

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA Y**

**MEDICINA PREVENTIVA**

**AREA DE PEDIATRÍA**

**ESTUDIO DE LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL A LA METACOLINA Y  
DE LA INFLAMACIÓN BRONQUIAL VALORADA MEDIANTE EL ÓXIDO  
NÍTRICO EXHALADO, EN NIÑOS MENORES DE CUATRO AÑOS CON  
BRONQUITIS SIBILANTES DE REPETICIÓN.**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA**

**POR**

**INES DE MIR MESSA**

**TUTOR**

**Prof. ANTONIO CARRASCOSA LEZCANO**

**DIRECTOR**

**Dr. ANTONIO MORENO GALDO**

**BARCELONA, 2005**

Don Antonio Carrascosa Lezcano, Catedrático de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona

**CERTIFICA:**

Que el trabajo titulado : **Estudio de la hiperrespuesta bronquial a la metacolina y de la inflamación bronquial valorada mediante el óxido nítrico exhalado, en niños menores de cuatro años con bronquitis sibilantes de repetición** ha sido realizado por Dña Inés de Mir Messa bajo la dirección del Dr Antonio Moreno Galdó, siendo yo tutor de la misma. El mencionado trabajo, se encuentra en condiciones de ser presentado como tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Barcelona, 1 de abril de 2005.

Prof. A. Carrascosa Lezcano

Don Antonio Moreno Galdó , Doctor en Medicina y Cirugía ,

**CERTIFICA:**

Que el trabajo titulado : **Estudio de la hiperrespuesta bronquial a la metacolina y de la inflamación bronquial valorada mediante el óxido nítrico exhalado, en niños de uno a tres años con bronquitis sibilantes de repetición** ha sido realizado por Dña Inés de Mir Messa bajo mi dirección. El mencionado trabajo, se encuentra en condiciones de ser presentado como tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Barcelona,1 de abril de 2005.

Dr Antonio Moreno Galdó

## **AGRADECIMIENTOS.**

Esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin la ayuda de muchas personas, a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Prof. Antonio Carrascosa Lezcano, Tutor de la tesis, por su apoyo, estímulo y ayuda.

Al Dr. Antonio Moreno Galdó, Director de la Tesis, por su constante orientación científica, y su dedicación.

Al Dr. Nicolás Cobos Barroso por las facilidades para la realización del estudio en la Unidad de Neumología Pediátrica y Fibrosis Quística del Hospital Universitari Vall d'Hebron, y por su apoyo científico.

Al Dr. Santos Liñan Cortés por su colaboración en el trabajo y el apoyo y las facilidades dadas.

A los médicos de la Unidad de Neumología Pediátrica y Fibrosis Quística, Dra. Silvia Gartner y Dr. Gerardo Vizmanos.

A las enfermeras y auxiliares de la Unidad de Neumología Pediátrica y Fibrosis Quística, en especial a Maite Domínguez y Ascensión Avilés por su ayuda y colaboración.

A Dorita, que siempre permanecerá en nuestra memoria.

Al Servicio de Farmacia del área Materno-Infantil del Hospital Vall d'Hebron por su colaboración en la preparación de las soluciones de metacolina.

A los niños, madres y padres que colaboraron de forma altruista en el estudio.

Al Dr Andreu Martí (DAP Sabadell) y a todo el personal de las ABS Ca N'Oriac (Sabadell) y Consell de Cent (3D) por creer en mí y apoyarme.

A la Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP) y la Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio (SEPAR), por su ayuda económica para la realización del proyecto.

A la Fundació Gol i Gorina y a todo el personal, por su ayuda económica y apoyo en todo momento.

A mi familia, en especial a mi padre, y amigos por su preocupación, y estímulo constante.

A Jaime por su apoyo incondicional, paciencia, ayuda y cariño. A nuestros hijos: Inés, Ana, Beatriz y Santiago por su comprensión y paciencia a pesar de los ratos robados durante estos años.

# INDICE

## INDICE.-

- <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.- El lactante y el niño en edad preescolar con bronquitis sibilantes.</b>	
1.1.- Introducción .....	3
1.2.- Epidemiología .....	4
1.2.1.- Factores de riesgo y tipos de bronquitis sibilantes recurrentes	
1.2.1.1.- Bronquitis sibilantes transitorias	
1.2.1.2.- Sibilantes persistentes no atópicos	
1.2.1.3.- Sibilantes atópicos	
1.2.2.- Influencia de las infecciones respiratorias y por virus respiratorio sincitial	
1.2.3.- Evolución a largo plazo	
1.3.- Inmunología .....	18
1.3.1.- Inmunología de las bronquitis sibilantes no relacionadas con la atopia	
1.3.2.- Inmunología de los sibilantes atópicos	
1.4.- Funcionalismo pulmonar .....	26
1.4.1.- Características de la vía aérea del lactante y del preescolar	
1.4.2.- Función respiratoria	
1.4.2.1.- El asa flujo-volumen a respiración constante	
1.4.2.2.- Pletismografía corporal	
1.4.2.3.- Resistencias por oscilometría de impulsos	
1.4.2.4.- Resistencias por interrupción	
1.4.2.5.- Compresión tóracoabdominal rápida	
1.4.2.6.- Presión transcutánea de O <sub>2</sub>	
<b>2.- Hiperrespuesta bronquial</b>	
2.1.- Definición .....	33
2.2.- Epidemiología de la hiperrespuesta bronquial.....	36
2.2.1.- Asociación con asma	
2.2.2.- Relación con atopia	
2.2.3.- Hiperrespuesta bronquial y otras patologías	
2.2.4.- Hiperreactividad bronquial y edad	
2.3.- Mecanismos de la hiperrespuesta bronquial .....	39
2.3.1.- Alteraciones del músculo liso bronquial	
2.3.2.- Alteraciones de la mecánica respiratoria	
2.3.3.- Disfunción del sistema nervioso autónomo	
2.3.4.- Inflamación	

2.3.5.- Factores genéticos y del desarrollo	
2.4.- Medición de la hiperrespuesta bronquial.....	45
2.4.1.- Pruebas de provocación bronquial	
2.4.1.1.- Estímulos directos	
2.4.1.2.- Estímulos indirectos	
2.5.- Valoración de la respuesta: espirometría y otros parámetros .....	51
2.6.- Factores que afectan la medida de la respuesta bronquial .....	52
2.6.1.- Métodos de nebulización	
2.6.2.- Comparación entre las pruebas directas e indirectas	
2.6.3.- Repetibilidad de las medidas	
2.6.4.- Influencia ambiental sobre la reactividad bronquial	
2.6.4.1.- Exposición a alérgenos	
2.6.4.2.- Infecciones víricas	
2.6.4.3.- Tabaco	
2.6.4.4.- Localización y etnia	
2.6.4.5.- Polución	
2.6.5.- Efectos de la medicación sobre la reactividad bronquial	
2.7.- Aplicaciones clínicas de la pruebas de broncoprovocación .....	60
2.7.1.- Despistaje de asma a nivel poblacional	
2.7.2.- Diagnóstico de asma	
2.7.3.- Marcador pronóstico	
2.7.4.- Valoración de la gravedad de asma	
2.7.5.- Manejo clínico de asma	
2.7.6.- Investigación	
<b>3.- Valoración de la inflamación bronquial mediante métodos no invasores.</b>	
<b>Oxido nítrico exhalado</b>	
3.1.- Introducción .....	62
3.2.- Fisiopatología .....	63
3.3.- Recomendaciones para la medición del óxido nítrico exhalado en los niños.....	65
3.3.1.- Características generales de la medición del óxido nítrico exhalado	
3.3.2.- Métodos utilizados en la determinación del óxido nítrico exhalado en la infancia	
3.3.2.1.- Respiración única on-line	
3.3.2.2.- Determinación on-line durante respiración espontánea	
3.3.2.3.- Determinación off-line	
3.3.2.4.- Determinación on-line versus off-line en niños	
3.3.3.- Factores que pueden influir en la determinación de óxido nítrico exhalado	
3.3.3.1.- Factores del paciente	
3.3.3.2.- Factores generales	
3.3.4.- Características del equipo de medición	

3.4.- Utilidad clínica de la determinación del óxido nítrico exhalado .....	73
3.4.1.- Ayuda en el diagnóstico de asma	
3.4.2.- Ayuda en la caracterización de la enfermedad	
3.4.3.- Monitorización de la enfermedad	
3.4.4.- Monitorización del tratamiento	
3.4.5.- Valoración de los preescolares y lactantes con sibilancias	
3.5.- Limitaciones de la determinación del óxido nítrico exhalado .....	76
3.6.- Otros marcadores de inflamación.....	77
3.6.1.- Proteínas derivadas del eosinófilo	
3.6.2.- Espujo inducido	
3.6.3.- Monóxido de carbono	
3.6.4.- Condensado de aire espirado	
<b>- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>83</b>
<b>- PACIENTES Y MÉTODOS</b>	
1.- Pacientes .....	89
1.1.- Grupo de pacientes con bronquitis de repetición	
Criterios de inclusión y exclusión	
1.2.- Grupo control	
Criterios de inclusión y exclusión	
1.3.- Aspectos éticos	
2.-Métodos .....	91
2.1.- Diseño del estudio .....	91
2.1.1.- Recogida de datos de anamnesis pacientes	
2.1.2.- Recogida de datos de anamnesis control	
2.1.3.- Protocolo de estudio clínico	
2.1.4.- Valoración de hiperrespuesta bronquial	
2.1.5.- Valoración de inflamación bronquial	
2.1.6.- Determinación de valores normales	
2.2.- Determinaciones .....	94
2.2.1.- Prueba de provocación bronquial con metacolina	
2.2.1.1.- Preparación de soluciones de metacolina	
2.2.1.2.- Protocolo de nebulización	
2.2.1.3.- Nebulizador	
2.2.1.4.- Requisitos y precauciones para la realización de la prueba	
2.2.1.5.- Valoración de la respuesta a la metacolina	
2.2.1.6.- procedimiento de realización de la prueba	
2.2.2.- Determinación de óxido nítrico exhalado	
2.2.2.1.- Instrumentación	
2.2.2.2.- Técnica de recogida de muestras de aire exhalado	
2.2.2.3.- Análisis de las muestras	
3.- Procesamiento de datos. Análisis estadístico .....	111

## **- RESULTADOS**

1.- Estudio de hiperrespuesta bronquial.....115

1.1.- Características basales del grupo con bronquitis de repetición

1.2.- Características basales del grupo control

1.3.- Comparación de las características basales del grupo con bronquitis y el grupo control

1.4.- Prueba de provocación bronquial con metacolina

1.5.- Análisis de la influencia de las diferentes variables sobre el resultado de la Prueba de provocación bronquial en el grupo de pacientes con bronquitis sibilantes de repetición

2.- Determinación del óxido nítrico exhalado .....142

2.1.- Características basales de los grupos de estudio

2.2.- Resultados de la determinación de óxido nítrico exhalado

2.3.- Influencia de las diferentes variables sobre el óxido nítrico exhalado en sanos

2.4.- Influencia de las diferentes variables sobre el óxido nítrico exhalado en el grupo de niños afectados de bronquitis de repetición

## **- DISCUSIÓN**

1.- Estudio de hipereactividad bronquial en niños no colaboradores .....159

1.1.- Utilidad, seguridad y eficacia de la prueba de provocación bronquial con metacolina en niños en edad preescolar

1.1.1.- Aspectos metodológicos de la prueba.

1.2.- Posibles mecanismos de la hiperrespuesta bronquial en niños de corta edad.

1.3.- Hiperrespuesta bronquial y predicción de asma.

1.4.- Determinantes precoces de la hiperrespuesta bronquial: Evidencia fisiológica y epidemiológica

1.4.1.- Relación con la edad de presentación de la primera bronquitis

1.4.2.- Género y positividad de la prueba de provocación bronquial con metacolina

1.4.3.- Antecedentes familiares de atopia

1.4.4.- Tabaco en el embarazo y tabaquismo pasivo postnatal

1.4.5.- Relación entre peso al nacer y hipereactividad bronquial

1.4.6.- Lactancia materna

1.4.7.- Asistencia a guardería. Número de hermanos

1.4.8.- Número de episodios de bronquitis en el último año

1.4.9.- Positividad del virus respiratorio sincitial en la primera bronquitis

1.1.10.- Edad a la que se realizó la prueba

2.- Determinación del óxido nítrico exhalado en niños no colaboradores .....180

2.1.- Viabilidad y utilidad de la determinación del óxido nítrico exhalado en niños preescolares.

2.1.1.- Viabilidad de la determinación de óxido nítrico en niños de corta edad

2.1.2.- Valores normales del óxido nítrico exhalado

2.1.3.- Utilidad de la determinación de óxido nítrico exhalado

- 2.2.- Limitaciones de la determinación del óxido nítrico exhalado en niños preescolares
- 2.3.- Análisis de factores que influyen en la determinación de óxido nítrico exhalado
  - 2.3.1.- Influencia del método de recogida
  - 2.3.2.- Factores técnicos
  - 2.3.3.- Factores fisiológicos, ambientales y patológicos
- 2.4.- Relación entre niños afectos de sibilancias, presencia de hiperrespuesta bronquial y niveles de óxido nítrico exhalado

- **CONCLUSIONES** .....193
- **BIBLIOGRAFÍA** .....197

# **INTRODUCCIÓN**

El asma es la enfermedad crónica infantil más frecuente. Aunque la incidencia de cuadros bronquiales con sibilantes a la auscultación en niños menores de tres años es muy elevada, el diagnóstico de asma bronquial en estos niños es difícil, ya que no pueden realizar las pruebas de función pulmonar o de provocación bronquial habituales.

Alrededor del 30% de los niños menores de tres años presentan algún episodio de bronquitis sibilante y cerca del 50% de ellos presentan sibilantes de forma recurrente en los primeros 2-3 años de vida. Dentro de estos niños que presentan bronquitis sibilantes en los tres primeros años de vida se pueden distinguir dos poblaciones<sup>1,2,2,3</sup>:

- Niños con sibilantes precoces transitorios que dejan de presentar estos episodios a los 3 años de vida. Serían niños que nacen con unas vías aéreas de menor calibre, como se demuestra por la existencia de una función pulmonar disminuida a las tres semanas de vida, y que están predispuestos a presentar sibilantes en el curso de sus infecciones respiratorias durante los primeros tres años (60% de los niños).

- Niños con sibilantes persistentes que los continúan presentando entre los 3 y 6 años. Entre ellos distinguimos dos subgrupos según los factores de riesgo asociados: no atópicos (desencadenados por infecciones víricas) y atópicos (en los que se implica un complejo formado por factores genéticos inmunomoduladores y ambientales)

Para poder llegar al diagnóstico de asma en los niños pequeños sería necesario demostrar en ellos la presencia de **hiperrespuesta bronquial**.

La hiperrespuesta bronquial es un rasgo característico del asma de los niños mayores y adultos. Existe una correlación intensa entre la hiperrespuesta bronquial y la frecuencia y gravedad de los episodios de sibilancias en niños de 8 a 15 años de edad. Esta correlación no se ha demostrado de forma clara en los niños de cero a seis años de edad con sibilancias. Se ha demostrado la presencia de hiperrespuesta bronquial en lactantes normales y en lactantes con bronquitis de repetición en estudios en los que no se utilizaba un grupo control de la misma edad<sup>4</sup>.

Sin embargo, en otros estudios realizados en lactantes con episodios de sibilantes recurrentes no se encontró un aumento de la reactividad bronquial respecto a niños sanos de la misma edad<sup>5</sup>.

La mayoría de estos estudios sobre la hiperrespuesta bronquial en los niños pequeños se han realizado utilizando como medida de la respuesta broncoconstrictora técnicas de función pulmonar en las que es preciso sedar a los niños, fundamentalmente la técnica de la compresión toraco - abdominal rápida determinando el flujo máximo a

capacidad residual funcional<sup>6,7,7</sup>. El uso de esta prueba está limitado por su complejidad técnica y la necesidad de sedación.

Se han desarrollado otros métodos para estudiar la hiperrespuesta bronquial y la función pulmonar en niños no colaboradores, como la pletismografía, la oscilometría de impulsos (IOS) y las resistencias por oclusión<sup>8-10,10,11,11,12</sup>.

Otros métodos que no precisan sedación son: la medición de la presión transcutánea de O<sub>2</sub><sup>13,14</sup> y el método de la auscultación traqueal<sup>16,17,17</sup>. Este último método se ha validado en niños mayores obteniéndose una buena correlación con los resultados de la provocación bronquial utilizando como variable respuesta el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>, VEMS)<sup>18-20</sup><sup>19,20</sup>. Utilizando este método de la auscultación traqueal, Guirau et al. han encontrado en niños entre 4 y 24 meses de edad con bronquitis de repetición un aumento de la hiperrespuesta bronquial respecto a un grupo control de la misma edad<sup>21</sup>. Estos datos sugieren que la medición de la hiperrespuesta bronquial a la metacolina mediante el método de la auscultación traqueal, podrían permitir una mejor caracterización de los niños pequeños menores de tres años de edad que presentan sibilantes de repetición, permitiendo su estudio de forma no invasora y sin necesidad de sedación.

Otro de los componentes fundamentales del asma bronquial es la **inflamación bronquial**. Son las células inflamatorias, las que mediante la liberación de mediadores químicos, citoquinas y quimoquinas, contribuyen a los cambios fisiopatológicos del asma. En los últimos 10 años, se ha investigado mucho sobre la patogenia del asma, abriéndose nuevos interrogantes sobre la patogenia de éste.

Así se han buscado diversos métodos para determinar la inflamación bronquial y se han estudiado distintos marcadores que fuesen fáciles de determinar (como el gold standard: la espirometría), sensibles, específicos, reproducibles, que correlacionasen con la enfermedad y con la severidad y que mejorasen con tratamiento inflamatorio eficaz.<sup>22</sup>

Uno de los marcadores más estudiados en los últimos años en niños y adultos ha sido el óxido nítrico exhalado, desde que en 1992 fue declarado la “molécula del año”<sup>23</sup>. Cumple con las características previas, y se mide fácilmente mediante aparatos de quimioluminiscencia. Hay multiplísimos trabajos publicados en adultos y niños mayores<sup>24</sup>, siendo muchos menos los grupos que han trabajado con niños no colaboradores, ya que éste grupo implica una serie de problemas técnicos y éticos. Asimismo la recogida de aire exhalado para la determinación del F<sub>E</sub>NO en este grupo etario está menos estandarizada aunque la American Thoracic Society<sup>25</sup> y la ERS<sup>26</sup>, ha publicado unas recomendaciones al respecto para niños y adultos.

# 1.- EL LACTANTE Y EL NIÑO EN EDAD PREESCOLAR CON BRONQUITIS SIBILANTES

## 1.1.- INTRODUCCIÓN

La bronquitis obstructiva o bronquitis aguda sibilante, es uno de los problemas más frecuentes en la consulta diaria del pediatra. La prevalencia de sibilancias en el niño pequeño, es muy alta; 50% de los niños han presentado algún episodio antes de los 6 años, según estudios realizados en Estados Unidos <sup>1</sup> y Australia<sup>27</sup>. En Europa, la frecuencia es algo inferior; así en un estudio realizado en Inglaterra, se encontró una prevalencia a esta edad del 29% <sup>28</sup> y en Italia del 17% a los 6-7 años<sup>29</sup>.

Por otro lado, es un patología que preocupa a los pediatras por su difícil manejo (en los niños más pequeños), y su etiopatogenia controvertida, y también a los padres, que se plantean diversas preguntas como: “¿qué le pasará al niño?, ¿cuál es el pronóstico a largo plazo?, ¿será un niño asmático?”.

Los estudios longitudinales llevados a cabo en los últimos 25 años han mostrado que los casos más graves de la enfermedad asmática han tenido frecuentemente los primeros síntomas en edad preescolar. Pero también sabemos que frecuentemente los niños que presentan sus primeras crisis antes de los 3 años, tienen únicamente bronquitis sibilantes transitorias (aunque a veces las crisis han sido también graves).

Es pues en esta franja etaria, donde este signo clínico es más difícil de evaluar y tratar.

Hay muchas causas de sibilancias en los preescolares<sup>30,31</sup> (tabla 1), pero son clínicamente indistinguibles y las pruebas diagnósticas que usamos no siempre nos orientan en el diagnóstico etiológico.

La medición de la función pulmonar y de la reactividad bronquial que tanto ayudan en el estudio del niño mayor con asma, son difíciles de realizar en el niño pequeño, requieren un laboratorio de función pulmonar especializado y además son frecuentemente poco concluyentes en los niños pequeños.

A pesar de todos los esfuerzos dedicados a la investigación de la patogenia y el tratamiento del asma en las últimas décadas, todavía tenemos numerosos interrogantes acerca de las causas y del tratamiento de las bronquitis sibilantes en los niños pequeños.

**Tabla 1.** Causas de sibilancias en los niños

Bronquitis sibilante
Asma
Fibrosis quística
Aspiración de cuerpo extraño
Bronquiectasias
Malformaciones de la vía aérea o cardíacas
Bronquiolitis obliterante
Compresión de la vía aérea
Aspiración recurrente

La epidemiología y la inmunología nos ha dado algunas pistas sobre los factores que determinan las bronquitis sibilantes en estos niños. Así se ha observado que hay al menos 3 grupos distintos de niños con sibilantes :

- a) Aquellos que presentan vías aéreas estrechas al nacer.
- b) Los que presentan bronquitis sibilantes en respuesta a infecciones víricas.
- c) Los que tienen unos antecedentes atópicos importantes.

## **1.2.- EPIDEMIOLOGÍA**

Se han realizado varios estudios longitudinales con seguimientos prolongados, iniciados en la gestación o en el nacimiento, que han dado una nueva visión de los factores de riesgo y del pronóstico de los sibilantes en los niños pequeños, demostrando que representan una condición heterogénea en la que los episodios recurrentes de obstrucción bronquial son la consecuencia final de diferentes mecanismos subyacentes, y en definitiva, de diferentes enfermedades. Ello explicaría porqué el manejo de estos niños es a veces, con las mismas armas terapéuticas, más difícil que el de los niños más mayores o el de los asmáticos adultos.

Es muy importante distinguir, cuando hablamos de los niños con bronquitis sibilantes, entre lo que F. Martínez denomina “sibilante típico” y “sibilante atípico”<sup>32</sup>.

- a) El “sibilante típico”, presenta sus primeras manifestaciones clínicas en los 2 primeros años de vida y pueden ser limitadas o persistir durante la infancia (transitorias o persistentes). Algunos casos tienen antecedentes atópicos, y otros tienen una clara relación con patología vírica. Sin embargo, ninguno de ellos tiene ninguna enfermedad de base significativa.
- b) El “sibilante atípico”, puede iniciar sus síntomas a cualquier edad, incluso en los primeros 2 meses de vida (hecho poco frecuente en el típico, probablemente porque hay algún factor materno o del desarrollo que protege al neonato y determina una respuesta inmune a los virus distinta de la del lactante mayor). La enfermedad no es debida ni a atopia ni a infecciones víricas y puede ser a veces muy grave (incluso con riesgo vital). Incluye patologías de base, habiéndose señalado las más importantes la tabla 1.

Son los niños con “sibilantes típicos” los que serán objeto de estudio en esta tesis.

La incidencia de los primeros episodios de sibilancias varía. Después de los 2 meses la incidencia aumenta rápidamente hasta un pico entre los 2 y 5 meses, luego decrece de nuevo y es relativamente baja y estable durante el segundo y tercer años de vida.

Quizás esto tenga relación con un retraso en el crecimiento de las vías aéreas en relación con el crecimiento somático en los primeros 5 meses de la vida<sup>32</sup>, y con la maduración del sistema inmune.

### **1.2.1.- Factores de riesgo y tipos de bronquitis sibilantes recurrentes**

Alrededor del 50% de los lactantes y preescolares que tienen un episodio de bronquitis aguda presentan nuevos episodios. En principio, ello podría ser atribuido a 2 posibles causas:

- existen en estos niños unos factores predisponentes que explicarían el episodio inicial y las recurrencias.
- la agresión sufrida en el episodio inicial deja al huésped predispuesto para presentar nuevas bronquitis.

Podemos distinguir, atendiendo a los resultados de los últimos estudios epidemiológicos<sup>33,34</sup>, tres tipos de niños con bronquitis sibilantes recurrentes. Son los siguientes:

- a) Precoces transitorias: se inician y autolimitan antes de los 3 años; suponen el 60% del grupo de niños menores de 3 años de edad con sibilantes.
- b) Persistentes no atópicos: persisten más allá de los 3 años, parecen relacionadas con cuadros víricos y no tienen base atópica; corresponden al 20% del total de bronquitis sibilantes en los menores de 3 años.
- c) Persistentes atópicos: son las que persisten más allá de los 3 años y tienen una base atópica; corresponden al resto de los sibilantes: 20%.

#### **1.2.1.1.- Bronquitis sibilantes transitorias**

Se trata de niños que inician sus episodios de bronquitis durante los 3 primeros años de vida, con más frecuencia el primero, y dejan de presentarlos a los 3 años.

Los síntomas tienden a ocurrir casi exclusivamente asociados con infecciones víricas, pero la gravedad de los episodios de bronquitis no es menor la que presentan los niños con bronquitis persistentes. Por tanto, en este grupo de edad, la gravedad de las bronquitis no es factor que nos permita predecir la evolución temporal de los episodios, a diferencia de lo que ocurre en los primeros años escolares, en que sí indica un mayor riesgo persistencia y gravedad.

Los niños de este grupo no tienen una frecuencia aumentada de antecedentes familiares de asma ni de historia personal de dermatitis atópica ni de pruebas cutáneas a alérgenos

positivas en relación con los niños sanos sin sibilantes. Los factores de riesgo que se han identificado asociados con este grupo de sibilantes transitorios son los siguientes:

#### 1. Tabaquismo materno

Hace más de 30 años que Coley y cols. empezaron a hablar de la influencia del tabaquismo pasivo sobre las bronquitis en la primera infancia. Posteriormente hubo cierta controversia, pero ahora parece clara la relación entre el tabaquismo, principalmente materno, y el riesgo de padecer sibilancias en edades posteriores<sup>35-37</sup>. El tabaquismo materno durante el embarazo podría provocar ya intraútero, una alteración de la elastina del pulmón, provocando cambios, que conllevarían un mayor riesgo de sibilancias<sup>38,39</sup>.

#### 2. Función pulmonar alterada al nacer

Varios estudios prospectivos y de función pulmonar, han puesto de manifiesto que estos niños presentarían un menor calibre de sus vías aéreas al nacer respecto al resto de los niños, lo que conllevaría una mayor predisposición a presentar crisis de sibilancias que mejorarían con el crecimiento del niño y de sus pulmones<sup>40,41</sup>. De esta manera, se trataría de una alteración del desarrollo, que estaría influenciado por el ambiente intrauterino antes del nacimiento. Esta alteración se ha puesto de manifiesto en estos niños antes de presentar el primer episodio de bronquitis.

Un grupo ha sugerido también, basándose en medidas fisiológicas complejas, que podría ser más importante en la predisposición para las sibilancias una distensibilidad alterada de la pared bronquial que su calibre<sup>42</sup>

Por otro lado, algunos estudios sugieren que las bronquitis sibilantes asociadas con virus de este grupo de niños no estarían asociadas con un aumento de la hiperrespuesta bronquial<sup>5,43</sup>

#### 3. Sexo masculino

Numerosos estudios avalan que la prevalencia de sibilantes a estas edades es más alta en niños que en niñas<sup>29,44,45</sup>. Este dato concuerda con la constatación en un estudio multicéntrico de que los flujos espiratorios máximos (corregidos para el tamaño corporal) medidos mediante el método de la compresión torácica, son mayores en niñas que en niños<sup>46</sup>.

#### 4. Factores ambientales

Los niños que acuden a guardería en los primeros meses de vida o que viven en familias numerosas tienen más episodios de sibilantes, pero ello se limita a los primeros 4 o 6 años de vida.

El grupo de Von Mutius observó que había mayor número de bronquitis, en los países en los que enviaban más precozmente a los niños a la guardería. No obstante, había a su vez menor prevalencia de asma, lo que sugiere que los mecanismos de los sibilantes transitorios y persistentes atópicos son diferentes, aunque clínicamente sean indistinguibles a edades tempranas<sup>47</sup>.

La exposición a un nivel aumentado de endotoxinas del polvo de la casa parece también estar relacionada con un riesgo aumentado de sibilantes que no se extendería más allá de los 4 – 6 años. Sin embargo, la exposición precoz a la endotoxina del polvo de la casa protegería contra el desarrollo de la sensibilización alérgica. Se cree que los niños pequeños que viven en casas con proporción elevada de ácaros, podrían tener aumentada la inmunidad Th1, lo que implicaría un aumento de interferon gamma pero no de interleuquinas (IL) 4, 5 y 13, protegiendo al niño en un futuro frente al asma<sup>48</sup>. Lo mismo sucedería con la exposición a cucarachas<sup>49</sup>.

#### 5. Edad de la madre

Los hijos de madres jóvenes presentan mayor incidencia de sibilantes en edades tempranas, quizás por un menor nivel de función pulmonar de sus recién nacidos<sup>29</sup>.

#### 6. Lactancia artificial

Actualmente hay gran controversia en cuanto al papel protector de la lactancia materna en los niños con sibilantes pues hay datos contradictorios. Se cree que en este grupo de sibilantes transitorios la lactancia materna protegería frente a infecciones, disminuyendo por tanto la incidencia de sibilancias<sup>29,50</sup>. El efecto protector de la lactancia materna desaparece con la edad y no se observa con los sibilantes persistentes.

### **1.2.1.2.- Sibilantes persistentes no atópicos**

Alrededor de un 20% de los niños con bronquitis sibilantes durante los 3 primeros años de vida continúan presentándolas a los 6 años de edad, en ausencia de sensibilización atópica.

En la adolescencia precoz la mayoría de estos niños ya no continúan presentando síntomas.

En este grupo de niños, los primeros episodios de bronquitis sibilantes se suelen presentar durante el primer año de vida, a diferencia de en los “persistentes atópicos”, en que es más frecuente que se inicien en el segundo o tercer año de vida.

Se ha sugerido que el aumento de susceptibilidad para presentar bronquitis en este grupo se debe a una alteración en la regulación del tono muscular de las vías aéreas<sup>32</sup>. Apoyan esta hipótesis el aumento de prevalencia de hiperrespuesta bronquial que se observa en la edad escolar en los niños con bronquitis sibilantes de repetición y antecedentes de bronquiolitis por virus respiratorio sincitial (VRS)<sup>51</sup>, y los hallazgos del Tucson Children's Respiratory study que muestran que los niños con historia de bronquiolitis por VRS y bronquitis sibilantes posteriores, a los 11 años de edad tienen una función pulmonar disminuida y una respuesta aumentada a los broncodilatadores<sup>52</sup>.

Se ha visto también que en estos niños no atópicos en los que se observa hiperrespuesta bronquial en edad escolar, esta tiende a disminuir con la edad, de forma que a los 13 años de edad ya no la presentan. Es posible que el crecimiento de las vías aéreas pueda inducir cambios en la geometría de las vías aéreas y esto a su vez causar una disminución de la hiperrespuesta bronquial<sup>52,53</sup>.

La alteración del tono muscular de la vía aérea podría ser debida a:

1. Factores genéticos

El aumento de labilidad de la vía aérea observado en estos niños estaría genéticamente determinado y estaría presente antes de que presentaran la primera bronquiolitis.

2. Presentar una infección por virus respiratorio sincitial

La infección por VRS, por la lesión que éste haya podido originar a nivel de la pared bronquial, provocaría una alteración en la regulación del tono de la vía aérea, y sería responsable de los posteriores episodios de bronquitis.

La infección por VRS determinaría un incremento de los episodios de sibilantes hasta los 13 años, pero no un incremento de atopia. Asimismo presentan una hiperreactividad bronquial que disminuye con la edad. <sup>52</sup>.

3. Combinación de los dos factores

La infección vírica puede producir un daño importante de la pared de la vía aérea y originar una alteración de la regulación del tono muscular en niños genéticamente susceptibles.

4. El factor socioeconómico incide de forma peculiar.

La exposición a una mayor carga vírica que se observa en niños de nivel social bajo, podría incrementar los sibilantes no atópicos, pero por otro lado se ha observado, que la mayor exposición en general a agentes microbianos, llevaría a una desensibilización alérgica y atópica, disminuyendo la incidencia de los sibilantes atópicos<sup>54,55</sup>.

Datos de un estudio australiano sugieren que la alteración en el tono muscular puede ser al menos en parte genética o congénita<sup>56</sup>. Los investigadores valoraron la hiperrespuesta bronquial poco después del nacimiento en un grupo de niños con el método de la compresión torácica y la inhalación de histamina. Hubo una asociación significativa entre la presencia de hiperrespuesta bronquial al nacimiento y de sibilantes a la edad de 6 años, independiente de la atopia. En cambio la hiperrespuesta bronquial a la edad de 6 años sí estuvo relacionada con el estado atópico de los niños, y también con la presencia de sibilantes a esta edad. Las 2 formas de hiperrespuesta bronquial, congénita y a la edad de 6 años, contribuyeron de forma separada a la presencia de sibilantes a los 6 años.

Por otro lado, estudios en modelos animales sugieren que la infección por VRS en los animales jóvenes puede producir alteraciones prolongadas de la estructura y función de la vía aérea<sup>57</sup>. En humanos, la lesión que se observa en la bronquiolitis obliterante producida por adenovirus es una prueba de que los virus pueden producir un daño sostenido de la vía aérea. Sin embargo, no existen datos similares tan concluyentes con el VRS<sup>32</sup>. La influencia de las infecciones víricas en el desarrollo de bronquitis sibilantes recurrentes se discute con más detalle posteriormente.

### **1.2.1.3.- Sibilantes atópicos**

Aunque el asma atópico de los niños en edad escolar y de los adultos puede comenzar a cualquier edad, la mayoría inician sus primeros síntomas en los primeros 6 años de vida, en los que coinciden con los niños con sibilantes transitorios y los niños con sibilantes persistentes no atópicos, sin que se pueda distinguir clínicamente unos de otros. No obstante, en los atópicos los síntomas suelen empezar más a menudo durante el segundo y el tercer año de vida y no en el primero como en los otros grupos.

Los factores de riesgo que favorecerían el inicio del asma atópico serían:

1. Antecedentes familiares de asma (cuatro veces más frecuente en estos niños).

2. Antecedentes personales de dermatitis atópica (dos a tres veces más frecuente en este grupo).

3. Respuesta inmune alterada.

Sólo una minoría de los niños que posteriormente se clasificarán como asma atópico tienen a esta edad pruebas cutáneas (Prick test) o IgE específica positiva contra aeroalérgenos locales, a los que se sensibilizarán más tarde. De esta manera se da la paradoja de que en el momento de sus primeros episodios de bronquitis muchos de estos niños no son atópicos, y estas pruebas serán positivas sólo meses o años después de sus primeros episodios<sup>32</sup>. Este hecho va en contra de la hipótesis de que el desarrollo de una IgE específica contra aeroalérgenos es la “causa” del asma en estos niños.

Sí son ciertos estos dos hechos: los pocos niños de este grupo de edad en los que la IgE específica a aeroalérgenos es positiva, casi con seguridad continuarán presentando episodios de bronquitis sibilante en los años posteriores, y los niños que están sensibilizados contra antígenos alimentarios en los primeros años de la vida y posteriormente se sensibilizan contra aeroalérgenos a los 7 años de vida, es más probable que tengan asma que los niños que se sensibilizan contra aeroalérgenos a los 7 años, pero no estaban previamente sensibilizados contra alimentos<sup>58</sup>. En contraste, los niños que estaban sensibilizados a alimentos en los primeros años, pero después no se sensibilizan a aeroalérgenos a los 7 años, no es probable que desarrollen asma. En resumen, esto indicaría que, en algunos niños, existiría una alteración del sistema inmune que por un lado predispondría a la producción de IgE específica contra antígenos alimentarios en los primeros años de vida y aeroalérgenos en los años posteriores, y por otro lado predispondría al desarrollo de sibilantes persistentes.

También apoya la existencia de una respuesta inmune alterada la mayor prevalencia de eosinofilia, sobre todo en los episodios agudos, en el grupo de sibilantes atópicos futuros, que en los transitorios<sup>59</sup>, así como el aumento de proteína catiónica eosinofílica en su primer episodio de bronquitis<sup>60</sup>.

En un estudio realizando lavados broncoalveolares se vió que los niños preescolares con sibilantes atópicos tenían una mayor eosinofilia que los sibilantes no atópicos<sup>61</sup>.

En conjunto, estos datos sugieren que los sibilantes atópicos tienen una alteración del sistema inmune, que puede ser incluso detectada en su primer

episodio de bronquitis sibilante. Esta alteración es la determinante del desarrollo subsiguiente de un estado atópico, y de su predisposición a los episodios persistentes de sibilancias en la edad escolar.

#### 4. Función pulmonar alterada a los 6 años (habiendo sido normal al nacer)

Los estudios longitudinales de Tucson y de Perth<sup>1,27</sup> revelan que como grupo, los sibilantes atópicos tienen un nivel de función pulmonar menor a los 6 años y en los años posteriores que los otros grupos. Sin embargo, la medición de la función pulmonar es poco útil a nivel individual para distinguir los futuros sibilantes atópicos de los otros tipos.

#### 5. Hiperrespuesta bronquial a los 6 años

La mayoría de estos niños presentan hiperrespuesta bronquial a los 6 años de edad y en los años posteriores.

Parece que los niños que acaban desarrollando sibilantes atópicos no tienen inicialmente (al nacimiento o antes de presentar los primeros episodios) hiperrespuesta bronquial, y que esta se desarrolla de forma progresiva como consecuencia del proceso inflamatorio o del remodelamiento bronquial<sup>5,13,62</sup>

Por tanto las distintas pruebas de función pulmonar y de hiperrespuesta bronquial, pueden medir diferentes aspectos de la fisiología pulmonar y de la vía aérea y puede que algunas de estas pruebas están alteradas antes de la aparición de las sibilancias y otras no. Ello también sugiere que la sensibilización temprana está asociada a cambios de función pulmonar y a hiperrespuesta bronquial que también pueden estar alterados antes o después de las primeras sibilancias.

Es pues importante reseñar, desde un punto de vista epidemiológico, que los sibilantes atópicos son una enfermedad del desarrollo: los cambios en el sistema inmune ocurridos en épocas cruciales en la maduración de este sistema influyen toda la vida y simultáneamente determinan patrones alterados del desarrollo pulmonar, de las vías aéreas y del control del tono de éstas.

Las características y factores de riesgo de los tres tipos de sibilantes podrían resumirse en la tabla 2.

**Tabla 2.** Características de los tres fenotipos de sibilantes. Estudio comparativo (Adaptada de Castro Rodríguez)<sup>63</sup>

	<b>Sibilantes transitorios precoces</b>	<b>Asmáticos persistentes atópicos</b>	<b>Preescolares sibilantes no atópicos</b>
Duración sibilantes	< 3 años	> 11 años	Hasta la pubertad
Tabaquismo prenatal	+++	+	±
Infecciones respiratorias	++++	±	++
Varios hermanos Guardería	++++	--	--
Antecedentes familiares y personales de atopia	--	+++	--
Función pulmonar			
Nacimiento	Muy disminuida	Normal	±
6 años	Disminuida	Disminuida	±
11 años	Disminuida	Algo disminuida	±
Hiperrespuesta a metacolina (11 años)	--	+++	--
Variabilidad PEF (11 años)	--	++	+
Respuesta broncodilatadora (11 años)	--	+	++
Daño vía aérea	Congénito: estructural o funcional (↓ resistencia o ↑ compliance dinámica)	Congénito/ adquirido: estructural o funcional	Funcional: alteración del tono

PEF: Pico flujo espiratorio

### **1.2.2.- Influencia de las infecciones respiratorias y por virus respiratorio sincitial**

Como hemos comentado, se han propuesto dos hipótesis para explicar la asociación entre las infecciones de las vías respiratorias y las anomalías respiratorias posteriores. Una afirma que las infecciones lesionan el pulmón en desarrollo o alteran la regulación inmune del huésped, y por tanto las infecciones víricas serían un factor de riesgo para el desarrollo de bronquitis sibilantes recurrentes. Otros dicen que las infecciones respiratorias son más graves en lactantes y niños ya predispuestos a presentar asma; en este caso la infección sería solo un indicador de una afección silente hasta aquel momento<sup>64</sup>.

