronquial** es considerada como uno de los rasgos fisiopatológicos característicos del asma (94), aunque también se ha descrito en otras enfermedades como la FQ (186), EPOC (95), rinitis alérgica (187) o infecciones respiratorias (96). La HRB es el resultado de una compleja interacción entre varios factores: mediadores inflamatorios, alteraciones en el músculo liso y remodelado bronquial, reducción del calibre de la vía aérea y relación entre vía aérea y parénquima pulmonar (188).

La utilización de pruebas de provocación bronquial permite aproximarnos al conocimiento de su fisiopatología, ya que cada agonista empleado traduce un mecanismo patogénico distinto: mientras los broncoconstrictores directos (**metacolina**) actúan sobre la pared bronquial, los broncoconstrictores indirectos (**AMP**) lo hacen a través de la liberación de mediadores por determinadas células inflamatorias. Por lo tanto, los resultados obtenidos con cada prueba de provocación han de ser interpretados en función del agonista empleado. De este modo, la respuesta a la metacolina se asocia con el remodelado y daño de la estructura bronquial y el AMP se considera mejor marcador del proceso inflamatorio de la vía aérea.

En este sentido, en los últimos años se han publicado varios trabajos que demuestran que la respuesta al AMP podría ser un marcador específico de **asma** (189), enfatizando su capacidad para identificar esta entidad de forma más precisa que la metacolina (94), detectando estados preclínicos o latentes de la enfermedad (190), distinguiendo el asma de otras enfermedades respiratorias que pueden producir síntomas similares (116) e incluso guiando la reducción del tratamiento de base, al ser un marcador del riesgo de exacerbaciones (191). Este hecho tiene especial relevancia en Pediatría, donde los síntomas de tos, disnea y sibilancias son extraordinariamente frecuentes, resultando crucial la distinción entre asma y otras enfermedades respiratorias crónicas (como la DCP) que pueden tener un tratamiento y pronóstico diferente.

A pesar de ello, todavía son escasas las publicaciones que estudian la respuesta al AMP en entidades distintas al asma. En el trabajo de Avital *et al* (116) se establece la diferente respuesta a la metacolina y AMP en tres grupos de niños: sanos, asmáticos y un conjunto heterogéneo con diversas enfermedades respiratorias crónicas (FQ, bronquiolitis obliterante, bronquiectasias y DCP). El estudio concluye que la respuesta al AMP es capaz de distinguir de forma precisa a los niños con asma de aquellos con otras enfermedades respiratorias crónicas, aunque los autores no analizan específicamente el comportamiento de los niños con DCP.

El grupo de Yoo *et al* (192) estudia también la diferente respuesta a metacolina y AMP en niños diagnosticados de bronquiolitis obliterante post-infecciosa asmáticos y controles sanos, obteniendo resultados similares al estudio de Avital (116): 78,6% de los niños con bronquiolitis obliterante respondían a metacolina pero sólo 21% lo hacían al AMP, mientras que el 100% de los asmáticos respondían a metacolina y 93,3% de ellos lo hacían también al AMP. De nuevo, en este trabajo se llega a las mismas conclusiones: la mayor capacidad del AMP, frente a la metacolina, para seleccionar a los pacientes asmáticos.

En nuestro conocimiento, no existe hasta ahora ningún trabajo publicado que evalúe de forma específica la respuesta al AMP en pacientes diagnosticados de DCP. Nuestros resultados muestran que la prevalencia de **HRB al AMP** no era significativamente distinta a la

del grupo control (12,5%). Sin embargo, cuando se utilizó **metacolina** como agonista, la prevalencia de HRB en los enfermos fue más del doble de la encontrada con AMP (31,2%), aunque sin llegar a ser significativamente superior a la encontrada en la población sana ( $p=0,06$ ).

Por ello, con el objetivo de poder evaluar cuantitativamente la respuesta a los broncoconstrictores, y no catalogar categóricamente las pruebas como positivas o negativas, se analizó también el **índice de reactividad** (IR) en todos los sujetos evaluados. Los resultados mostraron que el IR a la metacolina era significativamente mayor en los enfermos con DCP que en los controles sanos, mientras que estas diferencias no se observaron con el AMP. El grado de **atrapamiento aéreo**, medido por el deterioro de la FVC, -que traduce broncoconstricción fundamentalmente localizada en vías aéreas más distales-, fue también mucho más intenso con la metacolina que con AMP. Esto sugiere que las alteraciones estructurales de la geometría bronquial afectan a toda la vía aérea de los pacientes con DCP incluyendo sus porciones más distales.

Nuestros resultados confirman, por tanto, una significativa hiperrespuesta bronquial cuando se emplea un broncoconstrictor de acción directa sobre la pared bronquial dañada de los enfermos (metacolina), que sin embargo no está presente cuando el agonista empleado actúa de forma indirecta a través la liberación de mediadores inflamatorios (AMP).

Tal y como se ha comentado con anterioridad, una de las formas de presentación de la DCP que constituye un frecuente motivo de remisión a la consulta de Neumología infantil, es la presencia de un “asma de difícil control” sin respuesta al tratamiento habitual. Además, la prueba de provocación bronquial con metacolina es uno de los métodos más habitualmente empleados en la práctica clínica para llegar al diagnóstico de asma en la infancia (107, 193). A tenor de nuestros resultados, la elevada proporción de HRB frente a metacolina en los enfermos con DCP podría catalogar erróneamente como asmático a un niño que presentara esta sintomatología, retrasando el diagnóstico real y empeorando su pronóstico. Por ello, y a la vista de nuestros datos, ante una alta sospecha diagnóstica de DCP el enfermo siempre deberá ser sometido a las pruebas de diagnóstico de certeza (patrón y frecuencia de batida ciliar +/- ultraestructura del cilio), independientemente del resultado del *test* de provocación bronquial.

Es necesario añadir que mientras en trabajos previos publicados por el grupo de Prieto *et al* se describía en sujetos sanos una prevalencia de HRB al AMP inferior al 5% (108, 194), en nuestra población sana este valor prácticamente se duplica (9,3%). La razón de esta diferencia podría estar en que parte de la población incluida en nuestro estudio es pediátrica, siendo conocido que la prevalencia de HRB disminuye con la edad (195, 196). Teniendo en cuenta este hecho, nuestros resultados son similares a los encontrados en trabajos recientes. Así, en el ya mencionado estudio de Yoo *et al* (192), la prevalencia de HRB frente al AMP en el grupo de niños sanos fue del 8%. Otro artículo de este

mismo grupo que evaluaba las diferencias entre la respuesta al AMP y a la metacolina en niños sanos y asmáticos (197), reveló una proporción de HRB al AMP en población sana exactamente igual a la obtenida en nuestro trabajo (9,3%). Aunque en estas dos publicaciones la población era exclusivamente menor de 18 años y en nuestro estudio se incluyen también adultos, hay diferencias en el punto de corte empleado para definir la HRB, pues mientras ellos consideran que existe HRB al AMP cuando la PC<sub>20</sub> es inferior a 200 mg/ml, en nuestro trabajo este valor es de 400 mg/ml.

Por otra parte, la presencia de hiperrespuesta bronquial se ha postulado como un factor adyuvante que podría deteriorar aún más los mecanismos de aclaramiento mucociliar, perpetuando el círculo vicioso inflamación-infección que origina las **bronquiectasias** (109). Sin embargo, esta hipótesis ha sido escasamente estudiada; sólo existen hasta la fecha, cuatro trabajos publicados que estudien el papel de la HRB en pacientes con bronquiectasias de diversa etiología (110-113) y, únicamente, otros dos se centran en la DCP (114, 115). En todos estos estudios se emplearon agonistas directos (metacolina o histamina). En nuestro conocimiento, como ya se ha referido anteriormente, no existe ningún trabajo publicado sobre la prevalencia de HRB frente a agonistas indirectos como el AMP en pacientes con bronquiectasias, o con DCP.

Dada la elevada proporción de bronquiectasias en nuestra muestra, es interesante analizar los resultados de estos cuatro trabajos que

estudian la prevalencia de HRB, aunque se trate de pacientes con bronquiectasias sin DCP. Sin embargo, las diferencias en la metodología empleada, la ausencia en algunos de ellos de grupo control y el distinto punto de corte para establecer la presencia de HRB, hace que estos resultados deban ser analizados con cautela.

El trabajo más antiguo, publicado en 1984 (111), describió una elevada prevalencia de HRB a metacolina en 29 adultos con bronquiectasias de diversa etiología (69%); esta prevalencia es muy superior a la que encontramos en nuestra serie. Sin embargo, no se establece un grupo control con el que comparar los resultados. La inclusión de pacientes de edad avanzada con función pulmonar basal más deteriorada podría justificar esta elevada prevalencia.

En un estudio posterior (112) se realizó un test de provocación controlado con metacolina e histamina a 36 adultos con bronquiectasias, encontrando una prevalencia mucho menor que en el estudio previamente comentado (111), entre 20-23% según el agonista empleado, aunque significativamente más alta que en el grupo control. Sin embargo, la metodología y diluciones con las que se realizaron los *test* de provocación bronquial fueron diferentes a las habitualmente utilizadas, por lo que sus resultados son difícilmente comparables al resto de trabajos.

Por otro lado, el estudio de Ip *et al* (113), que tampoco incluyó niños ni grupo control, describió una prevalencia de 44,6% en 47 adultos

con bronquiectasias, utilizando un punto de corte para definir HRB a la metacolina más restrictivo que el del resto de trabajos (8 mg/ml). De nuevo, las diferencias en el punto de corte empleado hacen difícil poder establecer comparaciones con otros estudios.

Por último, la publicación más reciente de Koh *et al* (110) es la única en la que la prueba se realizó exclusivamente en niños, hallando una prevalencia de 47% entre los 63 diagnosticados de bronquiectasias, utilizando un punto de corte para la PC<sub>20</sub> de 25 mg/ml. Sin embargo, en este caso, tampoco se estableció un grupo control para poder comparar los resultados. Esta elevada proporción puede explicarse, al menos en parte, por las propias características de la muestra, ya que la prevalencia de HRB es inversamente proporcional a la edad.

Sólo en dos de los cuatro trabajos analizados se especificó el origen de las bronquiectasias. En el de Ip *et al* (113) sólo 2 individuos de los 47 estudiados estaban diagnosticados de DCP, y en el de Koh *et al* sólo 6 niños tenían este diagnóstico (110).