Múltiples estudios han demostrado que la mayoría de episodios de bronquitis sibilantes ocurridos durante los primeros 3 años de vida tienen un origen vírico. Se han relacionado con infecciones por VRS, parainfluenza, influenza, adenovirus y recientemente con el metapneumovirus. Actualmente con los progresos en la microbiología, se ha puesto mucho énfasis en la importancia de los rinovirus que estarían presentes en más del 80% de los niños con sibilantes.

En cuanto al VRS, se sabe que induce respuestas de tipo Th2 que pueden aumentar los cambios inflamatorios en niños predispuestos, dando finalmente lesiones en el epitelio respiratorio, liberando mediadores inflamatorios, exponiendo las terminaciones nerviosas, etc., y haciendo que se desencadenen las respuestas asmáticas<sup>65</sup>.

Sin embargo, no toda infección por VRS, desencadena una bronquitis. Long expone que más del 80% de los niños menores de 1 año, padecen una infección por VRS, pero de éstos, solo un 1% es hospitalizado, y un 0,1% requiere ingreso en UCIP. Por tanto debe existir más de un factor en el niño que determine el desarrollo de una bronquiolitis tras la infección VRS.

Por otro lado se discute si esta infección deja una susceptibilidad, o hiperreactividad bronquial, para toda la vida. En los últimos estudios del Tucson Birth Cohort Study, se vió que la infección producía un incremento de hiperrespuesta bronquial de hasta 4 veces- hasta los 6 años, que luego se reducía progresivamente hasta desaparecer el incremento del riesgo a los 13 años<sup>52</sup>.

¿Y qué ocurre con las otras infecciones respiratorias?

Existe una creciente evidencia a partir de estudios epidemiológicos que apoya la hipótesis de la higiene, es decir la existencia de una relación inversa entre el asma y la carga global de infecciones respiratorias.

Quizás los más concluyentes son los trabajos de los grupos de Von Mutius y Kramer que estudian la influencia en los niños de la asistencia a guarderías y del número de

hermanos<sup>66,67</sup> y concluyen que cuanto más temprano entra un niño en la guardería (<1 año), o si la familia es numerosa, aumenta el número de cuadros catarrales, pero parece que eso protegería de presentar asma en el futuro.

El grupo de Von Mutius observó en Alemania que cuanto más al este residían los ciudadanos (por ejemplo, la antigua República Democrática Alemana), menor prevalencia de asma había, incluso si en teoría el nivel socioeconómico era menor y la contaminación era mayor. Se postuló que en estos países los niños eran enviados más precozmente a guarderías; y cuanto más temprano iban, se observaban menos sensibilizaciones alérgicas (test cutáneos positivos), menor asma e igual o mayor número de bronquitis.

Por otro lado, también se vio que cuantas más rinitis el primer año de vida (más de dos), menor prevalencia de sibilancias a los 7 años<sup>44,47,48,54,55,64,66,68-70</sup>.

### **1.2.3.- Evolución a largo plazo**

Si pudiéramos predecir qué lactante con sibilantes en los primeros años de vida, tiene riesgo de tener asma persistente en el futuro, tendríamos la posibilidad de mejorar el tratamiento de estos niños, y así reducir la morbimortalidad del asma a largo plazo.

Se han realizado estudios con seguimiento a largo plazo como los de Melbourne, Australia<sup>71</sup>, en los que siguen a niños con asma hasta la edad adulta y observaron que la evolución de la enfermedad asmática no variaba. Por otro lado el grupo de F. Martínez, en la cohorte de Tucson, clasificó a los niños según el tipo de episodios de sibilancias durante los primeros tres años en cuatro grupos<sup>1,72</sup>: sin sibilancias, con sibilantes transitorios (cedían antes de los seis años), con sibilantes tardíos (no a los 3 años, pero sí después), con sibilantes persistentes (precoces, que persistían más adelante). Estudios posteriores han llevado a concluir que aunque el momento de aparición es importante, más importante para valorar el riesgo, la inmunopatogenia y el pronóstico es la diferenciación entre sibilantes no atópicos y atópicos<sup>3</sup>.

En un estudio longitudinal australiano, se estudió la función pulmonar de estos niños previa al cuadro de sibilantes y la misma a los 6 años, observando que al principio no habían diferencias entre los niños con sibilantes persistentes y el grupo control, pero a los 6 años existía un detrimento de función pulmonar en el primer grupo. Así concluyeron que probablemente el deterioro en el asma se daría entre el año y los seis años de edad y que éste persistiría hasta la vida adulta<sup>56</sup>.

Por otro lado con la cohorte de Tucson, se elaboró un algoritmo o Índice para Predecir el Asma (IPA)<sup>73,74</sup>, que combina criterios clínicos y de laboratorio, que se resumen en la tabla 3.

El IPA será positivo si un niño tiene más de tres episodios de sibilancias durante sus 3 primeros años (índice estricto), y 1 criterio mayor o 2 de los 3 criterios menores.

El resultado obtenido fue de un 97% de especificidad (probabilidad de que los niños sin asma hubiesen tenido un IPA negativo en la 1ª infancia).

El valor predictivo (VP) positivo fue del 77% (probabilidad de que los pequeños con IPA + tengan asma en la edad escolar). Por tanto no detectaba un 23% de los sibilantes persistentes.

El VPN era del 69% (probabilidad de que los lactantes con IPA negativo, no tengan asma en la edad escolar) Por tanto no detectó a un 30% de los sibilantes transitorios.

**Tabla 3.** Algoritmo para definir el riesgo de asma<sup>73</sup>

---

**CRITERIOS mayores:**

1. Antecedentes paternos de asma.
2. Dermatitis atópica.

*CRITERIOS menores:*

1. Rinorrea no explicable por Catarros. Rinitis alérgica
  2. Sibilancias no asociadas a catarros de vías altas
  3. Eosinofilia ( $\geq 5\%$ )
-

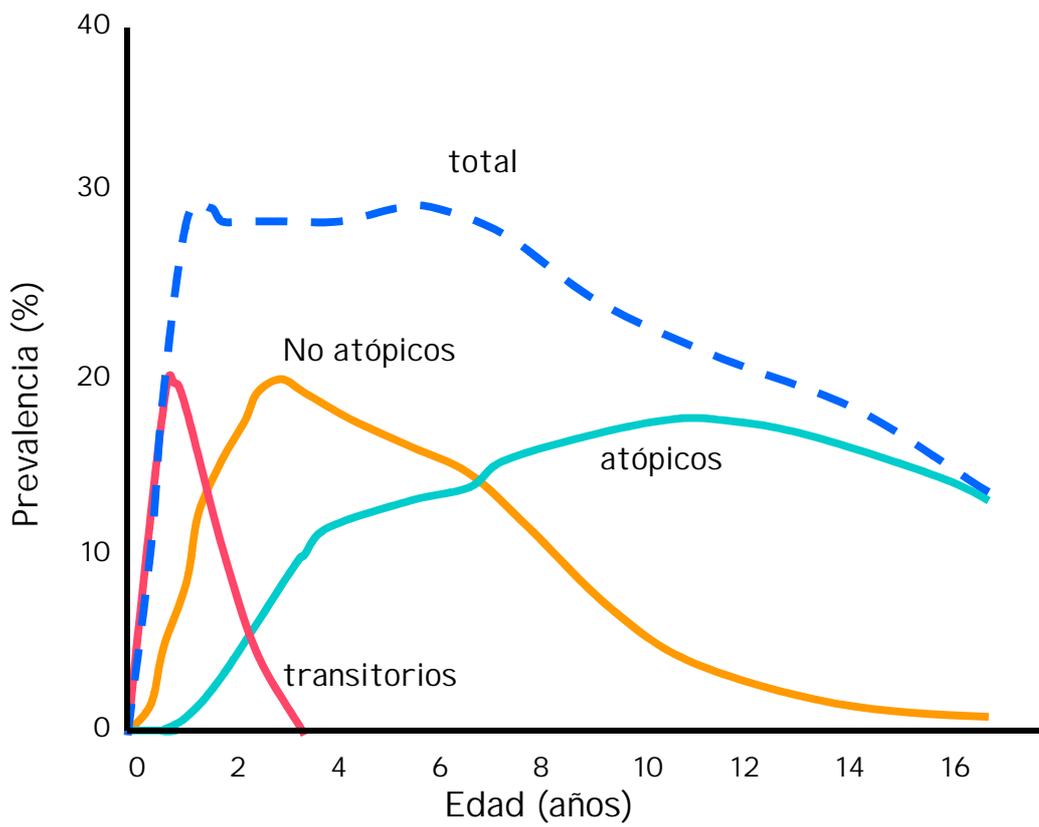
Hay otro estudio en el que los autores intentaron crear un índice para predecir asma. Clough y cols.<sup>75</sup> seleccionaron un grupo de niños < 36 meses con al menos el padre o la madre atópicos y estudiaron en ellos múltiples variables. Concluyeron que la probabilidad de presentar sibilantes persistentes era muy superior si ambos padres eran atópicos y si el niño era mayor y atópico. El modelo que ofrecía un mayor valor predictivo era la determinación del receptor soluble de la IL-2 valorado junto a la edad de presentación.

Así con los datos de todos estos estudios<sup>1,27,76</sup>, actualmente podemos asumir, que si el niño con sibilantes tiene menos de 2 años de edad, tiene un 60-70% de posibilidades de que estos cuadros se autolimiten con la edad durante los años siguientes, no desarrollando nunca asma.

Si tiene entre 2 y 6 años, entonces hay más probabilidades de que los sibilantes sean inducidos por virus y el niño probablemente deje de tener bronquitis durante la infancia o la adolescencia.

Si el niño es mayor de 6 años, hay una alta probabilidad de que el problema sea realmente una asma atópico verdadero, aunque estudios que llegan a la vida adulta sugieren que al menos en la mitad de estos individuos posiblemente desaparecerá su asma.

La frecuencia relativa de cada grupo de niños con bronquitis sibilante en las diferentes edades se resume en la figura 1<sup>32</sup>, que combina los datos de incidencia de los estudios de Tucson<sup>1</sup> y Perth<sup>1,27</sup>.



**Figura 1.-** Distribución de la prevalencia de bronquitis sibilantes en la infancia<sup>32</sup>.

### 1.3.- INMUNOLOGÍA

La introducción de la broncoscopia flexible y las técnicas modernas para el estudio de la respuesta inmune de los leucocitos han permitido conocer datos acerca de los posibles factores inmunológicos asociados con las bronquitis sibilantes de los niños pequeños.

Describiremos primero la inmunología de los sibilantes no relacionados con la atopia, y a continuación la inmunología de los sibilantes atópicos, para finalmente integrar los avances en estos dos campos para dilucidar las alteraciones que llevarían a presentar bronquitis sibilantes de repetición en el lactante y en el preescolar.

#### 1.3.1.- Inmunología de las bronquitis sibilantes no relacionadas con atopia

Esta es la forma más frecuente de presentación de las bronquitis sibilantes en el niño pequeño, corresponde al 80% de todos los casos. En ella se incluyen los sibilantes transitorios (60%) y los persistentes no atópicos (20%).

En estudios realizados mediante la práctica de lavados broncoalveolares<sup>61,77-79</sup>, se ha observado que estos niños presentan una inflamación crónica de sus vías aéreas y que es distinta de la hallada en niños con sibilantes atópicos del mismo grupo de edad (en los que predominan los eosinófilos y mastocitos). La inflamación crónica de estos pacientes, está caracterizada por incremento de neutrófilos<sup>77-79</sup> o de todos los tipos celulares<sup>79</sup>. No se conoce bien lo que determina esta inflamación crónica, pero parece que incluso en períodos asintomáticos, puede existir en estos niños un estado de activación persistente de los macrófagos alveolares y de los neutrófilos, que liberarían cantidades aumentadas de mediadores proinflamatorios (prostaglandina E2, leucotrienos B4 y E4, ácido 15-hidroxicicosatetraenoico -HETE-, factor de necrosis tumoral -TNF- $\alpha$ -, tromboxano A2 y proteína catiónica eosinofílica -procedente de los neutrófilos-)<sup>79,80</sup>.

Se ha observado recientemente el potencial papel de las alteraciones en la regulación inmune en génesis de los sibilantes no atópicos. Se ha constatado que estos niños presentan una reducción en la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) por los linfocitos Th1 en relación con los niños normales o los niños atópicos de su misma edad<sup>81,82</sup>. Datos preliminares del grupo de Tucson (Tucson Infant Immune Study) sugieren que esta alteración podría estar ya presente a los 3 meses de edad y que la respuesta de IFN- $\gamma$  estaría inversamente relacionada con el desarrollo subsiguiente de

episodios de bronquitis sibilantes durante el primer año de vida, lo que sugeriría una alteración innata de la respuesta inmune<sup>32</sup>.

La reducción de la producción de IFN- $\gamma$  por las células T puede alterar la regulación de la respuesta de los macrófagos a las infecciones víricas, conduciendo a una inflamación crónica de naturaleza neutrofílica, e incrementando la capacidad invasora de los virus y haciendo más difícil su eliminación de los pulmones.

Se desconoce si esta reducción de la producción de IFN- $\gamma$  es primaria o secundaria a alteraciones en otras citoquinas. Así en un estudio reciente de niños hospitalizados por bronquiolitis causadas por VRS, Bont y cols<sup>83</sup> observaron que estos niños no presentaban incrementos de IL-12 ni IFN- $\gamma$  en el momento agudo, pero los que posteriormente tuvieron episodios recurrentes durante el siguiente años, presentaban incrementos de IL-10 en la fase de convalecencia, y el número de recurrencias se correlacionó con los niveles de IL-10. La IL-10 regula a la baja los linfocitos T colaboradores y T citotóxicos, y esto puede explicar al menos parcialmente la reducción de IFN- $\gamma$  en los niños con sibilantes no atópicos.

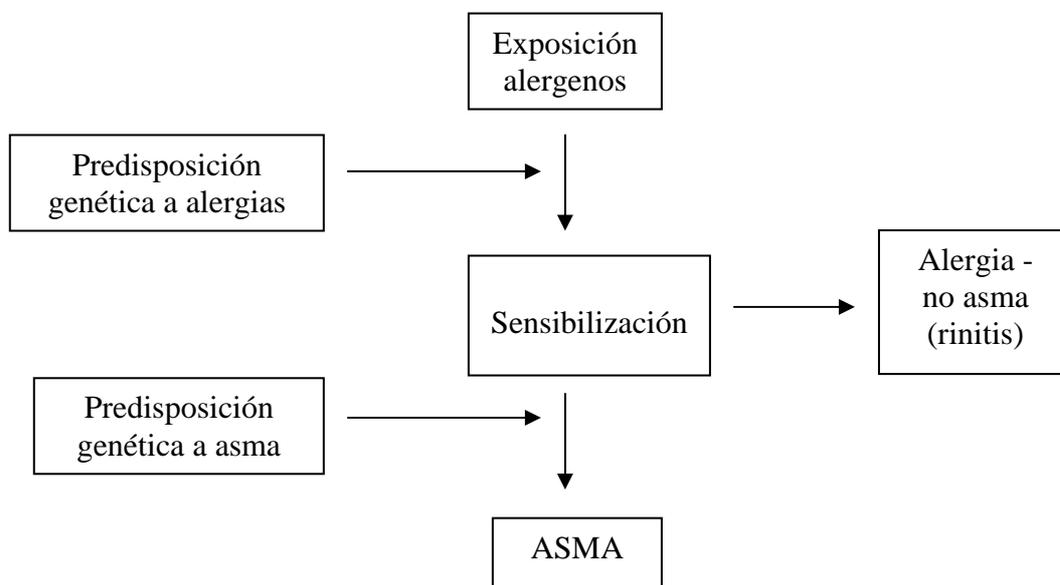
Por otro lado, la IL-10 no tiene sólo efectos sobre las células inmunitarias. Parece que podría actuar también sobre el músculo liso de la vía aérea alterando la regulación del tono de la pared bronquial y aumentando la hiperrespuesta bronquial<sup>84</sup>

Por tanto diferentes mecanismos pueden llevar a episodios de sibilantes no atópicos. En los periodos iniciales de la vida, una exposición mayor a factores que aumenten la respuesta aguda a los virus tales como ciertos alérgenos (ácaros y cucarachas), o productos bacterianos (endotoxinas), puede llevar a una respuesta inmune excesiva, que conlleve una inflamación crónica (de predominio neutrofílico) de la vía aérea, con la aparición de estos sibilantes. También los niños que producen un exceso de IL-10 durante las infecciones por VRS pueden estar predispuestos a las sibilancias recurrentes por el aumento comentado del tono muscular. Sin embargo, como veremos en la parte final de este apartado, el mecanismo principal asociado a los sibilantes no atópicos, parece que es la presencia congénita o adquirida de una respuesta disminuida de IFN- $\gamma$  frente a los virus.

### **1.3.2.- Inmunología de los sibilantes atópicos**

Los sibilantes atópicos solo constituyen en los niños menores de 3 años un 20 % del total, pero como hemos visto, son los que conllevan peor pronóstico a largo plazo, con persistencia de los síntomas hasta la edad adulta en un número elevado de casos.

Hay gran controversia respecto a la etiopatogenia en este grupo. Por definición, el asma atópico es un trastorno en el que los episodios recurrentes de la vía aérea se asocian con evidencia de sensibilización contra los aeroalérgenos locales. La teoría clásica, postulaba que en un paciente genéticamente predispuesto en el que se daba una exposición a un alérgeno determinado, se producía una sensibilización, que clínicamente daría sibilantes (asma) (figura 2), pero investigaciones recientes la han puesto en duda.



**Figura 2.** Teoría tradicional de la asociación entre el desarrollo de atopia y el desarrollo de asma (marcha atópica)<sup>32</sup>.

Es evidente que los alérgenos a que los asmáticos atópicos están sensibilizados actúan como desencadenantes de las crisis de asma, y que la evitación de estos alérgenos conlleva una mejora de los pacientes. Sin embargo, esto no prueba que estos alérgenos sean la causa inicial de la enfermedad.

En primer lugar se ha observado que en niños que desarrollan diferentes patologías alérgicas (asma y rinitis) se sensibilizan a distintos alérgenos. En el estudio de Dunedin, se vio que los niños que acababan presentando síntomas asmáticos presentaban pruebas cutáneas positivas a ácaros y epitelio de animales, mientras los

que sólo desarrollaban rinitis alérgica eran más sensibles a pólenes<sup>76</sup>. Si la teoría “alérgica” fuera correcta, se desconoce porqué unos alergenos serían más “asmogénicos” que otros.

En segundo lugar, y quizás más importante es la evidencia procedente del estudio alemán de Illi y cols.<sup>58</sup>, en el que se constata que la sensibilización a ácaros en los niños pequeños, es distinta si están genéticamente predispuestos, en los que dosis ínfimas son suficientes para sensibilizarlos, que si no lo están (no asmáticos) en los que la sensibilización seguiría a una relación del tipo dosis respuesta y se sensibilizan aquellos que están expuestos a una dosis alta de alergeno.

La ausencia de este tipo de relación dosis respuesta en los niños que desarrollan asma, pone en duda pues la teoría clásica.

En tercer lugar, se ha comprobado que distintos alergenos dan la misma enfermedad, así en lugares húmedos, de costa, el alérgeno principal es el ácaro del polvo, mientras en lugares secos de interior es la alternaria o en algunas zonas metropolitanas es la cucaracha.

Finalmente, si los sibilantes atópicos respondiesen a la relación exposición - sensibilización, la edad a la que ocurre la sensibilización no influiría en el posterior desarrollo de asma y se ha visto en varios estudios que esto no es cierto<sup>34</sup>. Así los niños sensibilizados precozmente, tienen mucha mayor probabilidad de presentar sibilantes persistentes que los sensibilizados de forma tardía, que no sólo no presentan mayor riesgo de asma, sino que además tienen muchas más posibilidades de remisión y desaparición de la sensibilización, probablemente por un mecanismo de tolerancia inmunológica.

Así en contraposición con la teoría previa para intentar explicar los sibilantes atópicos, se está desarrollando una nueva teoría, que se basa en que los individuos susceptibles de desarrollar asma presenta una alteración en su sistema inmune, que les predispone a producir respuestas mediadas por IgE ante muchos alergenos diferentes a los que se enfrentan especialmente durante los primeras épocas de su vida.

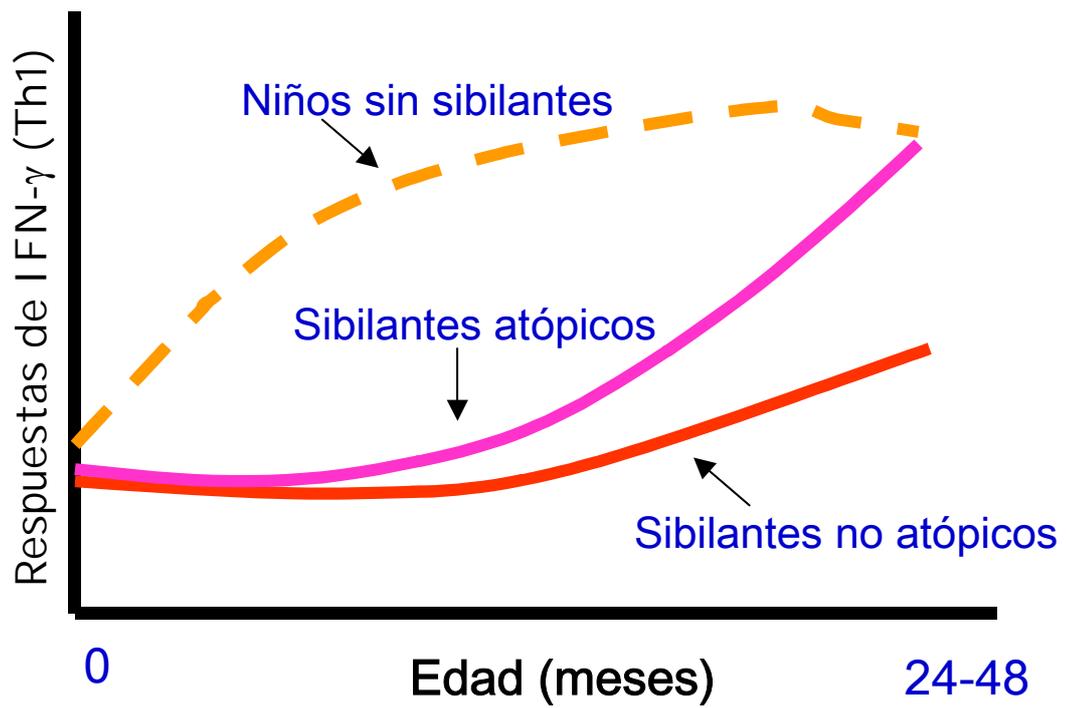
La naturaleza de esta alteración en el desarrollo inmune aún esta en discusión, sin embargo parece que sería de gran importancia la maduración de la capacidad de producir IFN- $\gamma$  durante los primeros años de la vida.

Los recién nacidos presentan característicamente una respuesta celular inmune global disminuida. No obstante, la producción de citoquinas de tipo Th-1 y especialmente de IFN- $\gamma$ <sup>85</sup> está más deprimida, por lo que en los recién nacidos existe un cierto predominio de la respuesta Th-2. El equilibrio Th1/Th2 está regulado por el desarrollo y de forma normal se alcanza a los 3 años de edad.

En las personas que posteriormente se sensibilizarán a alérgenos y desarrollarán asma, existe un retraso en la maduración de las respuestas de IFN- $\gamma$  durante el primer y el segundo año de vida, aunque a los 3 años de edad alcanzan los niveles de los niños normales<sup>86</sup> (figura 3). Este retraso en la maduración del IFN- $\gamma$  ocurre a menudo varios años antes que el desarrollo de la sensibilización a neumoalérgenos. De esta manera, los factores inmunes implicados en la producción de las bronquitis sibilantes en los primeros años de vida en este grupo de niños con sibilantes atópicos no son principalmente una respuesta IgE, sino una respuesta disminuida del IFN- $\gamma$  a los virus, de forma similar a lo que ocurre en los niños con sibilantes no atópicos.

Por otro lado, existen también evidencias de que los niños pequeños con sibilantes atópicos tienen una producción aumentada de IL-4 y una inflamación de tipo eosinofílico, como los niños mayores y adultos con asma<sup>61,81</sup>. Parece que en ellos existiría además la susceptibilidad genética para desarrollar una respuesta de tipo Th2. El IFN- $\gamma$  tiene un potente efecto inhibitorio de las respuestas Th-2 o sea de la activación de linfocitos B y producción de IgE, por lo que el retraso en la maduración de las respuestas del IFN- $\gamma$ , facilitaría en estos niños susceptibles genéticamente el desarrollo de respuestas Th-2 frente a los antígenos a los que se exponen en los primeros años de vida.

Además de influir en el desarrollo de sensibilización atópica, la facilitación de respuestas Th-2 puede tener un efecto sobre la vía aérea, ya que varias citoquinas Th-2 tales como la IL-4 y sobre todo la IL-13 actúan como factores de crecimiento sobre los fibroblastos y las células musculares lisas<sup>87,88</sup>. Por tanto, si la exposición a antígenos durante los primeros años de vida desencadena una respuesta Th-2 en estos niños predispuestos, un efecto desfavorable de ello puede ser una alteración en el desarrollo estructural normal de la vía aérea. Esta podría ser una de las explicaciones por la que estos niños nacen con una vía aérea normal, pero presentan una función pulmonar disminuida y una hiperrespuesta bronquial a los 6 años de edad.



**Figura 3.** Asociación entre las respuestas de interferón – gamma (IFN- $\gamma$ ) y los sibilantes atópicos y no atópicos durante los primeros años de vida<sup>32</sup>.

Así pues, para finalizar vemos que en los últimos 5 años, se han producido importantes avances en el conocimiento de las posibles bases de las sibilancias en los niños pequeños.

Los factores genéticos y ambientales (exposición incrementada a productos microbianos, endotoxinas, etc.) que determinan al maduración de las respuestas del IFN- $\gamma$  en los primeros años de la vida juegan un papel importante en el desarrollo de las formas atópicas y no atópicas de sibilantes.

Por ejemplo, la exposición a otros niños en guarderías, o a hermanos mayores, es un factor de riesgo para el desarrollo de sibilantes transitorios, pero disminuye la probabilidad de desarrollar sibilantes atópicos en la edad escolar<sup>47</sup>.

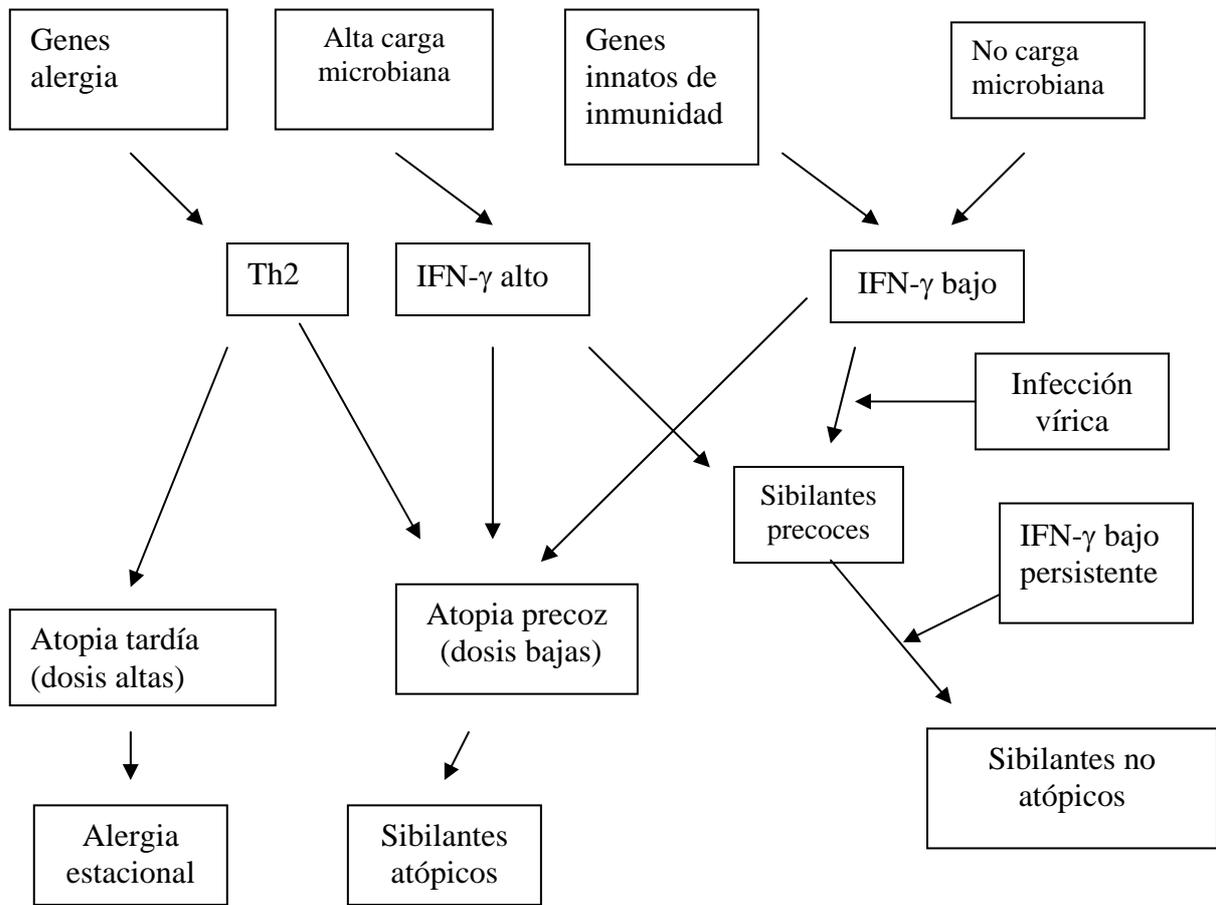
En cambio, la exposición en los primeros años de la vida a animales en granjas, o a gatos y perros disminuye tanto el riesgo de sibilantes atópicos, como de no atópicos<sup>89, 90</sup>.

Estas exposiciones tienen como factor común un aumento de la exposición a productos bacterianos. El determinante más importante de la maduración de las respuestas de IFN- $\gamma$  es la exposición a productos microbianos<sup>91</sup>. En el caso del contacto estrecho con los animales, existiría una carga importante de endotoxinas, que induciría una maduración rápida de las respuestas del IFN- $\gamma$ . En el caso de la guardería y las familias numerosas el estímulo para la maduración sería más lento, y la mayor exposición a los virus junto a un aumento de la susceptibilidad a ellos por la respuesta baja de IFN- $\gamma$  favorecería la presentación de los sibilantes no atópicos.

En aquellos niños en los que no hay predisposición genética para alergias, los sibilantes no atópicos pueden permanecer mientras exista el déficit de IFN- $\gamma$ , generalmente hasta la edad escolar.

Si el niño presenta predisposición genética, desarrollará más probablemente respuestas Th2, con lo que los bajos niveles de IFN- $\gamma$  conllevarán el desarrollo de múltiples sensibilizaciones ante dosis muy bajas de alergen.

Las interacciones genéticas y ambientales que originarían las diferentes formas de sibilancias quedan resumidas en la figura 4 tomada de Martinez FD y Godfrey S<sup>32</sup>.



**Figura 4.** Interacción entre los factores de riesgo alérgico y los factores de riesgo de asma en el desarrollo de las distintas formas de sibilantes y de alergia respiratoria durante los primeros años de vida<sup>32</sup>.

## **1.4.- FUNCIÓN PULMONAR**

Los sibilantes constituyen un signo inespecífico asociados a una restricción del flujo aéreo a través de unas vías aéreas estrechas, y se cree que son generados por la presencia de un flujo turbulento, que causa oscilación de la pared bronquial<sup>92</sup>.

### **1.4.1.- Características de la vía aérea del lactante y del preescolar**

Las características fisiológicas de la vía aérea a esta edad nos permiten entender la clínica que presentan estos niños<sup>93</sup>:

- Cuanto menor es la edad del niño, menor es el radio de la vía aérea y por tanto mayor la resistencia al flujo aéreo.
- La capacidad retráctil de la vía aérea del niño es inferior a la del adulto, debido a que presenta un intersticio pobre en colágeno y elastina.
- Las vías aéreas son menos rígidas por un menor desarrollo cartilaginoso y muscular. En situaciones de obstrucción bronquial, cuanto mayor es el trabajo respiratorio más grande es el segmento bronquial colapsado.
- Las glándulas mucosas son más numerosas, existe mayor secreción de moco y los mecanismos defensivos del árbol bronquial, como la tos y la expectoración están mal desarrollados o son insuficientes.
- La musculatura torácica es más débil, la parrilla costal menos firme, la presión abdominal está aumentada y la postura en decúbito dificulta la mecánica diafragmática.

### **1.4.2.- Función respiratoria**

En el laboratorio de función pulmonar distinguimos dos grupos de niños en función de la edad a la que presentan las sibilancias.

1) Niño colaborador (a partir de 5-6 años). Ante la sospecha de diagnóstico de asma en este grupo de edad, se puede realizar una espirometría basal<sup>94</sup>, una prueba broncodilatadora<sup>95,96</sup> o pruebas de hiperrespuesta bronquial utilizando como variable repuesta el descenso del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>) (tabla 4).

2) Lactantes y niños no colaboradores: Corresponde al grupo de nuestro estudio.

Para determinar la función pulmonar en este grupo, son necesarias pruebas más complejas que requieren sedación del paciente, como la pletismografía corporal o la técnica de compresión toracoabdominal mediante chaquetilla hinchable<sup>97</sup> o resistencias por interrupción (Rint)<sup>98</sup> u oscilometría de impulsos, con las que se puede establecer el diagnóstico de asma o de reversibilidad bronquial (tabla 5).

**Tabla 4.** Diagnóstico funcional de asma en niños mayores de 5 años<sup>99</sup>

---

Prueba broncodilatadora: incremento  $FEV_1 \geq 9\%$

Variabilidad del PEF  $\geq 20\%$

Provocación con metacolina: descenso del  $FEV_1 \geq 20\%$

Prueba de esfuerzo: descenso del  $FEV_1 \geq 15\%$

Provocación con suero salino hipertónico: descenso del  $FEV_1 \geq 15\%$

---

FEV<sub>1</sub>: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo

PEF: Pico flujo espiratorio

**Tabla 5.** Diagnóstico funcional de asma en niños no colaboradores, mediante prueba broncodilatadora<sup>99</sup>.

---

<b>Pletismografía</b>	Incremento $sG_{aw} \geq 25\%$
<b>Oscilometría de impulsos</b>	Descenso de $R_{sr5} \geq 30\%$ Incremento $X_{rs5} \geq 40\%$
<b>Resistencias por oclusión</b>	descenso $R_{int} \geq 25\%$
<b>Compresión tóracoabdominal</b>	Incremento $FEV_{0,5} \geq 10\%$ Incremento $FEF_{25-75\%} \geq 18\%$

---

$sG_{aw}$ : Conductancia específica

$R_{sr}$ : Resistencia a 5 Hz

$X_{rs}$ : Reactancia a 5 Hz

$R_{int}$ : Resistencias por oclusión (por interrupción)

$FEV_{0,5}$ : Flujo espiratorio forzado en el primer medio segundo

$FEF_{25-75\%}$ : Flujo espiratorio forzado entre el 25 y el 75% de la capacidad vital forzada

A continuación, se realiza una breve revisión de las diversas técnicas empleadas hasta hoy en niños no colaboradores para el estudio de la función pulmonar. Se han señalado sus utilidades, su interés y sus posibles inconvenientes.

#### **1.4.2.1.- El asa flujo-volumen a respiración corriente**

Es una técnica que determina el volumen corriente o analiza el asa flujo – volumen durante la respiración normal y reposada, usando una mascarilla y un neumotacógrafo.

Su interés radica en que no precisa colaboración ni sedación, la duración del procedimiento es breve de 30 segundos a 4 minutos, no precisa personal específicamente cualificado y solo precisa a nivel técnico: mascarilla facial, neumotacógrafo y ordenador para procesar los datos.

Se han publicado diversos artículos estableciendo valores normales, pero en algunos estudios se ha demostrado que carece de repetibilidad y la variabilidad intra sujeto en el grupo de niños pequeños es amplia. Por otro lado en las pruebas de provocación parece que el índice para determinar la positividad de la prueba, sería insensible si lo comparamos con el Vmax CRF de la compresión toracoabdominal<sup>100,101</sup>.

#### **1.4.2.2.- Pletismografía corporal**

Esta técnica permite:

- Determinar simultáneamente la capacidad residual funcional, la resistencia de las vías aéreas ( $R_{aw}$ = resistencia al flujo aéreo medido en el pulmón) y la conductancia de éstas ( $1/R_{aw}$ ).
- Medición de otros volúmenes pulmonares además de la capacidad residual funcional, para distinguir un proceso restrictivo o obstructivo (sólo posible en los niños colaboradores).
- Determinar la respuesta a broncodilatadores mediante el cambio de la resistencia.
- Estudiar la hiperrespuesta bronquial mediante la variación de la resistencia.

Precisa un pletismógrafo, que es una gran caja hermética cerrada donde el paciente se coloca durante el estudio, respirando mediante una mascarilla conectada a una válvula para interrumpir el flujo del aire y a un neumotacógrafo para la medición del flujo aéreo. Las señales se procesan mediante un ordenador.

Se basa en la ley de Boyle que relaciona volumen y presión en un recipiente cerrado.

Se han elaborado tablas de normalidad en niños y un estudio de 1999 ha propuesto valores de referencia en niños/as de 4 a 19 años.

Inconvenientes: Necesita sedación del paciente, personal entrenado en la realización de la técnica, y un pletismógrafo – material caro que no está al alcance de todas las unidades de neumología pediátrica<sup>102,103</sup>.

#### **1.4.2.3.- Resistencias por oscilometría de impulsos**

Esta técnica permite:

- Medición de la resistencia total respiratoria (Rrs) y de la reactancia (Xrs) de forma no invasora durante la respiración espontánea.
- Estudio de la hiperrespuesta bronquial.
- Estudiar la respuesta a los broncodilatadores.

Consiste en la aplicación de una oscilación de presión de pequeña amplitud en la entrada de la vía aérea mediante un altavoz y una cámara, mientras el paciente respira tranquilamente. La presión y el flujo en la boca son medidos respectivamente y de forma continua mediante un transductor de presión y un neumotacógrafo de presión diferencial. Ambas señales se acondicionan, filtran e introducen en el ordenador para el cálculo de la Rrs.

Inconvenientes: Precisa un equipamiento caro, tiempo y personal entrenado. Tiene problemas sobre todo en niños pequeños en detectar la broncoprovocación inducida debido a la distorsión de la señal y a los cambios asociados en el volumen pulmonar.

#### **1.4.2.4.- Resistencias por interrupción**

Esta técnica permite :

- Medición de las resistencias por interrupción (Rint).
- Estudio de la hiperrespuesta bronquial.
- Estudiar la respuesta a los broncodilatadores.

En los últimos años, se ha extendido mucho, dado que los avances técnicos han permitido fabricar sistemas más sencillos, precisos y baratos

Consiste en hacer respirar al paciente a volumen corriente a través de un neumotacógrafo con un oclisor que se dispara directamente al inicio de una espiración. Durante la oclusión se produce una relajación de los músculos respiratorios (reflejo de Herin Breuer) y se equilibra la presión en la boca con la alveolar; el flujo que se produce al abrir el oclisor se debe a la espiración pasiva. El sistema mide la presión en la boca durante la oclusión y el flujo tras liberar ésta.

La técnica es sencilla y la mayoría de niños sobre los 2 años la realizan bien.

Existen diversas publicaciones sobre los valores de referencia para la Rint en la población infantil normal y se observa que la Rint se correlaciona inversamente con la

talla y la edad de los niños reflejando el aumento de calibre de las vías aéreas con el crecimiento.

Inconvenientes: Precisa mascarilla y sedación en los < 2 años. Presenta un problema técnico, ya que si la interrupción es demasiado corta, no se llega al equilibrio entre presión alveolar y bucal con lo que obtendríamos una presión y una resistencia por debajo de lo real; esto sucede especialmente en niños obstruidos.