Los resultados obtenidos en nuestra población muestran una prevalencia de 31,2% de HRB a la metacolina en pacientes con DCP. Esta cifra es ligeramente inferior a la encontrada en algunos de los trabajos expuestos. Los pacientes de nuestra muestra tienen algunas peculiaridades que podrían explicar estas diferencias: nuestra población incluyó niños y adultos diagnosticados de DCP; además, se definió un punto de corte para la PC<sub>20</sub> de 16 mg/ml (según las

recomendaciones actuales de la ATS/ERS) y se excluyeron del estudio aquellos pacientes que tenían una función pulmonar basal moderadamente deteriorada, con un  $FEV_1 < 60\%$  del teórico. En cambio, los criterios de inclusión en el resto de trabajos fueron menos exigentes (Pang *et al* incluyen individuos con un  $FEV_1 > 45\%$  e Ip *et al*, con un  $FEV_1 > 50\%$ ), lo que podría justificar el mayor incremento de la HRB al incluir pacientes con una función pulmonar basal más disminuida.

Como se ha comentado anteriormente, tan sólo existen dos publicaciones que hagan referencia al papel de la HRB en pacientes diagnosticados de DCP, pero son antiguos y con escaso número de pacientes.

El trabajo de Evander *et al* (114), publicado hace más de 30 años, evalúa la función pulmonar y respuesta a la metacolina en sólo seis pacientes con diagnóstico de DCP, encontrado hiperrespuesta bronquial en cinco de ellos (83,3%). Sin embargo, el pequeño número de pacientes estudiado y la ausencia de grupo control hacen difícil establecer conclusiones.

El segundo trabajo, publicado por el grupo de Koh *et al* en 2000 (115), evalúa a un grupo de 19 niños con DCP con edades entre 7 y 16 años, encontrando una prevalencia de HRB a la metacolina de 36,8%, dato similar al encontrado en nuestro trabajo (31,2%). Un 84% de los pacientes ya tenían bronquiectasias, al igual que en nuestra muestra, y

se excluyeron también los pacientes con un FEV<sub>1</sub> inferior al 60%, como en nuestro caso. La diferencia es el punto de corte para definir la hiperrespuesta bronquial que para estos autores se estableció en 25 mg/ml, mientras que en nuestro caso fue de 16 mg/ml. Cabe pensar por tanto, que el porcentaje de HRB en este grupo hubiera sido mayor si se hubiera bajado el dintel a 16 mg/ml, lo cual es evidente puesto que como ya se ha comentado con anterioridad, la HRB es más frecuente si se considera exclusivamente a la población pediátrica.

Las diferencias metodológicas en todos los trabajos expuestos son notables, y es necesario destacar que en ninguno de estos estudios se hace referencia al tratamiento de base de los pacientes -especialmente corticoides inhalados-, y si fueron o no retirados antes de realizar las pruebas de provocación bronquial, lo cual también puede originar diferencias respecto a los datos obtenidos en nuestro estudio. Incluso en uno de los trabajos (116), las dos pruebas de provocación bronquial (AMP y metacolina) fueron realizadas el mismo día, con el riesgo de que la inhalación del primer broncoconstrictor pudiera haber influido sobre el resultado obtenido con el segundo.

A tenor de nuestros resultados, podríamos hipotetizar que la elevada prevalencia de HRB en los pacientes con DCP -que en su mayoría tienen también bronquiectasias-, es resultado del daño y remodelado de la estructura bronquial, que se pone de manifiesto a través de la hiperrespuesta frente a un agonista directo como la metacolina. Sin embargo, en nuestros pacientes, no debe existir un incremento de

mastocitos, ya que la respuesta al AMP -que actúa únicamente a través de mediadores liberados por estas células-, no muestra diferencias respecto a la población de individuos sanos. Por tanto, el perfil de la hiperreactividad bronquial en la DCP tendría unas características diferentes al asma, lo que conllevaría implicaciones terapéuticas respecto al uso, por ejemplo, de los corticoides inhalados, habitualmente empleados como tratamiento antiinflamatorio.

En cualquier caso, serían necesarios más estudios para determinar si la hiperrespuesta bronquial tienen un papel etiológico añadido en el origen de las bronquiectasias, o bien si está presente como resultado de la enfermedad.

### 7.3. Marcadores de inflamación en el aire exhalado

---

#### 7.3.1. Óxido nítrico

##### 7.3.1.1. Óxido nítrico nasal

El  $\text{NO}_n$  ha sido ampliamente estudiado en pacientes con DCP, y sus valores extraordinariamente bajos lo han erigido en marcador no invasivo para el despistaje de la enfermedad, por delante de otras pruebas clásicas como la medición del aclaramiento mucociliar

mediante radioisótopos (1, 47, 52, 54, 198, 199), aunque la causa de estos niveles tan bajos sea aún desconocida. Incluso se ha establecido una correlación significativa entre el valor de  $\text{NO}_n$  y la frecuencia del batido ciliar o porcentaje de cilios inmóviles (200).

*A priori*, los resultados obtenidos en nuestro estudio corroboran esta recomendación de la ERS (1) puesto que, globalmente, los pacientes con DCP tuvieron valores significativamente más bajos que los individuos sanos. Sin embargo, a este respecto hay que añadir algunas matizaciones. En primer lugar, no se dispone en la actualidad de ningún consenso sobre cómo realizar exactamente la medición de  $\text{NO}_n$ , ni tampoco existen valores de referencia exactos para diferenciar los enfermos de los sanos. En la última revisión publicada este mismo año, se establecen incluso diferentes puntos de corte en función del sistema de medida utilizado (47). En nuestra muestra, un 18,7% de los pacientes presentaron valores de  $\text{NO}_n$  que podrían haber sido considerados normales (siendo además 83% de ellos niños), por lo que de haber utilizado únicamente el  $\text{NO}_n$  como sistema de despistaje hubieran sido erróneamente considerados como libres de enfermedad.

Esta observación ya ha sido previamente realizada por otros autores. Así, en el trabajo de Marthin *et al* (50), el 8,4% de los pacientes con DCP confirmada (mediante alteraciones de la ultraestructura y/o frecuencia de batida ciliar) presentaron valores de  $\text{NO}_n$  normales. Del mismo modo, en un estudio más reciente del grupo belga de Boon *et al* (201) esta cifra fue aún mayor, alcanzando un nada desdeñable

10,5% del total de pacientes, aunque en ninguno de estos trabajos se especifica qué porcentaje correspondía a niños. En nuestro caso se añade la circunstancia de que el grueso de pacientes con valores de  $\text{NO}_n$  normales fueron niños, que es precisamente la población en la que más interesaría realizar un diagnóstico precoz.

Por todo lo referido, aunque no formaba parte de los objetivos iniciales de nuestro estudio, aportamos la reflexión de que se deberían establecer valores de referencia de  $\text{NO}_n$  no sólo en función del método de medida empleado, sino también de la **edad** del paciente, ya que en nuestra muestra los niños tuvieron más valores límite que los adultos. Para ello, evidentemente, sería necesario proyectar estudios prospectivos y multicéntricos en los que pudiera analizarse un mayor número de enfermos.

### 7.3.1.2. Óxido nítrico alveolar y bronquial

Aunque el  $\text{NO}_n$  está claramente disminuido en los pacientes con DCP, su medición no está implantada actualmente en la práctica clínica habitual, y son pocos los centros que cuentan con métodos apropiados para su medida. Por el contrario, los dispositivos para medir la fracción exhalada de NO exhalado (FENO) son ampliamente conocidos, y su utilización como apoyo en el diagnóstico y seguimiento del asma eosinofílica es ya una realidad, aunque su utilidad para el diagnóstico y control evolutivo de la misma está lejos

de haber sido establecida definitivamente. Diferentes estudios han intentado determinar si los valores de la FENO en pacientes con DCP podrían correlacionarse con el  $\text{NO}_n$  y servir así como método de cribado. Pese a que los valores de la FENO son también bajos en los pacientes con DCP, no lo son tanto como el  $\text{NO}_n$  y por ello, actualmente esta medida no sirve como método de despistaje de la enfermedad (46, 130, 202, 203).

En nuestra muestra, los resultados obtenidos corroboran lo anteriormente referido. Se han observado diferencias significativas entre los valores de FENO obtenidos en los enfermos con DCP y los individuos sanos, pero con menor significación que la obtenida con el  $\text{NO}_n$ .

Las razones por las que el  $\text{NO}_n$  y la FENO son tan bajos en los pacientes con DCP, pese a las infecciones recurrentes típicas del proceso que en teoría deberían dar lugar a una respuesta inflamatoria, -con el consiguiente incremento de los valores de FENO-, siguen siendo todavía una incógnita. El metabolismo del NO es complejo y está sujeto a la acción de la NO sintasa, cuyas tres isoformas se localizan mayoritariamente en diferentes lugares de la vía respiratoria: la NOS constitutiva neuronal (NOS-1 o **nNOS**) en las terminaciones neuronales y en el epitelio bronquial; la NOS inducible (NOS-2 o **iNOS**) en la porción apical del epitelio bronquial, muy cerca de los cilios; y la NOS constitutiva endotelial (NOS-3 o **eNOS**), en el endotelio y en los alveolos, donde no hay epitelio ciliado (130). Al

menos, en los estudios *in vitro*, la NOS-2 (que es la que más se relaciona con la motilidad ciliar) parecer ser la que contribuye en mayor medida al NO exhalado global (200).

Con el objetivo de profundizar en la fisiopatología subyacente, en este trabajo se determinó la contribución relativa de las diferentes áreas pulmonares (bronquial y alveolar) al NO exhalado total, mediante el modelo bicompartimental anteriormente descrito (124). Nuestros resultados demostraron que el NO bronquial ( $J'_{awNO}$ ) era significativamente más bajo en los pacientes con DCP que en los controles sanos, mientras que no se encontraron diferencias en el NO alveolar ( $CA_{NO}$ ). Estos resultados se mantuvieron, aunque en menor medida, tras excluir del análisis a los individuos atópicos. Por lo tanto, al menos en los enfermos de nuestra muestra, los valores del NO en la vía aérea no estuvieron significativamente influidos por la presencia de atopia.

Estos datos apoyarían la hipótesis de que la funcionalidad de la NO sintasa es dependiente de la frecuencia de batida ciliar. Ello explicaría que la producción de NO esté disminuida únicamente en el compartimento bronquial, porque en esta zona sí existe epitelio ciliado que, al no funcionar correctamente, alteraría la capacidad de la iNOS para producir cantidades normales de NO. En cambio, dado que el alveolo está desprovisto de cilios, la capacidad de síntesis de NO por la eNOS estaría indemne y, como consecuencia, no habría diferencias en la concentración de NO alveolar respecto a la población sana.