Por otro lado, infraestima el grado de broncoconstricción durante una prueba de metacolina, sobre todo en los más pequeños.

Así mismo, parece que presenta más variación debida al azar entre observadores

#### **1.4.2.5.- *Compresión toracoabdominal rápida***

Su importancia radica en que es capaz de cuantificar la función espiratoria y su patrón patológico característico, el obstructivo, que es el más frecuente e importante a esta edad.

Es una técnica que imita la espirometría de los niños mayores. Se ha utilizado en el estudio de la función pulmonar en niños de 0 a 2 años.

Consiste en sedar al niño con hidrato de cloral, y una vez dormido, en la camilla de exploración, se le coloca una chaquetilla neumática y se aplica a la cara una mascarilla almohadillada que selle bien; ésta va unida a un neumotacógrafo que mide el flujo, y los datos se registran mediante un sistema informático. La chaquetilla se infla a diferentes presiones para producir la espiración. Existen dos variantes la realizada a volumen corriente y la que se realiza con hiperinsuflación previa.

Cuantifica el flujo máximo a nivel de la capacidad residual funcional ( $V_{max}$  FRC), valor muy sensible para detectar la obstrucción, que correspondería al mesoflujo de una espirometría normal.

Inconvenientes: requiere sedación importante por lo que no puede utilizarse en niños con hipoxia basal ni con reflujo gastroesofágico. Dada la hiperpresión también se desaconseja en niños afectados de hernias. Aunque están suficientemente estandarizadas, aún no forman parte de la evaluación sistemática de lactantes con enfermedades respiratorias debido principalmente a la carestía de los aparatos y al tiempo y dedicación que requieren, junto al mayor problema, la necesidad de sedación<sup>104</sup>.

#### **1.4.2.6.- *Presión transcutánea de oxígeno (PtcO<sub>2</sub>)***

Se utiliza en lactantes y niños pequeños dado que es un método simple y no invasor. La correlación entre la PtcO<sub>2</sub> y la gasometría arterial está bien documentada en niños con asma aguda.

Consiste en la colocación de un electrodo sobre la piel del paciente, que detecta la  $P_{tcO_2}$ . La disminución de este parámetro se cree es debida a la alteración de la relación ventilación perfusión.

Inconvenientes: Requiere una calibración meticulosa y prolongada (>20 minutos). Es útil para valorar la broncoconstricción, pero no para determinar la broncodilatación. Posiblemente se afecta con la tos y los cambios en el patrón respiratorio. Parece que sólo es fiable en los estudios sobre niños con sibilantes, pero no en niños normales<sup>105</sup>.

## 2.- HIPERRESPUESTA BRONQUIAL

### 2.1. - DEFINICIÓN

Se denomina hiperrespuesta bronquial a la respuesta exagerada de los bronquios de algunos individuos frente a una gran variedad de estímulos, y se manifiesta por el cierre estas estructuras frente a la salida o la entrada del aire<sup>106</sup>.

La hiperrespuesta bronquial no es una enfermedad ni tampoco un síndrome clínico, a pesar de que muchas veces aparece como una etiqueta diagnóstica en solicitudes o informes médicos.

La hiperrespuesta bronquial es una de las características que acompaña al asma formando parte de la tríada diagnóstica de esta enfermedad<sup>99,107</sup>. Más del 80% de los pacientes con historia de asma y el 98-100% de los que presentan asma sintomática, presentan hiperrespuesta bronquial. No obstante, la presencia de hiperrespuesta bronquial no es patognomónica ni exclusiva del asma, por lo que ni su simple demostración ni su ausencia permiten asegurar el diagnóstico<sup>92,108</sup>. Se puede observar un grado, en general leve, de hiperrespuesta bronquial en otras patologías respiratorias como: fibrosis quística, bronquiectasias, displasia broncopulmonar, rinitis alérgica, niños atópicos, hermanos de asmáticos e infecciones víricas<sup>108</sup>.

Por otro lado, se ha comprobado también en distintos estudios epidemiológicos, que hay un porcentaje de niños normales asintomáticos que también presentan hiperrespuesta bronquial<sup>109</sup>.

Existe una respuesta bronquial normal en la que las vías aéreas se contraen en respuesta a estímulos físicos o químicos. Esta respuesta normal probablemente tiene una utilidad fisiológica en el sentido de mantener la relación ventilación – perfusión y en el de proteger al parénquima pulmonar de los efectos nocivos de los inhalantes tóxicos. Esta respuesta de las vías aéreas sigue una distribución normal continua. No hay una delimitación concreta entre la respuesta normal y la hiperrespuesta; la distinción es de alguna manera arbitraria y siempre existe una zona gris intermedia<sup>108</sup>.

#### **¿Qué entendemos por hiperrespuesta bronquial?**

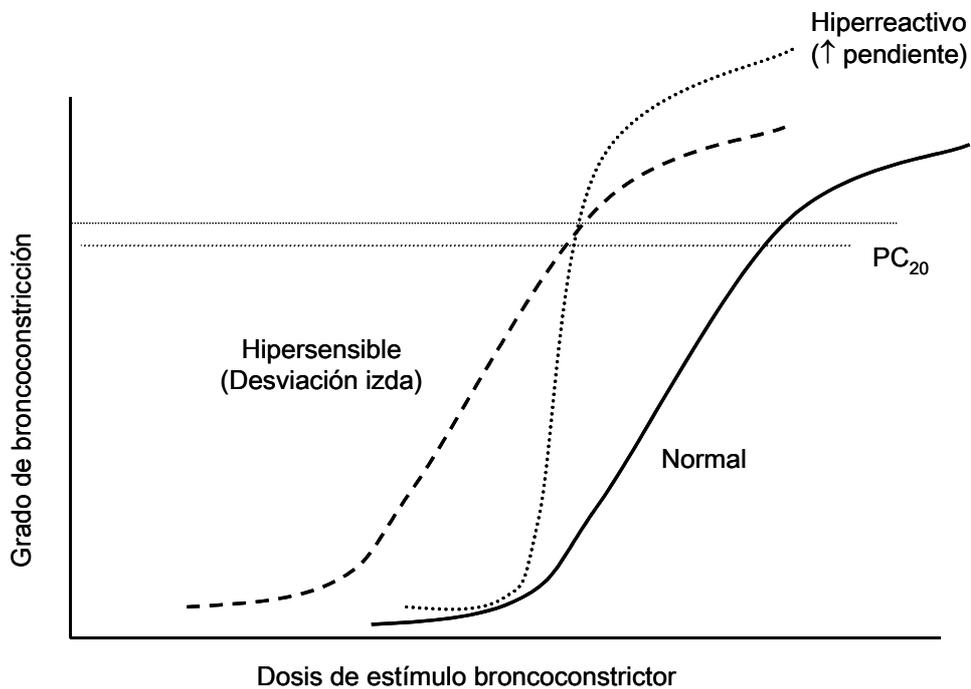
Entendemos por hiperrespuesta bronquial, un aumento en la facilidad y en el grado de obstrucción de las vías aéreas en respuesta a estímulos broncoconstrictores *in vivo*. Es un estado de sensibilidad anormal del árbol traqueo bronquial frente a una gran diversidad de estímulos como son los medicamentos agonistas colinérgicos, la sustancias químicas irritantes, la osmolaridad y el aire frío. Clínicamente se refiere a la reacción de algunos pacientes con una obstrucción bronquial frente a estímulos de

poca intensidad que en principio no provocaría reacción alguna en la población sana<sup>109-111</sup>.

La medición del grado de hiperrespuesta bronquial se realiza de forma objetiva; se practica una prueba de provocación, generalmente mediante el método de dosis - respuesta, exponiendo al sujeto a dosis crecientes de un estímulo broncoconstrictor, mientras se mide un índice de función pulmonar. Como resultado de la prueba se obtiene una curva dosis – respuesta en la que se pueden describir 3 características: la posición (que mide la *sensibilidad*), la pendiente (que mide la *reactividad*) y la meseta (que mide la *respuesta máxima*)<sup>112</sup> (figura 5).

De acuerdo con ello, se emplea la siguiente terminología:

- *Hiperrespuesta bronquial*, o de las vías aéreas: es la descripción general del fenómeno.
- *Hipersensibilidad bronquial*: se refiere a una desviación a la izquierda de la curva.
- *Hiperreactividad bronquial*: es el aumento de la pendiente de la curva dosis – respuesta. Este término se usa con frecuencia de modo inadecuado, refiriéndose a todo el fenómeno o a la hipersensibilidad bronquial.
- *Estrechamiento excesivo de las vías aéreas*: se refiere a un aumento en la respuesta máxima, que a menudo conduce a un nivel de meseta no cuantificable.



**Figura 5.** La hiperrespuesta bronquial definida como la dosis que origina una caída del 20% en el  $FEV_1$  ( $PC_{20}$ ) puede ser inducida por hipersensibilidad de las vías aéreas (desviación a la izquierda de la curva dosis respuesta) o por hiperreactividad de la vías aéreas (mayor pendiente de la curva dosis respuesta). Como se ve en la figura cualquiera de estos dos mecanismos puede conducir a un mismo grado de hiperrespuesta.

## **2.2.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL**

En los últimos años, se han publicado múltiples estudios epidemiológicos importantes respecto al asma y a la hiperrespuesta bronquial <sup>14,34,113</sup>

Se han aplicado diferentes métodos para estudiar la hiperrespuesta bronquial, pero todos ellos indican que la hiperrespuesta bronquial presenta una distribución unimodal, sin diferenciación exacta entre personas sintomáticas y asintomáticas, y sin un punto de corte determinado que defina la respuesta bronquial exagerada, cosa que hace que éste sea algo arbitrario.

Por otro lado, como los métodos utilizados en los distintos estudios, han sido diferentes, muchas veces los resultados de éstos no son estrictamente comparables.

### **2.2.1.- Asociación con asma**

Podemos diferenciar dos grupos de edad:

#### a) En el lactante y preescolar

A esta edad hay muy pocos trabajos, ya que las pruebas de broncoprovocación en los niños no colaboradores son más complejas, consumen más tiempo y generalmente requieren sedación. Hay algún trabajo en hijos de padres atópicos en los que no se observa relación entre la presencia de clínica respiratoria y hiperrespuesta bronquial <sup>5,27,114</sup>

En cambio hay algún estudio (en niños de 2 a 5 años), en los que la tasa de hiperrespuesta bronquial es francamente mayor entre el grupo asmático que entre el control <sup>115</sup>.

Parece, según estos estudios, que la hiperrespuesta bronquial en los primeros meses de vida, no se asocia necesariamente con sibilancias en la infancia y en los lactantes con bronquiolitis la hiperrespuesta bronquial sería transitoria durante la infección vírica. Por otro lado, la hiperrespuesta bronquial detectada en el primer mes de vida, antes de presentar problemas respiratorios, sí podría ser predictiva de hiperrespuesta bronquial y asma a los 6 años de edad <sup>56</sup>.

#### b) En el niño mayor y el adulto

No hay una relación totalmente directa en cuanto al asma y la hiperrespuesta bronquial. Se ha visto que un test de metacolina aislado, tiene un valor predictivo positivo (número de asmáticos con una prueba positiva / número total de personas con una prueba positiva) mediano (26%), mientras

que tiene un valor predictivo negativo para asma (número de personas normales con una prueba negativa /total de personas con una prueba negativa) elevado (86%)<sup>116</sup>.

En varios estudios poblacionales (de los grupos de Tucson y de Von Mutius), en niños entre 6 y 12 años de edad, la prevalencia de hiperrespuesta bronquial osciló entre 12,8 y 23%. En estos trabajos entre un 34 y 55% de los niños que presentaban hiperrespuesta bronquial se hallaban asintomáticos sin presentar síntomas de asma; este dato es similar al hallado en adultos<sup>117</sup>. Sin embargo, como grupo los adultos asmáticos y los escolares, sí presentan mayor grado de hiperrespuesta bronquial que el resto de la población.

Esta posible discrepancia entre hiperrespuesta bronquial y asma, sugiere que la patogenia de los sibilantes en la infancia es multifactorial con diferentes asociaciones entre hiperrespuesta bronquial y atopia.

### **2.2.2.- Relación con atopia**

Hay múltiples trabajos que relacionan la hiperrespuesta bronquial con atopia. Así, se observa que la hiperrespuesta bronquial aumenta en época polínica y disminuye al evitar dicha exposición en individuos susceptibles<sup>118</sup>. Lo mismo sucede con la exposición experimental a alérgenos.

Algunos estudios longitudinales como los de Australia y Nueva Zelanda, también sugieren relación entre atopia y hiperrespuesta bronquial incluso en individuos asintomáticos<sup>71</sup>

Esta relación es mayor en niños escolares y adultos jóvenes, luego disminuye con la edad. La evidencia es limitada en este aspecto en los niños pequeños.

Resumiendo, en estudios poblacionales de individuos mayores de 7 años se observa una intensa relación entre atopia y hiperrespuesta bronquial (incluso en asintomáticos), pero también hay una subpoblación de niños sibilantes o ex sibilantes en los que la hiperrespuesta bronquial es independiente de atopia.

### **2.2.3.- Hiperrespuesta bronquial y otras patologías**

Hay múltiples patologías inflamatorias y relacionadas con el desarrollo que pueden cursar con hiperrespuesta bronquial, como por ejemplo: fibrosis quística, bronquiectasias, crup, bronquitis crónica, prematuridad.

Parece que para distinguir estas patologías del asma serían más útiles las pruebas de broncoprovocación con estímulos indirectos, como el ejercicio o la adenosina, que con estímulos directos como la metacolina<sup>119</sup>. Así mismo, la determinación de la función pulmonar basal sería más importante en estas patologías que en la caracterización del asma.

#### **2.2.4.- Hiperreactividad bronquial y edad**

LeSouef y otros autores defienden que es muy difícil comparar valores crudos de hiperrespuesta bronquial en diferentes grupos de edad<sup>4,120</sup>.

Parece que la hiperrespuesta bronquial decrece con la edad pues lactantes<sup>121</sup> aparentemente normales responden a la histamina, mientras que la dosis del agente inhalado necesaria para producir una broncoconstricción se incrementa con la edad. Burrows y cols<sup>53</sup> observaron una prevalencia de hiperrespuesta bronquial en niños y niñas de 9 años del 30% y 22% respectivamente, que disminuía con la edad, siendo del 14% en ambos sexos a los 15 años de edad. Este descenso parece estar relacionado con la pérdida de hiperrespuesta bronquial por los niños no atópicos. En su estudio existió una relación entre la hiperrespuesta bronquial y los niveles de IgE, de forma que, con cifras bajas de IgE, existía una mayor probabilidad de que la hiperrespuesta bronquial desapareciera al crecer. También observaron una correlación entre el grado de hiperrespuesta bronquial, la presencia de síntomas y la intensidad de la obstrucción bronquial basal.

También Mochizuki en sus estudios (1995-2001) observó un descenso de la prevalencia de hiperrespuesta bronquial con la edad, así como diferencia entre ambos sexos<sup>45,122</sup>.

Sin embargo, Le Souef en otros estudios, defiende que la dosis inhalada por un niño es mayor que la inhalada por un adulto y por tanto si aplicamos la dosis corregida según el tamaño no existiría realmente ese descenso de hiperrespuesta bronquial con edad<sup>123,124</sup>.

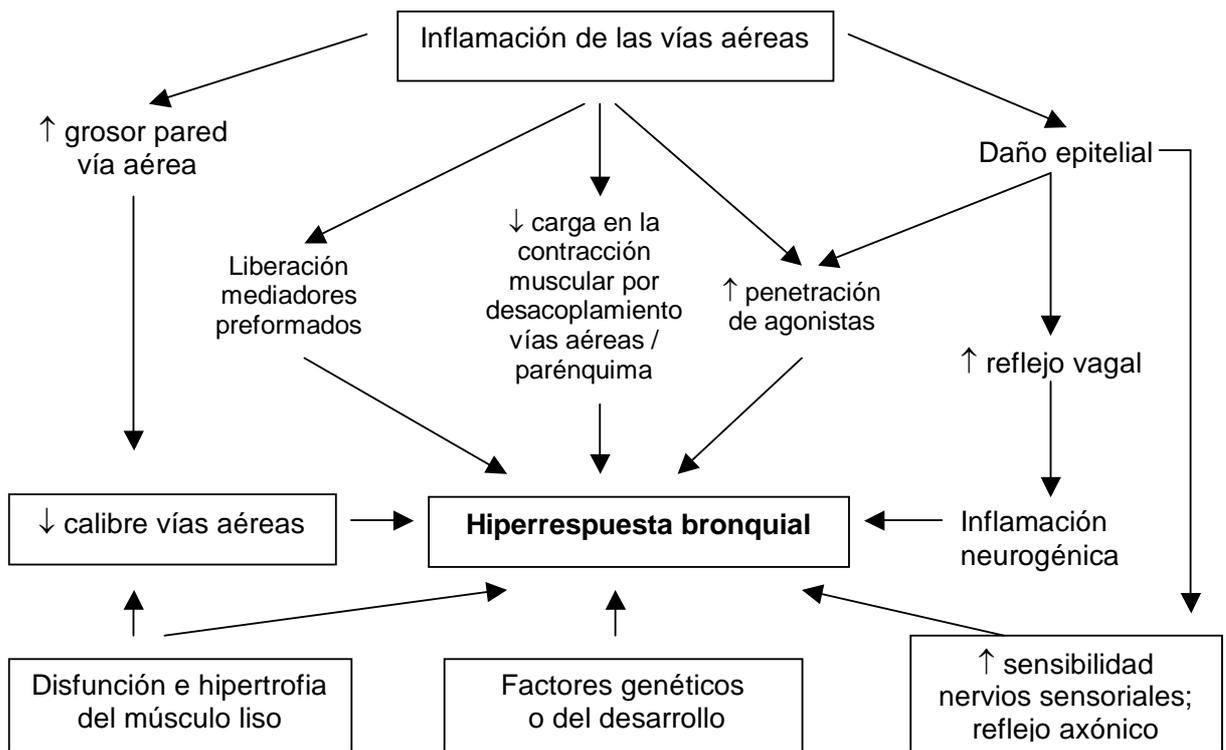
Hay otro factor que complica la cuestión; en el preescolar frecuentemente la inhalación se hace a través de mascarilla (por vía nasal), y en los mayores se hace por vía oral, y se ha comprobado que en un mismo grupo de niños el depósito es mayor cuando la inhalación se hace vía oral.

Así pues hay múltiples estudios con resultados aparentemente contradictorios al respecto de la relación edad – hiperrespuesta bronquial, probablemente porque hay muchas variables involucradas.

El análisis y seguimiento de la cohorte de Tucson, como vimos en el capítulo previo, ha proporcionado datos muy importantes para entender la historia del asma y de los sibilantes en los niños<sup>125,126</sup>. Los estudios realizados en niños de 0 a 6 años y su seguimiento hasta los 11 años, han hecho formular la hipótesis de que hay 3 tipos diferentes de niños con sibilantes. Es posible también, que varios factores determinen el nivel de respuesta bronquial durante la infancia. Uno no relacionado con la atopia, sino con algún factor genético o de desarrollo intrauterino, que afecta a los niños más pequeños quizás a través de una disminución del calibre de la vía aérea<sup>127</sup> o de una alteración del tono muscular. El otro estaría asociado a la sensibilización atópica, importante determinante de la respuesta bronquial que aumentaría durante la infancia.

### **2.3.- MECANISMOS DE LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL**

Los mecanismos exactos determinantes de la hiperrespuesta bronquial no son bien conocidos. Probablemente pueda deberse a la interacción de varios factores, que pueden variar entre diferentes personas, e incluso en la misma persona en diferentes momentos. En la figura 6 se resumen estos factores<sup>128</sup>.



**Figura 6.** Interacción de diferentes factores patológicos que resultan en un aumento de la respuesta constrictora de las vías aéreas.

Se han sugerido diversos mecanismos implicados en la producción y mantenimiento de la hiperrespuesta bronquial en el asma<sup>106,129</sup>:

- 1) Alteraciones del músculo liso bronquial.
- 2) Alteraciones en la mecánica respiratoria.
- 3) Disfunción del sistema nervioso autónomo. Se manifiesta por un desequilibrio entre los sistemas alfa y betadrenérgico y colinérgico.
- 4) Inflamación de la vía aérea
- 5) Factores genéticos y del desarrollo

### **2.3.1.- Alteraciones del músculo liso bronquial**

Los cambios en las propiedades contráctiles del músculo liso, característicos del asma pueden ser uno de los factores más importantes en el estrechamiento excesivo de las vías aéreas.

Varias observaciones clínicas apoyan el hecho de que el músculo liso bronquial juega un papel importante en la respuesta constrictora bronquial; la naturaleza transitoria de la broncoconstricción después de una broncoprovocación y la respuesta rápida a los  $\beta_2$ -agonistas claramente implican un mecanismo muscular<sup>128</sup>.

El aumento de la masa de músculo liso (hipertrofia e hiperplasia) y la alteración de la dinámica de la contracción del músculo liso bronquial, con una sensibilidad anormal y un aumento de la respuesta máxima a los estímulos contráctiles, podrían contribuir de forma importante a la producción de la hiperrespuesta bronquial en el asma<sup>130,131</sup>.

En las personas sanas no asmáticas en las que se ha inducido una broncoconstricción, realizar una inspiración profunda consigue un efecto broncodilatador. En cambio en las personas asmáticas no se observa este efecto, e incluso en algunas se puede acentuar la broncoconstricción. Este fenómeno ha hecho especular la existencia de una anomalía del músculo liso bronquial que produciría una hiperrespuesta bronquial.

Estas anomalías podrían consistir en una mayor rigidez de las vías aéreas que haría que no se puedan dilatar con facilidad, una mayor fuerza de contracción por un aumento de la masa de músculo liso, una mayor velocidad de acortamiento del músculo liso, y una menor "plasticidad"<sup>131</sup>.

La inflamación de las vías aéreas en el asma es un proceso multifactorial, que incluye la liberación de muchos mediadores inflamatorios. Hay algunas evidencias de que estas anomalías del músculo liso podrían estar inducidas por los mediadores inflamatorios, de forma que la disfunción del músculo liso podría ser uno de los mecanismos por los que la inflamación produce hiperrespuesta bronquial<sup>131</sup>.

### **2.3.2.- Alteraciones de la mecánica respiratoria: consideraciones geométricas**

Se ha propuesto que la disminución del calibre de las vías aéreas es uno de los determinantes principales de la hiperrespuesta bronquial.

La disminución de calibre de la vía aérea origina un aumento exponencial de la resistencia al paso del aire ya que la resistencia es inversamente proporcional a la cuarta potencia del radio (flujo laminar), o a la quinta potencia (flujo turbulento).

La respuesta a los estímulos se expresa habitualmente como un porcentaje del valor basal inicial. Una situación basal de calibre disminuido de las vías aéreas determinará un mayor efecto aparente de los estímulos broncoconstrictores, ya que un mismo descenso absoluto se traducirá en un mayor cambio en el porcentaje. En cierto modo, se podría hablar de una “seudo – hiperrespuesta” bronquial, debida a un artefacto producido por el estrechamiento anatómico de las vías aéreas<sup>108</sup>.

Parece que este puede ser uno de los mecanismos principales de la hiperrespuesta bronquial en las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. En estas enfermedades existe una correlación importantes entre el grado de disminución del FEV<sub>1</sub> y la hiperrespuesta bronquial<sup>132</sup>. También podría ser una de las causas de la hiperrespuesta bronquial en los niños pequeños con un calibre disminuido de su vía aérea.

En cambio, parece que no lo es en el asma bronquial, donde no existe una correlación tan buena entre el FEV<sub>1</sub> y la hiperrespuesta bronquial. Además en muchos pacientes con asma e hiperrespuesta bronquial de diferentes grados (leve a moderada), no se observa una disminución del calibre de las vías aéreas<sup>108</sup>.

Por otro lado, en el asma se produce un engrosamiento de la pared bronquial debido al edema, inflamación celular, así como a la remodelación estructural de la región subepitelial. Este engrosamiento tendrá un mínimo efecto sobre la función pulmonar en reposo, pero puede magnificar el aumento de las resistencias de la vía aérea al producirse la contracción del músculo liso<sup>133</sup>, contribuyendo de algún modo a la hiperrespuesta bronquial del asma.

### **2.3.3.- Disfunción del sistema nervioso autónomo**

El control nervioso autonómico de las vías respiratorias es complejo, ya que además de los sistemas clásicos adrenérgicos y colinérgicos, en las vías aéreas se identifican nervios no adrenérgicos no colinérgicos (NANC) y varios neuropéptidos. Varios estudios han investigado la posibilidad de que defectos en el control del sistema

nervioso autónomo puedan contribuir a la hiperrespuesta bronquial. Se han propuesto alteraciones tales como aumento de las respuestas colinérgicas y  $\alpha$ -adrenérgicas o disminución de la respuesta  $\beta$ -adrenérgica. Hoy se piensa que estas anomalías son más bien secundarias a la enfermedad, que defectos primarios<sup>134</sup>.

También se ha propuesto un defecto del sistema no adrenérgico no colinérgico inhibitorio, que parece ser la única inervación broncodilatadora de las vías aéreas, y cuyo neurotransmisor broncodilatador más importante es el óxido nítrico. Sin embargo, no se ha llegado a demostrar este defecto<sup>135</sup>.

Los mediadores inflamatorios pueden modular o inducir la liberación de neurotransmisores, y pueden activar los nervios sensoriales, resultando en una broncoconstricción colinérgica refleja o en la liberación de neuropéptidos inflamatorios como la bradiquinina. Un mediador importante de la hiperrespuesta bronquial en el asma son las neurotrofinas, como el factor de crecimiento neuronal, que liberado por las células epiteliales de la vía aérea, estimula la síntesis de neuropéptidos como la sustancia P por los nervios sensoriales, y sensibiliza las terminaciones nerviosas de la vía aérea.

La liberación de neuropéptidos como la sustancia P, neuroquinina A y péptido relacionado con el gen de la calcitonina, a partir de las terminaciones nerviosas sensibilizadas puede aumentar la respuesta inflamatoria. Esta inflamación neurogénica puede proporcionar un mecanismo para perpetuar la respuesta inflamatoria, incluso en la ausencia de los estímulos inflamatorios iniciales<sup>136</sup>.

#### **2.3.4.- Inflamación**

Los resultados de los estudios efectuados con biopsias bronquiales, lavados broncoalveolares, y examen de células en el esputo inducido, muestran claramente que incluso en el asma leve existe una inflamación de las vías aéreas, con infiltración de eosinófilos activados y linfocitos, junto con pérdida parcial del epitelio.

Sin embargo, la relación entre los índices de inflamación, y el grado de gravedad de la hiperrespuesta bronquial y del asma es compleja. La mayoría de estudios muestran una relación entre ambos<sup>137,138</sup>, pero no de forma constante<sup>139,140</sup>. Esto puede venir determinado por la falta de correlación entre varios métodos para medir la hiperrespuesta bronquial, y por el hecho de que diferentes maneras de medir la hiperrespuesta bronquial se relacionan de forma diferente con los marcadores de la inflamación<sup>105</sup>.

En cualquier caso, parece que uno de los factores más importantes en la génesis de la hiperrespuesta bronquial en el asma es la inflamación de las vías aéreas. Se piensa

que el aumento en el número de eosinófilos en las vías aéreas de los asmáticos produce muchos de los cambios tisulares propios de esta enfermedad: daño epitelial, engrosamiento de la membrana basal, liberación de mediadores con capacidad para causar contracción de la musculatura lisa bronquial y exudación de plasma, produciendo un engrosamiento de las paredes de las vías aéreas. También la infiltración por mastocitos en el músculo liso de los pacientes asmáticos podría jugar un papel importante.

Algunos de estos mecanismos podrían estar implicados en la hiperrespuesta basal de los pacientes asmáticos y otros serían importantes para explicar los cambios que se observan en la hiperrespuesta bronquial durante el curso de la enfermedad.

Como ya hemos comentado, el engrosamiento de la pared podría explicar el estado de hiperrespuesta bronquial basal de los pacientes asmáticos, incrementando por mecanismos geométricos la resistencia de la luz bronquial inducida por un cierto grado de acortamiento del músculo liso bronquial. Por otro lado la pérdida parcial de la barrera epitelial podría permitir acceder en mayor cantidad a los mediadores broncoconstrictores al músculo liso u otras células que amplifican el efecto broncoconstrictor. Además, el daño del epitelio resulta en una disminución de la liberación por el mismo de sustancias broncodilatadoras (factor relajante epitelial) tales como la PGE<sub>2</sub>.

Las fluctuaciones en el grado de inflamación eosinofílica podrían explicar los cambios en la hiperrespuesta bronquial que se observan durante el curso de la enfermedad. Así, la hiperrespuesta bronquial basal se ve incrementada por diferentes formas de exposición a alérgenos tales como la exposición a una dosis única de alérgeno, la exposición repetida a dosis bajas de alérgeno o la exposición estacional a un alérgeno polínico, todas las cuales aumentan la inflamación eosinofílica de las vías aéreas.

### **2.3.5.- Factores genéticos y del desarrollo**

La heredabilidad del asma se calcula que es hasta de un 68%. Varios estudios han mostrado una relación entre la atopia y la hiperrespuesta bronquial, pero no todas las personas atópicas tienen hiperrespuesta bronquial. Podría haber influencias genéticas diferentes en la herencia de atopia y de hiperrespuesta bronquial, relacionadas con diversos polimorfismos<sup>141,142</sup>.

En 2 estudios de cohortes se ha visto que en niñas, en las que las bronquitis sibilantes son menos frecuentes que en los niños, la presencia de hiperrespuesta bronquial en las primeras semanas de vida era mayor en aquella niñas que posteriormente tenían

bronquitis sibilantes que en las que no<sup>27,43</sup>. Estas observaciones apoyan una base genética para la hiperrespuesta bronquial.

Otras evidencias a favor de una influencia genética en la hiperrespuesta bronquial, es la presencia de una distribución bimodal (en contraste a la distribución unimodal continua de la población general), en estudios familiares entre los pacientes asmáticos y sus parientes no asmáticos<sup>143,144</sup>.

## **2.4.- MEDICIÓN DE LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL**

Distinguimos dos tipos de hiperrespuesta bronquial según el estímulo broncoconstrictor:

- Específica: respuesta a sustancias sensibilizantes específicas (alérgenos). Afecta sólo al grupo de pacientes sensibilizados al alérgeno determinado. La realización de una prueba de broncoprovocación específica, puede estar indicada cuando se sospecha fuertemente una sensibilización, pero ni el prick-test ni el RAST son concluyentes. Provoca una respuesta doble: precoz durante la primera media hora, y tardía, a las 4-5 horas de la inhalación. La intensidad de la hiperrespuesta bronquial específica, se relaciona directamente con la gravedad del asma provocado por dicha sustancia<sup>145,146</sup>.

- Inespecífica: respuesta constrictora de las vías aéreas ante una serie de estímulos físicos, químicos o farmacológicos. Estos estímulos, se denominan inespecíficos en la medida en que afectan a la mayoría de sujetos hiperreactivos. De ahora en adelante nos referiremos a este tipo de hiperrespuesta bronquial.

### **2.4.1.- Pruebas de provocación bronquial**

La hiperrespuesta bronquial se mide mediante pruebas de broncoconstricción o provocación bronquial. Para ello se utilizan estímulos que actúan a través de distintos mecanismos. Se clasifican en estímulos directos, cuando actúan directamente sobre el músculo liso bronquial y en indirectos cuando estimulan la liberación de mediadores celulares y o receptores sensoriales nerviosos (tabla 6).

Se han usado varios métodos para medir la respuesta bronquial inespecífica en niños (tabla 7). Los estímulos indirectos reproducen mejor las condiciones medioambientales del niño, aunque las más usadas son las farmacológicas con estímulos directos, pues están más estandarizadas y validadas.

Existen diferentes métodos para administrar el aerosol con la sustancia broncoconstrictora, de los que los más usados son el de la respiración a volumen corriente con nebulizador tipo jet, el método con dosímetro y el método con nebulizador ultrasónico (tabla 8).

**Tabla 6.** Estímulos indirectos y directos para las pruebas de provocación bronquial

<b>INDIRECTOS</b>	<b>DIRECTOS</b>
<b><i>Estímulos físicos</i></b>	<b>Agonistas colinérgicos</b>
Ejercicio	Acetilcolina
Aerosoles no isotónicos (hipertónico, hipotónico, agua destilada, manitol)	Metacolina
Hiperpnea voluntaria de aire seco	Carbacol
	<b>Histamina</b>
Estímulos farmacológicos	<b>Prostaglandina D2</b>
Adenosina	<b>Leucotrienos C4, D4, E4</b>
Taquiquinas	
Bradiquina	
Metabisulfito	
Propranolol	
Agentes selectivos	
Aspirina	
Alergenos	
<b>Otros estímulos</b>	
Endotoxinas (LPS)	
Factor activador plaquetario	
Ozono	

**Tabla 7.** Tipos de provocación usados para medir la respuesta bronquial en niños<sup>128</sup>.

<b>Estímulos</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Comentarios</b>
Directos		
Histamina	Receptores H <sub>1</sub> del músculo liso	Efectos sistémicos (rubor) y locales (tos...)
Metacolina	Receptores muscarínicos del músculo liso	Mínimos efectos colaterales. Puede usarse a altas dosis en individuos normales
Indirectos		
Ejercicio	Incrementa la ventilación, lo que favorece el enfriamiento y la evaporación de agua	Fisiológico pero de dosis única. Se afecta por las condiciones ambientales
Hiperventilación isocápnica	Similar al previo. Provocado por aire frío y seco	Precisa equipos complejos. No aventaja al previo
Provocación osmótica	Agua destilada o suero salino hipertónico tienen similar efecto	El más sencillo de los indirectos. Relación dosis respuesta. Refractariedad al repetirlo
Manitol (polvo seco)	Estimulo hipertónico	Útil en estudios epidemiológicos, pues es más simple que los aerosoles
AMP	Actúa a través de los mastocitos, liberando histamina y otros mediadores	Pocos estudios en niños. Es útil

**Tabla 8.** Métodos de administración de los aerosoles<sup>128</sup> broncoconstrictores

Método	Depósito del aerosol	Medida de la función pulmonar e índice de reactividad bronquial	Comentarios
Método estándar a volumen corriente <sup>147</sup>	Nebulizador tipo jet 2 minutos respirando a volumen corriente; dosis doble del agonista cada 5 minutos	Medida a los 90 y 180 s, comparada con el valor pos salino; PC	Barato, fácil, consume tiempo. Puede usarse un nebulizador de alto débito, pero dará distintos resultados
Modificación del previo <sup>148</sup>	Un minuto a volumen corriente; incrementos de concentración al cuádruple, no inhalación de SS	Medida a los 180 s, comparada con el basal; PC	Protocolo acortado útil en pequeños, riesgo de respuestas adversas por el incremento de dosis
Dosímetro <sup>149</sup>	Inhalación del agonista en 5 inspiraciones máxima; SS seguido por dosis dobles	Medida a los 90 s, comparada con los valores pos salino; PD acumulada	Caro, rápido, adecuado para niños $\geq 7$ años
Dosímetro manual <sup>150</sup>	SS seguido por dosis dobles. Número variable de inspiraciones máximas	Medida a los 90 s. PD acumulada	Barato, rápido, portátil, útil en estudios epidemiológicos
Método del reservorio <sup>150</sup>	El aerosol está contenido en un gran reservorio	Se puede calcular PC o PD	Ventajoso en niños pequeños porque la dosis inspirada es independiente de la entrada de aire
Nebulizador ultrasónico: para suero salino hipertónico o agua destilada <sup>151</sup>	El aerosol se inhala a intervalos dobles (0,5-1-2-4-8 min); nebulizador de alto débito (1-2,3 ml/min)	60 y180 s; PD o análisis de la respuesta basado en el tiempo	Tendencia a toser con el agua destilada, larga duración, respuesta grave ocasional con el agua destilada

SS: suero salino; PC: concentración que provoca la broncoconstricción; PD: Dosis acumulada que provoca la broncoconstricción; s: segundos

#### **2.4.1.1.- Pruebas con estímulos directo**

Se utilizan ampliamente y las sociedades neumológicas nacionales e internacionales han publicado normativas para la realización de estas pruebas a fin de estandarizar la metodología empleada y su interpretación, con objeto de poder realizar estudios comparativos<sup>129,152</sup>. La última ha sido la de la American Thoracic Society en 1999<sup>153</sup>.

Los estímulos directos causan obstrucción al flujo aéreo al actuar sobre las células efectoras, principalmente el músculo liso, pero también sobre las glándulas mucosas y sobre la microcirculación de la vía aérea sin involucrar vías intermedias<sup>154</sup>.

La metacolina es el estímulo más habitual junto a la histamina, siendo la potencia de ambas similar<sup>152</sup>, aunque esta última puede producir efectos sistémicos, por lo que se tiende a usar menos.

La metacolina estimula los receptores vagales muscarínicos de las vías aéreas provocando un reflejo broncoconstrictor. La acción es inmediata y no provoca respuesta tardía, revirtiéndose su efecto al administrar salbutamol.

La metacolina se comercializa en forma de polvo (Provocholine®, Metafarm inc, Brantford, Ontario).

#### **2.4.1.2.- Pruebas con estímulos indirectos**

La European Respiratory Society ha publicado recientemente un consenso para estandarizar la realización y aplicaciones de algunas de estas técnicas en la práctica clínica<sup>154</sup>.

Los estímulos indirectos (tabla 7), producen la limitación al flujo aéreo al actuar sobre las células inflamatorias y neuronales que al liberar mediadores o citocinas, causan una broncoconstricción secundaria.

##### *1. Ejercicio.*

La broncoconstricción se produce debido a la pérdida de agua por evaporación de la superficie aérea, secundaria a cambios térmicos y osmóticos, que condiciona una liberación de mediadores por parte de la célula como: histamina, leucotrienos, prostaglandinas, etc<sup>154</sup>.

El protocolo más detallado respecto a esta técnica es el publicado en 1999 por la American Thoracic Society<sup>153</sup>.

Esta técnica tiene alta especificidad, cercana al 99% y sensibilidad de alrededor del 60%.

##### *2. Hiperventilación isocápnica.*

Se realiza generalmente con aire frío; es similar a la anterior pero en condiciones controladas. El protocolo pediátrico más completo al respecto es el de Zach y cols<sup>155</sup>. La sensibilidad es de aproximadamente un 57% y la especificidad, como en la anterior es muy alta.

### 3. Suero salino hipertónico.

Se utiliza suero salino al 4,5% (similar a la concentración salina del agua de mar). El protocolo más usado en niños es el descrito por Wojnarowski<sup>156</sup> o en el manual de la fase 2 del estudio ISAAC<sup>157</sup>.

La especificidad y sensibilidad de esta prueba en niños es de 92% y 47% respectivamente<sup>158</sup>.

La ventaja de esta técnica es su sencillez y que no origina efectos secundarios.

### 4. Agua destilada.

Cuanto más hipotónica es la solución, más reacción provoca.

La especificidad de esta prueba es del 92% y la sensibilidad de solo el 36%. El protocolo más utilizado en niños es el descrito por Wojnarowski y Friescher<sup>156</sup>.

### 5. Adenosina 5' monofosfato (AMP)

La adenosina es un nucleósido del tipo de las purinas con capacidad para desencadenar varias respuestas celulares importantes en el asma a través de la interacción con receptores específicos para las purinas de la superficie celular<sup>154</sup>.

El mecanismo de la broncoconstricción inducida por la adenosina sería a través de la estimulación de los receptores A<sub>2B</sub> de los mastocitos, que movilizaría los depósitos intracelulares de calcio e induciría la liberación de histamina y otros mediadores preformados, como cisteinil-leucotrienos, prostaglandinas e interleuquina 8. Este efecto sería mayor en la atopia y en otras situaciones en que los mastocitos están "primados" para la liberación de mediadores.

En niños los estudios del grupo de Godfrey han mostrado que la respuesta a la adenosina podría ser un marcador más sensible y específico del asma bronquial que la respuesta a la metacolina, tanto en niños mayores y adolescentes, como en preescolares. La adenosina distingue el asma de los controles con una sensibilidad y especificidad del 98% y el asma de otras enfermedades obstructivas pediátricas con una sensibilidad y especificidad del 90%<sup>119</sup>.

Por tanto, una de las principales indicaciones de la prueba con adenosina podría ser la diferenciación entre asma y otras enfermedades obstructivas crónicas en casos dudosos.

## 2.5.- Valoración de la respuesta: espirometría y otros parámetros

El parámetro más utilizado para valorar la respuesta a los estímulos broncoconstrictores es la determinación del FEV<sub>1</sub> mediante la práctica de una espirometría.

Cuando se utilizan estímulos farmacológicos en dosis crecientes, la primera nebulización se realiza con el diluyente. El valor de FEV<sub>1</sub> obtenido tras la misma se utiliza como referencia, no debiendo ser inferior en más del 10% al valor basal.

Al acabar cada nebulización se determina el FEV<sub>1</sub> a los 30 y 90 segundos (60 y 180 segundos en el caso de la adenosina). En cada determinación se pueden realizar varios intentos (hasta 3 o 4), para obtener una espirometría de buena calidad. Se considera necesario obtener dos espirometrías reproducibles en las que el FEV<sub>1</sub> no difiera más del 5%<sup>153</sup>. Se recomienda recoger el mayor valor del FEV<sub>1</sub> de las 2 maniobras aceptables.

Si el FEV<sub>1</sub> no disminuye un 20% o más respecto al valor inicial se continua el procedimiento de forma sucesiva hasta llegar hasta la máxima concentración. Si no cae con esta, la prueba se considera negativa. La prueba se interrumpe si tras alguna de las nebulizaciones el descenso del FEV<sub>1</sub> es superior al 20%, en cuyo caso se administra salbutamol inhalado (4 puffs de 100 microgramos, con cámara espaciadora), y se repite la espirometría 10 minutos después. Hay que confirmar que se alcanza un valor del FEV<sub>1</sub> superior al 90% del valor inicial. Posteriormente se calcula la concentración (o la dosis acumulada) de la sustancia que produce un descenso del 20% o más del FEV<sub>1</sub> (PC<sub>20</sub> y PD<sub>20</sub>).

Cuando se utilizan otros estímulos en dosis única (ejercicio, suero salino hipertónico), se realizan espirometrías a intervalos determinados (por ejemplo 5, 10 y 15 minutos tras acabar el ejercicio) y se registra la variación del FEV<sub>1</sub>, siendo positiva la prueba si la disminución del FEV<sub>1</sub> respecto al valor basal es  $\geq$  al 15% tras el ejercicio, o tras la nebulización de suero salino hipertónico.

Además del FEV<sub>1</sub> se han utilizado otros parámetros para valorar la respuesta a los estímulos broncoconstrictores. Así se ha utilizado la medida de resistencias de la vía aérea valoradas mediante la pletismografía, oclusión simple<sup>9,159</sup> o la técnica de oscilación forzada<sup>9,160</sup>. En general se requiere con estas técnicas un aumento de resistencias superior al 45% para considerarlas positivas.

En los niños no colaboradores se han empleado técnicas de función pulmonar complejas con necesidad de sedación como la determinación del flujo máximo a volumen corriente (Vmax FRC) mediante el método de la compresión torácica rápida<sup>14</sup>

Con la finalidad de poder realizar la prueba de metacolina o adenosina en niños no colaboradores, sin necesidad de sedar a los niños, se han propuesto dos parámetros: la presión transcutánea de oxígeno<sup>15</sup> y la auscultación de sibilantes en tráquea y campos pulmonares<sup>17,18,161</sup>. Este método ha sido validado recientemente en nuestro medio en niños colaboradores por el grupo de Pérez-Yarza<sup>20</sup>. Con la utilización de este método, se denomina PCwheeze a la concentración de la sustancia broncoconstrictora en la que se auscultan sibilantes claros en tráquea y campos pulmonares. También se considera positiva la prueba si se produce un descenso de la saturación de oxígeno superior al 5% de la basal, o si aumenta la frecuencia respiratoria un 50% respecto al valor basal<sup>17</sup>.

## **2.6.- FACTORES QUE AFECTAN LA MEDIDA DE LA RESPUESTA BRONQUIAL.**

### **2.6.1.- Métodos de nebulización**

Se han descrito (tabla 8) diferentes métodos bien estandarizados.

A pesar de que el depósito del aerosol es más periférico durante la nebulización a volumen corriente que con el dosímetro, en adultos los 2 métodos proporcionan resultados equivalentes<sup>162</sup>

En niños pequeños es más fácil de usar la nebulización a volumen corriente y la repetibilidad es mayor.

Se debe tener en cuenta en los distintos estudios el débito del nebulizador y las características del aerosol, pues puede hacer que los estudios no sean comparables (sus valores absolutos de PC o PD).

### **2.6.2.- Comparación entre las pruebas directas e indirectas**

Se han utilizado más frecuentemente las técnicas directas, especialmente con histamina y metacolina, sobre todo el método de la inhalación a volumen corriente durante dos minutos, o la técnica del dosímetro. Ello ha dado resultados comparables de PD<sub>20</sub> o PC<sub>20</sub>, contando siempre con una adecuada calibración.

Las técnicas *directas* con metacolina o histamina, tomando el punto de corte en 8-16 mg/ml, son altamente sensibles para la detección de hiperrespuesta bronquial en laboratorios de función pulmonar para asma clínica (pacientes con síntomas en los días previos), siendo algo menos sensibles desde el punto de vista epidemiológico (pacientes con síntomas en el último año). Por el contrario, la especificidad y valor predictivo positivo de estas pruebas de broncoprovocación para los síntomas de asma

son más bajos. Sólo si el punto de corte fuese inferior, p.e  $PC20 \leq 1$  mg/ml, la especificidad aumentaría mucho, -disminuyendo la sensibilidad- permitiendo que la prueba confirmase la enfermedad.

Por tanto las pruebas de broncoprovocación realizadas con estímulos directos, excluyen muy bien la enfermedad en la población sospechosa de asma derivada al laboratorio de función pulmonar, pero no son muy útiles para: detectar broncoconstricción provocada por ejercicio, diferenciar el niño asmático del normal (que puede presentar hiperrespuesta bronquial) con un punto de corte alto, y distinguir el asmático de otras enfermedades con limitación crónica al flujo aéreo.

Las técnicas *indirectas*<sup>163</sup>, por el contrario, tienen mayor especificidad (confirman el diagnóstico de asma), diferencian bien los niños con asma de los que presentan otra patología respiratoria<sup>119,164</sup> y pueden ser más útiles para el seguimiento de la enfermedad, porque se relacionan mejor con los parámetros de inflamación bronquial. Por tanto pueden ser más útiles para valorar la respuesta de un paciente al tratamiento con corticoides inhalados y/o con leucotrienos. Por otro lado cada vez son más utilizadas para estudios epidemiológicos de prevalencia de hiperrespuesta bronquial, ya que la población prefiere hacer pruebas de broncoprovocación con estímulos más “fisiológicos”, como el ejercicio o la inhalación de suero salino, que con estímulos farmacológicos.

La seguridad de ambos tipos de pruebas de broncoprovocación es muy alta habiendo pocas reacciones indeseables declaradas en ambos grupos<sup>153,154</sup>.

### **2.6.3.- Repetibilidad de las medidas**

A corto plazo, la repetibilidad está relacionada con factores técnicos (tabla 9). A largo plazo, de semanas a años, factores clínicos y biológicos juegan un papel en la variabilidad. Esta se ha demostrado tanto en pacientes con asma como en sujetos sanos. Los factores ambientales que influyen en el nivel de reactividad bronquial contribuyen a estas variaciones (tabla 10).

En cuanto a los factores técnicos que afectan la repetibilidad a corto plazo de las pruebas de broncoprovocación, están el flujo, el tipo de dispositivo, el tiempo de nebulización y el tipo de nebulización.

Las partículas inhalables, se producen por atomización de la solución con aire comprimido,.

La penetración del aerosol en las vías aéreas depende de diversos factores:

- El tamaño de las partículas, que es distinto según el nebulizador. Se deben generar partículas respirables para que la fracción pulmonar disponible de una

dosis dada sea la óptima. Para ello el diámetro de la masa aerodinámica debe situarse entre 1 y 3,5 micras. Las partículas de mayor diámetro, se depositarán principalmente en la faringe, no llegando a su zona diana que es el bronquio.

- El flujo: para originar partículas respirables debe estar entre los 6 y los 8 L/min. El débito del aerosol indica la cantidad de aerosol disponible por unidad de tiempo para ser inhalado.

En cuanto al tipo de nebulización, se describen dos formas: intermitente (usando un dosímetro) y continua, en la que el aerosol se produce con un nebulizador de flujo continuo. El método fue descrito por Juniper EF y Cockcroft DW<sup>165</sup> en 1994.

En este último caso, la American Thoracic Association recomienda un nebulizador que proporcione un diámetro de masa media aerodinámico de 1-3,6 micras con una presión de 50 psi (3,45 barr) al flujo necesario según calibración del nebulizador, para proporcionar un débito de 0,13 ml/min  $\pm$  10%<sup>153,165</sup>.

Juniper y cols. aconsejan un nebulizador tipo Wright o en su defecto un Hudson, o un Bennet Twin<sup>165</sup>.

En cuanto al tiempo de inhalación debe ser exacto, ya que se ha comprobado que pasado éste la concentración del vial se incrementa en un 10%. En la prueba de broncoprovocación con metacolina, se inhalan las concentraciones vistas del agonista mediante mascarilla facial durante dos minutos, con respiración en reposo (a volumen corriente).

**Tabla 9.** Factores técnicos que afectan la repetibilidad a corto plazo de las pruebas de broncoprovocación

---

<b>Aerosoles (metacolina, histamina, etc)</b>	
Flujo del gas conductor	El tamaño de la partícula influye en el lugar de depósito: mayor de 5 micras en vías altas, menor de 1 micra es exhalado
Dispositivo	Nebulizadores tipo jet pueden tener distintas características
Tiempo de nebulización	A mayor tiempo, menor temperatura y mayor concentración del aerosol en los nebulizadores, lo que incrementa la respuesta
Patrón respiratorio	Mayor deposición periférica con respiración a volumen corriente ( a inspiración máxima); ello no tiene repercusión en estudios poblacionales. Vía nasal, versus oral (mascarilla) afecta la dosis de 2 a 4 veces
<b>Pruebas de broncoprovocación indirectas</b>	
Ejercicio	Ventilación minuto, duración del ejercicio, condiciones ambientales, refractariedad transitoria
Hiperventilación	Temperatura y humedad del aire; refractariedad
Provocación osmótica	Duración y tonicidad del aerosol; refractariedad
<b>Medida de función pulmonar</b>	La repetibilidad de la prueba de función pulmonar y del efecto broncodilatador de la inhalación máxima durante una broncoconstricción inducida son críticos

---

#### **2.6.4.- Influencia ambiental sobre la reactividad bronquial**

A largo plazo (semanas o años), se ha observado una marcada variación en el nivel de reactividad bronquial tanto en sujetos normales como asmáticos. Los diversos factores ambientales (tabla 10), podrían contribuir a esta variación.

##### **2.6.4.1.- Exposición a alergen**

La exposición a alergen en individuos sensibles, incrementa la reactividad bronquial. Así los sujetos sensibles, durante la época polínica<sup>118</sup> presentan una menor dosis de provocación (PD20). Esto es clínicamente importante y además explica la variabilidad de reactividad bronquial en algunos pacientes. Además se ha observado que la sensibilización a un alérgeno puede afectar a la respuesta de otros estímulos<sup>166</sup>

##### **2.6.4.2.- Infecciones víricas**

Las infecciones respiratorias por virus, pueden producir un aumento en la reactividad de las vías aéreas<sup>167,168</sup> tanto en niños asmáticos atópicos como en preescolares independientemente de la atopia<sup>52</sup>.

Hay dos observaciones que demuestran la relación entre infecciones víricas y el estado de hiperrespuesta bronquial:

- Sujetos normales pueden presentar una hiperrespuesta bronquial transitoria inducida por virus. Asimismo, se ha visto que hay adultos que presentan historia de sibilantes inducidos por virus sin ninguna base atópica
- Los niños que han presentado infección por VRS, tienen hiperrespuesta bronquial que se prolonga durante la infancia<sup>169</sup>. Clínicamente se ha visto que hay un amplio grupo de niños que solo presentan sibilantes en las infecciones víricas, estando asintomáticos entre los episodios, lo que va en contra de que tengan una base inflamatoria. Estos niños no responden bien al tratamiento corticoideo.

Los mecanismos que explicarían la hiperrespuesta bronquial inducida por virus incluyen<sup>170,171</sup>:

- Daño de las células epiteliales.
- Liberación de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores.
- Producción de IgE virus específica.
- Expresión de moléculas de adhesión
- Disminución de la actividad de los receptores beta.
- Infección vírica crónica persistente.

##### **2.6.4.3.- Tabaco**

El efecto del tabaco puede ocurrir tanto con la exposición intra útero como durante la infancia por inhalación pasiva. Así se ha relacionado tanto con el incremento de sibilantes transitorios<sup>37</sup>, especialmente en varones, como con el incremento del riesgo de sensibilización atópica.

Parece que el tabaco incrementaría la reactividad bronquial (sin necesidad de provocar broncoconstricción) tanto en sanos como en enfermos.

#### **2.6.4.4.- Localización y etnia**

Parece que la ciudad de nacimiento así como el área de residencia influyen en el grado de reactividad bronquial como observa el grupo de Peat en el estudio longitudinal llevado a cabo en Nueva Zelanda<sup>116</sup>.

#### **2.6.4.5.- Polución**

Experimentalmente muchos gases (óxido de nitrógeno, ozono) pueden provocar respuestas de hiperrespuesta bronquial e inflamación bronquial. El efecto directo de la polución es más difícil de demostrar.

**Tabla 10.** Factores ambientales de riesgo para el incremento de la reactividad bronquial

<b>Determinantes a largo plazo</b>	<b>Determinantes a corto plazo</b>
<p><b>PERINATAL</b>            Bajo peso al nacer            Tabaquismo materno            Lugar de nacimiento            Mes de nacimiento            Grupo étnico</p> <p><b>LACTANTE</b>            Exposición a alérgenos            (ácaros, mascotas)            Tabaquismo pasivo            Infección vírica temprana</p> <p><b>INFANCIA</b>            Tabaquismo pasivo            Exposición a alérgenos/sensibilización            Polución</p>	<p>Exposición a alérgenos            Dieta            Infección vírica            Calibre de la vía aérea            Medicación            Reflujo gastroesofágico            Hora del día (variación diurna)</p>

### 2.6.5.- Efectos de la medicación sobre la reactividad bronquial

Algunos medicamentos pueden interferir en las pruebas de broncoprovocación (tabla 11) y por tanto deberían ser evitados unas horas antes de llevarse a cabo la prueba. Pueden tener efectos a corto plazo al bloquear la broncoconstricción inducida por un estímulo, a medio plazo al modular la inflamación de la vía aérea o a largo plazo al alterar la patología estructural subyacente.

**Tabla 11.** Medicamentos que pueden interferir con las pruebas de broncoprovocación.

---

Agonistas  $\beta_2$  inhalados - orales

Anticolinérgicos inhalados

Teofilina

Antihistamínicos  $H_1$  específicos (terfenadina, loratadina, astemizol)

Antihistamínicos  $H_1$  no específicos (clorfeniramina, clemastina)

Otras medicaciones para el asma: corticoides inhalados

antileucotrienos

(Éstos pueden no alterar agudamente la respuesta de las vías aéreas a metacolina o histamina, aunque tras un uso prolongado sí pueden afectar la respuesta bronquial)

---

## **2.7.- Aplicaciones clínicas de las pruebas de broncoprovocación**

### **2.7.1.- Despistaje de asma a nivel poblacional**

Valor predictivo positivo bajo dada la modesta especificidad y el difícil consenso en la definición de asma.

### **2.7.2.- Diagnóstico de asma**

Con las pruebas con estímulos directos puede no ser útil en los casos donde hay dudas diagnósticas, en que la respuesta positiva se produce en el límite alto de la positividad, pero sí en los casos que responden a un valor más bajo. En cambio, la ausencia de hiperrespuesta bronquial sí apoya la exclusión del diagnóstico de asma.

Una respuesta positiva con las pruebas con estímulos indirectos apoya fuertemente el diagnóstico de asma.

### **2.7.3.- Marcador pronóstico**

La hiperrespuesta bronquial puede ser útil como marcador pronóstico, permitiendo la identificación de niños asintomáticos de riesgo. Así hay grupos, como el de Perth, que defienden que la hiperrespuesta bronquial en época neonatal, es un factor de riesgo para predecir la presencia de asma a los 6 años, pero no la atopia, la IgE o la eosinofilia<sup>27,56</sup>.

De todos modos parece que la sensibilidad es baja para identificar pacientes que se beneficiarían de tratamiento antiinflamatorio. Un índice pronóstico que combine hiperrespuesta bronquial con otros factores de riesgo (como alergia) será más sensible.

### **2.7.4.- Valoración de la gravedad del asma**

Se ha visto una correlación entre reactividad bronquial y gravedad (valorada por el nivel de tratamiento) en niños y adultos<sup>164,172</sup>.

Por otro lado, se ha visto que la correlación entre reactividad bronquial y gravedad, sirve solo para grandes grupos, ya que hay demasiado solapamiento para su uso en clínica.

La hiperreactividad extrema se ha relacionado con muerte súbita en asma<sup>173</sup>.

### **2.7.5.- Manejo clínico del asma**

Se ha sugerido que el tratamiento del asma teniendo como objetivo conseguir eliminar la hiperrespuesta bronquial consigue un mejor control clínico del asma, con menor frecuencia de exacerbaciones. Sin embargo, ello podría llevar a tratar a los pacientes con dosis excesivas de corticoides inhalados.

#### **2.7.6.- Investigación**

La obstrucción bronquial inducida por pruebas de broncoprovocación, ha sido muy útil en el estudio de la fisiología de la obstrucción bronquial, mostrando además la existencia de diferencias interindividuales.

También se está trabajando en la base molecular genética para la hiperrespuesta bronquial.

A pesar del escaso valor en el diagnóstico y manejo del asma, las pruebas de broncoprovocación tienen interés en la investigación clínica, en epidemiología, dando información sobre factores de riesgo para la enfermedad, y en la determinación de la eficacia de las intervenciones terapéuticas.

### 3. VALORACIÓN DE LA INFLAMACIÓN BRONQUIAL MEDIANTE MÉTODOS NO INVASORES. ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO.

#### 3.1.- INTRODUCCIÓN

Los componentes del fenotipo asmático son tres<sup>99,174</sup>: obstrucción de la vía aérea intermitente y reversible, hiperrespuesta de ésta frente a estímulos constrictores, e inflamación con infiltrado de células inflamatorias como eosinófilos, linfocitos, macrófagos. Estas células contribuyen a los cambios fisiológicos del asma mediante la liberación de mediadores químicos, citocinas y quimiocinas.

En los últimos años se ha pasado de una definición de asma basada en la clínica y caracterizada por sibilancias, tos y dificultad respiratoria a valorar más su patogenia<sup>139,175,176</sup>. Sin embargo, esto nos abre múltiples interrogantes sobre los mecanismos básicos del asma, la importancia y la medida de la inflamación bronquial, la relación entre inflamación y remodelado de la vía aérea, la relación entre hiperrespuesta bronquial, inflamación y grado de actividad del asma, etc.

Se han estudiado diversos métodos para determinar la inflamación bronquial<sup>176,177</sup>. Se han estudiado marcadores en diversos fluidos biológicos: sangre periférica y orina, esputo, aire espirado y condensado del aire espirado. Estos marcadores deberían cumplir de forma ideal las siguientes condiciones:

- El marcador es liberado por células asociadas a la inflamación de las vías aéreas.
- La medida debe ser sensible, específica y repetitiva y a ser posible no tiene que modificarse por el procedimiento de extracción de la muestra.
- La medida debe ser no invasora, segura e instantánea.
- No se debe liberar en otras enfermedades.
- El marcador se libera durante las pruebas de broncoprovocación en los sujetos asmáticos.
- Los niveles aumentan en los pacientes con asma crónica.
- Los niveles se correlacionan con la gravedad de la enfermedad.
- Los niveles disminuyen con un tratamiento antiinflamatorio eficaz.
- El aumento del marcador debería ocurrir preferentemente antes, que después de la exacerbación.

El óxido nítrico exhalado ( $F_{E}NO$ ; fracción espirada de óxido nítrico) es un marcador en el que se cumplen muchos de estos requisitos siendo por tanto potencialmente un buen marcador de la inflamación bronquial.

El óxido nítrico (NO) es una molécula simple y muy difusible<sup>178</sup>, que en 1992 fue nominada como “molécula del año”<sup>179</sup>. Primero se demostró su existencia en la circulación sistémica y pulmonar comprobándose que era el “factor relajante del

endotelio. En 1991, se demostró la existencia de NO en el aire exhalado en humanos y animales, mediante estudios de quimioluminiscencia. Desde entonces se han publicado un número muy elevado de trabajos en adultos y también en niños sobre la determinación, utilidades, etc. de la medición de la  $F_{E}NO$ , así como recomendaciones de la American Thoracic Society<sup>25</sup> y de la European Respiratory Society<sup>180</sup> (1999 y 2002) para consensuar la medición de la  $F_{E}NO$  en niños, sobre todo en los más pequeños.

El aumento en la producción y concentración del NO en el árbol bronquial de los pacientes con asma es un hecho evidente en toda la literatura publicada. Sin embargo, en los estudios se observa una variabilidad importante en los valores, tanto en sujetos normales como asmáticos, debido a la falta de una técnica estándar. Las directrices de la European Respiratory Society y de la American Thoracic Society coinciden en que los dos factores principales que influyen en la metodología de la medición de la  $F_{E}NO$  son: la posibilidad de contaminación por aire ambiental o nasal y la variabilidad originada por los distintos flujos del aire exhalado<sup>25,180</sup>.

Se pueden utilizar diversos métodos para medir la  $F_{E}NO$ , y la selección del más adecuado dependerá principalmente de la edad y del grado de cooperación del niño.

### **3.2.- FISIOPATOLOGÍA**

El NO es una molécula de señalización intercelular que participa en la regulación de una amplia variedad de funciones respiratorias, teniendo especial importancia en varias enfermedades<sup>181</sup>.

El NO endógeno se forma a partir del aminoácido L-arginina mediante la acción del enzima NO-sintasa (NOS), de la que se han caracterizado dos isoformas constitutivas (cNOS) y una forma inducible. Las isoformas constitutivas son la NOS neuronal (nNOS, NOS1), que se expresa predominantemente en las neuronas, y la NOS endotelial (eNOS, NOS3), que se expresa fundamentalmente en el endotelio.

Las isoformas constitutivas son calcio dependientes y producen pequeñas cantidades (fisiológicas) de NO en respuesta a agonistas que aumentan el calcio intracelular.

La síntesis de NO a partir de NOS inducible (iNOS, NOS2), puede ser estimulada por la acción de citocinas proinflamatorias y de endotoxinas. La NOS2 es calcio independiente, puede producir grandes cantidades de NO y es bloqueada por los corticoides, que no afectan a las isoformas constitutivas (cNOS).

Hay algunos aspectos bioquímicos, moleculares, celulares, anatómicos y genéticos del NO que son relevantes en la interpretación de las mediciones realizadas en niños y que presentaremos brevemente a continuación:

- a) Origen celular del NO. Las células epiteliales de las vías aéreas, pueden expresar todas las isoformas de la NOS y por tanto contribuyen al NO de las vías respiratorias inferiores. Además, en las enfermedades inflamatorias como el asma, el incremento de  $F_{E}NO$  puede reflejar la inducción de la NOS2 por las citocinas proinflamatorias, y ésta puede expresarse también en otros tipos de células (macrófagos, eosinófilos y otras células inflamatorias)<sup>182</sup>.
- b) Localización anatómica de la síntesis de NO. Las vías aéreas superiores (cavidad nasal y senos) producen gran cantidad de NO observándose la máxima concentración en los senos paranasales (3.000 ppb), muy superior al espirado por la boca. Por tanto las vías aéreas superiores contribuyen grandemente en sujetos sanos al NO exhalado. El tracto inferior también contribuye, en forma sustancial al NO exhalado. En pacientes asmáticos se ha observado mediante la realización de bronoscopias flexibles un aumento del NO en la tráquea y en los bronquios principales similar al registrado en la boca, lo que indica que los niveles elevados en el asma proceden de las vías aéreas inferiores.
- c) Papel biológico del NO exhalado. Las concentraciones de NO en el aire espirado son demasiado bajas para ser de relevancia fisiológica, dada la exposición continua a la hemoglobina sanguínea capilar que se une al NO y lo inactiva. Sin embargo, la activación de la NOS no produce únicamente NO sino también una variedad de óxidos de nitrógeno tales como nitratos, nitritos, y peroxinitritos que dependiendo de las concentraciones y la situación oxidoreductora ambiental pueden ser citoprotectores o citotóxicos. También se forman S-nitrosotioles (SNOs), que se almacenan y pueden realizar algunas de las actividades biológicas del NO tales como broncodilatación, motilidad ciliar, efectos antimicrobianos y efectos de hidratación de las vías aéreas.

En los pulmones el NO endógeno tiene las siguientes funciones<sup>183</sup>:

- Broncodilatador discreto
- Vasodilatador potente
- Neurotransmisor del sistema no adrenérgico no colinérgico (NANC), regulando la broncoconstricción colinérgica.
- Antimicrobiano (acción citostática y bactericida).
- Modulador de la diferenciación celular: Concentraciones altas de NO favorecen la inhibición de la diferenciación de las células CD4+ T helper en Th1

(productoras de IL-2 e interferon-gamma) y el aumento de Th2 (secretoras de IL-4 e IL-5 que favorecen la producción de IgE, adhesión y acúmulo de eosinófilos). Así pues, el incremento local de NO favorece la existencia de un patrón celular y de mediadores de inflamación similar al encontrado en asmáticos, tanto atópicos como no atópicos.

- Amplificador de la inflamación de la vía aérea: el NO favorece el aumento del edema, la exudación plasmática y el despegamiento epitelial bronquial<sup>184</sup>.

- d) Genética de la vía de síntesis del NO en el asma. Hay evidencias de que la NOS neuronal (NOS1) está involucrado en la genética del asma. El gen de la NOS1 está localizado en el cromosoma 12. Variantes dentro de este gen parece que están asociadas a una mayor frecuencia de asma y a unos niveles más elevados de F<sub>E</sub>NO. Estos datos sugieren que la variabilidad del F<sub>E</sub>NO puede ser explicada parcialmente por una predisposición genética<sup>180</sup>.

Por último, cabe mencionar que, la producción de NO en las vías aéreas y la influencia de los diferentes factores sobre su determinación en el aire exhalado pueden explicarse utilizando un modelo bicompartimental<sup>185</sup>. El primer compartimiento es el alveolar y el segundo el bronquial. Durante la espiración el aire alveolar es transportado a través de las vías aéreas y enriquecido por el NO que difunde desde la pared de las mismas. La difusión depende de la concentración de NO en la pared bronquial, y disminuye cuando la pared bronquial está engrosada o cuando disminuye la superficie de difusión (con la broncoconstricción). La difusión aumenta con un incremento de superficie (en la inflamación del asma) y disminuye con un flujo alto.

En las vías aéreas más distales las concentraciones pueden ser muy bajas, del orden de 5 ppb, dada la avidéz de la hemoglobina por el NO<sup>186-188</sup>.

Trabajos recientes<sup>189</sup> sugieren que midiendo el F<sub>E</sub>NO a distintos flujos sería posible diferenciar la contribución alveolar y la de la vía aérea. Se sabe que con flujos bajos, se obtienen valores mayores de F<sub>E</sub>NO, quizás debido al mayor contacto del aire espirado con el epitelio bronquial, por el contrario, cuando el flujo es rápido, tendremos menores concentraciones de F<sub>E</sub>NO. Parecería que el tiempo de inhalación, también podría influir, pero se ha visto que no es así<sup>190</sup>.

### **3.3.- RECOMENDACIONES PARA LA MEDICIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO EN LOS NIÑOS**

#### **3.3.1.- Características generales en la medición de óxido nítrico exhalado**

El NO es el marcador de inflamación más estudiado en aire espirado. Es un gas que está presente en el aire exhalado y puede medirse mediante quimioluminiscencia. Esta técnica se basa en la reacción del NO con el ozono que genera NO<sub>2</sub>, el cual al estabilizarse emite una radiación lumínica proporcional a la concentración de NO en el aire espirado.

La estandarización en los últimos años de la medición del NO, por la American Thoracic Society y la European Respiratory Society, tanto en adultos como en niños<sup>25,26,180</sup>, permite que la técnica sea más fiable.

Hay tres métodos principales para medir el NO: la técnica de la respiración única a flujo constante, medido on-line (en tiempo real) o off-line (medido con posterioridad a la recogida de la muestra) y el método de recogida del aire a volumen corriente, medida que puede realizarse on-line y off-line<sup>191</sup> (tabla 12).

En el método de respiración única a flujo constante on-line, el gas exhalado se recoge a un flujo fijo a través de una conexión lateral del circuito espiratorio, directamente en el aparato de quimioluminiscencia, realizando la medición en tiempo real. El flujo espiratorio recomendado varía según la normativa: inicialmente se recomendaban flujos de 167 a 250 ml/seg (10-15 ml/min), que en las últimas normativas se han reducido a 50 ml/seg<sup>180</sup>. Esta diferencia es importante dado que a mayor flujo, menor valor de F<sub>E</sub>NO. Existen evidencias fisiológicas que sugieren que a este flujo el F<sub>E</sub>NO deriva principalmente de la difusión del NO en las vías aéreas. Ya que el asma es una enfermedad de las vías aéreas, estos flujos bajos pueden ser más discriminantes entre los sujetos y más sensibles a los cambios temporales<sup>180</sup>.

Esta técnica requiere la colaboración del individuo y por tanto es difícil de practicar en niños pequeños, salvo si se realiza con sedación y chaquetilla de compresión torácica<sup>192</sup>.

En el método off-line, se recoge el aire exhalado en una bolsa de material inerte y se analiza con posterioridad.

**Tabla 12.** Métodos para la determinación de la fracción exhalada de óxido nítrico en niños<sup>180</sup>.

Edad (años)	Respiración única on-line	Respiración única Flujo controlado off-line	Respiración espontánea Flujo controlado on-line	Respiración única o espontánea Flujo no controlado on-line o off-line	Respiración única Exhalación forzada on-line
5 - 16	+	+			
2 - 5			+	+	
< 2				+	+ (*)

(\*) Se requiere sedación y la técnica de compresión tóraco abdominal

### **3.3.2.- Métodos utilizados en la determinación del óxido nítrico exhalado en la infancia**

#### **3.3.2.1.- Respiración única on-line (exhalación lenta a flujo controlado)**

La American Thoracic Society, en 1999 estableció unas recomendaciones para la determinación de la  $F_{E}NO$  en niños escolares, on-line<sup>25</sup>. De forma resumida, el niño debe sentarse confortablemente y respirar de forma normal y tranquila durante 5 minutos para aclimatarse. El gas ambiental debe ser bajo en NO (< 5 ppb). El niño tiene que inhalar a capacidad pulmonar total para luego exhalar inmediatamente, sin apnea intermedia, a flujo constante (50 ml/s), contra una presión de 5 a 20 cm H<sub>2</sub>O para cerrar el velo del paladar hasta conseguir una meseta de  $\geq 2$  s durante una exhalación de  $\geq 4$  s. Se deben hacer tres determinaciones cuyos resultados varíen < 10% o dos con variación del 5% y se debe registrar la media de las determinaciones de  $F_{E}NO$ .

Esta es considerada la técnica de referencia para la determinación de la  $F_{E}NO$ , ya que usa un flujo constante y bajo, excluye la contaminación nasal, realiza la exhalación desde la capacidad pulmonar total (volumen fácilmente estandarizable; los valores medidos a capacidad residual funcional son un 20% menores) y es on-line lo que permite la selección de las buenas exhalaciones.

Sin embargo, es una técnica difícil de realizar en niños preescolares ya que no quieren o no pueden colaborar, con la inhalación hasta capacidad pulmonar total y la exhalación posterior con un flujo y una presión determinada, y durante un tiempo suficiente como para llegar a la meseta. Baraldi y cols.<sup>193</sup> y Jobsis y cols.<sup>194</sup> encontraron que un 50 y 30% de los niños  $\geq$  a 4 años respectivamente, no podían realizar correctamente esta técnica.

Para intentar evitar estos problemas se ha trabajado en sistemas que facilitasen<sup>180</sup> la técnica, como métodos audiovisuales, personal entrenado y restrictores de flujo dinámicos manuales o automáticos<sup>195,196</sup>. Con estos métodos mejora mucho el cumplimiento en niños de estas edades, aunque en los menores, es difícil resolver el problema de falta de cooperación.

Hay una experiencia limitada en lactantes con esta técnica. Se ha utilizado una modificación aprovechando la realización de las maniobras de compresión tóraco abdominal rápida para la determinación del flujo máximo a capacidad residual funcional<sup>192</sup>, midiendo la  $F_{E}NO$  durante una exhalación forzada. Requiere sedación. No está claro como comparar esta técnica con niños de su edad con determinaciones realizadas a volumen corriente o con niños mayores (con determinaciones mediante respiración única on-line).

### **3.3.2.2.- Determinación on-line durante respiración espontánea**

Se utiliza en niños de 2 a 5 años, sin requerir sedación.

Se determina la  $F_{E}NO$  durante la respiración espontánea mientras el flujo exhalado se ajusta a 50 ml/seg al ir cambiando las resistencias exhalatorias<sup>195</sup>. Se registra el valor de  $F_{E}NO$  en el momento del ciclo respiratorio espontáneo en que el flujo espiratorio coincide con 50 ml/seg.

Este método tiene limitaciones: requiere cooperación pasiva para realizar una respiración pausada y regular a través de la pieza bucal, no controla el volumen pulmonar desde el que se realiza la medición (y por tanto no se puede estandarizar a todos los niños el mismo volumen inicial), y el tiempo de exhalación puede ser variable. Por tanto es precisa una caracterización del método diferente a la del método de la respiración única on -line, incluyendo la definición de valores normales en niños sanos.

### **3.3.2.3.- Determinación off-line (en una bolsa inerte para el NO) con flujo variable o constante**

- Espiración única a flujo variable en un reservorio inerte para el NO (bolsas Mylar o Tedlar). Hay que evitar la contaminación nasal aplicando una resistencia y la contaminación ambiental. Es una técnica simple y útil a nivel epidemiológico ya que permite determinaciones a distancia. Tiene buena reproducibilidad. Su principal problema es que no controla el flujo.

- Espiración única a flujo constante en un reservorio. Sería el método off-line de elección ya que la estandarización del flujo como se ha visto en niños mayores<sup>197</sup>, mejora mucho la reproducibilidad y fiabilidad de la determinación de la  $F_{E}NO$  off-line. Primero se realizó con la ayuda de métodos audiovisuales, y actualmente con el empleo de reductores de flujo dinámicos en el sistema de recolección. Se ha visto que esta técnica es factible hasta en niños de 3-4 años<sup>198</sup>.

- Respiración a volumen corriente: El niño va respirando a través de una pieza bucal o a través de una mascarilla en un aparato (que tiene un sistema valvular para evitar el reflujo del aire) que lleva conectada una bolsa Mylar. El niño respira primero aire libre de NO, para luego conectarlo a la bolsa de forma que ésta se irá llenando gradualmente. La ventaja mayor es que no precisa cooperación y por tanto se puede realizar desde la época neonatal. Se debe evitar la contaminación nasal y ambiental.

Resumiendo, en *lactantes* se han utilizado para la medición del  $F_{E}NO$  determinaciones a volumen corriente on y off line y determinaciones tipo respiración única on-line aprovechando la técnica de compresión rápida tóraco abdominal<sup>192,199,200</sup>.

### **3.3.2.4.- Medición on-line versus off-line en niños**

La medición off-line ofrece:

- La posibilidad de recolección de muestras lejos del aparato analizador.
- Independencia del tiempo de respuesta del aparato.
- Ahorro de tiempo y un uso más eficaz del analizador.

Sin embargo, la medición off-line tiene algunas posibles desventajas:

- Contaminación con gas no derivado de la vía aérea baja.
- Error por el almacenamiento de la muestra.
- No disponibilidad del bio-feedback inmediato.
- Posible contaminación por inhalación previa de aire atmosférico o nasal rico en NO. Este problema se evita haciendo respirar a través de un filtro de aire bajo en NO antes de recoger el aire exhalado y aplicando una presión que cierre el paladar blando y aisle las fosas nasales de la cavidad bucal. Además se debería utilizar una mascarilla que cubriese solo la boca o con un tabique nasal que permitiese medir solo el aire exhalado por la boca<sup>199</sup>.

### **3.3.3.- Factores que pueden influir en la determinación de óxido nítrico exhalado**

#### **3.3.3.1.- Factores del paciente**

- Edad, sexo: En los estudios realizados en niños en edad escolar e ha visto que la edad, el sexo, la talla o el peso no afectan la  $F_{E}NO$ <sup>201</sup>.
- Maniobras respiratorias (velocidad de flujo en la exhalación lenta).
- Calibre de la vía aérea
- Ingesta de algunos alimentos o bebidas.
- Ritmo circadiano (por lo que se recomienda realizar todas las pruebas en el mismo horario).
- El ejercicio físico, puede disminuir la  $F_{E}NO$  por incremento del flujo<sup>202</sup>. Por otro lado, hay trabajos interesantes que muestran que la  $F_{E}NO$  basal ayuda a predecir la broncoconstricción posterior al ejercicio<sup>203</sup>.
- Infecciones de vías respiratorias altas y bajas<sup>204</sup>, pueden llevar a niveles de  $F_{E}NO$  elevados.
- Tóxicos: las personas expuestas al tabaco, también de forma pasiva, presentan una menor  $F_{E}NO$ , quizás por el feedback negativo originado por la alta concentración de NO inhalado del tabaco.
- Ingesta de medicamentos: los corticoides tal y como se ha visto ampliamente en la literatura disminuyen la  $F_{E}NO$ <sup>205 206</sup>.

### **3.3.3.2.- Factores generales**

- Procedencia del NO: La formación de NO como hemos visto es muy superior en las vías respiratorias altas que en las bajas. El NO de la pared gástrica no contamina la determinación. Por tanto la contaminación nasal es muy importante, pero mediante técnicas adecuadas es posible evitarla.
- NO en el aire ambiental: puede influir sobre todo en la recogida a volumen corriente donde la contribución del espacio muerto es mayor. Sin embargo, el empleo de técnicas de exhalación contra resistencia y la rápida captación del NO ambiental por la Hb del lecho capilar pulmonar evitan que el NO ambiental afecte la lectura de la  $F_{E}NO$ . El empleo de aire libre de NO será imprescindible en las técnicas off-line (para realizar un lavado previo).
- Flujo espiratorio elevado, puede dar un descenso de la  $F_{E}NO$ . Como hemos comentado, actualmente se aconseja un flujo de  $50 \text{ ml /s}^{207}$ .
- Apnea: origina acumulación de NO procedente de la cavidad nasal, es causa de los picos iniciales en la determinación on-line.

### **3.3.4.- Características del equipo de medición de óxido nítrico**

Los analizadores de óxido nítrico utilizan el principio de quimioluminiscencia. Esta técnica se basa en la reacción del NO con el ozono que genera  $NO_2$ , el cual al estabilizarse emite una radiación lumínica proporcional a la concentración de NO en el aire espirado.

La American Thoracic Society describió una serie de especificaciones básicas para la medición de la  $F_{E}NO^{25}$  (Tabla 13).

**Tabla 13.** Especificaciones básicas para la medición de la  $F_E\text{NO}^{25}$

---

<b>Parámetros</b>	<b>Valores</b>
Sensibilidad	1 ppb
Ratio señal/ ruido	> 2
Eficacia	Mejor de 1 ppb
Rango	1-500 ppm
Tiempo de respuesta	< 500 ms
Lapso de espera	A ser medido por el investigador
Drift	< 1 % / 24h
Reproducibilidad	Mejor que 1 ppb

---

### **3.4.- UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO**

#### **3.4.1.- Ayuda en el diagnóstico del asma**

Recientemente se han publicado datos a este respecto en niños y adultos que muestran que la determinación de óxido nítrico exhalado puede ser de ayuda en el diagnóstico de asma:

Chatkin y cols. mostraron que la  $F_{E}NO$  era capaz de distinguir pacientes asmáticos entre un grupo de pacientes con tos crónica con una sensibilidad del 75% y especificidad del 85%<sup>208</sup>.