Estudios realizados *in vitro* sobre epitelio respiratorio de modelos animales han demostrado que la adición de L-arginina, uno de los substratos para la NO sintasa, es capaz de incrementar la frecuencia de batido ciliar (204). Por todo ello, la relación entre esta enzima y la función ciliar parece clara.

Esta teoría podría también explicar, al menos en parte, el hecho de que, con un mecanismo etiopatogénico común a todos los enfermos como es la dismotilidad ciliar, exista una importante heterogeneidad clínica, con pacientes que tienen una función pulmonar prácticamente normal en la edad adulta mientras otros desarrollan bronquiectasias desde épocas tempranas. Tal vez los diferentes patrones de batida o grados de alteración de la frecuencia ciliar estén ligados a distintos niveles de afectación de la NO sintasa, y por tanto, a cambios en las concentración final del NO bronquial que -como ya se ha comentado anteriormente- tiene unas importantes funciones en la vía aérea, como la inmunomodulación y el poder bacteriostático y bactericida frente a las infecciones. A este respecto, serían necesarios estudios prospectivos para evaluar el papel del NO bronquial como un posible marcador para identificar la disfunción ciliar, correlacionándola con la evolución clínica, espirométrica y radiológica de los enfermos a lo largo de los años.

Hasta ahora se han publicado tan sólo cuatro trabajos en los que se identificó la  $CA_{NO}$  y  $J'_{awNO}$  en pacientes con DCP, con resultados contradictorios y con algunas diferencias metodológicas respecto a

nuestro estudio. Todos los autores coinciden en que, en los pacientes con DCP, los valores de NO bronquial son más bajos que en los del grupo control y que en pacientes con otras enfermedades respiratorias crónicas. Sin embargo, existen diferencias en los resultados del NO alveolar.

El primer trabajo publicado por el grupo de Mahut en 2006 (134), sobre un grupo de 16 niños con DCP y 28 controles, encontró una disminución significativa tanto de NO alveolar como bronquial en los enfermos. Su justificación fue una posible afectación de todas las isoformas de la NOS, incluyendo la NOS3 o NO sintasa endotelial en la DCP. Ésta se localiza no sólo a nivel de la mucosa paranasal y bronquial, sino también en el alveolo, lo que daría como resultado una disminución del NO a todos los niveles.

Por el contrario, el trabajo del grupo de Bush publicado al año siguiente (135), obtiene unos resultados similares a los nuestros, al no encontrar diferencias en los valores del NO alveolar entre enfermos y sanos. Este estudio fue realizado en una población más pequeña que la nuestra (24 niños con DCP y 20 controles), aunque es llamativo que 15 de los pacientes (62,5%), estuvieran en tratamiento con corticoides inhalados en el momento de efectuar las mediciones. Los autores justificaron la decisión de no retirar el tratamiento al haberse demostrado previamente que, al menos en los pacientes asmáticos, los corticoides inhalados podrían disminuir el NO bronquial, pero no el alveolar (205).

Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Shoemark y Wilson en 2008 (136), realizando las mismas mediciones pero esta vez únicamente en adultos, e incluyendo también un grupo de pacientes con bronquiectasias-no FQ y un grupo control (con 20 individuos por grupo). La mayoría de los enfermos de uno u otro grupo mantuvieron el tratamiento con corticoides inhalados que llevaban antes del inicio. Al igual que en el trabajo de Bush y que en el nuestro, los valores del NO alveolar no mostraron diferencias entre los grupos. El NO bronquial fue más bajo en los pacientes con DCP y, sorprendentemente, más alto en el grupo de bronquiectasias-no FQ que en la población control. Estos resultados apoyarían por tanto, la teoría de que la disminución del NO exhalado en los pacientes con DCP se produce mayoritariamente a expensas del compartimento bronquial y está íntimamente relacionada con la disfunción del epitelio ciliar, que es algo característico de la DCP y que no está presente en las bronquiectasias de otro origen.

Finalmente, en el último estudio publicado sobre este tema por el grupo de Southampton en 2013 (133), los resultados aportan nuevas controversias ya que, si bien claramente el NO bronquial estuvo disminuido en los pacientes con DCP, también lo estuvo el NO alveolar, coincidiendo así en sus conclusiones con el primer trabajo de Mahut (134). En este caso, la medición del NO se realizó sobre cuatro grupos de pacientes (DCP, asmáticos, FQ y controles), todos menores de 14 años. Respecto a este estudio hay que señalar la escasez de la muestra (menos de 20 individuos en cada grupo), por lo que resulta

aventurado establecer conclusiones extrapolables al total de los enfermos.

Los cuatro trabajos analizados, así como nuestros propios resultados, coinciden en que el NO bronquial está globalmente disminuido en los pacientes con DCP, lo que evidencia que es el que en mayor medida contribuye al óxido nítrico exhalado global, que es significativamente bajo en estos enfermos. Las discrepancias observadas en los valores del NO alveolar podrían explicarse por varios factores. En primer lugar, por el escaso tamaño muestral de todos los trabajos, ya que únicamente nuestro estudio recoge datos de más de 30 pacientes. En segundo lugar, porque la técnica empleada para hacer las mediciones es diferente, puesto que en nuestro caso se utilizó un sistema portátil mediante método electroquímico, y en el resto de trabajos referenciados se empleó un sistema de quimioluminiscencia. Por otra parte, no hay que olvidar que en nuestro estudio la población es heterogénea ya que se incluyeron niños y adultos, con distinto tiempo de evolución de la enfermedad, lo cual podría haber modificado también los resultados obtenidos. Además, salvo en uno de los trabajos (134), la mayoría de los pacientes con DCP recibían tratamiento con corticoides inhalados que, por su poder antiinflamatorio, podrían haber interferido en los valores del NO bronquial y alveolar. Por último, en todos los estudios referenciados se ha utilizado el modelo bicompartimental de Tsoukias y George (124), sin realizar ajustes para la morfología en trompeta de las vías aéreas y para la difusión axial de NO (126), lo cual puede haber originado valores de  $CA_{NO}$  artefactualmente elevados. Nuestro trabajo es el

único en el que se ha aplicado el factor de corrección para la difusión axial en todas las mediciones.

En cualquier caso, salvando las diferencias metodológicas, parece claro que el compartimento bronquial es el que contribuye en mayor medida a la disminución del NO exhalado en los pacientes con DCP, lo que parece tener relación con la alteración de la motilidad ciliar en el epitelio bronquial adyacente a la NO sintasa. Quedarían algunas incógnitas por resolver, como el comportamiento de los pacientes con formas “atípicas” de DCP que tienen un movimiento ciliar hipercinético o *stiff*.

Mientras que en el asma se han publicado trabajos que evalúan la determinación del NO bronquial y alveolar como método no invasivo para monitorizar la progresión de la enfermedad (205, 206), el beneficio potencial de utilizar este marcador en la DCP será uno de los retos a tener en cuenta en el futuro.

### **7.3.2. pH del condensado de aire exhalado**

Se ha demostrado que la acidificación del pH del fluido luminal que reviste las vías aéreas, generada por el estrés oxidativo y por la inflamación pulmonar, produce un daño sobre la mucosa bronquial y una disminución de la motilidad ciliar (207, 208) que a su vez ya se encuentra muy afectada en los pacientes con DCP. Pese a que existen

múltiples estudios que analizan el valor del pH del condensado de aire exhalado en otras enfermedades crónicas como el asma (137), FQ (151) o la tuberculosis (152), en nuestro conocimiento este es el primer estudio en el que se analiza el valor de este parámetro en los enfermos con DCP.

En nuestra población de enfermos con DCP el pH del CAE fue significativamente más ácido que en los controles sanos, traduciendo en teoría una hiperactividad inflamatoria con el consiguiente incremento del estrés oxidativo. De nuevo, no deja de ser llamativo que pese al estado proinflamatorio bronquial secundario a las infecciones respiratorias de repetición puesto de manifiesto por esa acidificación del pH, el resto de los presuntos marcadores de inflamación (NO exhalado y bronquial) sean tan bajos, como se ha comentado en líneas anteriores. Esto amplía las expectativas del estudio del papel del estrés oxidativo en los enfermos con DCP. Pese a que sólo dos trabajos han estudiado el CAE de los pacientes con esta patología, ninguno de ellos hace referencia al valor del pH (157, 158).

En el asma, entidad en la que este parámetro se ha estudiado más profusamente, existen varios trabajos que demuestran valores de pH más bajos durante las exacerbaciones, mientras que en los asmáticos controlados son similares a los de los sujetos sanos (151, 208), postulándose incluso su papel como posible factor predictor de las reagudizaciones en los niños (209).

Aunque la etiopatogenia de ambas entidades es bien distinta, la extrapolación de los resultados obtenidos en el asma a la DCP da lugar, inevitablemente, a la formulación de nuevas preguntas. Llama la atención que pese a que todos los pacientes que formaron parte del estudio se encontraban estables, sin reagudizaciones recientes y sin recibir antibióticos en las semanas previas a la toma de la muestra, presentaron una diferencia de pH respecto a los individuos sanos muy notable. Posiblemente, la diferencia radique en el componente eosinofílico o neutrofilico de la inflamación. En cualquier caso, nuestro trabajo aporta resultados originales que podrían ser un punto de partida para nuevos estudios, como la relación entre el pH del CAE y los metabolitos del estrés oxidativo con otros parámetros evolutivos de los enfermos con DCP.

#### 7.4. Correlación entre HRB y marcadores de inflamación

---

Como se ha venido explicando hasta ahora, en otras enfermedades respiratorias crónicas como el **asma**, las publicaciones disponibles parecen demostrar que la HRB a agonistas **indirectos** como el AMP identifica, de forma más precisa que los agonistas **directos**, el proceso inflamatorio en la vía aérea. De hecho, se ha demostrado en niños asmáticos, una asociación significativa entre sensibilidad bronquial al AMP y otros marcadores inflamatorios, como el porcentaje de

eosinófilos en sangre periférica y esputo inducido (197). Por el contrario, la relación entre estos marcadores y la hiperrespuesta a metacolina es mucho más débil (189, 210). Esto es debido a que, como ya se ha comentado anteriormente, los agonistas directos como la metacolina actúan directamente sobre el músculo liso bronquial, mientras que los agonistas indirectos inducen la broncoconstricción a través de la estimulación de células inflamatorias, para que liberen mediadores broncoconstrictores.

Por otro lado, existen algunos estudios que tratan de identificar la asociación entre la FENO y la intensidad de la HRB. La mayor parte de trabajos se centran en el asma, y no existen datos publicados sobre esta relación en pacientes con DCP. Los estudios realizados en asma ofrecen resultados contradictorios; mientras algunos investigadores demuestran una correlación significativa entre sensibilidad bronquial a la metacolina y concentraciones de la FENO, otros observan esta relación de forma significativa sólo con AMP (211).

Como se ha comentado anteriormente, en la DCP la alteración del transporte mucociliar favorece las infecciones de repetición que, a su vez perpetúan el estado inflamatorio, con el progresivo desarrollo de bronquiectasias. Es llamativo que pese a este estado de inflamación crónica de la vía aérea, los valores de la FENO y del  $\text{NO}_n$  sean anormalmente bajos, incluso significativamente menores que en otras enfermedades crónicas como la FQ y las bronquiectasias-no FQ (133).

Aunque se han establecido varias hipótesis para explicar este hecho (130), hasta ahora ninguna ha podido ser completamente demostrada. El análisis de la relación entre las concentraciones de óxido nítrico bronquial y alveolar y los parámetros de hiperrespuesta bronquial puede aportar información relevante para apoyar alguna de estas hipótesis. A este respecto, ninguno de los estudios publicados ha analizado la correlación entre los valores de FENO,  $J'aw_{NO}$ ,  $CA_{NO}$  y la intensidad de la hiperrespuesta bronquial en pacientes con DCP.

En nuestro estudio no se ha podido establecer una relación en los enfermos con DCP entre la respuesta al AMP y los marcadores de inflamación bronquial (FENO y  $J'aw_{NO}$ ), lo cual concuerda con el resto de resultados obtenidos, ya que la hiperrespuesta bronquial no parece secundaria a cambios inflamatorios agudos, sino a alteraciones persistentes de la estructura de la vía aérea. Sin embargo, el hallazgo de una relación significativa entre la respuesta a AMP y el NO alveolar ( $CA_{NO}$ ) es un dato nuevo y original que aporta este trabajo, y cuya posible explicación avalaría alguna de las hipótesis que se han formulado para explicar la baja concentración de NO exhalado en estos enfermos.

La producción de NO exhalado depende en su mayor parte de la NOS-2 o inducible, presente en el epitelio ciliado bronquial pero no en el alveolo. Si esto fuera cierto, cabría esperar que en los individuos con DCP la concentración de NO bronquial fuera significativamente menor que en los sujetos sanos, mientras que la concentración de NO

de la región alveolar, desprovista de cilios, no debería ser muy diferente en las dos poblaciones. Nuestros resultados no sólo avalan este hecho como ya se ha referido con anterioridad, sino que la linealidad observada entre respuesta a AMP y NO alveolar –no presente en el área bronquial- sugeriría que, efectivamente, la disfunción de la NOS se localiza de forma concreta en esta área, y por consiguiente depende de una correcta funcionalidad del epitelio ciliado, que únicamente se encuentra a este nivel y no en la región alveolar.

Por tanto, a partir de nuestros resultados podrían formularse nuevas hipótesis basadas en considerar al NO bronquial como un marcador potencial de la **funcionalidad de los cilios**. De este modo, podrían plantearse estudios prospectivos que determinen el papel diagnóstico de este marcador, dado el escenario actual en el que no hay un único *gold standard* y son necesarias varias pruebas complementarias para llegar al diagnóstico definitivo (87). Para ello sería necesario comparar el valor del NO bronquial no sólo con la población sana, sino con los pacientes que presentan otras patologías que cursan también con un óxido nítrico exhalado globalmente bajo. Si el NO bronquial dependiera de la funcionalidad ciliar, debería existir una disminución significativa en los enfermos con DCP respecto a otras enfermedades respiratorias donde la funcionalidad ciliar fuera normal, como la FQ.

Por otra parte, en nuestra muestra no se ha podido establecer una relación entre la intensidad del **atrapamiento aéreo** inducido por

AMP o metacolina y la concentración bronquial o alveolar del óxido nítrico. Dado que el atrapamiento aéreo ocurre en gran medida como consecuencia del cierre de las vías aéreas distales, cabría esperar una correlación positiva entre el grado de atrapamiento y el NO alveolar. A la luz de nuestros datos, y tal y como se ha señalado en otros trabajos (102), ambos parámetros no están relacionados, por lo que podría postularse que la intensidad del atrapamiento aéreo inducido por los broncoconstrictores no depende de la intensidad del proceso inflamatorio, sino de las propias características de la vía aérea de cada paciente.

Finalmente, en nuestra muestra no se ha podido establecer una correlación entre los valores del pH del CAE y los parámetros de hiperrespuesta bronquial con uno u otro agonista. De nuevo, la ausencia de trabajos previos que evalúen este parámetro en enfermos con DCP hace imposible poder establecer comparaciones. En el asma, los trabajos publicados hasta ahora tampoco han podido establecer ninguna relación estadística entre los parámetros de hiperrespuesta bronquial y los niveles del pH del CAE (190, 212, 213).

Sin embargo, aunque la recogida de aire exhalado y la medición del pH es una técnica sencilla y muy bien tolerada en niños, es necesario apuntar algunas matizaciones. La falta de un protocolo estandarizado para recoger la muestra, la influencia de la temperatura ambiental, la contaminación salival y otros condicionantes técnicos pueden afectar

de manera decisiva a los resultados, por lo que deben ser interpretados con cautela.

Para finalizar, es necesario recordar que debido a la complejidad de las técnicas realizadas, nuestro trabajo se ha centrado en pacientes con DCP a partir de los 7 años de edad, por lo que se desconoce, de momento, el valor de todos los parámetros analizados en los niños menores de esta edad.



# Conclusiones



## 8.- CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio no se han podido identificar diferencias en la prevalencia ni en el grado de hiperrespuesta bronquial a AMP entre pacientes con DCP e individuos sanos. En cambio, la respuesta a metacolina estaba claramente incrementada en los pacientes con DCP. Estos resultados sugieren que los mecanismos que generan la hiperrespuesta bronquial en los pacientes con DCP dependen primariamente de la presencia de alteraciones persistentes en la geometría de las vías aéreas.
2. No existen diferencias en el atrapamiento aéreo inducido por AMP entre los afectados de DCP y los individuos sanos. Sin embargo, la metacolina produce un intenso grado de atrapamiento aéreo en los enfermos, que sugiere que las alteraciones estructurales están presentes en toda la vía aérea de los pacientes con DCP, incluyendo sus porciones más distales.
3. No se ha podido establecer relación significativa entre los presuntos marcadores de inflamación bronquial activa (FENO, J'awNO) y la intensidad de la respuesta bronquial a cada uno de los dos agonistas en los pacientes con DCP, lo cual es concordante con el hecho de que la hiperreactividad bronquial

de estos pacientes es secundaria al daño de la pared bronquial y no a cambios inflamatorios agudos.

4. Los resultados de la presente Tesis Doctoral confirman que los pacientes con DCP presentan concentraciones de óxido nítrico nasal significativamente menores que los sujetos sanos. Sin embargo, la superposición evidente de los valores de este marcador entre las dos poblaciones, especialmente en los niños, permite dudar de su utilidad como método de *screening* en este grupo de edad.
5. Existen claras diferencias en las concentraciones de óxido nítrico exhalado entre los enfermos con DCP y los individuos sanos: el NO exhalado global es significativamente más bajo en los enfermos, a expensas del componente bronquial, sin que se observen diferencias en el óxido nítrico alveolar. Estos resultados, junto a la relación encontrada entre la respuesta a AMP y el NO alveolar -pero no bronquial-, apoyan la hipótesis de que la causa de la disminución del NO exhalado en los pacientes con DCP radica fundamentalmente en la disfunción del epitelio ciliado donde se localiza la iNOS, presente en la región bronquial pero no en el alveolo.
6. Nuestro estudio documenta, por primera vez, una significativa acidificación del condensado del aire exhalado en los pacientes con DCP. Aunque la implicación patogénica de este hallazgo

es totalmente especulativa, puede aventurarse que el estudio de los mecanismos que generan la inflamación y el estrés oxidativo o nitrosativo en la DCP puede aportar una información muy útil desde el punto de vista pronóstico en esta patología.

7. No se ha podido establecer correlación entre el valor del pH del condensado de aire exhalado y la sensibilidad bronquial y atrapamiento aéreo inducido por los agonistas broncoconstrictores en los pacientes con DCP. Esto sugiere que ambas alteraciones ocurren como consecuencia del efecto de factores y de mecanismos independientes.



# **Trabajos derivados de la presente Tesis Doctoral**



## 9.- TRABAJOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Las publicaciones, cursos y congresos, ponencias y clases derivadas de la presente Tesis Doctoral han sido:

- ✓ Romero Rubio MT, Armengot Carceller M, Escribano Montaner, A. ¿Cuál es el patrón oro en el diagnóstico del síndrome de Discinesia Ciliar Primaria? XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica (SENP). Salamanca, mayo de 2011. Premio en investigación a la mejor comunicación a congreso en las Jornadas científicas del Departamento de Salud de Denia 2011.
- ✓ Romero Rubio MT, Armengot Carceller M, Carda Batalla C, Escribano Montaner A, Milara Paya J. What is the gold standard in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia syndrome? European Respiratory Journal. 2011;38 (Suppl 55) (214).
- ✓ MT Romero, L Prieto, M Armengot, A Escribano. Bronchial hyperreactivity and inflammation markers in exhaled breath condensate in patients with PCD. ERS Task Force on PCD Meeting. Viena, september 2012.

- ✓ MT Romero, M Armengot, A Escribano Clinical, morphological and functional features of Primary Ciliary Dyskinesia children in southeast Spain. 12th Congress on Pediatric Pulmonology. CIPP XII. Valencia 29 junio-1 julio 2013. (Comunicación oral finalista como Young Investigator Award).
- ✓ Romero MT, Carda C, Milara J, Armengot M, Escribano A. Clinical, morphological and functional features of primary ciliary dyskinesia children in southeast Spain. Paediatric Respiratory Reviews 2013.14:S52 (171).
- ✓ MT Romero. Clase en el Máster en Investigación Clínica del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Mayo de 2013.
- ✓ MT Romero. Clase en el Máster en Investigación Clínica del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Mayo de 2014.
- ✓ MT Romero. “Discinesia Ciliar Primaria: aspectos clínicos y diagnósticos”. Ponencia en el XXXVII Congreso Nacional de Neumología Pediátrica. Barcelona, 9 de mayo de 2015.