En pacientes adultos un punto de corte de NO exhalado de 16 ppb mostró una especificidad elevada para el diagnóstico de asma (90%), aunque una baja sensibilidad (69%), y con un punto de corte de 13 ppb se obtuvo una sensibilidad del 85% y una especificidad del 80%<sup>209</sup>.

Malmberg y cols. en un grupo de niños de 3 a 7 años observaron que con un punto de corte de 9,6 ppb la sensibilidad para el diagnóstico de asma era del 86% y la especificidad del 92%, para distinguir el niño enfermo del control sano<sup>210</sup>.

En los asmáticos no tratados se observan niveles elevados de  $F_{E}NO$ . Desde que se utiliza en niños más mayores la técnica estandarizada on-line con flujos de 50 ml/seg, la prueba es más discriminante, no observándose la superposición que existía en estudios previos entre pacientes e individuos sanos<sup>194,203</sup>.

#### **3.4.2.- Ayuda en la caracterización de la enfermedad**

Se cree que la  $F_{E}NO$  podría diferenciar de forma no invasora los diferentes fenotipos de asma (con predominio eosinofílico o neutrofílico). Hay varios estudios en pacientes con asma que examinan la relación entre  $F_{E}NO$  e inflamación bronquial medida directamente por esputo inducido, lavado broncoalveolar, y biopsia endobronquial, y sugieren que el aumento de la  $F_{E}NO$  reflejaría la inflamación eosinofílica de la vía aérea<sup>211,212</sup>.

En pacientes alérgicos asmáticos, incrementos en la  $F_{E}NO$  se asocian a mayor exposición al alérgeno. Asimismo se asocian a la positividad de la prueba broncodilatadora y de las pruebas de provocación directas e indirectas. La elevación de la  $F_{E}NO$  parece asociada a mecanismos subyacentes que relacionarían atopia e hiperreactividad bronquial, pero no necesariamente clínica respiratoria<sup>213</sup>.

Un tema aún en estudio es porqué hay diferencia en la  $F_{E}NO$  entre asmáticos atópicos y no atópicos, estando claro que los niveles aún se elevan más si los niños además presentan clínica (sibilantes, hiperrespuesta bronquial).

En el estudio longitudinal de Jones y cols., la medición de la  $F_{E}NO$  fue tan eficaz como la determinación de eosinófilos en esputo o las pruebas de broncoprovocación para predecir la pérdida del control del asma, con la ventaja de que la  $F_{E}NO$  es una técnica mucho más fácil y rápida<sup>214</sup>.

### **3.4.3.- Monitorización de la enfermedad**

Los niveles de NO exhalado tienen utilidad para monitorizar el efecto del tratamiento antiinflamatorio y la aparición de exacerbaciones. En pacientes en los que se disminuye la dosis de corticoides inhalados, los niveles de NO pueden aumentar antes de que ocurran cambios en otros parámetros, tales como la función pulmonar o el número de eosinófilos en el esputo, y por lo tanto pueden servir como un aviso precoz de una pérdida de control del asma<sup>215</sup>.

### **3.4.4.- Monitorización del tratamiento**

Se ha demostrado que la  $F_{E}NO$  es muy sensible al tratamiento antiinflamatorio. La medida de la  $F_{E}NO$  puede ayudar a constatar que la inflamación está controlada con el tratamiento dado al paciente.

Los niveles de NO exhalado no se afectan por la administración de  $\beta$ -agonistas de acción corta ni prolongada, lo que concuerda con la idea de que estos agentes no tienen influencia sobre la inflamación crónica del asma<sup>215</sup>. El tratamiento con nedocromil tampoco disminuye los niveles de NO exhalado<sup>216</sup>.

El montelukast disminuye en un 15-30% los niveles de NO exhalado en niños con asma<sup>217</sup>.

Los niveles de NO son muy sensibles al tratamiento con corticoides. Pueden disminuir de forma significativa incluso 6 horas después del tratamiento con un corticoide nebulizado, y 2-3 días después del uso de corticoides inhalados, obteniéndose un efecto máximo después de 2-4 semanas de tratamiento<sup>215</sup>.

Cobos y cols.<sup>178</sup> y también otros grupos<sup>218</sup> han observado como los valores de  $F_{E}NO$  se normalizan al emplear corticoides inhalados en niños afectados de asma leve o moderada que en fase intercrisis tenían niveles superiores a lo normal. Asimismo, en las crisis agudas de asma tiene lugar un incremento de  $F_{E}NO$  que disminuye o se normaliza tras la administración de corticoides orales<sup>199,206,219</sup>.

Al interrumpir el tratamiento con corticoides inhalados, incluso en pacientes que los han tomado hasta 4 años, se produce un aumento de los niveles de NO exhalado<sup>216</sup>. Esto parece indicar que los corticoides inhalados no producen un efecto inhibitorio sostenido sobre la producción de NO. También sugiere que la monitorización de los niveles de NO exhalado en los pacientes que toman corticoides inhalados puede servir como parámetro de valoración del cumplimiento del tratamiento<sup>220</sup>.

Al determinar la F<sub>E</sub>NO en niños con asma grave persistente de difícil control incluso en tratamiento con corticoides inhalados y / o orales, se ha visto que había un subgrupo que a pesar del tratamiento, mantenían la F<sub>E</sub>NO elevada. Estos resultados podrían orientar a la utilización de tratamientos alternativos en estos casos ya que parece son resistentes o insensibles al tratamiento corticoideo<sup>221</sup>.

Estudios comparativos con otras técnicas que miden el grado de inflamación, como los eosinófilos en esputo, muestran que quizás el F<sub>E</sub>NO sea demasiado sensible al tratamiento con corticoides ya que se normaliza éste más precozmente que los eosinófilos en el esputo<sup>209</sup>. Mientras que con el empleo de corticoides inhalados a dosis bajas se puede conseguir un control de los síntomas de asma y una disminución de los niveles de NO exhalado, la disminución de los eosinófilos en esputo, con un control similar de los síntomas puede necesitar dosis mayores de corticoides inhalados, lo que sugiere que los niveles de NO pueden ser demasiado sensibles al tratamiento con corticoides para determinar que la inflamación está totalmente controlada.

No está claro si los niveles de NO son útiles para indicar un cambio de tratamiento en los pacientes con asma. Datos recientes indican que un valor de NO superior a 13 ppb puede tener una sensibilidad de 0,67 y una especificidad de 0,65 para predecir la evolución del paciente y por tanto inducir a un cambio en el tratamiento inhalado<sup>222</sup>.

Covar y cols. en un estudio reciente sobre la relación entre F<sub>E</sub>NO y la medida de la actividad de la enfermedad entre niños con asma leve a moderada, con mínima o nula afectación de la función pulmonar, concluyen que la F<sub>E</sub>NO sería una buena herramienta para asesorar al pediatra en el control del asma y de la respuesta a la medicación<sup>216</sup>.

También Lierl y cols. han estudiado el valor de la F<sub>E</sub>NO en el manejo y tratamiento del niño asmático<sup>205</sup>.

La monitorización del NO puede ser útil en pacientes que toman tratamiento combinado con  $\beta$ -agonistas y corticoides inhalados, para asegurar que la inflamación está controlada, ya que puede ser difícil valorarla en base a la evolución de los síntomas, al estar usando un  $\beta$ -agonista de acción prolongada<sup>218</sup>.

### **3.4.5.- Valoración de los preescolares y lactantes con sibilancias**

Recientemente se ha descrito también la medida del óxido nítrico exhalado en niños entre 3 y 24 meses de edad durante la realización de estudios de función pulmonar con la técnica de la espiración forzada con presión positiva. Los lactantes con episodios de sibilancias y los que tenían una historia familiar de atopia presentaron niveles más elevados que los lactantes normales<sup>192</sup>. Se han puesto a punto también métodos para la determinación del NO exhalado recogiendo el aire de la respiración a volumen corriente de niños pequeños. Utilizando esta metodología Baraldi y cols.<sup>199</sup> encontraron en niños con bronquitis de repetición un aumento del NO exhalado en las fases de agudización, y Avital y cols.<sup>223</sup> un aumento del NO en niños entre 2 y 7 años con asma bronquial en fase estable.

La importancia de estos estudios es la posibilidad de que pueda haber diferencias entre los lactantes con sibilancias debidas a infecciones víricas en los que NO exhalado no estaría elevado, y aquellos con sibilancias recurrentes en los que estaría elevado y disminuiría con el tratamiento con corticoides<sup>220</sup>.

### **3.5.- LIMITACIONES DE LA DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO**

Una de las limitaciones del empleo del NO exhalado como monitorización de los pacientes asmáticos es la falta de existencia de una curva dosis – respuesta adecuada con el empleo de corticoides inhalados de forma que algunos autores han observado un plateau en la respuesta del NO con 400 µg de budesonida<sup>224</sup>. Según estos autores en pacientes tratados con dosis moderadas o altas de corticoides inhalados existirían pocas diferencias en los valores de NO en contraste con diferencias más importantes desde el punto de vista clínico en cuanto a la gravedad del asma. Parece pues que el NO exhalado no refleja todos los cambios inflamatorios que se producen en los pacientes asmáticos. Otras limitaciones del NO exhalado en la monitorización de los pacientes asmáticos son<sup>205</sup>: los niveles de NO en los pacientes con asma no alérgico no están aumentados, la producción de NO puede aumentar transitoriamente en respuesta a infecciones víricas, por lo que no se debe determinar el NO inmediatamente tras una infección vírica, y finalmente existe una superposición de valores entre los controles normales y los pacientes asmáticos, pudiendo los asmáticos tener valores desde normales a muy elevados.

Hay otros factores que pueden modificar el valor de la  $F_{E}NO$ , como el tabaquismo que puede disminuirlo o las infecciones víricas que pueden aumentarlo. La rinitis alérgica, también lo eleva tanto en época polínica como en no polínica<sup>225</sup>.

Se podrían resumir de la siguiente forma las ventajas e inconvenientes de la determinación del óxido nítrico como marcador inflamatorio:

*Ventajas:*

- Bien estandarizada en niños > 4 años
- No invasora
- Repetible
- Instantánea

*Inconvenientes:*

- Limitada experiencia en niños < 4 años y lactantes
- Problemas metodológicos en este grupo etario cuando se determina a volumen corriente
- Actualmente precisa sedación para obtener un flujo espiratorio constante

### **3.6.- OTROS MARCADORES DE INFLAMACIÓN**

#### **3.6.1.- Marcadores en sangre y orina. Proteínas derivadas del eosinófilo**

En el asma se observa una elevación de eosinófilos en sangre, esputo y mucosa respiratoria. Los eosinófilos segregan principalmente cuatro sustancias : proteína catiónica eosinofílica, neurotoxina derivada del eosinófilo, proteína básica y peroxidasa del eosinófilo. La cuantificación de estos productos nos da más información que el mero conteo de eosinófilos, ya que nos indica la actividad de éstos<sup>226</sup>. Sin embargo, tienen una serie de limitaciones:

- Son determinaciones caras y precisan personal experimentado en su manejo y procesamiento.
- Los resultados hasta ahora no han sido concluyentes en el asma, ya que nos encontramos con superposición de valores entre niños sanos y asmáticos, tampoco diferencian entre asma intrínseca y extrínseca ni entre asma grave y leve- moderada. También se elevan en otros procesos alérgicos<sup>227</sup>.

Por otro lado, hay algunos estudios que señalan su posible papel predictor en el desarrollo de asma en la infancia. Observan que los niños que tienen valores de proteína catiónica eosinofílica superiores a 16 y 20  $\mu\text{g/l}$  respectivamente presentan mayor posibilidad de posteriores episodios de sibilancias<sup>228</sup>.

### **3.6.2.- Espujo inducido**

El examen del espujo proporciona un método directo de estudiar de forma no invasora la inflamación de las vías aéreas.

En 1992 se publicó el primer estudio de inducción del espujo en niños con asma, gracias a la utilización de suero salino hipertónico nebulizado ultrasónicamente para facilitar la producción del espujo<sup>229</sup>.

La administración de suero salino hipertónico constituye un estímulo broncoconstrictor por lo que se deben realizar mediciones repetidas de la función pulmonar y se tiene que inhalar previamente salbutamol para prevenir el broncoespasmo, a menos que se pretenda realizar de forma conjunta una prueba de broncoprovocación, midiendo en la misma prueba la hiperrespuesta bronquial y la inflamación de las vías aéreas<sup>230,231</sup>. La tasa de éxitos en la inducción del espujo en niños oscila entre el 60 y el 100%, y es menor si se realiza la prueba de broncoprovocación, que si se administra previamente salbutamol. El tratamiento previo con  $\beta$ -agonistas no altera el recuento celular<sup>230</sup>.

Se utilizan de forma sucesiva nebulizaciones de suero salino al 3%, 4% y 5%<sup>232</sup> o bien de suero salino al 3,5%<sup>138</sup> o 4,5%<sup>233</sup> durante tiempos crecientes.

El espujo es una mezcla variable de secreciones traqueobronquiales, saliva y suero salino hipertónico. Se han descrito dos técnicas básicas para procesarlo: La primera consiste en seleccionar todas las porciones viscosas de la muestra expectorada<sup>229</sup>, y la segunda en procesar toda la muestra, conteniendo espujo más saliva<sup>234</sup>. Con ambas técnicas se han obtenido resultados válidos y reproducibles, tanto de la composición de la fracción celular como de la fracción soluble del espujo inducido<sup>235</sup>, aunque la mayoría de estudios en niños han utilizado la primera técnica.

El estudio de más utilidad en el espujo es el recuento celular y fundamentalmente el del porcentaje de eosinófilos. La célula dominante en el espujo de niños normales es el macrófago, y el límite superior normal del porcentaje de eosinófilos es el 2,5%. La presencia de eosinófilos en el espujo se correlaciona con el porcentaje de los mismos en el aspirado bronquial y en el lavado broncoalveolar<sup>236</sup>. El espujo es una muestra de la luz bronquial, reflejando progresivamente de las vías aéreas centrales a las periféricas a medida que el tiempo de inducción es mayor. Por eso el porcentaje de eosinófilos en el espujo se correlaciona mejor con el lavado bronquial o el aspirado

bronquial, que con el número de eosinófilos en la biopsia bronquial. Se han estudiado también un conjunto muy amplio de marcadores solubles en el sobrenadante del esputo de pacientes asmáticos: citocinas, mediadores derivados del eosinófilo, neutrófilo y mastocito, moléculas de adhesión, derivados del óxido nítrico, etc<sup>235</sup>.

El hecho de tratarse de una técnica relativamente no invasora y que se puede repetir de una manera secuencial ha permitido avanzar en los conocimientos sobre la reacción inflamatoria que ocurre en el asma incluyendo lo que ocurre en los niños. Así los niños con asma estable presentan un aumento de eosinófilos (mediana 4,3%) y de células epiteliales (mediana 14%) comparado con los niños normales (medianas 0,3% y 1,5%), demostrando que los niños con asma presentan una inflamación eosinofílica y daño epitelial<sup>233</sup>. Además en este trabajo la inflamación se observaba incluso en los niños que recibiendo corticoides inhalados, tenían función pulmonar normal y un buen control sintomático de su enfermedad<sup>233</sup>.

En niños con crisis agudas de asma se observa un aumento importante del porcentaje de eosinófilos<sup>237</sup>

El grado de eosinofilia en el esputo se correlaciona con la gravedad del asma crónica en los niños, de forma que los niños con asma persistente presentan un porcentaje más elevado de eosinófilos, que los niños con asma frecuente episódico y estos a su vez que los niños con asma episódico infrecuente<sup>238</sup>. De esta forma, parece que el patrón clínico del asma se relaciona con el grado de inflamación de la vía aérea, lo que apoya el empleo de la valoración clínica de la frecuencia de episodios de sibilantes en los últimos 12 meses para determinar los requerimientos de tratamiento antiinflamatorio.

El tratamiento con corticoides disminuye el porcentaje de eosinófilos en el esputo. Un aspecto interesante de la respuesta del porcentaje de eosinófilos al tratamiento con corticoides inhalados es la existencia de una curva dosis respuesta en todos los intervalos de dosis desde 100 a 1600  $\mu\text{g}/\text{día}$ , mientras que con el óxido nítrico se observa una meseta a partir de 400  $\mu\text{g}/\text{día}$ <sup>224</sup>.

Otra utilidad de los marcadores en el esputo inducido es su ayuda en el diagnóstico de asma para lo que tienen una fiabilidad mayor que los marcadores séricos: Los pacientes con asma en comparación con el grupo control tienen un mayor porcentaje de eosinófilos en esputo, eosinófilos en sangre, y niveles mayores de proteína catiónica eosinofílica en esputo. El área bajo la curva ROC muestra que los eosinófilos en esputo (0,9) son significativamente mejores marcadores que los eosinófilos en sangre (0,72) y que la proteína catiónica eosinofílica sérica (0,67)<sup>239</sup>.

El estudio del esputo inducido ofrece unas perspectivas prometedoras en el manejo del asma. No obstante, se trata de un método costoso y que requiere tiempo, por lo

que hasta ahora se ha utilizado fundamentalmente en investigación y menos en la práctica clínica.

### **3.6.3.- Otros marcadores en el aire espirado. Monóxido de Carbono (CO)**

El monóxido de carbono (CO) es un gas que produce en el organismo y se puede detectar también en el aire exhalado. Hay tres fuentes principales del CO en el aire exhalado: degradación enzimática del hem, liberación no relacionada con el hem (peroxidación lipídica, xenobióticos, bacterias) y CO exógeno. Alrededor del 85% del CO endógeno procede de la degradación del hem por la hem oxigenasa. Existen dos formas de hem oxigenasa, una forma constitucional (HO-2) y una forma inducible (HO-1) de distribución ubicua y que se activa por citocinas pro inflamatorias, óxido nítrico, peróxido de hidrógeno, endotoxinas y oxidantes.

La técnica para la determinación del CO en el aire exhalado es similar a la empleada para la medición del NO utilizando en este caso un analizador de CO, que tiene la ventaja de ser portátil, más barato, y sencillo de manejar.

En el aire exhalado de los pacientes asmáticos se encuentran niveles elevados de CO, que reflejarían el grado de inducción de la HO-1, con niveles normales en pacientes tratados con corticoides inhalados<sup>240,241</sup>. También se han encontrado niveles elevados de CO en pacientes con asma grave, incluyendo pacientes tratados con corticoides orales<sup>242</sup>. Sin embargo, la diferencia entre los niveles de CO exhalado entre los pacientes asmáticos y los sanos es menor que para el NO, existiendo mayor superposición de valores<sup>243</sup>

En un estudio realizado en niños, los niveles de CO fueron más elevados en los niños con asma persistente que en los niños sanos y los niños con asma episódica ocasional. Los valores en estos dos últimos grupos no fueron significativamente diferentes<sup>243</sup>. El NO exhalado se comportó de forma diferente ya que estuvo elevado respecto a los controles sanos tanto en el grupo de niños con asma persistente, como en el grupo con asma episódica ocasional y no fue diferente entre los dos grupos de pacientes asmáticos, lo que sugiere que la medida del NO puede no distinguir entre niños asmáticos con distinto nivel de gravedad. La medida del CO podría ofrecer por tanto datos complementarios a los obtenidos con el NO. En este estudio también se apreció un inconveniente de la determinación de CO exhalado, al aumentar los niveles de forma importante en las infecciones respiratorias de vías altas, aunque los valores se normalizan en el periodo de recuperación<sup>243</sup>.

### **3.6.4.- Condensado del aire espirado**

Otro enfoque para analizar los mediadores de la inflamación en el asma es la medición de mediadores no volátiles en el condensado del aire espirado. El gas subglótico está saturado con agua. El condensado del vapor de agua del aire espirado se consigue enfriándolo. Se trata de un procedimiento totalmente no invasor, y que no está influenciado por el calibre de las vías aéreas. El procedimiento es muy bien tolerado incluso por pacientes con obstrucción grave de la vía aérea y por niños. Para recoger el condensado se hace respirar al paciente a través de una válvula que separa el aire inspirado del espirado. Se hace circular el aire espirado por un condensador que se enfría a 0°C con hielo, o a -20°C mediante un circuito refrigerado, lo que hace que se condense y pueda ser recogido. En general, se tardan unos 10 – 15 minutos en obtener 1-3 ml de condensado<sup>215</sup>. Es importante evitar la contaminación con saliva, y controlarla mediante la determinación de la concentración de amilasa en el condensado.

En el condensado se encuentran moléculas y sustancias derivadas de la cavidad oral, orofaringe, árbol traqueobronquial y alvéolos. La contribución proporcional de cada uno de estos orígenes no se conoce todavía. Se asume que a partir del líquido superficial de las vías aéreas se origina un aerosol con el flujo turbulento de aire, de forma que el contenido del condensado refleja la composición del líquido superficial de las vías aéreas<sup>215</sup>. Dado que hay una buena correlación entre los niveles de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en el líquido condensado y en el aire espirado<sup>244</sup>, es posible que las partículas de aerosol espiradas en la respiración reflejen la composición del líquido de recubrimiento extracelular broncoalveolar.

Mediante este procedimiento se han encontrado concentraciones elevadas en pacientes asmáticos de peróxido de hidrógeno, prostanoïdes (isoprostanos y leucotrienos), productos de la peroxidación lipídica, y nitritos y nitratos.



# **PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**



El asma es la enfermedad crónica infantil más frecuente, siendo la incidencia de cuadros bronquiales con sibilantes en niños menores de tres años muy elevada. El asma se caracteriza por la presencia de obstrucción bronquial reversible, hiperrespuesta bronquial e inflamación bronquial.

La demostración de estas características en los niños pequeños es difícil ya que no pueden realizar las pruebas de función pulmonar o provocación bronquial habituales, y para la mayoría de las pruebas aplicables en este grupo de edad se precisa sedar a los niños.

Dentro de los marcadores de inflamación bronquial, se ha visto en niños mayores y adultos, que el óxido nítrico exhalado constituye un marcador relativamente fácil de determinar, sensible, específico y reproducible.

Existen pocos estudios en niños pequeños, no colaboradores, con bronquitis sibilantes de repetición, que valoren la presencia de hiperrespuesta y de inflamación bronquial.

Basándonos en estas consideraciones, nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la respuesta bronquial normal a la metacolina en niños sanos menores de 4 años de edad, mediante el método de la auscultación traqueal modificado.
- 2) Estudiar la presencia de hiperrespuesta bronquial a la metacolina en niños menores de 4 años con bronquitis sibilantes de repetición, comparándola con la del grupo control.
- 3) Valorar la eficacia y seguridad del método de la auscultación traqueal modificado para medir la hiperrespuesta bronquial a la metacolina en niños menores de 4 años de edad, sin utilización de sedación.
- 4) Analizar las variables que pueden afectar esta hiperrespuesta bronquial.
- 5) Determinar los valores normales de óxido nítrico exhalado en niños sanos menores de 4 años de edad, mediante un método de recogida off-line, con respiración a volumen corriente.
- 6) Valorar la inflamación bronquial mediante la determinación de óxido nítrico exhalado en niños menores de 4 años de edad afectados de bronquitis sibilantes de repetición en fase intercrisis.
- 7) Analizar las variables que pueden influir en los niveles de óxido nítrico exhalado en estos niños.



# **PACIENTES Y MÉTODOS**



## **1. PACIENTES**

### **1.1. - GRUPO DE PACIENTES CON BRONQUITIS DE REPETICIÓN**

Para realizar el presente trabajo, se han seleccionado durante un periodo de dos años (2002 - 2003) niños afectados de bronquitis sibilantes de repetición, procedentes de la Unidad de Neumología Pediátrica y Fibrosis Quística del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.

#### **1.1.1. - Criterios de inclusión en el estudio**

El criterio básico establecido para la inclusión de un niño al estudio fue tener una edad comprendida entre 6 meses y 3 años y 11 meses de edad, y haber presentado tres o más episodios de bronquitis aguda sibilante, diagnosticadas por un médico, en el último año.

A los efectos de este estudio se entendió como bronquitis aguda sibilante: cuadros agudos de tos acompañados de sibilantes a la auscultación, con o sin signos de dificultad respiratoria, y en los que se había administrado tratamiento con un broncodilatador.

Durante las tres semanas previas al estudio, debían estar asintomáticos, sin crisis de bronquitis ni catarros de vías altas intercurrentes.

Durante el período de inclusión se admitió que hasta un tercio de los niños estuvieran recibiendo tratamiento de base con corticoides inhalados o antagonistas de los leucotrienos.

#### **1.1.2. - Criterios de exclusión**

Niños afectados de otras enfermedades pulmonares (fibrosis quística, displasia broncopulmonar), cardiopatías congénitas y prematuros al nacimiento.

### **1.2. - GRUPO CONTROL**

#### **1.2.1. - Criterios de inclusión.**

Se reclutó un grupo formado por niños sanos, sin enfermedades de base, con edades comprendidas entre los 6 meses y 3 años 11 meses, con los siguientes requisitos:

- No haber presentado ningún episodio de bronquitis aguda
- Ser hijos de padres no fumadores (no tabaquismo en la vivienda).

- No tener antecedentes familiares en primer grado (hermanos ni padres) de asma, dermatitis atópica, ni rinitis alérgica.
- Ser recién nacidos a término
- No presentar catarros de vías altas en las tres semanas previas a la prueba.

### **1.3 - Aspectos éticos**

La inclusión de los niños en el estudio se ha realizado previa información y consentimiento paterno y el estudio ha sido aprobado por el Comité de ética en investigación clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

La justificación ética del estudio se basa en el objetivo de mejorar el conocimiento de los factores que participan en la producción de las bronquitis sibilantes en los niños de 6 meses a 3 años de edad lo que puede ayudar a mejorar el manejo de una de las patologías más frecuentes en este grupo de edad. El estudio a realizar no comporta peligrosidad para los niños que serán incluidos. Las determinaciones a realizar no son invasoras y no precisan para su realización de sedación. Los datos de la literatura, incluyendo niños del grupo de edad a estudiar, confirman la seguridad de la prueba de provocación bronquial con metacolina no habiéndose publicado ningún efecto adverso importante y siendo sus posibles efectos inmediatamente retrogradados por los broncodilatadores  $\beta_2$  agonistas.

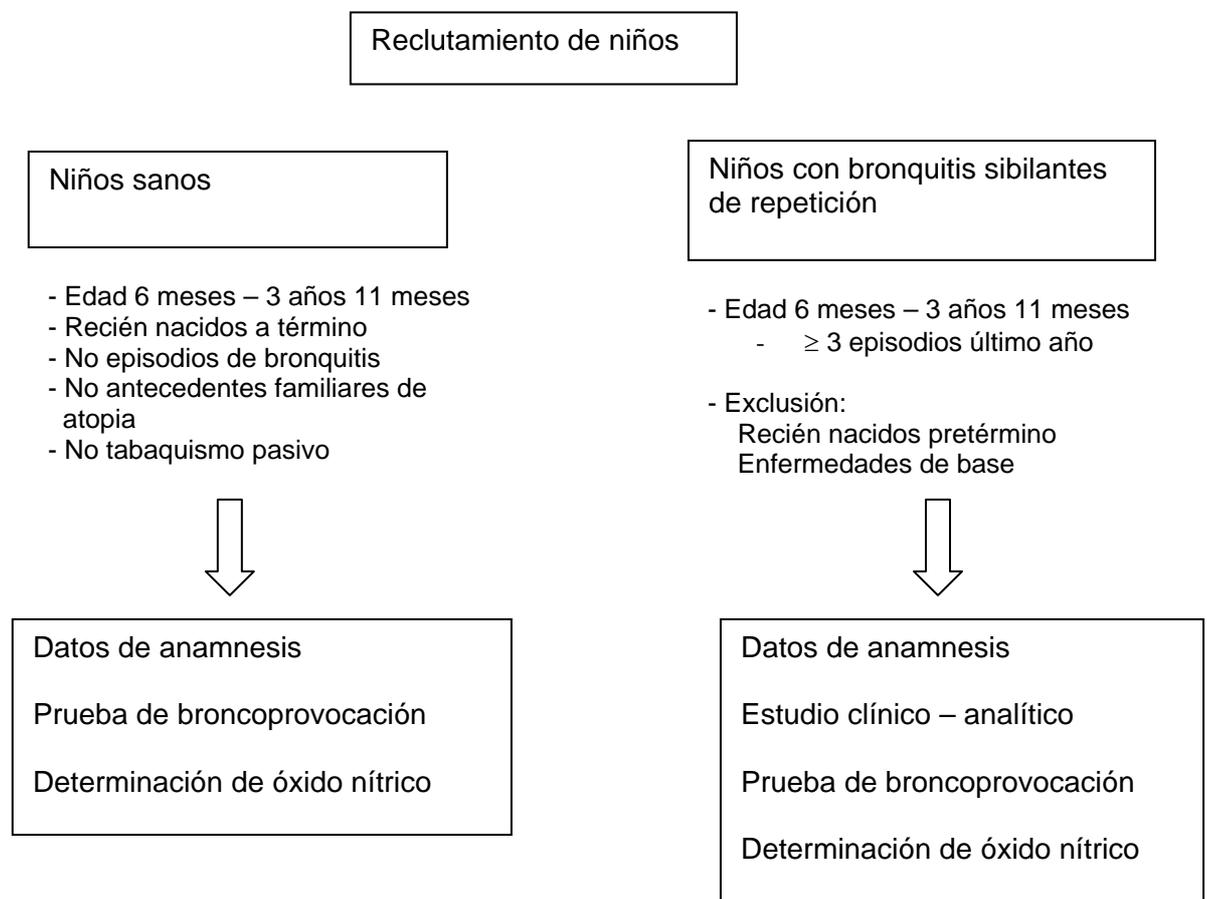
La realización del estudio no interfiere, en ningún momento, con las decisiones terapéuticas a realizar por los médicos encargados de la asistencia de los pacientes.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 . Diseño del estudio

Se ha realizado un estudio prospectivo, de tipo observacional.

El estudio incluyó la recogida de datos de anamnesis, el estudio clínico de los pacientes, la valoración de la hiperrespuesta bronquial mediante la prueba de metacolina, y la determinación de óxido nítrico exhalado.



### **2.1.1. - Recogida de datos de anamnesis en el grupo de pacientes:**

Se valoraron las siguientes características de los pacientes mediante la anamnesis:

- a) Edad
- b) Género
- c) Antecedentes familiares:
  - bronquitis, rinitis y dermatitis en familiares de primer grado (padres, hermanos)
  - bronquitis, rinitis y dermatitis en familiares de segundo grado (primos, tíos)
- d) Antecedentes personales:
  - Antecedentes perinatales
  - Madre fumadora en el embarazo
  - Padres fumadores
  - Peso al nacer
  - Edad gestacional
  - Tipo de lactancia materna o artificial, y duración de la lactancia materna
  - Asistencia a guardería
  - Número de hermanos
- e) Variables en relación con los episodios de bronquitis
  - Edad del primer episodio de bronquitis
  - Determinación de virus respiratorio sincitial en el episodio de bronquitis
  - Número de episodios en el último año
  - Tratamiento en el momento de la prueba

### **2.1.2 - Recogida de datos de anamnesis en el grupo control.**

En los niños del grupo control se recogieron en la anamnesis las mismas variables que en el grupo de pacientes relativas a edad, género, antecedentes familiares de segundo grado, y antecedentes personales (antecedentes perinatales, peso al nacer, edad gestacional, lactancia materna o artificial (meses de lactancia materna), asistencia a guardería (número de meses a los que acudió a la escuela), y número de hermanos.

### **2.1.3 - Protocolo de estudio clínico**

A los niños del grupo con bronquitis de repetición se les ha realizado el protocolo de estudio clínico siguiente, formando parte del estudio de su patología de base:

a) Determinaciones analíticas:

Se realizó un hemograma con recuento del número total de eosinófilos, y se determinaron las inmunoglobulinas A, G y M, la IgE total, y la IgE específica frente los siguientes neuroalergenos: dermatophagoides farinae, dermatophagoides pteronyssinus, caspa de gato, alternaria, parietaria y olivo

b) Pruebas cutáneas (Prick), frente a los neuroalergenos habituales en nuestro medio: ácaros, epitelio de perro y caspa de gato, olivo, parietaria, gramíneas, árboles.

c) Radiografía de tórax. Se realizó a todos los pacientes, si no se disponía de una previa, una radiografía de tórax para excluir cualquier patología distinta de la estudiada.

d) Se descartó la fibrosis quística mediante la comprobación de que la prueba de detección precoz neonatal (disponible en Cataluña desde septiembre de 1999) había sido negativa y en los casos en que no se había realizado se realizó el test del sudor.

#### **2.1.4 .- Valoración de la hiperrespuesta bronquial**

En los niños del grupo con bronquitis sibilante de repetición se realizó una prueba de provocación bronquial con metacolina, para valorar si presentan hiperrespuesta bronquial.

#### **2.1.5 .- Valoración de la inflamación bronquial eosinofílica**

En los niños del grupo con bronquitis sibilante de repetición se determinó el óxido nítrico exhalado (FE<sub>NO</sub>), como marcador de inflamación bronquial eosinofílica persistente, para valorar si los niños con bronquitis sibilantes de repetición, en situación estable, presentan un aumento del FE<sub>NO</sub>.

#### **2.1.6. - Determinación de valores normales**

En los niños del grupo control se determinó el óxido nítrico exhalado y se realizó una prueba de broncoprovocación con metacolina para establecer los patrones de normalidad y poderlos comparar con los grupos de estudio.

## **2.2. - DETERMINACIONES**

### **2.2.1. - Prueba de provocación bronquial con metacolina**

Se ha realizado una prueba de provocación bronquial con metacolina utilizando el método de la respiración a volumen corriente. En esta técnica el aerosol se genera con un nebulizador de flujo continuo, que el niño inhala respirando a volumen corriente durante un periodo de tiempo determinado<sup>165</sup>.

Dado que no existen unas recomendaciones oficiales para la realización de pruebas de provocación bronquial con metacolina en niños no colaboradores, hemos asumido las recomendaciones de la American Thoracic Society (ATS) para niños colaboradores y adultos para la realización de la prueba de broncoprovocación con metacolina<sup>153</sup>.

La valoración de la respuesta al estímulo con la metacolina se ha realizado mediante el método de la auscultación traqueal modificado<sup>17</sup>.

#### **2.2.1.1. - Preparación de las soluciones de metacolina**

La metacolina se comercializa en forma de polvo como cloruro de metacolina (Provocholine®, Methapharm inc., Brantford, Ontario). Se preparan soluciones de diferentes concentraciones empleando como diluyente cloruro sódico al 9%, no siendo aconsejable el uso de solución tampón pues se hidroliza rápidamente. La estabilidad de las soluciones preparadas a 4°C (guardada en nevera) es de tres semanas y no es reutilizable. La solución debe estar a temperatura ambiente 30 minutos antes de su uso.

Se han utilizado tres mililitros de solución nebulizados durante 2 minutos.

Las diferentes soluciones en concentraciones descendentes desde 16 mg/ml hasta 0,0625 mg/ml, fueron preparadas en el Servicio de Farmacia del Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, en cámara de flujo laminar, de acuerdo con el siguiente protocolo:

Solución A (16mg/ml):

100 mg de metacolina disueltos con 6,25 ml de diluyente

Solución B (8mg/ml):

3 ml de solución A + 3 ml de diluyente  
Solución C (4 mg/ml)  
3 ml de solución B + 3 ml de diluyente  
Solución D (2 mg/ml)  
3 ml de solución C + 3 ml de diluyente  
Solución E (1 mg/ml)  
3 ml de solución D + 3 ml de diluyente  
Solución F (0,5 mg/ml)  
3 ml de solución E + 3 ml de diluyente  
Solución G (0,25 mg/ml)  
3 ml de solución F + 3 ml de diluyente  
Solución H (0,125 mg/ml)  
3 ml de solución G + 3 ml de diluyente  
Solución I (0,0625 mg/ml)  
3 ml de solución H + 3 ml de diluyente

#### **2.2.1.2. - Protocolo de nebulización**

En el protocolo de la ATS se utilizan concentraciones crecientes de metacolina desde 0,031 mg/ml hasta 8 mg/ml, doblando la concentración de metacolina en cada ocasión. De esta forma resultan incluyendo la administración del disolvente un total de 10 nebulizaciones. Dada la dificultad práctica de utilizar este número elevado de nebulizaciones en los niños pequeños, se confeccionó un protocolo abreviado para el grupo de pacientes con bronquitis de repetición, cuadruplicando las dosis en las concentraciones inferiores (7 nebulizaciones), y uno más abreviado para el grupo de niños controles, que no estaban habituados a recibir medicación nebulizada, utilizando concentraciones a partir de 0,5 mg/ml (6 nebulizaciones).

**Tabla 14.** Protocolos utilizados para la realización de la prueba de provocación bronquial con metacolina.

Concentraciones de metacolina		
Protocolo American Thoracic Society	Protocolo reducido Grupo Bronquitis de repetición	Protocolo reducido Grupo Control
Disolvente	Disolvente	Disolvente
0,031 mg/mL		
0,0625 mg/mL	0,0625 mg/mL	
0,125 mg/mL		
0,250 mg/mL	0,250 mg/mL	
0,500 mg/mL		0,500 mg/mL
1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
2 mg/mL	2 mg/mL	2 mg/mL
4 mg/mL	4 mg/mL	4 mg/mL
8 mg/mL	8 mg/mL	8 mg/mL

### 2.2.1.3 - Nebulizador

Las diferentes soluciones de cloruro sódico y de metacolina se han administrado con un nebulizador y una mascarilla facial empleando como fuente de nebulización una botella de aire comprimido trabajando a 15 psi de presión (1 barr).

Se ha utilizado un nebulizador Micromist® (Hudson RCI, Temmeccula,Ca), que proporciona un diámetro de masa media aerodinámico entre 1 y 3,6 µm.

Se calibró el nebulizador para calcular el flujo de aire comprimido necesario para proporcionar un débito de 0,13 mL/min  $\pm$  10%, según del protocolo de la American Thoracic Society. El débito del aerosol indica la cantidad de aerosol disponible por unidad de tiempo para ser inhalado .

Para calcular el débito del nebulizador se realizó el siguiente procedimiento, siguiendo el protocolo de la American Thoracic Society (1999):

- 1) Introducción de 3 ml de suero salino fisiológico en el nebulizador.
- 2) Pesar el nebulizador usando una balanza de precisión (peso previo)
- 3) Ajustar el flujo a 4 L/min y nebulizar exactamente 2 minutos.

- 4) Pesar de nuevo el nebulizador (postpeso) y vaciarlo.
- 5) Repetir los pasos previos para los flujos de 3 y 5 L/min
- 6) Calcular el débito del nebulizador para cada uno de los flujos, asumiendo que 1 ml de suero fisiológico, pesa 1000 mg:

$$\text{Débito (ml/min)} = \left( \frac{\text{peso previo (mg)} - \text{peso final (mg)}}{\text{tiempo (minutos)}} \right) / 1.000$$

- 7) Por interpolación se determina el flujo que produzca un débito de 0,13 ml/min.

Con este procedimiento se hizo la calibración utilizando 3 nebulizadores de cada lote empleado. Se calculó que un flujo de 4 L/min producía un débito dentro del rango requerido (0,13 ml/min  $\pm$  10%).

#### **2.2.1.4 - Requisitos y precauciones para la realización de la prueba**

Para realizar la prueba de metacolina se debían cumplir los siguientes requisitos:

- No haber presentado un episodio de bronquitis ni un cuadro catarral de vías altas en las tres semanas anteriores.
- Saturación basal de oxígeno  $\geq$  95%.
- Auscultación respiratoria normal.
- Ausencia de taquipnea.

Se suspendieron antes de la prueba las medicaciones beta-agonistas, bromuro de ipratropio, cromonas, teofilina, antagonistas de los leucotrienos y los antihistamínicos según las recomendaciones de la ATS.

Es una contraindicación para la realización de la prueba la hipersensibilidad conocida a la metacolina, dato no conocido en este caso ya que en todos los niños era la primera vez que se realizaba la prueba.