- 
- ✓ MT Romero Rubio, M Armengot Carceller, L Prieto Andrés, A, Escribano Montaner. ¿Es realmente útil el Óxido Nítrico nasal como método de *screening* de Discinesia Ciliar Primaria en niños? XXXVII Congreso nacional de Neumología Pediátrica. Barcelona, mayo de 2015.
  
  - ✓ MT Romero. Clase en el Máster en Investigación Clínica del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Mayo de 2015.



# Bibliografía



## 10.- BIBLIOGRAFÍA

1. Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, Snijders D, Azevedo I, Baktai G, *et al.* Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur Respir J.* 2009;34(6):1264-76.
2. Armengot Carceller M, Mata Roig M, Milara Paya X, Cortijo Gimeno J. Primary ciliary dyskinesia. Ciliopathies. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2010;61(2):149-59.
3. Leigh MW, O'Callaghan C, Knowles MR. The Challenges of Diagnosing Primary Ciliary Dyskinesia. *Proc Am Thorac Soc.* 2011;8(5):434-7.
4. Siewart A. Über einem fall von bronchiektasis bei einem patient mit situs inversus viscerum. *Klin Wschr.* 1904;41:139-41.
5. Kartagener M. Zur Pathogenese der Bronchiektasien. *Beitr Klin Tuberk.* 1933(83):489-501.
6. Afzelius BA, Eliasson R, Johnsen O, Lindholmer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Biol.* 1975;66(2):225-32.
7. Pedersen H, Rebbe H. Absence of arms in the axoneme of immobile human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1975;12(5):541-4.
8. Eliasson R, Mossberg B, Camner P, Afzelius BA. The immotile-cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility. *N Engl J Med.* 1977;297(1):1-6.
9. Afzelius BA, Mossberg B. Immotile cilia. *Thorax.* 1980;35(6):401-4.

10. Afzelius BA, Camner P, Eliasson R, Mossberg B. On renaming the immotile-cilia syndrome. *Lancet*. 1981;2(8251):870.
11. Rossman CM, Newhouse MT. Primary ciliary dyskinesia: evaluation and management. *Pediatr Pulmonol*. 1988;5(1):36-50.
12. Veerman AJ, van der Baan S, Den Hollander W. Disorders in mucociliary transport. Primary ciliary dyskinesia. *Tijdschr Kindergeneeskd*. 1983;51(6):185-92.
13. Fischer L, Burri PH, Bauer W, Kraemer R, Sauter K. How useful is the ultrastructural study of the cilia of the respiratory tract in the diagnosis of an immotile cilia syndrome? *Schweiz Med Wochenschr*. 1984;114(18):610-9.
14. Mygind N, Pedersen M, Nielsen MH. Primary and secondary ciliary dyskinesia. *Acta Otolaryngol*. 1983;95(5-6):688-94.
15. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli MP, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, *et al*. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *Eur Respir J*. 2010;36(6):1248-58.
16. Stillwell PC, Wartchow EP, Sagel SD. Primary Ciliary Dyskinesia in Children: A Review for Pediatricians, Allergists, and Pediatric Pulmonologists. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*. 2011;24(4):191-6.
17. Majithia A, Fong J, Hariri M, Harcourt J. Hearing outcomes in children with primary ciliary dyskinesia: a longitudinal study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005;69(8):1061-4.
18. Boon M, Jorissen M, Proesmans M, De Boeck K. Primary ciliary dyskinesia, an orphan disease. *Eur J Pediatr*. 2013;172(2):151-62.
19. Noone PG, Leigh MW, Sannuti A, Minnix SL, Carson JL, Hazucha M, *et al*. Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(4):459-67.

20. Werner C, Onnebrink JG, Omran H. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Cilia*. 2015;4(1):2.
21. Ferkol T, Leigh M. Primary ciliary dyskinesia and newborn respiratory distress. *Semin Perinatol*. 2006;30(6):335-40.
22. Chang AB, Van Asperen PP, Glasgow N, Robertson CF, Mellis CM, Masters IB, *et al*. Children with chronic cough: when is watchful waiting appropriate? Development of likelihood ratios for assessing children with chronic cough. *Chest*. 2015 Mar;147(3):745-53.
23. Ricketti PA, Unkle DW, King KA, Cleri DJ, Ricketti AJ. A 15-year old girl with asthma and lower lobe bronchiectasis. *Allergy Asthma Proc*. 2015;36(1):82-6.
24. Brown DE, Pittman JE, Leigh MW, Fordham L, Davis SD. Early lung disease in young children with primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol*. 2008;43(5):514-6.
25. Maglione M, Bush A, Nielsen KG, Hogg C, Montella S, Marthin JK, *et al*. Multicenter analysis of body mass index, lung function, and sputum microbiology in primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol*. 2014;49(12):1243-50.
26. Ellerman A, Bisgaard H. Longitudinal study of lung function in a cohort of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 1997;10(10):2376-9.
27. Marthin JK, Petersen N, Skovgaard LT, Nielsen KG. Lung function in patients with primary ciliary dyskinesia: a cross-sectional and 3-decade longitudinal study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(11):1262-8.
28. Hellinckx J, Demedts M, De Boeck K. Primary ciliary dyskinesia: evolution of pulmonary function. *Eur J Pediatr*. 1998;157(5):422-6.

29. Santamaria F, Montella S, Tiddens HA, Guidi G, Casotti V, Maglione M, *et al.* Structural and functional lung disease in primary ciliary dyskinesia. *Chest.* 2008;134(2):351-7.
30. Kennedy MP, Noone PG, Leigh MW, Zariwala MA, Minnix SL, Knowles MR, *et al.* High-resolution CT of patients with primary ciliary dyskinesia. *AJR Am J Roentgenol.* 2007;188(5):1232-8.
31. Maglione M, Bush A, Montella S, Mollica C, Manna A, Esposito A, *et al.* Progression of lung disease in primary ciliary dyskinesia: is spirometry less accurate than CT? *Pediatr Pulmonol.* 2012;47(5):498-504.
32. Boon M, Vermeulen FL, Gysemans W, Proesmans M, Jorissen M, De Boeck K. Lung structure-function correlation in patients with primary ciliary dyskinesia. *Thorax.* 2015 Apr;70(4):339-45.
33. Bush A, Irving S. Wavering in the breeze: is multiple breath washout useful in primary ciliary dyskinesia? *Thorax.* 2015 Apr;70(4):305-6.
34. Ichioka K, Kohei N, Okubo K, Nishiyama H, Terai A. Obstructive azoospermia associated with chronic sinopulmonary infection and situs inversus totalis. *Urology.* 2006;68(1):204.e5-7.
35. Ramos Barselo E, Portillo Martin JA, Correas Gomez MA, del Valle Schaan JI, Gutierrez Banos JI, Villanueva Pena A, *et al.* Testicular seminoma in a patient with Kartagener's syndrome. *Arch Esp Urol.* 2008;61(3):431-4.
36. Munro NC, Currie DC, Lindsay KS, Ryder TA, Rutman A, Dewar A, *et al.* Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax.* 1994;49(7):684-7.
37. McLachlan RI, Ishikawa T, Osianlis T, Robinson P, Merriner DJ, Healy D, *et al.* Normal live birth after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in variant primary ciliary dyskinesia

with completely immotile sperm and structurally abnormal sperm tails. *Fertil Steril*. 2012;97(2):313-8.

38. Afzelius BA, Eliasson R. Male and female infertility problems in the immotile-cilia syndrome. *Eur J Respir Dis Suppl*. 1983;127:144-7.

39. Blyth M, Wellesley D. Ectopic pregnancy in primary ciliary dyskinesia. *J Obstet Gynaecol*. 2008;28(3):358.

40. Kennedy MP, Omran H, Leigh MW, Dell S, Morgan L, Molina PL, *et al*. Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *Circulation*. 2007;115(22):2814-21.

41. Lee L. Riding the wave of ependymal cilia: genetic susceptibility to hydrocephalus in primary ciliary dyskinesia. *J Neurosci Res*. 2013;91(9):1117-32.

42. Vieira JP, Lopes P, Silva R. Primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus with aqueductal stenosis. *J Child Neurol*. 2012;27(7):938-41.

43. Armengot M, Salom D, Diaz-Llopis M, Millan JM, Milara J, Mata M, *et al*. Nasal ciliary beat frequency and beat pattern in retinal ciliopathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(4):2076-9.

44. Driscoll JA, Bhalla S, Liapis H, Ibricevic A, Brody SL. Autosomal dominant polycystic kidney disease is associated with an increased prevalence of radiographic bronchiectasis. *Chest*. 2008;133(5):1181-8.

45. Coren ME, Meeks M, Morrison I, Buchdahl RM, Bush A. Primary ciliary dyskinesia: age at diagnosis and symptom history. *Acta Paediatr*. 2002;91(6):667-9.

46. Lundberg JO, Weitzberg E, Nordvall SL, Kuylenstierna R, Lundberg JM, Alving K. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *Eur Respir J*. 1994;7(8):1501-4.

47. Collins SA, Gove K, Walker W, Lucas JS. Nasal nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2014;44(6):1589-99.
48. Jeong JH, Yoo HS, Lee SH, Kim KR, Yoon HJ, Kim SH. Nasal and exhaled nitric oxide in chronic rhinosinusitis with polyps. *Am J Rhinol Allergy.* 2014;28(1):e11-6.
49. American Thoracic Society; European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(8):912-30.
50. Marthin JK, Nielsen KG. Choice of nasal nitric oxide technique as first-line test for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 2011;37(3):559-65.
51. Beydon N, Chambellan A, Alberti C, de Blic J, Clément A, Escudier E. *et al.* Technical and practical issues for tidal breathing measurements of nasal nitric oxide in children. *Pediatr Pulmonol.* [internet]. 2015 [citado 5 junio 2015]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.23167>
52. Leigh MW, Hazucha MJ, Chawla KK, Baker BR, Shapiro AJ, Brown DE, *et al.* Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc.* 2013;10(6):574-81.
53. Moreno Galdo A, Vizmanos Lamotte G, Reverte Bover C, Gartner S, Cobos Barroso N, Rovira Amigo S, *et al.* Value of nasal nitric oxide in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *An Pediatr (Barc).* 2010;73(2):88-93.
54. Manna A, Montella S, Maniscalco M, Maglione M, Santamaria F. Clinical application of nasal nitric oxide measurement in pediatric airway diseases. *Pediatr Pulmonol.* 2015;50(1):85-99.

55. Armengot M, Escribano A, Carda C, Basterra J. Clinical and ultrastructural correlations in nasal mucociliary function observed in children with recurrent airways infections. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1995;32(2):143-51.
56. Armengot Carceller M, Ruiz Hernández G, Romero de Ávila C, Cardá C, Basterra Alegría J. Utilidad diagnóstica del estudio del transporte mucociliar nasal con isótopos en pacientes con infecciones respiratorias recidivantes. *Rev Esp Med Nucl.* 1998;17(1):21-6.
57. Sanchez C. Estudio del aclaramiento mucociliar nasal en la infancia [tesis doctoral]. Valencia: Universidad de Valencia, Facultad de Medicina; 1999.
58. Escribano Montaner A, Armengot Carceller M. Discinesia ciliar primaria. *An Pediatr Contin.* 2013;11(1):38-45.
59. Escribano A, Armengot M, Marco V, Basterra J, Brines J. An isotopic study of nasal mucociliary transport in newborns: preliminary investigation. *Pediatr Pulmonol.* 1993;16(3):167-9.
60. Marthin JK, Mortensen J, Pressler T, Nielsen KG. Pulmonary radioaerosol mucociliary clearance in diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Chest.* 2007;132(3):966-76.
61. Marthin JK. Nasal nitric oxide and pulmonary radioaerosol mucociliary clearance as supplementary tools in diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Dan Med Bull.* 2010;57(8):B4174.
62. Munkholm M, Nielsen KG, Mortensen J. Clinical value of measurement of pulmonary radioaerosol mucociliary clearance in the work up of primary ciliary dyskinesia. *EJNMMI Res.* 2015;5(1):118.
63. Walker WT, Young A, Bennett M, Guy M, Carroll M, Fleming J, *et al.* Pulmonary radioaerosol mucociliary clearance in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 2014;44(2):533-5.

64. Canciani M, Barlocco EG, Mastella G, de Santi MM, Gardi C, Lungarella G. The saccharin method for testing mucociliary function in patients suspected of having primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol.* 1988;5(4):210-4.
65. Goodenough UW, Heuser JE. Substructure of inner dynein arms, radial spokes, and the central pair/projection complex of cilia and flagella. *J Cell Biol.* 1985;100(6):2008-18.
66. Busquets RM, Caballero-Rabasco MA, Velasco M, Lloreta J, Garcia-Algar O. Primary ciliary dyskinesia: clinical criteria indicating ultrastructural studies. *Arch Bronconeumol.* 2013;49(3):99-104.
67. Papon JF, Coste A, Roudot-Thoraval F, Boucherat M, Roger G, Tamalet A, *et al.* A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 2010;35(5):1057-63.
68. Davis SD, Ferkol TW, Rosenfeld M, Lee HS, Dell SD, Sagel SD, *et al.* Clinical features of childhood primary ciliary dyskinesia by genotype and ultrastructural phenotype. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(3):316-24.
69. Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B, Verbeken E, De Boeck K. Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis in culture. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000;54(3):343-56.
70. Pifferi M, Di Cicco M, Piras M, Cangiotti AM, Saggese G. Up to date on primary ciliary dyskinesia in children. *Early Hum Dev.* 2013;89 Suppl 3:S45-8.
71. Bartoloni L, Blouin JL, Pan Y, Gehrig C, Maiti AK, Scamuffa N, *et al.* Mutations in the *DNAH11* (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(16):10282-6.

72. Pifferi M, Michelucci A, Conidi ME, Cangiotti AM, Simi P, Macchia P, *et al.* New *DNAH11* mutations in primary ciliary dyskinesia with normal axonemal ultrastructure. *Eur Respir J.* 2010;35(6):1413-6.
73. Schwabe GC, Hoffmann K, Loges NT, Birker D, Rossier C, de Santi MM, *et al.* Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by *DNAH11* mutations. *Hum Mutat.* 2008;29(2):289-98.
74. Vallet C, Escudier E, Roudot-Thoraval F, Blanchon S, Fauroux B, Beydon N, *et al.* Primary ciliary dyskinesia presentation in 60 children according to ciliary ultrastructure. *Eur J Pediatr.* 2013;172(8):1053-60.
75. Tamalet A, Clement A, Roudot-Thoraval F, Desmarquest P, Roger G, Boule M, *et al.* Abnormal central complex is a marker of severity in the presence of partial ciliary defect. *Pediatrics.* 2001;108(5):E86.
76. Boon M, Smits A, Cuppens H, Jaspers M, Proesmans M, Dupont LJ, *et al.* Primary ciliary dyskinesia: critical evaluation of clinical symptoms and diagnosis in patients with normal and abnormal ultrastructure. *Orphanet J Rare Dis* [internet]. 2014 [citado 6 junio 2015]; 22;9:11. Disponible en: <http://www.ijrd.com/content/9/1/11>.
77. Jorissen M, Willems T. Success rates of respiratory epithelial cell culture techniques with ciliogenesis for diagnosing primary ciliary dyskinesia. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000;54(3):357-65.
78. Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B. Ciliary function analysis for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia: advantages of ciliogenesis in culture. *Acta Otolaryngol.* 2000;120(2):291-5.
79. Rovira Amigo S. Discinesia ciliar primaria. *Medicina Respiratoria.* 2011;4(1):49-56.
80. Geremek M, Witt M. Primary ciliary dyskinesia: genes, candidate genes and chromosomal regions. *J Appl Genet.* 2004;45(3):347-61.

81. Kurkowiak M, Zietkiewicz E, Witt M. Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics. *J Med Genet.* 2015;52(1):1-9.
82. Antony D, Becker-Heck A, Zariwala MA, Schmidts M, Onoufriadis A, Forouhan M, *et al.* Mutations in *CCDC39* and *CCDC40* are the major cause of primary ciliary dyskinesia with axonemal disorganization and absent inner dynein arms. *Hum Mutat.* 2013;34(3):462-72.
83. Fliegauf M, Olbrich H, Horvath J, Wildhaber JH, Zariwala MA, Kennedy M, *et al.* Mislocalization of *DNAH5* and *DNAH9* in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(12):1343-9.
84. Knowles MR, Leigh MW, Carson JL, Davis SD, Dell SD, Ferkol TW, *et al.* Mutations of *DNAH11* in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure. *Thorax.* 2012;67(5):433-41.
85. Boon M, Jorissen M, Jaspers M, Cuppens H, De Boeck K. Is the sensitivity of primary ciliary dyskinesia detection by ciliary function analysis 100%? *Eur Respir J.* 2013;42(4):1159-61.
86. Pifferi M, Bush A, Montemurro F, Pioggia G, Piras M, Tartarisco G, *et al.* Is the sensitivity of primary ciliary dyskinesia detection by ciliary function analysis 100%? *Eur Respir J.* 2013;42(4):1161.
87. Lucas JS, Leigh MW. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: searching for a gold standard. *Eur Respir J.* 2014;44(6):1418-22.
88. Kuenhi C. Short update on current PCD research projects (BESTCILIA, ERS TF, COST action). Ponencia presentada en el *Ist Young researcher's meeting on Primary Ciliary Dyskinesia*. 12-13 marzo 2015. Berna, Suiza.
89. Lucas JS, Carroll M. Primary ciliary dyskinesia and cystic fibrosis: different diseases require different treatment. *Chest.* 2014;145(4):674-6.

90. Strippoli MP, Frischer T, Barbato A, Snijders D, Maurer E, Lucas JS, *et al.* Management of primary ciliary dyskinesia in European children: recommendations and clinical practice. *Eur Respir J.* 2012;39(6):1482-91.
91. Lucas JS, Burgess A, Mitchison HM, Moya E, Williamson M, Hogg C. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child.* 2014;99(9):850-6.
92. Chhin B, Negre D, Merrot O, Pham J, Tourneur Y, Ressenkoff D, *et al.* Ciliary beating recovery in deficient human airway epithelial cells after lentivirus ex vivo gene therapy. *PLoS Genetics* [internet]. 2009 [citado 2 mayo 2015];5(3):e1000422. Disponible en <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000422>
93. Ollerenshaw SL, Woolcock AJ. Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145(4 Pt 1):922-7.
94. Moeller A, Carlsen KH, Sly PD, Baraldi E, Piacentini G, Pavord I, *et al.* Monitoring asthma in childhood: lung function, bronchial responsiveness and inflammation. *Eur Respir Rev.* 2015;24(136):204-15.
95. Zanini A, Cherubino F, Zampogna E, Croce S, Pignatti P, Spanevello A. Bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation, and reversibility in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015;10:1155-61.
96. Borges Mde C, Ferraz E, Vianna EO. Bronchial provocation tests in clinical practice. *Sao Paulo Med J.* 2011;129(4):243-9.
97. Prieto L, Gutierrez V, Marin J. Relationship between airway sensitivity to adenosine 5' monophosphate and the shape of the

concentration-response curve to methacholine in subjects with allergic rhinitis. *Respir Med.* 2001;95(6):457-63.

98. Prieto L, Lopez V, Catalan P, Barato D, Marin 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. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2009;102(5):393-9.

99. Cockcroft D, Davis B. Direct and indirect challenges in the clinical assessment of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2009;103(5):363-9; quiz 9-72, 400.

100. Spicuzza L, Bonfiglio C, Polosa R. Research applications and implications of adenosine in diseased airways. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(8):409-13.

101. Crimi N, Palermo F, Oliveri R, Polosa R, Settineri I, Mistretta A. Protective effects of inhaled ipratropium bromide on bronchoconstriction induced by adenosine and methacholine in asthma. *Eur Respir J.* 1992;5(5):560-5.

102. Lopez Calatayud V. 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]. Valencia: Universidad de Valencia, Facultad de Medicina; 2014.

103. Perpina Tordera M, Garcia Rio F, Alvarez Gutierrez FJ, Cisneros Serrano C, Compte Torrero L, Entrenas Costa LM, *et al.* Guidelines for the study of nonspecific bronchial hyperresponsiveness in asthma. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch Bronconeumol.* 2013;49(10):432-46.

104. Boezen HM, Postma DS, Schouten JP, Kerstjens HA, Rijcken B. PEF variability, bronchial responsiveness and their relation to allergy markers in a random population (20-70 yr). *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(1):30-5.