Antes de la realización de la prueba se adoptaron las siguientes precauciones:

a) Anamnesis antes de iniciar la prueba. Preguntar sobre:

- Medicación que está tomando. Anotarla, y anotar el día y hora de la última dosis.
- Infecciones respiratorias acontecidas. Ver la fecha de la misma y la medicación que tomó.
- Posible embarazo materno. Esta prueba no hay indicios de que sea teratogénica, pero no hay ensayos clínicos al respecto, por tanto si la madre

está embarazada es mejor que haya junto al niño otro adulto, de forma que la madre no inhale la metacolina que desprende el nebulizador.

b) Exploración física del niño y determinación de la saturación de hemoglobina.

#### **2.2.1.5. - Valoración de la respuesta a la metacolina**

La respuesta a medir en la prueba de provocación bronquial es la obstrucción al flujo aéreo intrapulmonar.

En los niños colaboradores, capaces de hacer una espirometría forzada correcta y reproducible, la variable de elección es el FEV<sub>1</sub>, y el resultado se expresa como PC20 o PD20, que es la concentración o la dosis de metacolina que produce un descenso del 20% sobre el FEV<sub>1</sub> basal.

En los niños no colaboradores de nuestra muestra hemos utilizado como expresión de la obstrucción al flujo aéreo intrapulmonar la determinación de la denominada PCwheeze (PCw) descrita por Avital y cols.<sup>16</sup> y modificada posteriormente por el mismo grupo<sup>245</sup>.

Se trata de determinar mediante la auscultación traqueal la concentración de metacolina que provoca sibilancias. También se considera PCwheeze, si antes de auscultarse sibilancias en la tráquea se produce una disminución de la SaO<sub>2</sub> o taquipnea.

De esta forma se considera una respuesta positiva a una determinada concentración de metacolina (PCwheeze) cuando:

- Se auscultan sibilancias claras en la tráquea o el tórax.
- La SaO<sub>2</sub> desciende un 5% sobre la basal.
- Aparece taquipnea: Aumenta la frecuencia respiratoria un 50% sobre el valor basal

No se considera PCw la auscultación de ligeras sibilancias en los campos pulmonares, la auscultación de crepitantes localizados y la tos transitoria que a veces pueden aparecer antes que los sibilantes audibles en tráquea.

#### **2.2.1.6 .- Procedimiento de realización de la prueba**

Se ausculta y valora al paciente anotando la frecuencia respiratoria y la SaO<sub>2</sub> basal en el niño y registrando la frecuencia cardiaca.

Se inician las nebulizaciones que se inhalan mediante mascarilla a volumen corriente durante dos minutos comenzando por la solución salina.

Tras cada nebulización se ausculta la tráquea, la parte antero – superior e infero – posterior del tórax en fases de 20 segundos y se miden la frecuencia respiratoria y cardiaca y la saturación de oxígeno cada minuto, durante los tres minutos siguientes.

Si no hay sibilancias, ni polipnea (> de dos veces la basal), ni caída de la saturación de oxígeno  $\geq$  5% de la basal, se nebulizan de forma sucesiva las diferentes concentraciones de metacolina durante 2 minutos, realizando el mismo procedimiento tras cada nebulización, hasta llegar a la concentración máxima de 8 mg/mL.

Si aparecen tos persistente o sibilancias débiles en tórax se aumenta la concentración sólo a la mitad de dosis.

En los casos con respuesta positiva se administra al niño salbutamol nebulizado.

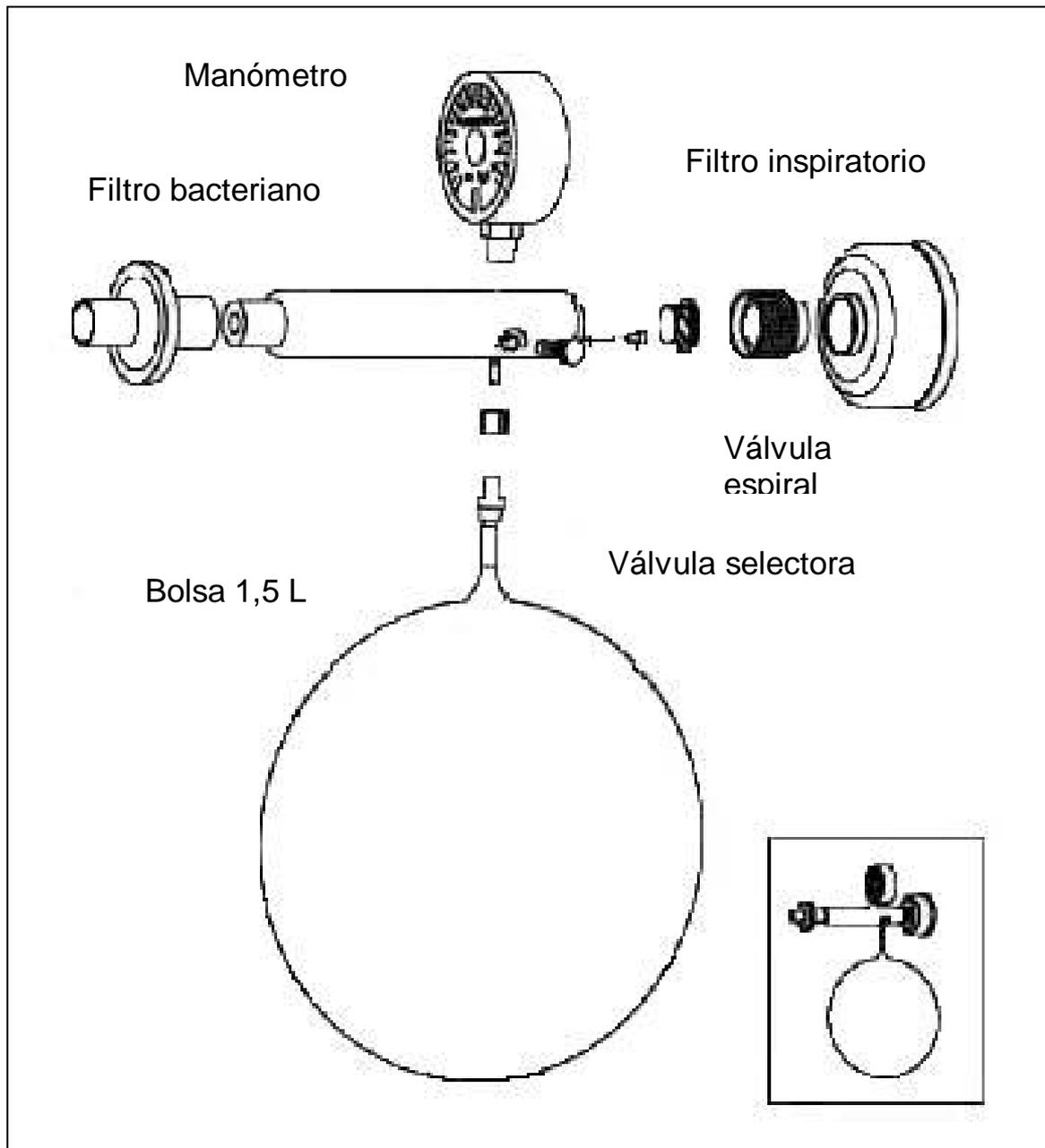
## **2.2. 2. - Determinación del óxido nítrico exhalado**

Para la determinación del óxido nítrico en el aire exhalado ( $FE_{NO}$ ) hemos utilizado una técnica *off-line*, en la que primero se recoge el aire exhalado en una bolsa tipo Mylar, y posteriormente se analiza el contenido de la bolsa.

### **2.2.2.1. - Instrumentación**

#### **2.2.2.1.1.- Sistema de recogida de muestras**

Para la recogida del aire exhalado hemos utilizado un sistema desarrollado por la casa Sievers (“Deadspace Discard Bag Collection and Sampling Kit (BSK 01400)”; Sievers Instruments, Inc., Boulder, CO, USA) (figura 7). Este sistema se adapta a las recomendaciones de la American Thoracic Society<sup>25</sup> para la determinación de óxido nítrico *off-line*.



**Figura 7.** Sistema de recogida de aire exhalado para el análisis de óxido nítrico.

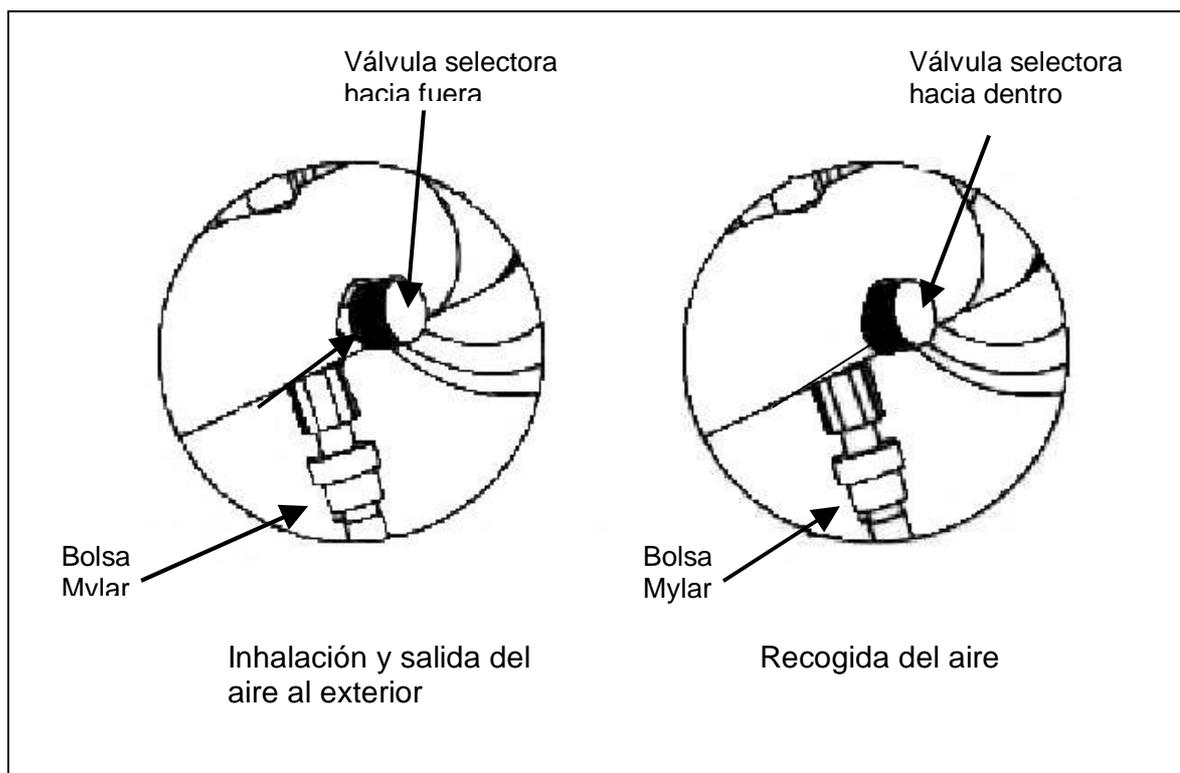
El sistema de recogida incluye (figura 7):

- un filtro para el aire inspirado de carbón activado para asegurar que los niños inspiren aire libre de NO. La vida media del filtro es de 3 meses.
- una válvula y un manómetro de presión para controlar que la exhalación se produzca a un flujo constante
- un filtro antibacteriano de un solo uso, para evitar la contaminación del equipo y entre pacientes.
- una válvula selectora que permite que el aire circule por el sistema sin ir hacia la bolsa de recogida, o que circule hacia la bolsa de recogida (figura 8).
- una bolsa tipo Mylar de 1,5 L de capacidad, equipada con una válvula antirreflujo, que es totalmente "impermeable" a los gases del exterior (aunque para ello debe guardarse ligeramente doblada y manipularse cuidadosamente, ya que sino podrían abrirse pequeños poros que alterarían la muestra).
- filtro de aire libre de NO para el procedimiento de limpieza de las bolsas.

Este sistema de recogida Sievers, sigue las Recomendaciones de la ATS de Toronto 1998 para la medición de FE<sub>NO</sub> off line. Así :

- el volumen inicial espiratorio descartado es de 250 ml,
- el volumen espirado recogido es de 50 a 1500 ml
- la velocidad de flujo espiratorio es de 100 ml /seg
- no es necesario pinzar la nariz al paciente, dado que la elevada presión, implica un cierre del paladar blando. Sin embargo, dado que nuestros pacientes a veces no llegan a dicha presión, se toma la precaución de usar mascarilla facial especial, que asegure que no entre aire procedente de la región nasal.

La bolsa es de un material inerte de cara al NO y además es absolutamente impermeable frente al gas exterior (atmósfera).



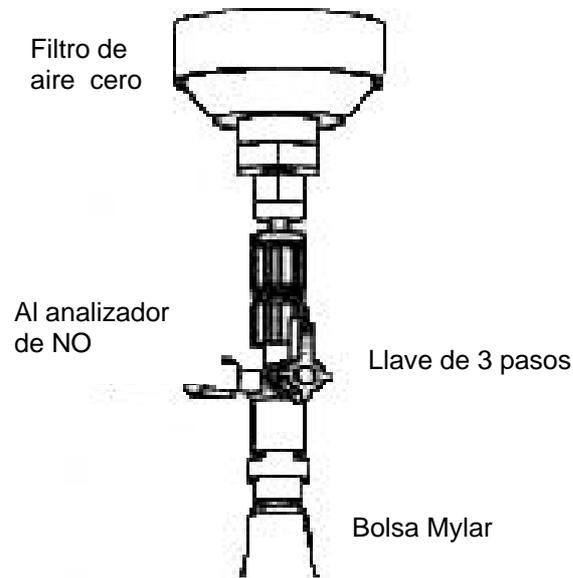
**Figura 8.** Manejo de la válvula selectora. Con la válvula hacia fuera el aire circula entre la mascarilla facial y el filtro sin llenar la bolsa. Con la válvula hacia dentro se abre la apertura a la bolsa Mylar y se rellena esta de aire.

#### 2.2.2.1.2.- Manejo y conservación de las bolsas de recogida

Las bolsas pueden ser reutilizadas hasta 50 veces sin problemas. El proceso de limpieza para la reutilización de las bolsas es el siguiente:

Las bolsas de Mylar, se conectarán al analizador de NO mediante una llave de 3 pasos, con una de las llaves conectadas a un filtro de aire. Se activa la lectura de NO en el analizador, con lo que la bomba de vacío del analizador aspira el aire de la bolsa. Luego se rellena la bolsa con aire medicinal o oxígeno, libres de NO, a través del filtro de aire zero por la llave de tres pasos, y se aspira de nuevo el oxígeno mediante el analizador. Se repite el aclarado de la bolsa tres veces. Antes de desconectar la bolsa ya limpia, la llave de 3 pasos debe estar cerrada hacia el analizador y abierta hacia el filtro de aire, ya que después de la aspiración la bolsa mantendrá un ligero vacío y aspirará una ligera cantidad de aire del exterior hasta equilibrarse con la

presión atmosférica. De esta forma se aspira aire libre de NO y la bolsa no se contamine de nuevo (figura 9).



**Figura 9.** Conexión mediante una llave de 3 pasos de la bolsa Mylar al analizador de NO y a un filtro de aire libre de NO, para su limpieza.

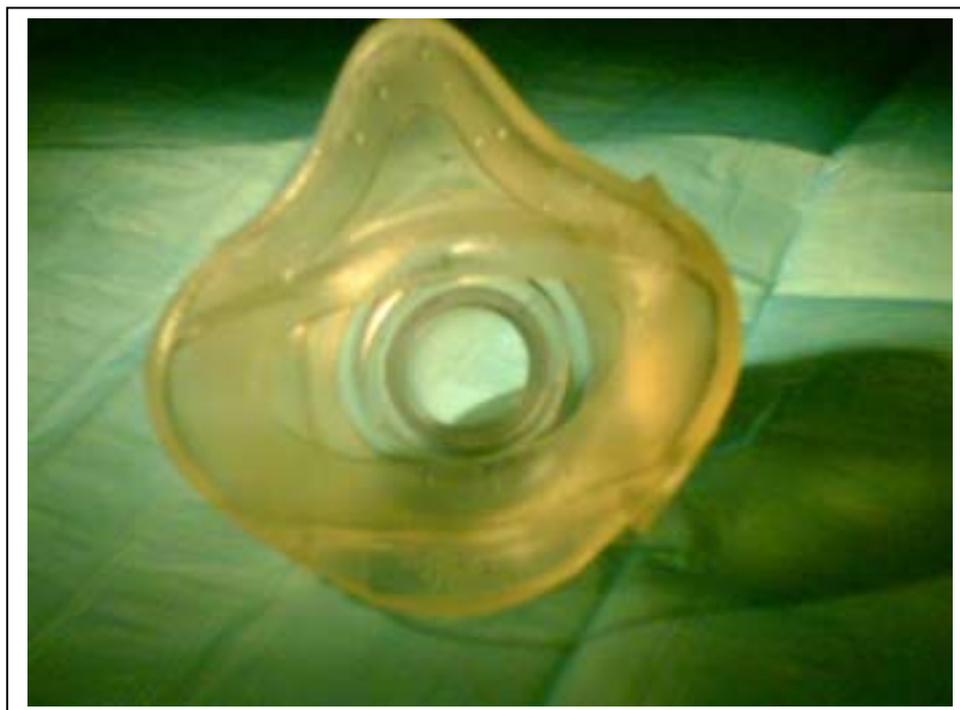
En ocasiones se desarrollan pequeños orificios en las bolsas debido a su manipulación. Esto puede llevar consigo la contaminación de la bolsa con aire ambiente. Para controlarlo, periódicamente se puede comprobar la integridad de la bolsa rellenándolas con aire exhalado y midiendo la concentración de NO en la bolsa durante un periodo de varias horas, mientras se mide también la concentración de NO ambiental. Si la bolsa no está íntegra, y la concentración de NO en el ambiente es mayor que en la bolsa se producirá un incremento progresivo de la concentración de NO en la bolsa, y viceversa.

Asimismo la bolsa debe estar perfectamente fijada mediante el anillo de sujeción al cuerpo el aparato para asegurar un flujo reproducible. El sujeto solo inhala a través de la boca y debe exhalar a través del aparato inmediatamente después de la inhalación sin contener la respiración (figuras 7,8,9).

#### 2.2.2.1.3.- *Mascarilla para niños con tabique nasal*

Con la finalidad de evitar la contaminación de la muestra recogida con óxido nítrico procedente de los senos paranasales se ha utilizado una mascarilla buco nasal dotada de un tabique que impide el paso de aire desde la nariz y permite la recogida únicamente de aire procedente de la boca (figura 10).

Se han utilizado 2 tamaños de mascarilla, uno para los niños de menos de 2 años y otro para los niños de más de 2 años (Rudolf face masks; Pediatric small 7970 Size #2; Hans Rudolph, inc., Mi, USA)



**Figura 10.-** Mascarilla utilizada con tabique nasal

#### 2.2.2.1.4.- *Medidor de óxido nítrico*

La medición de óxido nítrico se ha realizado mediante un analizador de quimioluminiscencia (LR 2000, Logan Research, Rochester, UK).

El analizador se ha calibrado diariamente con bombona conteniendo una concentración conocida de NO de alrededor de 110 ppb.

#### 2.2.2.2. - ***Técnica de recogida de las muestras de aire exhalado***

Todas las determinaciones fueron realizadas por el mismo pediatra y por la mañana para evitar posibles factores de confusión.

Se siguieron las recomendaciones de la ERS<sup>26</sup> y ATS<sup>25</sup>, para estandarizar las medición del NO.

A los niños sentados en la falda de su madre, se les mostraba el instrumento de recogida para que se familiarizasen con él y se les explicaba, si la edad lo permitía, la técnica (figura 11).



**Figura 11.-** Instrumento de recogida de muestras de aire exhalado

Se colocaba la mascarilla sobre cara y nariz sin sujetar ésta (dada la dificultad por su anatomía a estas edades y la incomodidad de la maniobra).

Para evitar la contaminación por NO procedente del ambiente (muy variable en nuestro laboratorio, entre 5 y 40 ppb) se hacía a los niños realizar un mínimo de 5 inhalaciones a través del filtro de aire libre de NO.

Posteriormente se cerraba la válvula selectora, recogiendo entre 50 y 300 ml de aire exhalado en la bolsa de Mylar, evitando siempre la sobredistensión de la bolsa. Durante la exhalación la presión en el manómetro según el esfuerzo del niño oscilaba entre 5 y 20 cm H<sub>2</sub>O (figura 12).



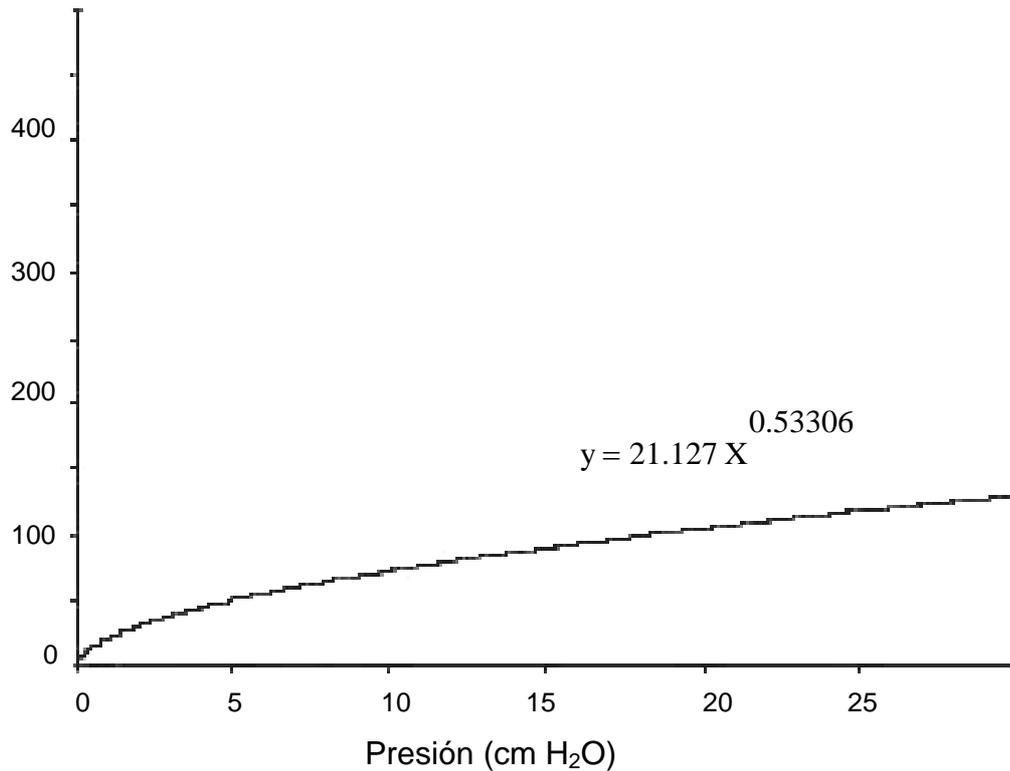
**Figura 12.-** Imagen de recogida de la muestra por parte de una paciente de 44 meses

En los niños mayores colaboradores y en las personas adultas, la recogida de óxido nítrico se puede realizar a un flujo constante. Con el diseño del sistema de recogida a una presión espiratoria de 5 cm H<sub>2</sub>O, el flujo espiratorio es de 50 ml/seg, a una presión de 19 cm H<sub>2</sub>O el flujo es de 100 ml/seg y a una presión espiratoria de 25 cm H<sub>2</sub>O, el flujo espiratorio es de 125 ml/seg (figura 13).

En los niños pequeños no es posible adiestrarlos para mantener un flujo constante y por tanto la recogida de la muestra se realiza a volumen corriente, a un flujo variable que oscila según el esfuerzo espiratorio del niño entre 0 ml/seg (justo antes de iniciar la espiración) y 125 ml/seg.

La presión espiratoria superior a 5 cm H<sub>2</sub>O ayuda a cerrar el paladar blando, lo que evita la contaminación del aire procedente de las vías respiratorias altas.

Flujo (ml/s BTPS)



**Figura 13.** Relación entre Presión espiratoria (cm H<sub>2</sub>O) y flujo espiratorio

Para recoger la muestra, el niño debe exhalar en el sistema durante aproximadamente 2 segundos o hasta que haya una muestra adecuada ( $\geq 50$  ml; son necesarios aproximadamente 15 segundos de exhalación en el sistema para rellenar totalmente la bolsa- pero con pequeñas muestras es suficiente y nunca se debe sobreinflar la bolsa).

La bolsa se separa del cuerpo de la toma de muestra de forma cuidadosa, para evitar la contaminación ambiental y siempre se procederá a la desconexión con el niño respirando aún dentro de la mascarilla. Una vez retirada la bolsa queda sellada con la válvula de auto sellado que incorpora.

Tras dejar descansar al niño aproximadamente un minuto, se recogía una segunda muestra.

Si al analizar las muestras se obtenía una variación entre la medida de ambas bolsas superior al 20% del valor inferior, se repetía la toma de 2 bolsas más.

La muestra se puede contaminar con el NO del aire ambiente si el acoplamiento de la mascarilla no es correcto. Por eso en caso de obtener en una de las bolsas un valor de NO desproporcionadamente alto en relación al resto de las bolsas se desechaba esta.

Siempre se requería disponer de 2 bolsas con una diferencia entre ellas menos del 20%, para valores de NO menores de 10 ppm y menor del 10% para valores de NO mayores de 10 ppm, considerando que estos límites indican diferencias clínicamente no significativas.

En nuestro estudio se tomó como valor de NO de cada paciente la media de las 2 determinaciones, aunque algunos estudios refieren que en caso de disparidad, el más fiable será el menor obtenido, ya que el otro puede estar influenciado por alguna contaminación que hubiese pasado desapercibida.

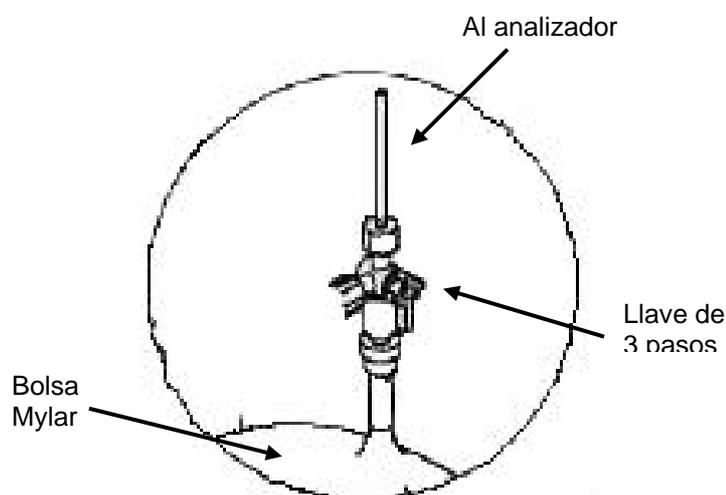
### **2.2.2.3.- Análisis de las muestras**

Para el análisis de la muestra se conecta la bolsa Mylar mediante una llave de 3 pasos y un adaptador macho - macho tipo "Luer" a una línea de teflón del medidor de NO.

Se activa la medición de NO habiendo programado el analizador previamente a un flujo de aspiración . La llave de 3 pasos se mantiene cerrada hasta que el analizador de NO indica el inicio de la succión de la muestra. A continuación se abre y se inicia la toma de gas desde el analizador que debe durar al menos 15 segundos. En la curva de medición se observa un aumento progresivo de la concentración de NO hasta alcanzar una meseta. La medición del NO se realiza en la fase de nivel estable o meseta.

La muestra se analizará de forma inmediata o diferida en el tiempo (2 o 4 horas, aunque la muestra permanece estable durante 8 horas en la bolsa de Mylar, si es preciso).

Luego se procederá a conectar la llave de tres pasos a la línea (tubo de Teflón) del analizador y a la bolsa, dejando ésta cerrada hasta que el aparato señale que está listo para succionar la muestra de la bolsa de Mylar (figura 14). La toma desde el analizador debe durar al menos 15 segundos . Después se puede conectar a través de la llave de tres pasos el analizador al filtro de aire zero externo extrayendo muestra durante 10 segundos.



**Figura 14.** Toma desde el analizador.

En caso de resultados dudosos, por movimiento del niño y mascarilla..., se procederá a dos mediciones más. Asimismo, las bolsas de Mylar de recogida, son teóricamente compartimentos estancos con válvula de seguridad, a las que no debe afectar el ON ambiental, sin embargo, para evitar falsos positivos, se debería mirar el  $FE_{NO}$  que debería ser de 0 ppb.

Otros factores que podrían afectar los resultados de la medición y que fueron controlados son:

Ritmo circadiano: No se sabe si puede afectar, por lo que nosotros optamos por realizar todas las tomas por la mañana a primera hora.

Tabaquismo pasivo. No hay datos al respecto.

Infecciones. Los cuadros respiratorios pueden afectar el  $FE_{NO}$ , por tanto se realizará la medida en condiciones basales cuando haya pasado 3 o más semanas asintomáticos y cuando se toma en fase aguda, se anotará dicha incidencia.

Otros factores. La realización de la prueba de la metacolina podría afectar, por lo que se ha realizado siempre la medida del  $F_{E}NO$  en primer lugar.

Hay otras limitaciones relativas concierne sobretodo a los aspectos técnicos; P.E si el niño se niega o llora intensamente, la muestra probablemente no será valorable

### **3.- PROCESAMIENTO DE DATOS. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La hiperrespuesta bronquial se expresa mediante la PCwheeze (PCw), concentración de metacolina a la que la prueba se positiviza.

La concentración de óxido nítrico exhalado se expresa en partes por billón (ppb).

#### **3.1.- Cálculo del tamaño de la muestra**

La PCwheeze del grupo control se estima que debe estar alrededor de 8 mg/mL<sup>21</sup>. Consideraremos clínicamente significativa una diferencia en la PCwheeze entre el grupo control y el grupo de pacientes con sibilantes de 4 mg/mL (una dilución de metacolina). A partir de los datos de la literatura asumimos una desviación estándar de 3,55<sup>18</sup>. Teniendo en cuenta un riesgo alfa de 0,05, riesgo beta de 0,15 y una hipótesis unilateral se necesitan 13 pacientes en cada grupo. Contando con un 20% de pérdidas se necesitarían 16 niños en cada grupo.

Este estudio es la fase inicial de un trabajo prospectivo para discernir si existen diferencias en cuanto a la hiperrespuesta bronquial entre los niños con sibilantes persistentes y transitorios. Teniendo en cuenta los datos publicados sobre la frecuencia de sibilantes persistentes y transitorios en este grupo de edad se espera que dos tercios del grupo de niños con bronquitis sibilantes de repetición correspondan al grupo de sibilantes transitorios y un tercio al de sibilantes persistentes. Por tanto para disponer de 20 niños en este último grupo se necesita una muestra inicial de 60 niños en el grupo de pacientes con bronquitis de repetición.

#### **3.2.- Análisis estadístico**

Para poder realizar los cálculos numéricos de la PCwheeze en aquellos niños en que no se ha obtenido respuesta con una concentración de metacolina de 8 mg/mL, se ha asumido que esta es de 16 mg/mL.

El análisis estadístico de los datos obtenidos, se ha realizado mediante el programa Medcalc® versión 8.0.0.0.

Para estudiar la normalidad de la distribución de las variables se ha aplicado inicialmente la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

Para realizar las comparaciones entre 2 grupos si seguían una distribución normal, se ha aplicado el test de la t de Student para datos no apareados o apareados según correspondiera. En caso contrario se ha aplicado el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney.

Para comparar 3 o más grupos se ha utilizado el análisis de la varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni, o el test de Kruskal-Wallis si las variables no seguían una distribución normal.

La comparación entre las variables cualitativas se ha realizado mediante el test de Chi-cuadrado.

Se ha estudiado la relación entre variables cuantitativas mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Para cuantificar el riesgo de presentar una determinada característica se ha estimado la odd-ratio y su intervalo de confianza al 95%, considerándose significativo si el intervalo de confianza no incluía el 1.

El análisis univariante se ha completado, cuando ha sido procedente para el análisis de la influencia en los resultados de diferentes variables, con el análisis multivariante mediante la regresión logística.

Los resultados se expresan como media, mediana, desviación estándar (DE), odds ratio (OR), e intervalo de confianza al 95% (IC 95%).

Se han considerado significativos valores de  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS



## 1. - ESTUDIO DE HIPERRESPUESTA BRONQUIAL

Entre marzo de 2002 y septiembre de 2003 se han incluido en el estudio 63 niños afectados de bronquitis sibilante de repetición y 16 controles sanos.

### 1.1.- CARACTERÍSTICAS BASALES DEL GRUPO CON BRONQUITIS DE REPETICIÓN

#### 1.1.1. - Características demográficas

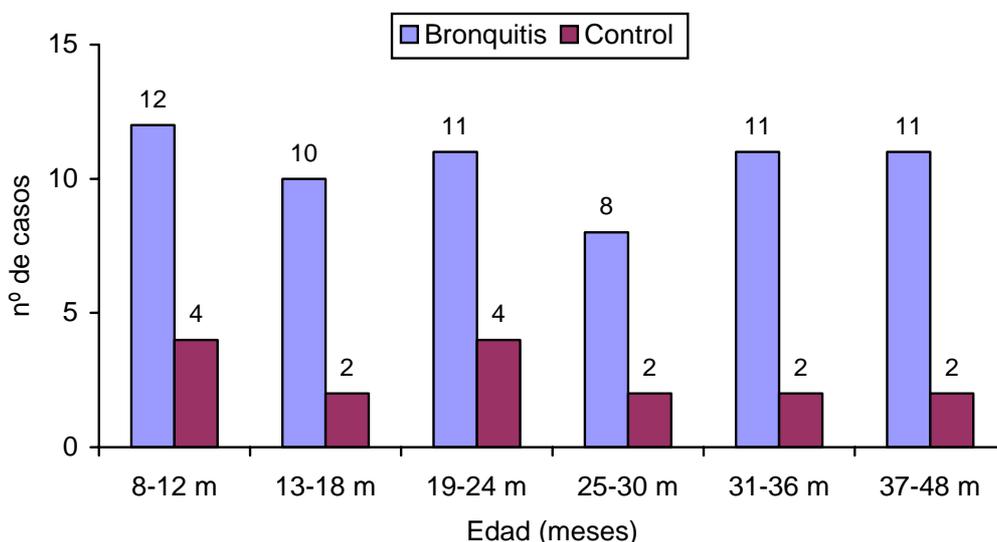
El rango de edad de los 63 niños de este grupo, osciló entre 8 y 47 meses con una edad media de 25,2 meses (DE 11,4), y una mediana de 24 meses (figura 15).

Cuarenta y seis pacientes fueron varones (73,01%) y 17 mujeres.

La media del peso al nacer fue 3.163,4 g (DE 524), siendo el rango de 2.050 a 4.350 g, y la mediana de 3.150 g.

Todos los niños eran recién nacidos a término, con una edad gestacional media de 39,2 semanas (DE 0,17), con un mínimo de 37 semanas, un máximo de 42 y una mediana de 40 semanas.

Ninguno de los niños presentó antecedentes perinatales de interés.



**Figura 15.** Edad de los pacientes y de los niños del grupo control, en el momento de la realización de la prueba de metacolina.

### 1.1.2. - Características de los episodios de bronquitis

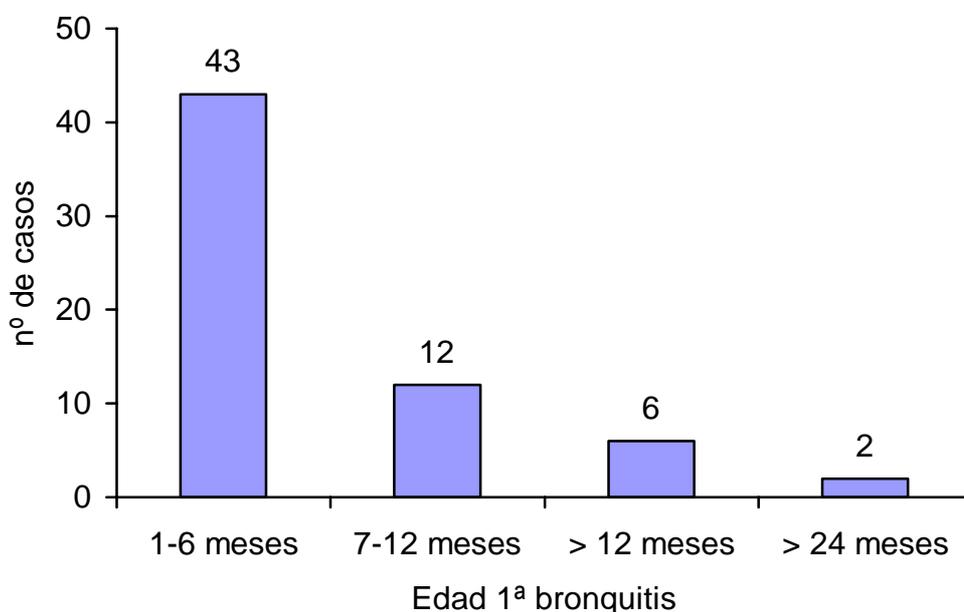
Todos los niños tenían el antecedente de haber presentado bronquitis de repetición con sibilancias diagnosticadas por un médico.

La edad media de la primera bronquitis, fue de 6,8 meses (DE 0,78 meses), siendo el rango entre los pacientes de 1 mes a 28 meses y la mediana de 5 meses (figura 16).

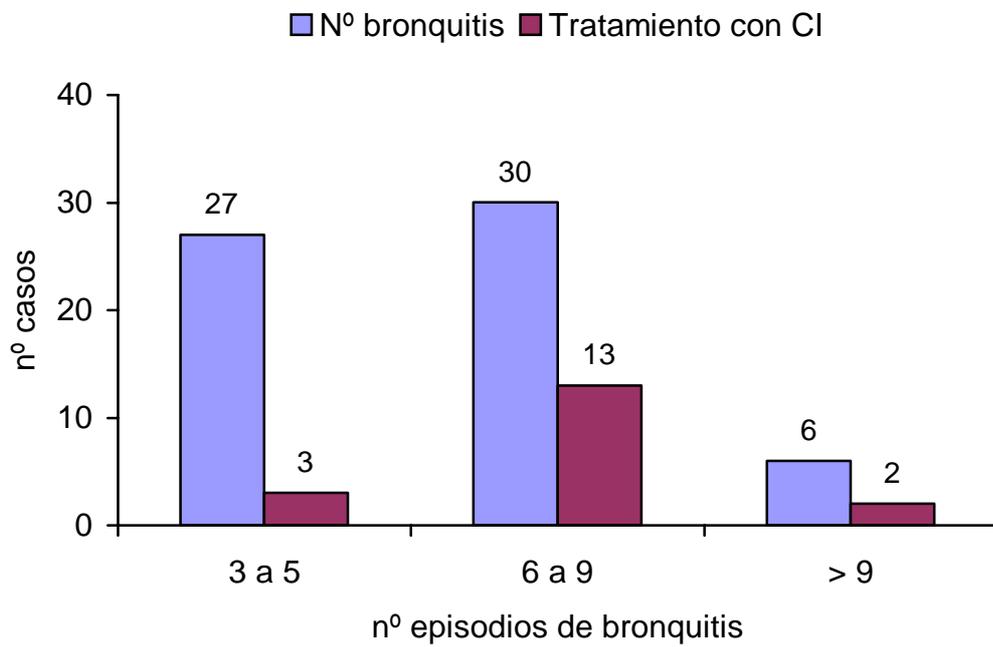
En esta primera bronquitis, se había realizado un test para la detección de virus respiratorio sincitial en 24 casos, de los cuales en 12 fue positivo (19%) y en otros 12 (19%) negativo. En 39 casos este dato era desconocido (61,9%).

El numero de bronquitis, en el año previo al estudio, fue de 3 a 5 episodios en 27 niños (42,85%), de 6 a 9 episodios en 30 niños (47,61%) y de 10 o más episodios en 6 niños (9,6%) (figura 17).