105. Postma DS, Boezen HM. Rationale for the Dutch hypothesis. Allergy and airway hyperresponsiveness as genetic factors and their interaction with environment in the development of asthma and COPD. *Chest*. 2004;126(2 Suppl):96S-104S; discussion 59S-61S.
106. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, *et al.* Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):309-29.
107. Asensio de la Cruz O, Cordon Martinez A, Elorz Lambarri J, Moreno Galdo A, Villa Asensi JR. Respiratory function assessment in cooperative patients. Part II. *An Pediatr (Barc)*. 2007;66(5):518-30.
108. Prieto L, Gutierrez V, Linana J, Marin J. Bronchoconstriction induced by inhaled adenosine 5'-monophosphate in subjects with allergic rhinitis. *Eur Respir J*. 2001;17(1):64-70.
109. Cole P. A new look at the pathogenesis and management of persistent bronchial sepsis: a vicious cycle hypothesis and its logical therapeutic connotations. In: Davies B, editor. *Strategies for the management of chronic bronchial sepsis*. Oxford, UK.: Medicine Publishing Foundation 1984. p. 1-16.
110. Koh YY, Lee MH, Sun YH, Sung KW, Chae JH. Effect of roxithromycin on airway responsiveness in children with bronchiectasis: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur Respir J*. 1997;10(5):994-9.
111. Bahous J, Cartier A, Pineau L, Bernard C, Ghezzi H, Martin RR, *et al.* Pulmonary function tests and airway responsiveness to methacholine in chronic bronchiectasis of the adult. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1984;20(4):375-80.
112. Pang J, Chan HS, Sung JY. Prevalence of asthma, atopy, and bronchial hyperreactivity in bronchiectasis: a controlled study. *Thorax*. 1989;44(11):948-51.

113. Ip M, Lam WK, So SY, Liong E, Chan CY, Tse KM. Analysis of factors associated with bronchial hyperreactivity to methacholine in bronchiectasis. *Lung*. 1991;169(1):43-51.
114. Evander E, Arborelius M, Jr., Jonson B, Simonsson BG, Svensson G. Lung function and bronchial reactivity in six patients with immotile cilia syndrome. *Eur J Respir Dis Suppl*. 1983;127:137-43.
115. Koh YY, Park Y, Jeong JH, Kim CK, Min YG, Chi JG. The effect of regular salbutamol on lung function and bronchial responsiveness in patients with primary ciliary dyskinesia. *Chest*. 2000;117(2):427-33.
116. Avital A, Springer C, Bar-Yishay E, Godfrey S. Adenosine, methacholine, and exercise challenges in children with asthma or paediatric chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1995;50(5):511-6.
117. Kharitonov SA, Yates D, Springall DR, Buttery L, Polak J, Robbins RA, *et al*. Exhaled nitric oxide is increased in asthma. *Chest*. 1995;107(3 Suppl):156s-7s.
118. Sahin G, Klimek L, Mullol J, Hormann K, Walther LE, Pfaar O. Nitric oxide: a promising methodological approach in airway diseases. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;156(4):352-61.
119. Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasemann H, *et al*. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. *Chest*. 2010;138(3):682-92.
120. Perez-Frances C. Determinación de la respuesta bronquial a adenosina 5-monofosfato y de la concentración de óxido nítrico en aire exhalado en pacientes con Colitis Ulcerosa [tesis doctoral]. Valencia: Universidad de Valencia, Facultad de Medicina; 2010.
121. Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, *et al*. Nitric oxide synthase in human and rat lung:

immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9(4):371-7.

122. Pechkovsky DV, Zissel G, Goldmann T, Einhaus M, Taube C, Magnussen H, *et al.* Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(4):L684-92.

123. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest.* 1994;94(6):2231-6.

124. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol* (1985). 1998;85(2):653-66.

125. Lehtimäki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, Hahtola P, Jarvenpää R, Koivula T, *et al.* Extended exhaled NO measurement differentiates between alveolar and bronchial inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(7):1557-61.

126. Condorelli P, Shin HW, Aledia AS, Silkoff PE, George SC. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant flow exhalations and an axial diffusion model. *J Appl Physiol* (1985). 2007;102(1):417-25.

127. Shin HW, Condorelli P, George SC. Examining axial diffusion of nitric oxide in the lungs using heliox and breath hold. *J Appl Physiol* (1985). 2006;100(2):623-30.

128. Verbanck S, Kerckx Y, Schuermans D, de Bisschop C, Guenard H, Naeije R, *et al.* The effect of posture-induced changes in peripheral nitric oxide uptake on exhaled nitric oxide. *J Appl Physiol* (1985). 2009;106(5):1494-8.

129. Moschino L, Zanconato S, Bozzetto S, Baraldi E, Carraro S. Childhood asthma biomarkers: present knowledge and future steps.

Paediatr Respir Rev [internet]. 2015 [citado 14 junio 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2015.05.001>

130. Walker WT, Jackson CL, Lackie PM, Hogg C, Lucas JS. Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2012;40(4):1024-32.

131. Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1-3):240-52.

132. Major TA, Panmanee W, Mortensen JE, Gray LD, Hoglen N, Hassett DJ. Sodium nitrite-mediated killing of the major cystic fibrosis pathogens *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Burkholderia cepacia* under anaerobic planktonic and biofilm conditions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4671-7.

133. Walker WT, Liew A, Harris A, Cole J, Lucas JS. Upper and lower airway nitric oxide levels in primary ciliary dyskinesia, cystic fibrosis and asthma. *Respir Med*. 2013;107(3):380-6.

134. Mahut B, Escudier E, de Blic J, Zerah-Lancner F, Coste A, Harf A, *et al*. Impairment of nitric oxide output of conducting airways in primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41(2):158-63.

135. Paraskakis E, Zihlif N, Bush A. Nitric oxide production in PCD: possible evidence for differential nitric oxide synthase function. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42(10):876-80.

136. Shoemark A, Wilson R. Bronchial and peripheral airway nitric oxide in primary ciliary dyskinesia and bronchiectasis. *Respir Med*. 2009;103(5):700-6.

137. Konstantinidi EM, Lappas AS, Tzortzi AS, Behrakis PK. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. *Scientific World Journal* [internet]. 2015 [citado 6 junio 2015]. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1155/2015/435160>.

138. Moreno, A. Marcadores de la enfermedad asmática: de la función pulmonar al aire espirado. *An Pediatr (Barc)*. 2004;02 Supl 1:37-47 - Vol. 02.
139. Alves Vento D, Arcencio L, Rodrigues AJ. Nitric oxide in the exhaled breath condensate of healthy volunteers collected with a reusable device. *Arch Bronconeumol*. 2012;48(4):120-5.
140. Von Pohle WR, Anholm JD, McMillan J. Carbon dioxide and oxygen partial pressure in expiratory water condensate are equivalent to mixed expired carbon dioxide and oxygen. *Chest*. 1992;101(6):1601-4.
141. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest*. 2006;130(5):1541-6.
142. Gaber F, Acevedo F, Delin I, Sundblad BM, Palmberg L, Larsson K, *et al*. Saliva is one likely source of leukotriene B4 in exhaled breath condensate. *Eur Respir J*. 2006;28(6):1229-35.
143. Simpson JL, Wood LG, Gibson PG. Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(9):1180-5.
144. Zweifel M, Rechsteiner T, Hofer M, Boehler A. Detection of pulmonary amylase activity in exhaled breath condensate. *J Breath Res*. 2013;7(4):046007.
145. Prieto L, Orosa B, Barato D, Marin J. The effect of different periods of argon deaeration on exhaled breath condensate pH. *J Asthma*. 2011;48(4):319-23.
146. Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A, Bunyan D, Hom S, Nguyen A, *et al*. Normative data for pH of exhaled breath condensate. *Chest*. 2006;129(2):426-30.

147. Calusic AL, Varnai VM, Macan J. Acute effects of smoking and food consumption on breath condensate pH in healthy adults. *Exp Lung Res.* 2011;37(2):92-100.
148. Bodini A, D'Orazio C, Peroni DG, Corradi M, Zerman L, Folesani G, *et al.* IL-8 and pH values in exhaled condensate after antibiotics in cystic fibrosis children. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007;20(3):467-72.
149. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, Turner R, Nguyen TA, Smith A, *et al.* Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J.* 2003;22(6):889-94.
150. Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Dette F, Pinkenburg O, Schmid S, *et al.* Ambient temperature impacts on pH of exhaled breath condensate. *Respirology.* 2010;15(1):155-9.
151. 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(10):1364-70.
152. Caffarelli C, Dascola CP, Peroni D, Rico S, Stringari G, Varini M, *et al.* Airway acidification in childhood asthma exacerbations. *Allergy Asthma Proc.* 2014;35(3):51-6.
153. Ngamtrakulpanit L, Yu Y, Adjei A, Amoah G, Gaston B, Hunt J. Identification of Intrinsic Airway Acidification in Pulmonary Tuberculosis. *Glob J Health Sci.* 2010;2(1):106-10.
154. Antus B, Barta I, Csiszer E, Kelemen K. Exhaled breath condensate pH in patients with cystic fibrosis. *Inflamm Res.* 2012;61(10):1141-7.
155. Palop-Cervera M, de Diego Damia A, Martinez-Moragon E, Cortijo J, Fullana J, Leon M. Inflammation markers in the exhaled air of patients with bronchiectasis unassociated with cystic fibrosis. *Arch Bronconeumol.* 2009;45(12):597-602.

156. Antus B, Barta I. Exhaled breath condensate pH in patients with lung cancer. *Lung Cancer*. 2012;75(2):178-80.
157. Csoma Z, Bush A, Wilson NM, Donnelly L, Balint B, Barnes PJ, *et al*. Nitric oxide metabolites are not reduced in exhaled breath condensate of patients with primary ciliary dyskinesia. *Chest*. 2003;124(2):633-8.
158. Zihlif N, Paraskakis E, Tripoli C, Lex C, Bush A. Markers of airway inflammation in primary ciliary dyskinesia studied using exhaled breath condensate. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41(6):509-14.
159. Armengot M, Milara J, Mata M, Carda C, Cortijo J. Cilia motility and structure in primary and secondary ciliary dyskinesia. *Am J Rhinol Allergy*. 2010;24(3):175-80.
160. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(3):1107-36.
161. Gardner RM, Hankinson JL. Standardization of spirometry-1987 ATS update (American Thoracic Society). *J Occup Med*. 1988;30(3):272-3.
162. Oliva Hernandez C, Gomez Pastrana D, Sirvent Gomez J, Asensio de la Cruz O. Respiratory function assessment in cooperative patients. Part I. Spiromery and bronchodilator reversibility testing. *An Ped (Barc)*. 2007;66(4):393-406.
163. Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR, *et al*. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol*. 1975;56(4):323-7.
164. Prieto L, Marin J. Methacholine inhalation challenge. Practical consequences of using duplicate spirograms after each concentration. *Ann Allergy*. 1993;70(6):487-90.

165. Burrows B, Sears MR, Flannery EM, Herbison GP, Holdaway MD. Relations of bronchial responsiveness to allergy skin test reactivity, lung function, respiratory symptoms, and diagnoses in thirteen-year-old New Zealand children. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;95(2):548-56.
166. Kuehni C. When to suspect PCD: main clinical presenting features. Ponencia presentada en *Primary ciliary dyskinesia: sharing knowledge and experience across Europe*. Noviembre 2013. Nápoles, Italia.
167. Perez-Yarza EG, Villa JR, Cobos N, Navarro M, Salcedo A, Martin C, *et al.* Forced spirometry in healthy preschool children. *An Ped (Barc).* 2009;70(1):3-11.
168. De Mir Messa I, Moreno Galdo A, Cobos Barroso N, Gartner S, Martin de Vicente C, Rovira Amigo S, *et al.* Bronchial hyperresponsiveness to methacholine in children under 4 years with recurrent bronchitis. *Arch Bronconeumol.* 2010;46(12):621-7.
169. Barker AF, Hirshman CA, D'Silva R, Hanifin JM. Airway responsiveness in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;87(4):780-3.
170. Kyllonen H, Malmberg P, Remitz A, Ryttila P, Metso T, Helenius I, *et al.* Respiratory symptoms, bronchial hyper-responsiveness, and eosinophilic airway inflammation in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 2006;36(2):192-7.
171. Romero MT, Carda C, Milara J, Armengot M, Escribano A. Clinical, morphological and functional features of primary ciliary dyskinesia children in southeast Spain. *Paediatr Respir Rev.* 14:S52.
172. Jain K, Padley SP, Goldstraw EJ, Kidd SJ, Hogg C, Biggart E, *et al.* Primary ciliary dyskinesia in the paediatric population: range and severity of radiological findings in a cohort of patients receiving tertiary care. *Clin Radiol.* 2007;62(10):986-93.

173. Wolter NE, Dell SD, James AL, Campisi P. Middle ear ventilation in children with primary ciliary dyskinesia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012;76(11):1565-8.
174. Pruliere-Escabasse V, Coste A, Chauvin P, Fauroux B, Tamalet A, Garabedian EN, *et al.* Otologic features in children with primary ciliary dyskinesia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;136(11):1121-6.
175. Montella S, Santamaria F, Salvatore M, Maglione M, Iacotucci P, De Santi MM, *et al.* Lung disease assessment in primary ciliary dyskinesia: a comparison between chest high-field magnetic resonance imaging and high-resolution computed tomography findings. *Ital J Pediatr.* 2009;35(1):24.
176. Hosie PH, Fitzgerald DA, Jaffe A, Birman CS, Rutland J, Morgan LC. Presentation of primary ciliary dyskinesia in children: 30 years' experience. *J Paediatr Child Health.* 2015;51(7):722-6.
177. Alsaadi MM, Habib SS, Al Muqhem BA, Aldrees A, Al Zamil JF, Alsadoon HA. Significance of fractional exhaled nitric oxide measurements in detecting primary ciliary dyskinesia in Saudi children. *Saudi Med J.* 2013;34(1):24-8.
178. Oktem S, Karadag B, Erdem E, Gokdemir Y, Karakoc F, Dagli E, *et al.* Sleep disordered breathing in patients with primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol.* 2013;48(9):897-903.
179. Beucher J, Chambellan A, Segalen J, Deneuille E. Primary ciliary dyskinesia: a retrospective review of clinical and paraclinical data. *Rev Mal Respir.* 2011;28(7):856-63.
180. Sommer JU, Schafer K, Omran H, Olbrich H, Wallmeier J, Blum A, *et al.* ENT manifestations in patients with primary ciliary dyskinesia: prevalence and significance of otorhinolaryngologic comorbidities. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268(3):383-8.

181. Lesic I, Maurer E, Strippoli MP, Kuehni CE, Barbato A, Frischer T. Primary ciliary dyskinesia (Pcd) in Austria. *Wien Klin Wochenschr.* 2009;121(19-20):616-22.
182. Iñiguez CR, Fonseca AX, Hernández CJ, González BS, Sánchez D I. Disquinesia ciliar: diagnóstico ultraestructural, evolución clínica y alternativas de tratamiento. *Rev Med Chil.* 2007;135:1147-52.
183. Holzmann D, Felix H. Neonatal respiratory distress syndrome--a sign of primary ciliary dyskinesia? *Eur J Pediatr.* 2000;159(11):857-60.
184. El-Sayed Y, al-Sarhani A, al-Essa AR. Otolological manifestations of primary ciliary dyskinesia. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1997;22(3):266-70.
185. Magnin ML, Cros P, Beydon N, Mahloul M, Tamalet A, Escudier E, *et al.* Longitudinal lung function and structural changes in children with primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol.* 2012;47(8):816-25.
186. Eggleston PA, Rosenstein BJ, Stackhouse CM, Mellits ED, Baumgardner RA. A controlled trial of long-term bronchodilator therapy in cystic fibrosis. *Chest.* 1991;99(5):1088-92.
187. Choi SH, Yoo Y, Yu J, Rhee CS, Min YG, Koh YY. Bronchial hyperresponsiveness in young children with allergic rhinitis and its risk factors. *Allergy.* 2007;62(9):1051-6.
188. Joos GF, O'Connor B, Anderson SD, Chung F, Cockcroft DW, Dahlen B, *et al.* Indirect airway challenges. *Eur Respir J.* 2003;21(6):1050-68.
189. Van Den Berge M, Meijer RJ, Kerstjens HA, de Reus DM, Koeter GH, Kauffman HF, *et al.* PC(20) adenosine 5'-monophosphate is more closely associated with airway inflammation in asthma than PC(20) methacholine. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(7):1546-50.

190. Van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, Prins JB. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(11):2107-13.
191. Prieto L, Ferrer A, Domenech J, Lopez V, Marin J. Predictive value of the response to inhaled adenosine 5'-monophosphate for reducing the dose of inhaled corticosteroids in asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013;23(5):351-8.
192. Yoo Y, Yu J, Kim DK, Choi SH, Kim CK, Koh YY. Methacholine and adenosine 5'-monophosphate challenges in children with post-infectious bronchiolitis obliterans. *Eur Respir J.* 2006;27(1):36-41.
193. Castillo Laita JA, De Benito Fernandez J, Escribano Montaner A, Fernandez Benitez M, Garcia de la Rubia S, Garde Garde J, *et al.* Consensus on the treatment of asthma in pediatrics. *An Ped (Barc).* 2007;67(3):253-73.
194. Prieto L, Uixera S, Gutierrez V, Bruno L. Modifications of airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate and exhaled nitric oxide concentrations after the pollen season in subjects with pollen-induced rhinitis. *Chest.* 2002;122(3):940-7.
195. Clifford RD, Radford M, Howell JB, Holgate ST. Prevalence of respiratory symptoms among 7 and 11 year old schoolchildren and association with asthma. *Arch Dis Child.* 1989;64(8):1118-25.
196. Clifford RD, Howell JB, Radford M, Holgate ST. Associations between respiratory symptoms, bronchial response to methacholine, and atopy in two age groups of schoolchildren. *Arch Dis Child.* 1989;64(8):1133-9.
197. 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 cationic protein. *Allergy*. 2007;62(10):1119-24.

198. Adams PS, Tian X, Zahid M, Khalifa O, Leatherbury L, Lo CW. Establishing normative nasal nitric oxide values in infants. *Respir Med*. 2015; 109(9):1126-30.

199. Lucas JS, Walker WT. Nasal nitric oxide is an important test in the diagnostic pathway for primary ciliary dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10(6):645-7.

200. Pifferi M, Bush A, Maggi F, Michelucci A, Ricci V, Conidi ME, *et al*. Nasal nitric oxide and nitric oxide synthase expression in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2011;37(3):572-7.

201. Boon M, Meyts I, Proesmans M, Vermeulen FL, Jorissen M, De Boeck K. Diagnostic accuracy of nitric oxide measurements to detect primary ciliary dyskinesia. *Eur J Clin Invest*. 2014;44(5):477-85.

202. Karadag B, James AJ, Gultekin E, Wilson NM, Bush A. Nasal and lower airway level of nitric oxide in children with primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 1999;13(6):1402-5.

203. Narang I, Ersu R, Wilson NM, Bush A. Nitric oxide in chronic airway inflammation in children: diagnostic use and pathophysiological significance. *Thorax*. 2002;57(7):586-9.

204. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;191(1):83-8.

205. Lehtimäki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, Turjanmaa V, Moilanen E. Inhaled fluticasone decreases bronchial but not alveolar nitric oxide output in asthma. *Eur Respir J*. 2001;18(4):635-9.

206. Puckett JL, Taylor RW, Leu SY, Guijon OL, Aledia AS, Galant SP, *et al*. Clinical patterns in asthma based on proximal and distal

airway nitric oxide categories. *Respir Res* [internet]. 2010 [citado 20 agosto 2015];11:47. doi: 10.1186/1465-9921-11-47.

207. Hunt J. Exhaled breath condensate pH: reflecting acidification of the airway at all levels. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(4):366-7.

208. Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA, *et al*. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(3 Pt 1):694-9.

209. Robroeks CM, van Vliet D, Jobsis Q, Braekers R, Rijkers GT, Wodzig WK, *et al*. Prediction of asthma exacerbations in children: results of a one-year prospective study. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(5):792-8.

210. Van den Berge M, Kerstjens HA, de Reus DM, Koeter GH, Kauffman HF, Postma DS. Provocation with adenosine 5'-monophosphate, but not methacholine, induces sputum eosinophilia. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(1):71-6.

211. Prieto L, Gutierrez V, Uixera S, Bruno L. Concentrations of exhaled nitric oxide in asthmatics and subjects with allergic rhinitis sensitized to the same pollen allergen. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(12):1728-33.

212. Nicolaou NC, Lowe LA, Murray CS, Woodcock A, Simpson A, Custovic A. Exhaled breath condensate pH and childhood asthma: unselected birth cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(3):254-9.

213. Prieto L, Palacios R, Aldana D, Ferrer A, Perez-Frances C, Lopez V, *et al*. 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 Clin Immunol*. 2010;6(1):27.

---

214. Romero Rubio MT, Armengot Carceller M, Carda Batalla C, Escribano Montaner A, Milara Paya J. What is the gold standard in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia syndrome? *Eur Respir J.* 2011;38(Suppl 55).