De los 27 niños con 3 a 5 episodios de bronquitis sibilantes sólo 3 estaban recibiendo tratamiento con corticoides inhalados (11,1%), en el momento de realizar la prueba. Esta proporción fue mayor en aquellos que presentaron 6 a 9 episodios (42,9%), y en aquellos con 10 o más episodios (33,3%) ( $p=0,030$ ) (figura 17). Dos de los pacientes recibían tratamiento con montelukast, uno en el grupo de 6 a 9 bronquitis, y otro en el que habían presentado 10 o más bronquitis.



**Figura 16.** Edad de los pacientes al presentar el primer episodio de bronquitis



**Figura 17.** Número de bronquitis en el último año en el grupo de pacientes y proporción de los mismos que recibían tratamiento con corticoides inhalados (CI).

### 1.1.3 - Antecedentes familiares y ambientales

Se recogió en el cuestionario realizado a los pacientes la presencia de antecedentes familiares de asma, rinitis y atopía cutánea. Se distinguieron 2 grupos según el parentesco, en primer grado (padres y/o hermanos), o en segundo grado (otros familiares), obteniéndose los siguientes resultados: 26 niños tenían antecedentes familiares de primer grado de asma (41,3%), 12 de rinitis (19%) y 7 de dermatitis atópica (11,1%). En cuanto a los antecedentes en el resto de familiares, de segundo grado, se recogía historia de asma en 25 casos (39,7%) y de rinitis y/o dermatitis en 7 casos (11,1%).

Respecto a otros factores que se han relacionado con los episodios de bronquitis sibilante, se interrogó a los padres sobre el número de hermanos en la familia, hábitos tabáquicos pre y pos natales en la familia, tipo de lactancia y asistencia a guardería (y en caso positivo, a qué edad iniciaron ésta).

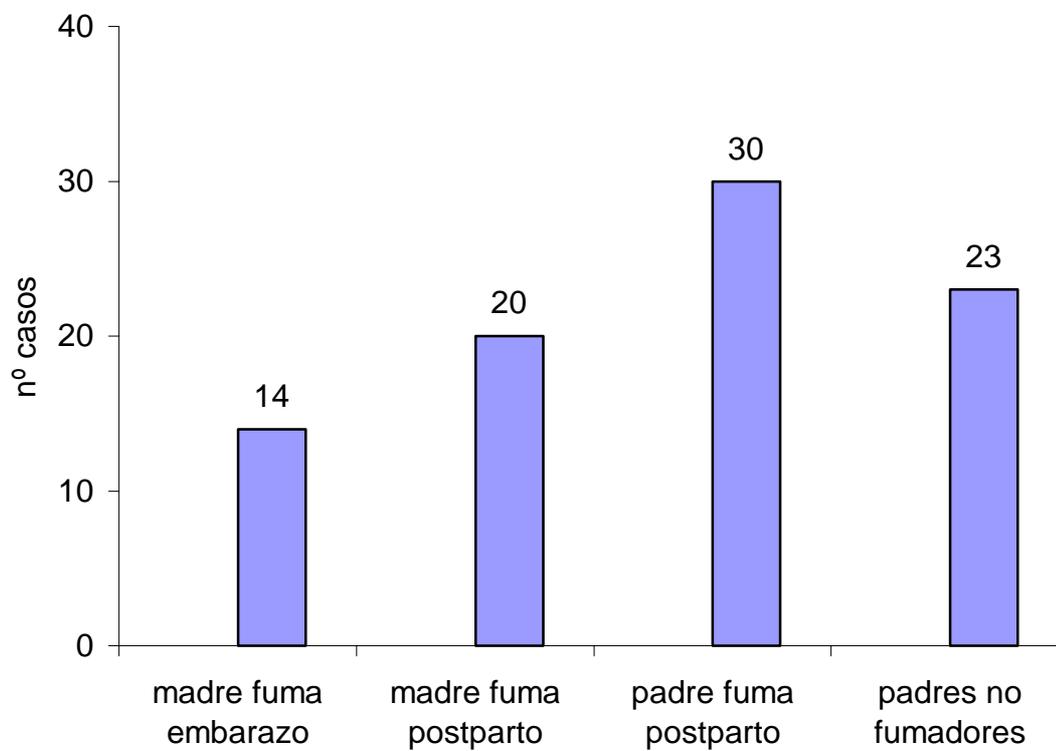
Cuarenta de los niños (63,5%) habían recibido lactancia materna, con una media de tiempo de lactancia de 4,17 meses (DE 4,33), y con un rango entre 2 y 21 meses. Cinco niños habían tomado lactancia mixta, y 18 lactancia artificial (28,6%).

En cuanto a la asistencia a guardería, 25 no habían acudido hasta los 3 años (edad de escolarización habitual en España), y 38 sí la habían frecuentado (60,3%), con una edad media global de entrada de 9,63 (DE 10,31 meses).

Analizando el número de hermanos, la media fue de 0,75 (DE 0,62), con un rango de 0 a 2.

Por último en la variable del tabaquismo, constatamos que 14 niños (22,2%), tenían historia de tabaquismo prenatal materno, mientras que tras el nacimiento en 20 casos fumaba la madre en casa, en 30 el padre (en 10 de ellos coincidían madre y padre), y en 23 no fumaba nadie en casa (figura 18). Todos ellos alegaban fumar fuera del alcance del niño.

En conjunto, en el grupo de los niños con sibilantes estudiados, en 40 había algún progenitor fumador en casa (61,9%) y en 23 nadie fumaba (36,5%).



**Figura 18.** Antecedentes de tabaquismo en los niños con bronquitis sibilantes

#### **1.1.4 .- Estudio de atopia**

El valor medio de la IgE total fue de 50,6 UI/ml (DE 94,57) con un rango de 5 a 514 UI/ml, y una mediana de 15 UI/ml. En 11 niños fue superior a 100 UI/ml.

La media de eosinófilos en sangre fue de 336,7/mm<sup>3</sup> (DE 224,2), con un rango de 15 a 1.000/mm<sup>3</sup> y una mediana de 280. En 52 sujetos (82,5%) el recuento de eosinófilos fue normal (< 400 eosinófilos/mm<sup>3</sup>) y en 11 (17,5%), estuvo elevado (eosinofilia ≥ 400/mm<sup>3</sup>)

La Ig E específica (CAP) a neuroalergenos habituales fue positiva en solo 5 casos (7,9%), siendo negativa en el resto 58 (92,1%). En cuanto a las pruebas cutáneas, el Prick-test a neuroalergenos fue positivo en 4 (6,3% del total) y negativo en 59. En total en 7 niños (11,1%) fue positiva una de las 2 pruebas.

Cuatro de los niños presentaban un déficit de IgA, siendo las inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) normales en el resto.

#### **1.1.5. - Otros estudios**

También se valoró la radiografía de torax (en fase intercrisis) que se realizó en 59 casos, siendo normal en 55. En 4 se observaba una imagen compatible con síndrome de lóbulo medio, que desapareció en posteriores controles en los 4 casos.

### **1.2 .- CARACTERÍSTICAS BASALES DEL GRUPO CONTROL**

El número total de niños incluidos en este grupo fue de 16.

La edad media fue de 23,94 meses (DE 12,2 meses), con un rango de 8 a 47 meses y una mediana de 23,5 meses (figura 15). Hubo 8 varones (50%) y 8 mujeres (50%).

El peso medio al nacer fue de 3240,6 g (DE 465,6 g), siendo el rango de 2.500 a 4.000 g y la mediana de 3.190 g.

La edad gestacional promedio fue de 39,6 semanas (DE 1,8 semanas) con un mínimo de 37 semanas y un máximo de 42 y una mediana calculada de 40 semanas.

Ningún niño presentó antecedentes perinatales de interés.

Quince de los niños (93,7%) habían recibido lactancia materna, con una media de tiempo de lactancia de 5,7 meses (DE 0,26; rango 3 –12 meses), y 1 lactancia artificial (6,3%).

En cuanto a la guardería, 7 no habían acudido hasta los 3 años, y 8 sí la habían frecuentado (53,3%), con una edad media de entrada de 9,3 meses (DE 11,1).

La media del número de hermanos, en este grupo fue de 2,25 (DE 1,80), con un rango de 0 a 6 y una mediana de 2.

### **1.3.- COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS BASALES ENTRE EL GRUPO CON BRONQUITIS Y EL GRUPO CONTROL.**

El grupo control fue comparable estadísticamente en todas las variables al grupo de pacientes con bronquitis de repetición, salvo en las que le exigían para ser control: no antecedentes de sibilantes ni en el niño ni en familiares de primer grado, y no tabaquismo pasivo.

En la tabla 15 se recogen las características basales del grupo control, comparadas con las del grupo con bronquitis de repetición.

Como se observa los dos grupos fueron comparables en cuanto a edad y peso al nacimiento y edad gestacional. En el grupo con bronquitis de repetición, hubo una mayor proporción de varones (71,4%), respecto al grupo control (50%), pero sin ser la diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,103$ )

No hubo tampoco diferencias en cuanto a la proporción de lactancia materna y asistencia a guardería y únicamente hubo diferencias en cuanto al número de hermanos ( $p=0,005$ ).

**Tabla 15.** Comparación de las características basales entre el grupo control y el de pacientes afectados de bronquitis sibilante de repetición. Valores expresados como media (desviación estándar) o porcentaje de casos.

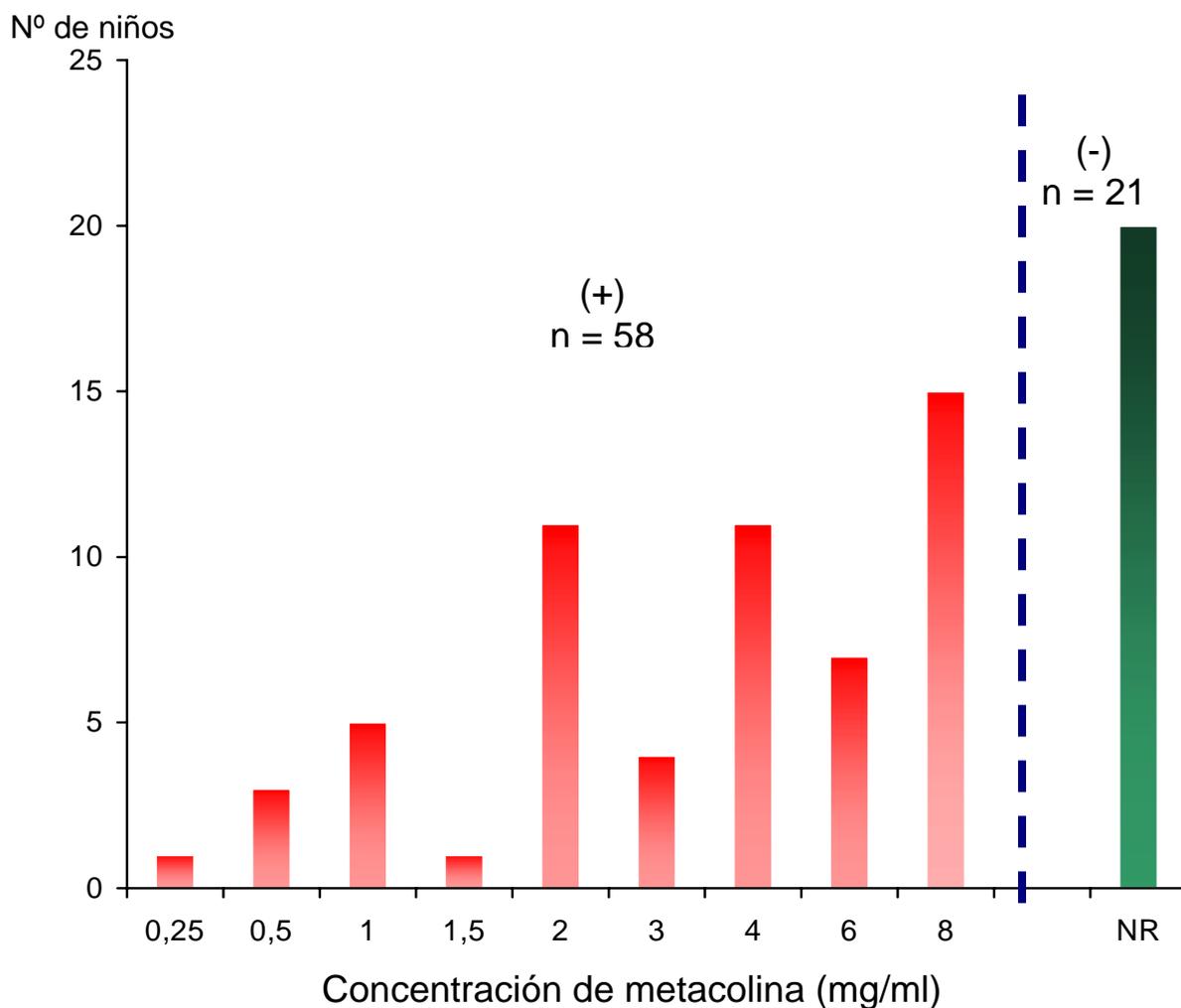
	<b>Control</b>	<b>Bronquitis</b>	<b>p</b>
Edad (meses)	23,9 (12,2)	25,22 (11,44)	0,693
Género	8 V / 8 M (V 50%)	45 V/ 18 M (V 71,4%)	0,103
Peso al nacer (g)	3240,6 (465,6)	3163,4 (524,4)	0,593
Edad gestacional (semanas)	39,6 (1,8)	39,2 (1,3)	0,374
Lactancia materna	14 / 16 (87,5%)	45 / 63 (71,4%)	0,076
Lactancia materna (meses)	5,7 (2,7)	4,2 (4,3)	0,188
Asistencia a guardería	9 / 16	38 / 63	0,767
Asistencia a guardería [edad entrada (meses)]	9,3 (11,1)	9,6 (10,6)	0,913
Nº hermanos	2,25 (1,84)	0,75 (0,6)	0,005

**V:** varones; **M:** mujeres

#### 1.4.- PRUEBA DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL CON METACOLINA

Se realizó en 79 niños, 63 pertenecientes al grupo de estudio y 16 pertenecientes al grupo control.

En conjunto, 58 respondieron a la prueba de provocación bronquial con metacolina a concentraciones  $\leq 8$  mg/ml, y 21 no respondieron.

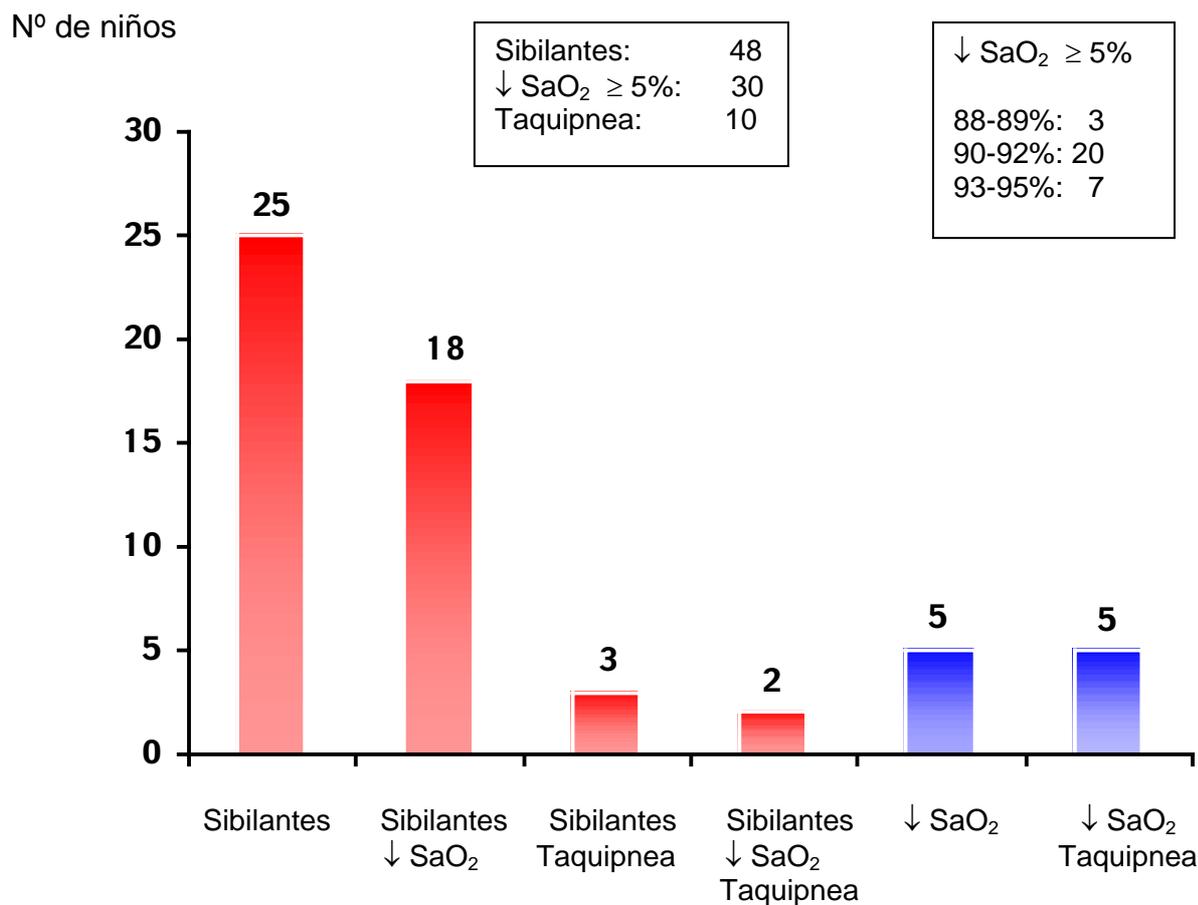


**Figura 19.** Respuesta de los niños estudiados (grupo total) a las diferentes concentraciones de metacolina, mediante el método de la auscultación traqueal modificado (NR: no respuesta).

#### **1..4.1.- Criterios de positividad y seguridad de la prueba**

La respuesta positiva a la metacolina se manifestó de la siguiente forma: en 48 casos se observaron sibilantes, aislados en 25 niños y asociados a desaturación de O<sub>2</sub> y/o polipnea en 23; en 30 casos se constató una desaturación de O<sub>2</sub> que fue aislada en 5 casos y asociada a otra clínica en el resto. En 10 casos observamos polipnea ( $\geq$  doble de la basal) siempre asociada a otra sintomatología (figura 20). El incremento medio de la frecuencia respiratoria fue de 14,7 respiraciones/minuto (tabla 16).

La SaO<sub>2</sub> media al final de la prueba fue de 93,02%, con un descenso medio del 4,08% (tabla 16). El descenso de la SaO<sub>2</sub>, en ningún caso inferior al 88%, fue autolimitado, y en cuanto se paraba la inhalación de la metacolina dejaba de descender, incrementándose espontáneamente, en general de forma inmediata. Tras aplicar el broncodilatador, en los casos indicados, la reversibilidad fue completa y total, de forma que al acabar la inhalación del salbutamol ya se había normalizado, y a los 20 minutos fue en todos casos igual a la inicial o superior.



**Figura 20.** Criterios de respuesta a la metacolina, con el método de la auscultación traqueal modificado, en el grupo global (pacientes y controles).

**Tabla 16.** Variaciones de la frecuencia respiratoria y de la saturación de hemoglobina con la prueba de broncoprovocación en el conjunto global de pacientes.

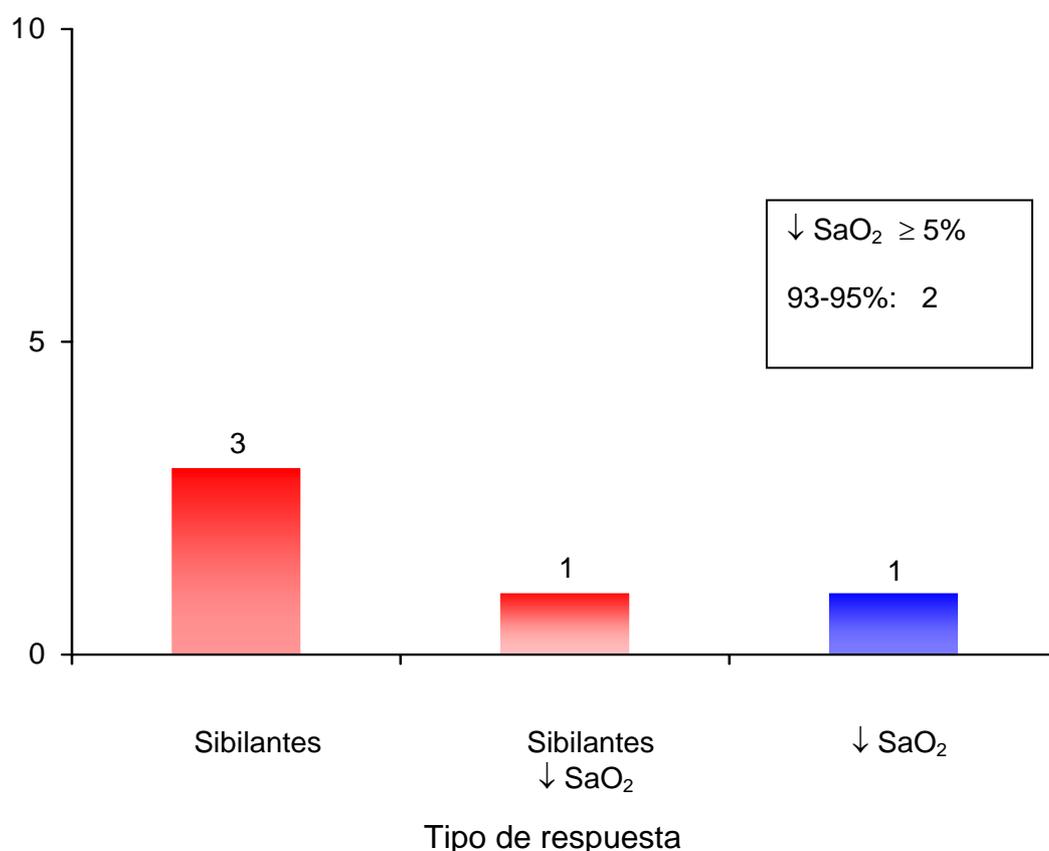
	Inicial	Final	Variación	p
Frecuencia respiratoria	27,4 (4,9)	42,1 (10,4)	+ 14,7 (8,9)	< 0,0001
SaO <sub>2</sub> (%)	97,2 (0,9)	93,2 (2,4)	- 4,08 (2,4)	< 0,0001

### 1.4.2. - Grupo control. Criterios de respuesta y seguridad

La prueba fue negativa en 11 casos (68,75%), y en 5 casos (31,25%) los niños presentaron signos de positividad a una concentración de metacolina de 8 mg/ml. En ningún caso fue inferior a 8 mg/ml. El valor medio de la PCwheeze en este grupo fue de 13,5 mg/ml (IC95% 11,17 – 15,49).

No hubo relación entre la edad de los niños y la positividad de la prueba ( $p = 0,9$ ).

La positividad de la prueba, se debió en cuatro casos a la aparición de sibilancias traqueobronquiales y en dos casos a un descenso de la saturación de  $O_2 >5\%$  (uno de los cuales había presentado también sibilancias). El descenso medio de la  $SaO_2$  fue del 3,2% (tabla 17). No se detectó polipnea ni tiraje significativos en ningún caso del grupo control. El incremento medio de la frecuencia respiratoria fue de 9,3 respiraciones/minuto (tabla 17). El descenso de la  $SaO_2$  no fue diferente del que ocurrió en el grupo de pacientes con bronquitis de repetición, mientras que el incremento de la frecuencia respiratoria fue menor en el grupo control ( $p = 0,008$ ) (tabla 18), (figura 21).



**Figura 21.** Criterios de respuesta a la metacolina en el grupo control, con el método de la auscultación traqueal modificado.

**Tabla 17.** Variaciones de la frecuencia respiratoria y de la saturación de hemoglobina con la prueba de broncoprovocación en el grupo control.

	Inicial	Final	Variación	p
Frecuencia respiratoria	26,3 (5,6)	35,6 (7,4)	+ 9,3 (6,5)	0,0001
SaO <sub>2</sub> (%)	97,5 (0,8)	94,3 (2,3)	- 3,2 (2,2)	0,0001

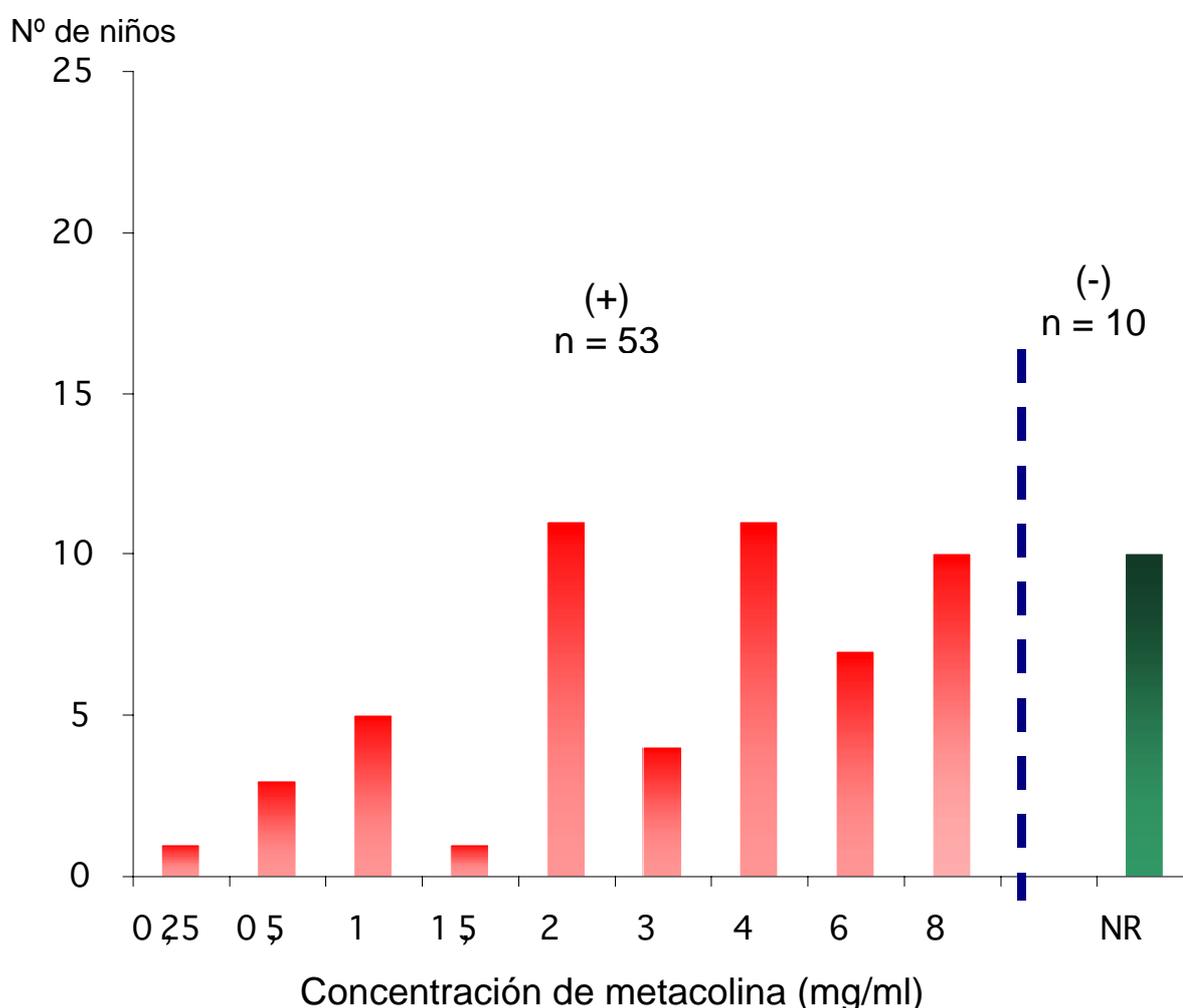
**Tabla 18.** Comparación de las variaciones de la frecuencia respiratoria y de la saturación de hemoglobina con la prueba de broncoprovocación en el grupo de pacientes con bronquitis de repetición y en el grupo control.

	Grupo control	Grupo bronquitis	p
Frecuencia respiratoria	+ 9,3 (6,5)	+ 16,0 (9,0)	0,008
SaO <sub>2</sub> (%)	- 3,2 (2,2)	- 4,3 (2,4)	0,118

### 1.4.3 - Grupo de pacientes con bronquitis sibilante de repetición

La prueba de broncoprovocación con metacolina se realizó en 63 pacientes afectados de bronquitis sibilante recidivantes, en fase asintomática. El valor mínimo obtenido fue de 0,25 mg/ml. Asumiendo un valor de 16 mg/ml en los casos sin respuesta a la metacolina, la media del grupo fue de 5,84 mg/ml (DE 5,02), con una mediana de 4,0 mg/ml y un intervalo de confianza al 95% (IC95%) de 4,58 a 7,11 mg/ml.

En 10 casos (15,9%) no hubo respuesta a la metacolina, en 10 la prueba fue positiva a concentraciones de metacolina 8 mg/ml y en 43 (68,2%) fue positiva a concentraciones de metacolina  $\leq 6$  mg/ml (figura 22)



**Figura 22.** Distribución de la respuesta a la metacolina en el grupo de pacientes con bronquitis de repetición, con el método de la auscultación traqueal modificado. (NR no respuesta)

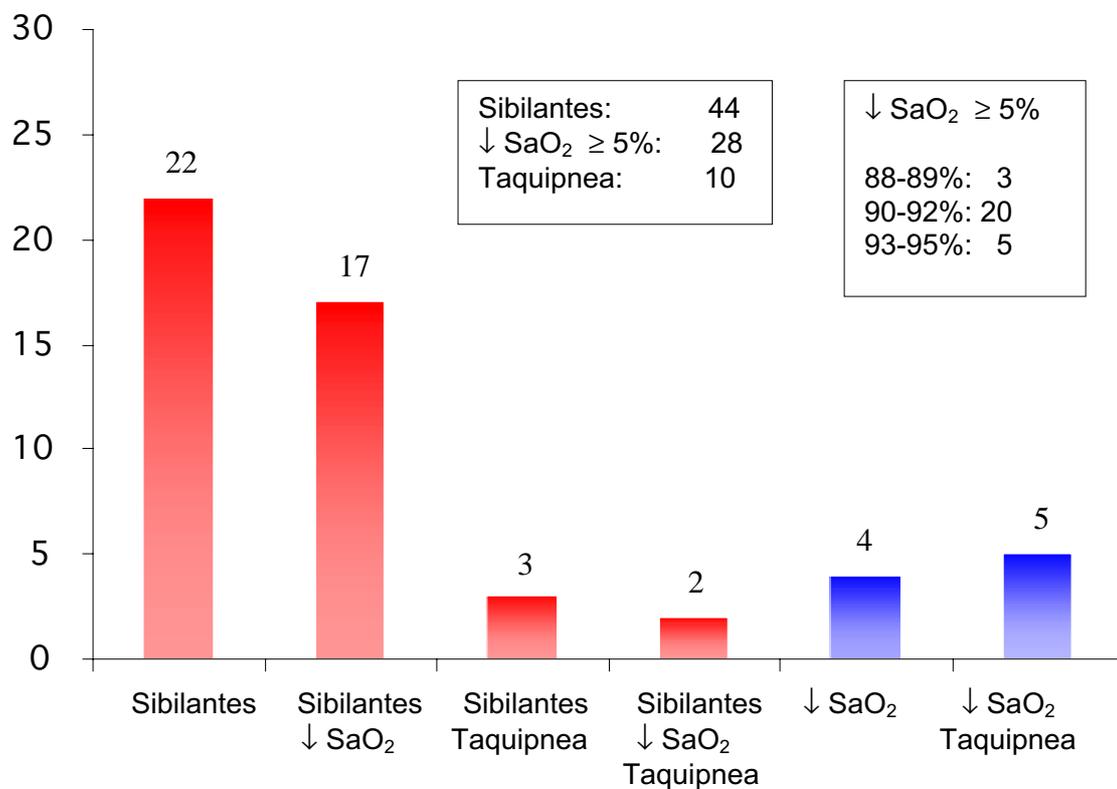
#### **1.4.4.- Criterios de respuesta y seguridad en el grupo con bronquitis de repetición**

De los 53 casos en que hubo respuesta a la metacolina, en 44 se consideró positiva la prueba por auscultarse sibilantes traqueales, que en 31 casos fueron traqueales y bronquiales y en 13 únicamente traqueales.

En los 9 casos restantes se consideró positiva por disminución de la saturación de oxígeno del 5% o más. Además el descenso de la saturación de oxígeno  $\geq 5\%$ , se observó también en 19 niños de los 44 en que se auscultaron sibilantes. El descenso medio de la SaO<sub>2</sub> fue del 4,3% (tabla 19).

Diez niños tuvieron un tercer criterio de positividad al detectarse un incremento del doble o mayor de la frecuencia respiratoria basal, manteniéndose la frecuencia dentro de rangos normales en el resto (53 casos). El incremento medio de la frecuencia respiratoria fue de 16 respiraciones/minuto (tabla 19), (figura 23).

En cuanto a otros efectos de la nebulización, no considerados criterios de positividad 35 niños presentaron tiraje intercostal, subcostal o suprasternal, y 28 no lo presentaron. En 41 casos presentaron tos. La tos apareció en 36 casos con prueba positiva y cinco casos sin respuesta a la metacolina. No presentaron tos 22 casos, de los cuales, en 17 la prueba de broncoprovocación fue positiva.



**Figura 23.** Criterios de respuesta a la metacolina en el grupo de pacientes con bronquitis sibilantes de repetición, con el método de la auscultación traqueal modificado.

**Tabla 19.** Variaciones de la frecuencia respiratoria y de la saturación de hemoglobina con la prueba de broncoprovocación en el grupo de pacientes con bronquitis de repetición.

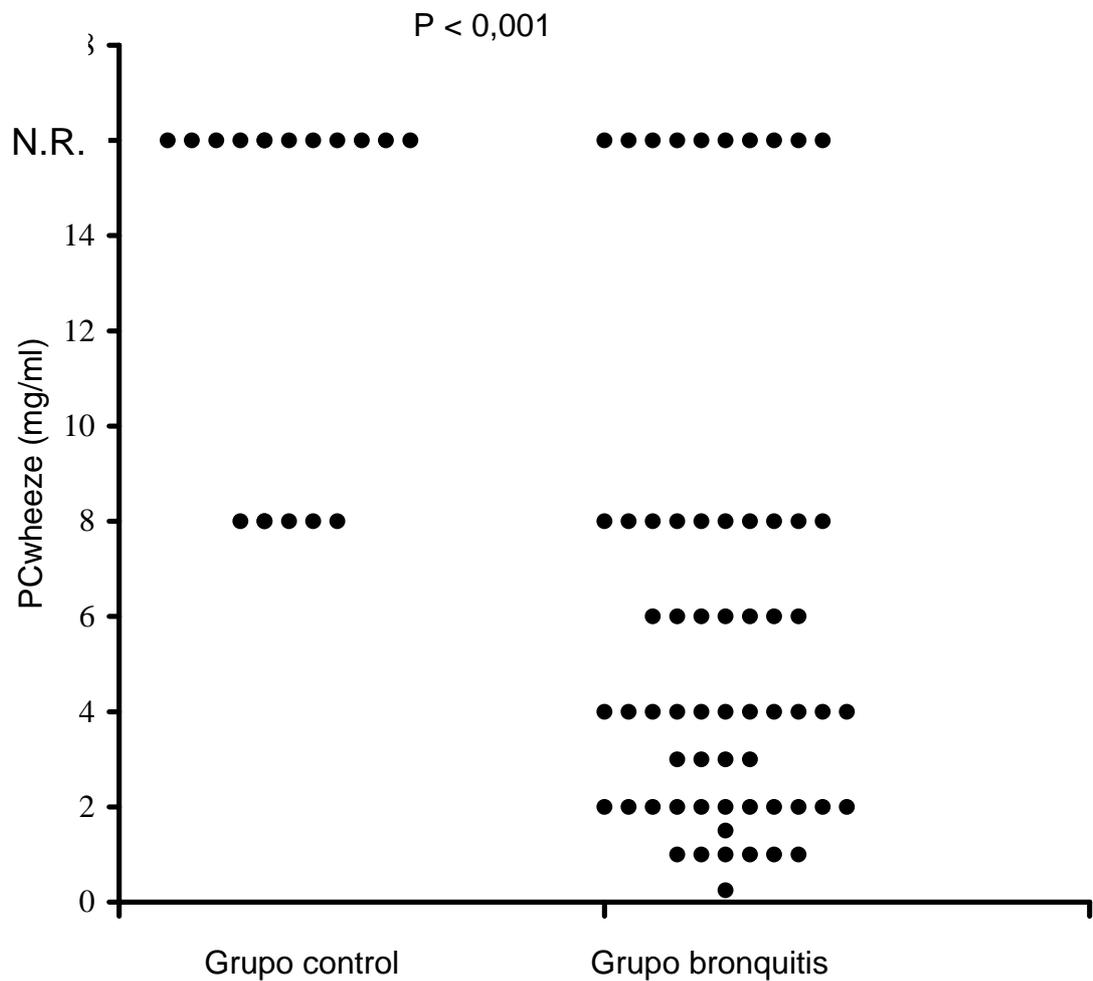
	Inicial	Final	Variación	p
Frecuencia respiratoria	27,7 (4,7)	43,7 (10,5)	+ 16,0 (9,0)	< 0,0001
SaO <sub>2</sub> (%)	97,2 (0,9)	92,9 (2,4)	- 4,3 (2,4)	< 0,0001

#### **1.4.5 .- Comparación del valor de la PCwheeze, entre el grupo control y el grupo con bronquitis de repetición.**

Asumiendo un valor de 16 mg/ml para los casos en que no hubo respuesta a la metacolina, el valor medio de la PCw en el grupo de pacientes con bronquitis fue de 5,84 mg/ml (DE 5,02) mientras que en el grupo control fue de 13,5 mg/ml (DE 3,8).

La diferencia entre el grupo control y el grupo bronquitis, fue estadísticamente significativa con una  $p < 0,001$  (figura 24).

Asumiendo este valor de 16 mg/ml para los casos sin respuesta a la metacolina el límite inferior de la normalidad en nuestra serie, a partir de los datos del grupo control sería de 8 mg/ml [calculando un intervalo de referencia del 95% de una cola, mediante un método no paramétrico de percentiles, ya que los valores de metacolina en el grupo control no siguen una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov:  $p = 0,003$ )]. De acuerdo con ello, el 68,2% de los niños del grupo con bronquitis de repetición presentaron una PCwheeze  $\leq$  a 6 mg/ml, inferior a la del grupo control.



**Figura 24.** Comparación de la respuesta a la metacolina entre el grupo control y el grupo con bronquitis sibilante de repetición, mediante el método de la auscultación traqueal modificado. Resultado expresado como PCwheeze (concentración de metacolina que produce sibilantes audibles en tráquea o campos pulmonares, o descenso de la  $SaO_2 \geq 5\%$ , o aumento de la frecuencia respiratoria  $\geq 50\%$ ). N.R.: no respuesta.

## **1.5. – ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES VARIABLES SOBRE EL RESULTADO DE LA PRUEBA DE BRONCOPROVOCACIÓN EN EL GRUPO DE PACIENTES CON BRONQUITIS SIBILANTE DE REPETICIÓN**

### **1.5.1. - Antecedentes familiares, personales y ambientales**

En el grupo de pacientes con bronquitis de repetición, se analizó la influencia de las diferentes variables recogidas sobre los resultados de la prueba de broncoprovocación (tablas 20, 21 y 22).

La influencia de las diferentes variables se estudió para las variables cualitativas comparando la media de la PCwheeze según la variable tuviera un valor u otro (tabla 20), y para las variables cuantitativas analizando la correlación entre el valor de la variable y la PCwheeze (tabla 21).

En el análisis realizado con las variables cualitativas (tabla 20), no hubo diferencias en el valor medio de la PCw en relación con las diferentes variables analizadas: género, antecedentes familiares de asma, rinitis o dermatitis atópica, tabaquismo pasivo durante el embarazo o posnatal, haber recibido lactancia materna, asistencia a guardería, tener 1 o más hermanos, antecedente de bronquiolitis por VRS y número de episodios de bronquitis en el último año.

En cuanto a las variables cuantitativas (tabla 21), no hubo correlación entre la edad de los pacientes en el momento de realizar la prueba y el valor de la PCw. Como se observa en la figura 25, la respuesta a la metacolina fue muy similar en los niños de diferentes grupos de edades.

Hubo una ligera tendencia a presentar un valor más bajo de la PCw en relación con un menor peso al nacimiento, que no alcanzó la significación estadística ( $R=0,24$ ;  $p=0,054$ ). Sí encontramos una correlación estadísticamente significativa entre la edad de los pacientes al padecer la primera bronquitis y la PCw ( $r = 0,26$ ;  $p = 0,04$ ), de forma que los pacientes que tenían una menor edad en el momento de presentar la primera bronquitis, presentaban un valor menor de la PCw.

Por otro lado, se estimó el riesgo (odd ratio) que suponía presentar una determinada característica para obtener una respuesta en la prueba de broncoprovocación a una concentración de metacolina inferior a la que presentaron los pacientes del grupo control (PCw < 8 mg/ml) (tabla 22).

Los niños que presentaron la primera bronquitis a una edad mayor presentaron un menor riesgo de presentar un valor de PCw inferior al del grupo control (OR 0,91; IC95% 0,84-0,99;  $p =0,049$ ). Si hacemos el cálculo inverso, por cada mes menos de

edad al presentar la primera bronquitis aumenta el riesgo de tener una PCw inferior a la del grupo control un 9,9%.

Los niños que recibieron lactancia materna presentaron una tendencia, sin alcanzar la significación estadística, a tener un mayor riesgo de presentar una respuesta a la metacolina a concentraciones  $\leq 6$  mg/ml (OR 3,09; IC95% 0,98 – 9,93;  $p=0,0053$ ), con tendencia a aumentar este riesgo con un mayor número de meses de lactancia materna (OR 1,14; IC95% 0,98 – 1,94;  $p=0,094$ ).

También, los niños que iniciaron la guardería a una edad más tardía tuvieron una tendencia no estadísticamente significativa a reaccionar menos a la metacolina (OR 0,95; IC95% 0,90 – 1,004;  $p=0,069$ ).

El resto de variables no incrementaron el riesgo de presentar una respuesta a la metacolina a una concentración  $< 8$  mg/ml (tabla 22).

**Tabla 20.** Influencia de las diferentes variables sobre la respuesta a la metacolina en el grupo de niños con bronquitis sibilantes de repetición.  
(Se asumió en los casos sin respuesta a la metacolina un valor de PCwheeze de 16 mg/mL).

	PCwheeze		
	Media (DE)	Media (DE)	P
Género	Varones	Mujeres	
	5,39 (4,8)	6,94 (5,7)	0,28
Antecedentes asma	No	Sí	
	6,45 (5,6)	4,98 (4,0)	0,25
Antecedentes rinitis	No	Sí	
	5,98 (5,26)	5,25 (3,9)	0,65
Antecedentes dermatitis atópica	No	Sí	
	5,77 (5,1)	6,43 (5,0)	0,75
Tabaco en el embarazo	No	Sí	
	5,77 (4,8)	6,07 (5,9)	0,85
Tabaquismo pasivo	No	Sí	
	4,84 (4,23)	6,42 (5,4)	0,23
Lactancia materna	No	Sí	
	7,28 (6,2)	5,27 (4,4)	0,154
Asistencia a guardería	No	Sí	
	5,4 (5,3)	6,14 (4,9)	0,57
1 o más hermanos	No	Sí	
	6,75 (5,7)	5,36 (4,6)	0,30
Bronquiolitis por VRS	Negativo	Positivo	
	3,89 (4,8)	6,00 (4,9)	0,30
Episodios último año	3-5	5-9	≥ 10
	5,74 (4,5)	5,62 (5,2)	7,17 (6,6)
			0,76

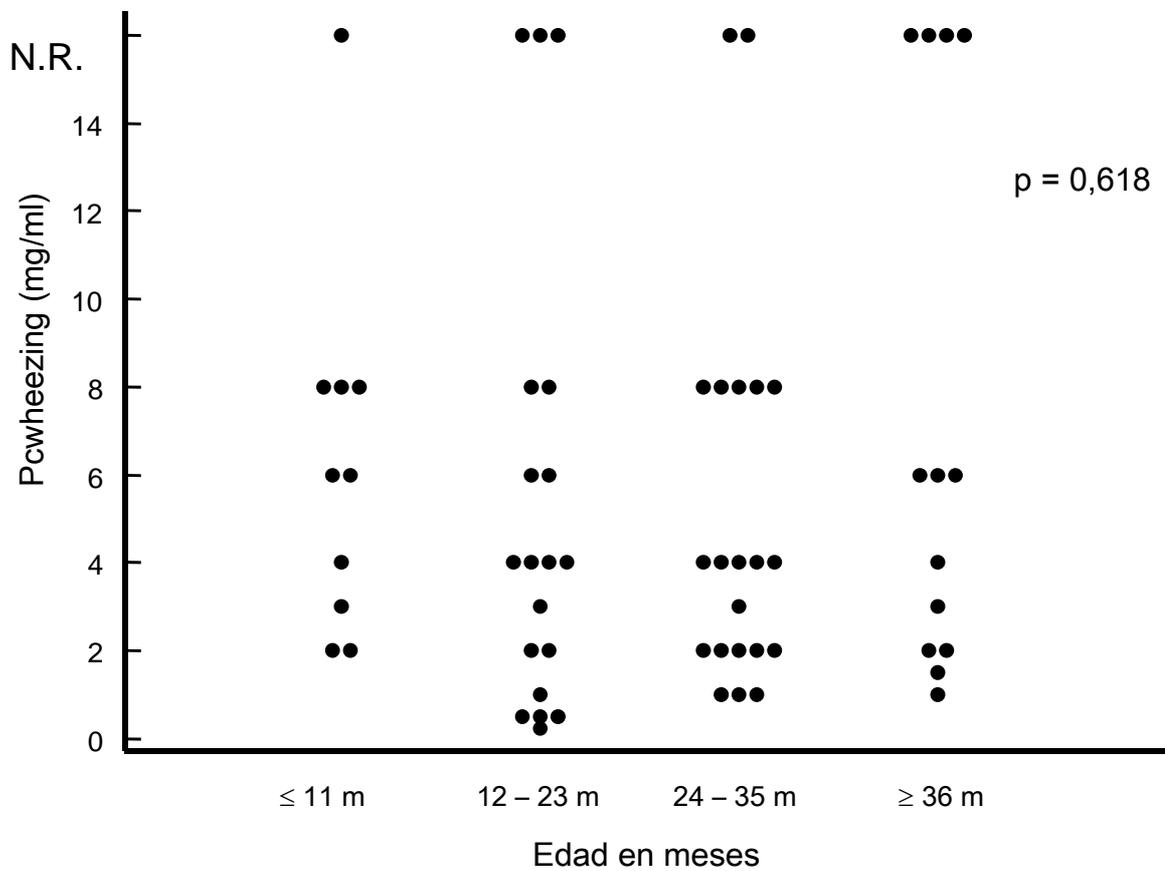
VRS: virus respiratorio sincitial

**Tabla 21.** Influencia de las diferentes variables en la respuesta a la metacolina en el grupo de niños con bronquitis sibilantes de repetición.  
(Se asumió en los casos sin respuesta a la metacolina un valor de PCwheeze de 16 mg/mL).

	<b>Correlación de Pearson</b>	<b>P</b>
Edad (meses)	R = 0,11	0,37
Peso nacimiento	R = 0,24	0,054
Edad 1 <sup>a</sup> bronquitis	R = 0,26	0,04

**Tabla 22.** Influencia de las diferentes variables sobre la probabilidad de obtener una respuesta a la metacolina en el grupo de niños con bronquitis sibilantes de repetición a un valor inferior a los obtenidos en el grupo control (respuesta positiva: PCw < 8 mg/ml).

	OR	IC 95%	P
Género	0,45	0,14 – 1,42	0,177
Antecedentes asma	2,03	0,66 – 6,27	0,210
Antecedentes rinitis	2,73	0,54 – 13,82	0,192
Antecedentes dermatitis atópica	0,58	0,12 – 2,88	0,512
Tabaco embarazo	0,82	0,23 – 2,86	0,75
Tabaquismo pasivo	0,463	0,14 – 1,51	0,188
Lactancia materna	3,09	0,98 – 9,73	0,053
Meses lactancia materna	1,14	0,98 – 1,34	0,094
Guardería	0,75	0,25 – 2,25	0,605
Edad inicio guardería	0,95	0,90 – 1,004	0,069
Número de hermanos	1,79	0,73 – 4,42	0,204
Edad 1ª bronquitis	0,91	0,84 – 0,99	0,049
Edad en el test	0,99	0,95 – 1,04	0,951
Episodios último año			
6 – 9	2,63	0,81 – 8,59	0,108
≥ 10	0,92	0,17 – 4,93	0,919
Tratamiento con corticoides	0,80	0,25 – 2,60	0,713



**Figura 25.** Respuesta a la metacolina en el grupo de pacientes de bronquitis de repetición, con el método de la auscultación traqueal modificado, clasificados por grupos de edades en el momento de la realización de la prueba. N.R. : no respuesta.

### 1.5.2. - Niveles de IgE

Se estudió la relación entre el valor de IgE y el grado de hiperrespuesta bronquial medido con el test de metacolina: de los 63 niños con bronquitis sibilante sólo 11 tenían un valor de IgE  $\geq 100$  UI/ml, y en éstos el valor medio de la PCw fue de 5,0 mg/ml (DE 4,80). Entre los pacientes que presentaron valores de IgE  $< 100$  UI/ml, el valor medio de la PCw fue de 6,02 mg/ml (DE 5,09). Las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas ( $p=0,54$ )

Entre los 20 pacientes que tuvieron un comportamiento similar al del grupo control (no respuesta o respuesta a concentración de 8 mg/ml), el valor medio de IgE fue de 62,80 mU/L (DE 125,6), mientras entre los 43 niños en los que hubo una respuesta a la prueba de metacolina a concentraciones menores de 8 mg/ml el valor de IgE fue de 45,40 mU/L (DE 77,3). Las diferencias entre ambos grupos tampoco fueron significativas ( $p = 0,501$ ).

No hubo ninguna correlación entre el valor de la IgE total y el valor de la PCw ( $r = -0,049$ ;  $p= 0,7$ ).

### 1.5.3. – Niveles de eosinófilos

También se estudió la relación entre la cifra de eosinófilos y la PCw.

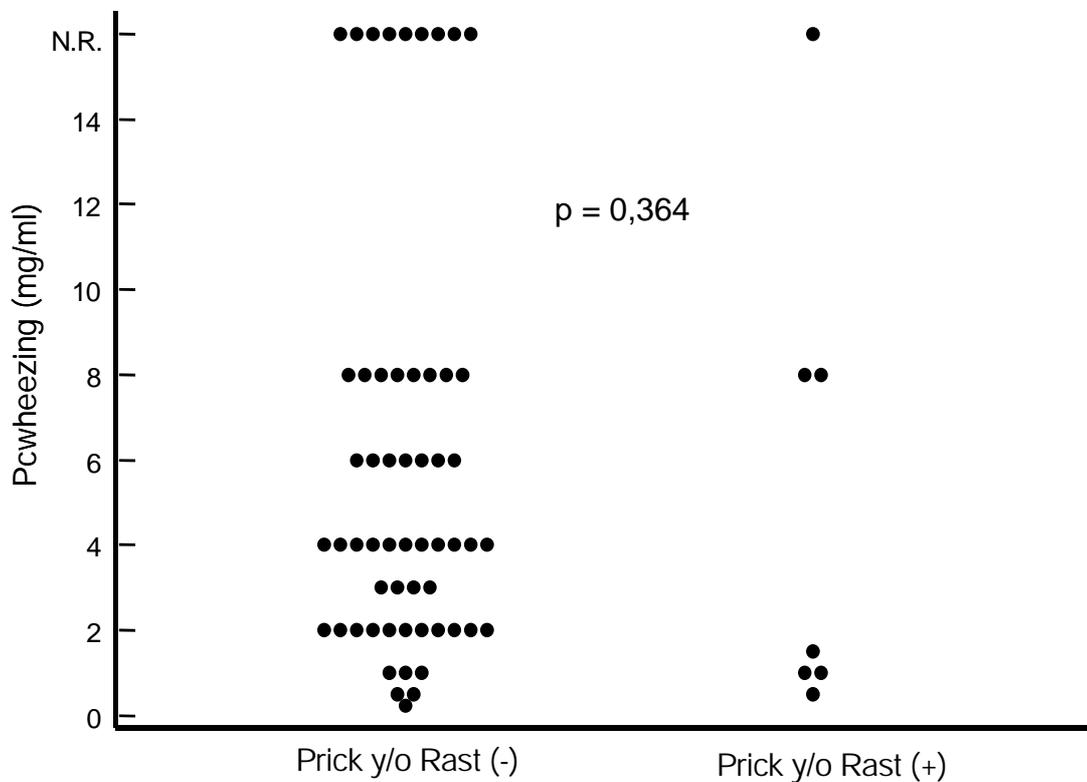
Los eosinófilos fueron normales ( $< 400/\text{mm}^3$ )<sup>246</sup> en 52 niños y estaban aumentados en once. Entre los niños que presentaron cifras normales de eosinófilos, el valor medio de la PCw fue de 5,55 mg/ml (DE 4,79). En los once pacientes que presentaron eosinofilia, el valor medio de la prueba fue de 7,22 mg/ml (DE 6,04). Las diferencias no fueron significativas ( $p= 0,31$ ).

Entre los 20 pacientes que tuvieron un comportamiento similar al del grupo control (no respuesta o respuesta a concentración de 8 mg/ml), el valor medio de eosinófilos fue de  $380,6/\text{mm}^3$  (DE 242,0), mientras entre los 43 niños en los que hubo una respuesta a la prueba de metacolina a concentraciones menores de 8 mg/ml el valor medio de éstos fue de  $316,3/\text{mm}^3$  (DE 215,3). Las diferencias entre ambos grupos tampoco fueron significativas ( $p =0,573$ ).

No hubo ninguna correlación entre la cifra de eosinófilos y el valor de la PCw ( $r= 0,17$ ;  $p=0,19$ ).

#### 1.5.4.- Test cutáneos a neumoalergenos y IgE específica a neumoalergenos

En 7 pacientes las pruebas cutáneas a neumoalergenos o la IgE específica fueron positivas. Seis de ellos (85,7%) presentaron respuesta a la metacolina, dos a una concentración de 8 mg/ml, y 4 a una concentración inferior a 2 mg/ml (figura 26). Esta proporción de respuestas a la metacolina no fue diferente de la del resto de pacientes ( $p = 0,669$ ). Tampoco hubo diferencias entre las medianas de ambos grupos de pacientes (1,5 mg/ml versus 4 mg/ml;  $p = 0,364$ ), asumiendo un valor de 16 mg/ml para los casos sin respuesta positiva.



**Figura 26.** Comparación de la respuesta a la metacolina entre el grupo de pacientes con pruebas cutáneas y o IgE específica a neumoalergenos positivas y el grupo de pacientes con resultado negativo en ambas pruebas (NR: No respuesta)

### **1.5.5. - Tratamiento recibido en el momento de hacer la prueba.**

Cuarenta y cuatro de los niños incluidos en el estudio, no llevaban tratamiento en el momento de realizarse la prueba de broncoprovocación. En ellos, el valor medio de la metacolina fue de 5,51 mg/ml (DE 4,85).

Diecisiete pacientes tomaban corticoides inhalados administrados mediante cámara espaciadora. La media de la PCw en ellos fue de 7,0 mg/ml (DE 5,55). La diferencia entre el grupo sin tratamiento y el grupo que recibía corticoides inhalados, no fue significativa ( $p= 0,308$ ).

Dos niños tomaban montelukast. En ellos el valor de la PCw fue de: 0,5 y 6 mg/ml respectivamente.

## **2. - DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO**

Entre marzo de 2002 y septiembre de 2003 se incluyeron en esta parte del estudio 63 niños afectados de bronquitis sibilante de repetición, de los que se determinó el óxido nítrico exhalado ( $F_{E}NO$ ; fracción espiratoria de óxido nítrico) en 62, y 23 controles sanos de los que finalmente se determinó el  $F_{E}NO$  en 18.

Además se ha estudiado también otro grupo de 19 niños sanos, en los que existían antecedentes de tabaquismo familiar y/o bronquitis en padres o hermanos

### **2.1.- CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

#### **2.1.1.- Características basales del grupo con bronquitis de repetición**

La población de estudio fue la misma que se utilizó para el estudio de hiperrespuesta bronquial formada por 63 niños con edades entre 8 y 47 meses, afectados de bronquitis sibilante de repetición. En un niño varón de 18 meses de este grupo no fue posible la determinación del óxido nítrico exhalado, por lo que el grupo de estudio estuvo formado finalmente por 62 niños. Las características del grupo son pues prácticamente idénticas a las descritas previamente, y quedan resumidas en la tabla 23.

#### **2.1.2. - Características basales del grupo control**

El grupo control para la determinación del  $F_{E}NO$  estuvo formado por 18 niños: 10 niños del grupo control utilizado para la valoración de la hiperrespuesta bronquial, y 8 nuevos niños normales. Todos ellos cumplían los requisitos para pertenecer al grupo control: niños sanos, sin antecedentes de bronquitis ni asma ni en el niño ni en familiares de primer grado, y ausencia de tabaquismo pasivo.

El motivo de no realizar el óxido nítrico exhalado en 5 niños del grupo control en los que se valoró la hiperrespuesta bronquial fue el hecho de no insistir en su determinación si los niños se mostraban algo reacios, ya que interesaba obtener su máxima colaboración para la prueba de broncoprovocación.

La edad media fue de 20,5 meses (DE 12,6), con un rango de 6 a 46 meses y una mediana de 18. Hubo 14 varones (77,8%) y 4 mujeres (22,2%) (tabla 23).

El peso al nacer fue en media de 3185,9 g (DE 519,0 g), siendo el rango de 2395 a 4025 g y la mediana de 3150 g.

La edad gestacional promedio fue de 40 semanas (DE 1,59 semanas) un mínimo de 37 semanas y un máximo de 42, y una mediana calculada de 40.

Ningún caso presentó antecedentes perinatales de interés.

En 17 casos (94,4%) habían recibido lactancia materna (con un rango entre 1 y 12 meses), con una media de tiempo de lactancia de 5,12 (DE 2,9 meses).

En cuanto a la guardería, 13 no habían acudido, y 5 sí la habían frecuentado (27,7%), con una edad media global de entrada de 6,45 (DE 8,4 meses).

La media del número de hermanos, en este grupo fue de 1,5 (DE 1,9), con un rango de 0 a 6 y una mediana de 1.

### **2.1.3.- Comparación de las características basales entre el grupo de estudio y el grupo control**

En la tabla 23, se recogen las características basales del grupo control, comparando con las del grupo con bronquitis de repetición.

Como se observa los dos grupos fueron comparables en cuanto a edad en el momento de realización de la prueba, género y peso al nacimiento. La edad gestacional media fue ligeramente superior en el grupo control (40 versus 39,2 semanas;  $p = 0,049$ ), aunque en ambos casos se trató de recién nacidos a término.

No hubo tampoco diferencias en cuanto a la proporción de lactancia materna y asistencia a guardería y únicamente hubo diferencias en cuanto al número de hermanos ( $p=0,004$ ).

**Tabla 23.** Comparación de las características basales entre el grupo control y el de pacientes afectados de bronquitis sibilantes de repetición. Valores expresados como media (desviación estándar) o porcentaje de casos.

	<b>Grupo control</b> (n=18)	<b>Grupo bronquitis</b> (n=62)	<b>p</b>
Edad (meses)	20,5 (12,6)	25,3 (11,5)	0,128
Género	14 V / 4 M (V 77,8%)	44 V / 18 M (V 70,9%)	0,798
Peso al nacer (g)	3185,9 (519,0)	3162,8 (528,6)	0,873
Edad gestacional (semanas)	40 (1,59)	39,2 ( 1,32)	0,049
Lactancia materna	17/18 (94,4%)	44/62 (70,9%)	0,098
Lactancia materna (meses)	5,12 (2,9)	4,18 (4,4)	0,400
Asistencia a guardería	5/18 (27,7%)	38/62	0,024
Guardería (edad entrada) (meses)	6,45 (8,4)	9,79 (10,3)	0,315
Número de hermanos	1,5 (1,9)	0,74 (0,62)	0,009

**V:** varones **M:** mujeres

#### **2.1.4.- Grupo de niños sanos con historia de tabaquismo pasivo y/o antecedentes familiares de bronquitis**

Además de los niños que cumplían los requisitos estrictos para pertenecer al grupo control, se determinó el óxido nítrico en otro grupo de 19 niños sanos en este rango de edad, sin antecedentes de bronquitis, pero en los que existían antecedentes de tabaquismo familiar y/o bronquitis en padres o hermanos. De los 19 niños, 17 tenían antecedentes de exposición al tabaco posnatal (en 4 casos también durante el embarazo), y 5 de bronquitis o asma en padres o hermanos, coincidiendo ambos antecedentes en 3 de los niños.

En la tabla 24 se comparan las características basales de este grupo con el grupo control de niños sanos sin antecedentes familiares de bronquitis ni de tabaquismo pasivo. Como se observa los grupos fueron comparables en la edad y el peso al nacimiento, pero no en el sexo, existiendo un mayor porcentaje de varones (77,8%) en el grupo control que en el grupo de niños sanos con antecedentes (36,8%), ni en la edad gestacional algo menor en el grupo con antecedentes, aunque todos eran recién nacidos a término.

**Tabla 24.** Comparación de las características basales entre el grupo control y el grupo de niños sanos con antecedentes de tabaquismo pasivo o antecedentes familiares de bronquitis. Valores expresados como media (desviación estándar) o porcentaje de casos.

	<b>Grupo control</b> (n=18)	<b>Niños sanos con</b> <b>antecedentes</b> (n=19)	<b>p</b>
Edad (meses)	20,5 (12,6)	16,89 (12,5)	0,389
Género	14 V / 4 M (V 77,8%)	7 V / 12 M (V 36,8%)	0,029
Peso al nacer (g)	3185,9 (519,0)	3259,1 (312,4)	0,629
Edad gestacional (semanas)	40 (1,59)	38,8 (1,25)	0,018
Lactancia materna	17/18 (94,4%)	16/19 (84,2%)	0,679
Lactancia materna (meses)	5,12 (2,9)	4,42 (3,3)	0,509
Asistencia a guardería	5/18 (27,7%)	6/19 (31,6%)	0,950
Guardería (edad entrada) (meses)	6,45 (8,4)	17,75 (14,7)	0,081
Número de hermanos	1,5 (1,9)	1,0 (1,1)	0,345

## **2.2. - RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO**

### **2.2.1.- Grupo control**

Se realizó en 16 niños sanos, que no habían presentado ninguna infección intercurrente en las 3 semanas previas. Se tomaban 2 muestras de igual forma que en el grupo de bronquitis.

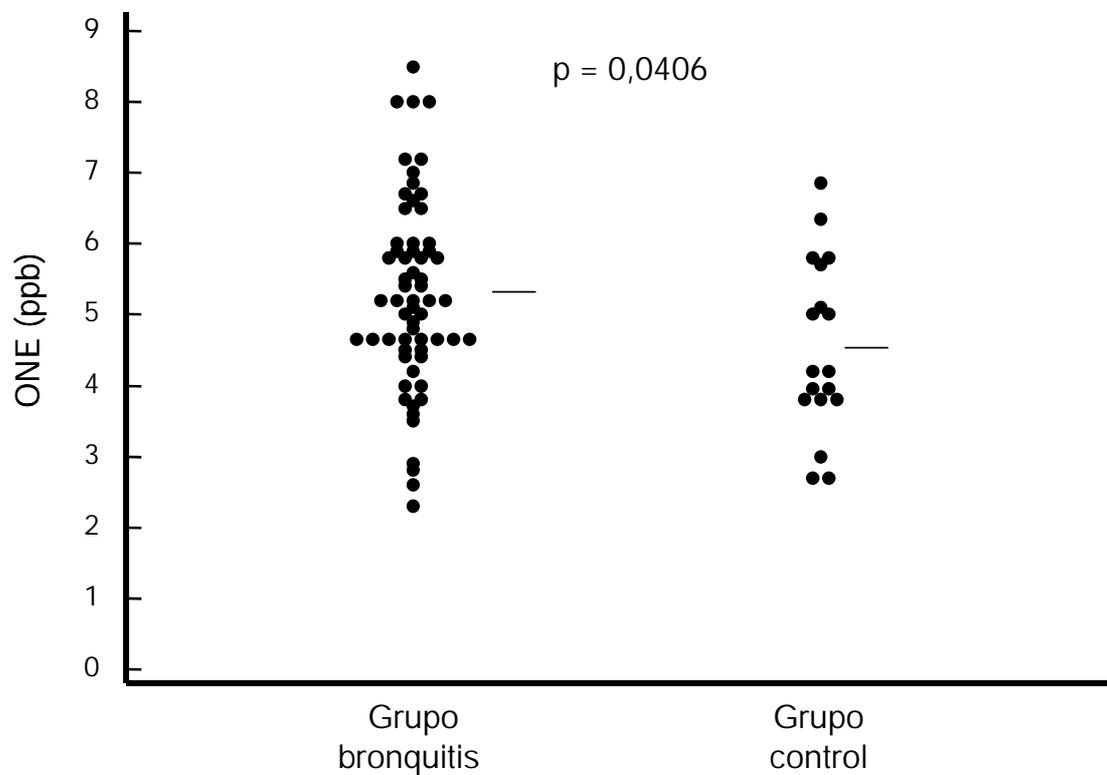
El valor mínimo obtenido fue 2,30 ppb, y el máximo de 6,85 ppb. La media del grupo fue de 4,55 ppb (DE 1,23). El intervalo de confianza al 95% para la media fue de 3,93 a 5,16 ppb.

### **2.2.2.- Grupo de pacientes con bronquitis sibilantes**

En los 62 pacientes afectados de bronquitis sibilante de repetición en los que se determinó el valor del óxido nítrico exhalado, el valor mínimo obtenido fue 2,30 ppb, y el máximo de 8,50 ppb. La media del grupo fue de 5,28 ppb, (DE 1,34). El intervalo de confianza al 95% para la media fue de 4,94 a 5,62 ppb.

### **2.2.3.- Comparación entre el grupo de pacientes con bronquitis de repetición y el grupo control**

La diferencia entre el valor del óxido nítrico exhalado obtenido en el grupo de pacientes con bronquitis de repetición fue estadísticamente significativa ( $p = 0,0406$ ) (figura 27), aunque existió una superposición muy amplia de valores entre ambos grupos.



**Figura 27.** Comparación de los valores de óxido nítrico exhalado (ONE) entre el grupo de pacientes con bronquitis de repetición y el grupo control. Las líneas horizontales representan los valores medios.

### **2.3.- INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES VARIABLES SOBRE EL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO EN NIÑOS SANOS**

Se analizó la influencia de las siguientes variables sobre los niveles de óxido nítrico exhalado en niños normales: edad, género, edad gestacional, peso al nacimiento, tabaquismo pasivo y antecedentes personales de asma (tabla 25). Para ello se incluyeron todos los niños normales, con o sin antecedentes de bronquitis y con o sin antecedentes de tabaquismo pasivo.

No hubo diferencias en los valores de óxido nítrico exhalado en relación con la edad, la edad gestacional o el peso al nacimiento.

Tampoco la hubo en relación con el tabaquismo pasivo posnatal. No se pudo valorar la posible relación con la exposición al tabaco en el embarazo dado el escaso número de niños que estuvieron expuestos (4/37).

Hubo una tendencia no significativa a presentar valores más elevados de óxido nítrico exhalado en los niños con antecedentes personales de asma, aunque el número de niños incluido con estos antecedentes era muy pequeño (5/37).

Sí hubo relación entre el género y el valor del óxido nítrico exhalado, presentando las niñas un valor más elevado de óxido nítrico exhalado.

**Tabla 25.** Influencia de las diferentes variables sobre los valores de óxido nítrico exhalado en niños sanos (n=37)

	<b>Oxido nítrico exhalado Media (DE)</b>	<b>Oxido nítrico exhalado Media (DE)</b>	<b>Análisis univariante P</b>	<b>Análisis multivariante P</b>
Género	Varones (n=21) 4,36 (1,1)	Mujeres (n=16) 5,32 (0,8)	0,005	0,027
Antecedentes de asma	No (n=32) 4,66 (1,1)	Sí (n=5) 5,51 (0,8)	0,096	0,344
Tabaquismo pasivo	No (n=20) 4,58 (1,2)	Sí (n=17) 5,00 (0,9)	0,235	0,955
	Coeficiente de correlación de Pearson			
Edad (meses)	r = - 0,031		0,857	0,583
Edad gestacional (semanas)	r = -0,105		0,309	
Peso al nacimiento (g)	r = - 0,25		0,155	

## **2.4. - INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES VARIABLES SOBRE EL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO EN EL GRUPO DE NIÑOS CON BRONQUITIS DE REPETICIÓN**

Se analizó la influencia de las siguientes variables sobre el óxido nítrico exhalado en el grupo de pacientes con bronquitis de repetición: edad, género, antecedentes familiares de asma, exposición al tabaco durante el embarazo y tabaquismo pasivo posnatal, nivel de IgE, número de eosinófilos, número de episodios previos de bronquitis, tratamiento recibido y resultados de la prueba de broncoprovocación.

### **2.4.1.- Antecedentes familiares, personales y ambientales**

Hubo una tendencia a presentar valores menores de óxido nítrico exhalado en los niños de menor edad, que no alcanzó la significación estadística ( $r= 0,24$ ;  $p=0,061$ ).

En el grupo de pacientes con bronquitis de repetición, a diferencia del grupo de niños sanos, no existió relación entre el género y los niveles de óxido nítrico exhalado. Tampoco la hubo con la edad gestacional ni el peso al nacimiento.

No hubo relación entre los niveles de óxido nítrico exhalado y la presencia de antecedentes familiares de asma. Tampoco hubo relación con la exposición al tabaco durante el embarazo, y el valor de óxido nítrico exhalado fue ligeramente superior en los niños expuestos al tabaco posnatalmente, pero de forma no significativa ( $p=0,098$ ).

No hubo relación entre el número de episodios previos de bronquitis que habían presentado los pacientes y el nivel de  $F_{E}NO$ .

### **2.4.2. - Niveles de IgE**

Los niños con un nivel de IgE  $\geq 100$  UI/ml tuvieron un valor ligeramente más elevado de óxido nítrico exhalado (5,99 ppb) que los niños con una IgE  $< 100$  UI/ml (5,13 ppb), en el límite de la significación estadística ( $p = 0,052$ ). Al analizar de forma cuantitativa la correlación entre el nivel de IgE y el valor del óxido nítrico exhalado, esta no fue significativa ( $r = 0,15$ ;  $p = 0,256$ ).

### **2.4.3 – Niveles de eosinófilos**

Los niños con un recuento de eosinófilos  $\geq 400/mm^3$  presentaron una cifra más elevada de óxido nítrico exhalado (6,21 ppb) que los niños con un recuento  $<$

400/mm<sup>3</sup>, de forma significativa ( $p = 0,01$ ). Al analizar de forma cuantitativa la correlación entre el recuento de eosinófilos y el valor del óxido nítrico exhalado, esta no alcanzó la significación estadística ( $r = 0,24$ ;  $p = 0,063$ ).

#### **2.4.4.- Test cutáneos a neuroalergenos y IgE específica a neuroalergenos**

En 7 pacientes las pruebas cutáneas a neuroalergenos o la IgE específica fueron positivas. La mediana del valor de F<sub>E</sub>NO fue ligeramente superior (6,7 ppb) que en el grupo con pruebas negativas (5,2 ppb), pero sin ser la diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,1221$ ).

#### **2.4.5.- Hiperrespuesta bronquial y nivel de óxido nítrico exhalado**

No hay diferencias significativas en el nivel de óxido nítrico exhalado entre el grupo que presentó hiperrespuesta bronquial (PCw  $\geq 6$  mg/ml) y el que no la presentó (PCw  $\geq 8$  mg/ml)

Tampoco hubo relación entre el número de crisis de bronquitis agudas presentadas en el último año y el óxido nítrico exhalado, siendo equivalente el óxido nítrico exhalado en los 3 grupos (3 a 5; 6 a 9;  $\geq 10$  episodios)

**Tabla 26.** Relación entre los niveles de óxido nítrico exhalado y las diferentes variables cuantitativas en el grupo de niños con bronquitis sibilantes de repetición.

	F <sub>E</sub> NO		Análisis
	Media (DE)	Media (DE)	univariante
			P
Género	Varones (n=44)	Mujeres (n=18)	
	5,45 (1,4)	4,89 (1,1)	0,150
Antecedentes de asma	No (n=37)	Sí (n=25)	
	5,25 (1,5)	5,32 (1,17)	0,851
Tabaquismo pasivo	No (n=23)	Sí (n=39)	
	5,65 (1,3)	5,06 (1,3)	0,098
Madre fuma embarazo	No (n=47)	Sí (n=14)	
	5,23 (1,2)	5,26 (1,7)	0,937
Número de eosinófilos	< 400/mm <sup>3</sup> (n=51)	≥ 400/mm <sup>3</sup> (n=11)	
	5,08 (1,24)	6,21 (1,4)	0,01
Nivel de IgE	< 100 UI/ml (n=51)	≥ 100 UI/ml (n=11)	
	5,13 (1,3)	5,99 (1,4)	0,052
Prueba de broncoprovocación (PCwheeze)	PCw ≥ 8 mg/ml (n=20)	PCw ≤ 6 mg/ml (n=42)	
	5,59 (1,4)	5,13 (1,3)	0,212
Número de episodios de bronquitis	3 – 5 (n=27)	6 – 9 (n=28)	≥ 10 (n=7)
	5,19 (1,2)	5,39 (1,4)	5,25 (1,7)

**Tabla 27.** Relación entre los niveles de óxido nítrico exhalado y las diferentes variables cualitativas en el grupo de niños con bronquitis sibilantes de repetición.

	<b>Coefficiente de correlación de Pearson</b>	<b>Análisis univariante p</b>
Edad (meses)	r = 0,24	0,061
Número de eosinófilos	r = 0,24	0,063
Ig E	r = 0,15	0,239
Prueba de broncoprovocación (PCwheeze)	r = 0,15	0,256
Edad gestacional (semanas)	r = -0,10	0,44
Peso al nacimiento (g)	r = 0,017	0,891

#### **2.4.5. - Tratamiento recibido en el momento de hacer la prueba.**

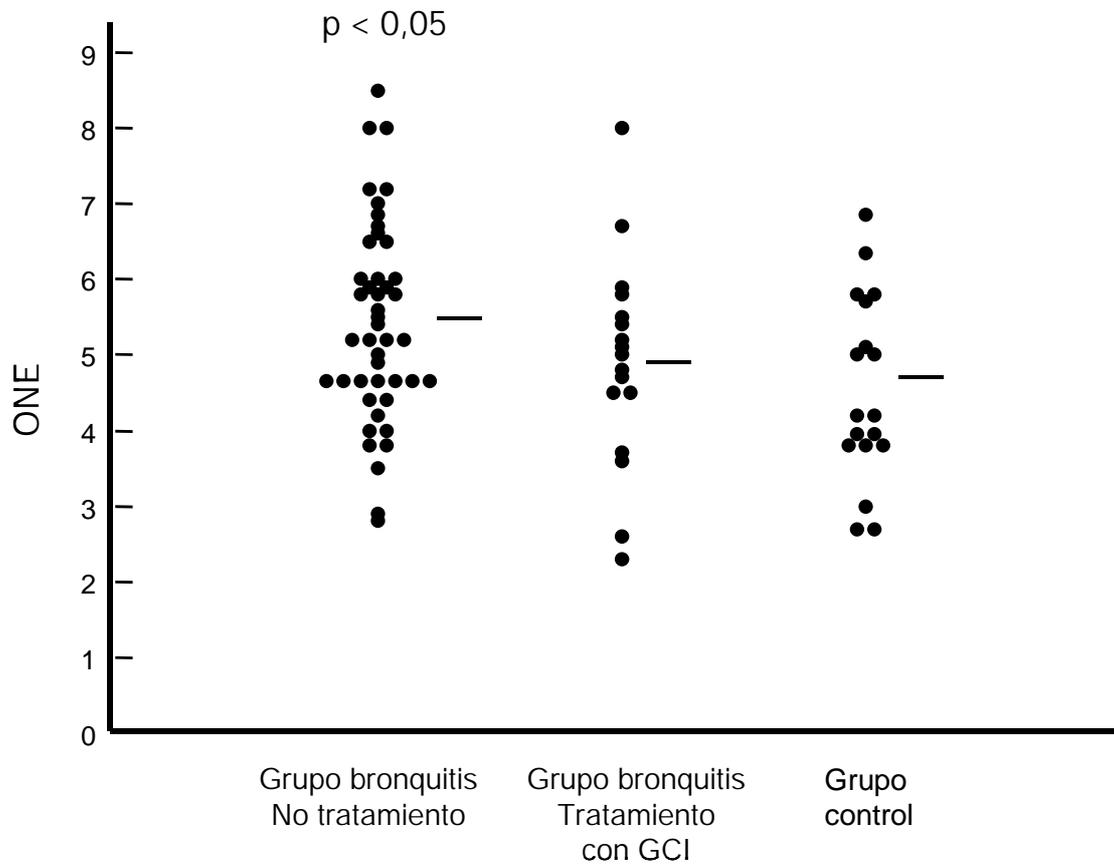
Cuarenta y tres niños de los incluidos en el estudio, no llevaban tratamiento a la hora de realizarse la determinación de óxido nítrico exhalado. En ellos, el valor medio de  $F_{E}NO$ , previo a la prueba de broncoprovocación, fue de 5,39 ppb (DE 1,3).

Diecisiete niños tomaban corticoides inhalados mediante cámara. La media del óxido nítrico exhalado fue de 4,90 (DE 1,39).

No hubo diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con corticoides ( $P=0,211$ ).

Dos niños tomaban montelukast. En ellos los valores de  $F_{E}NO$  fueron de 5,80 y 6,70 ppb respectivamente.

Al comparar las diferencias en cuanto al  $F_{E}NO$ , entre el grupo control y los pacientes con bronquitis de repetición según recibieran o no tratamiento con corticoides inhalados (figura 28), la diferencia fue significativa entre los pacientes que no recibían tratamiento con corticoides y los del grupo control, pero no entre los pacientes que sí recibían tratamiento con corticoides y el grupo control.



GCI: Glucocorticoides inhalados. ONE: óxido nítrico exhalado

**Figura 28.** Comparación del resultado del óxido nítrico exhalado en los pacientes según recibieran o no tratamiento con corticoides inhalados en el momento de realizar la prueba.

# DISCUSIÓN



## **1.- ESTUDIO DE HIPERRESPUESTA BRONQUIAL EN NIÑOS NO COLABORADORES**

Este estudio, fue diseñado para determinar la presencia o no de hiperrespuesta bronquial en los niños afectos de bronquitis con sibilantes en edades tempranas.

Es el primer estudio realizado en nuestro país que estudia, con técnicas no invasoras, la hiperrespuesta bronquial en los niños con bronquitis sibilantes menores de 4 años de edad.

Los objetivos de nuestro trabajo han sido principalmente dos:

- Determinar la utilidad, seguridad y eficacia de la prueba de provocación bronquial con metacolina en los niños pequeños (preescolares).
- Determinar la respuesta bronquial a la metacolina en un grupo de niños preescolares, menores de 4 años, afectos de sibilantes, comparandola con un grupo control de niños sanos de iguales edades y características.

### **1.1.- UTILIDAD, SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA PRUEBA DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL CON METACOLINA EN NIÑOS EN EDAD PREESCOLAR**

Hemos demostrado en este estudio que la determinación de la hiperrespuesta bronquial mediante la prueba de provocación bronquial con metacolina y el método de auscultación traqueal modificado, es **factible** en niños de corta edad. En nuestro trabajo todos los niños incluidos, tanto en el grupo de pacientes afectos de sibilantes, como en el grupo control, fueron capaces de realizar la prueba en su totalidad.

La prueba es relativamente sencilla, no necesita cooperación por parte de los niños, de forma que se puede realizar independientemente de la edad del niño y no precisa sedación.

En nuestra experiencia hemos visto que la prueba ha sido más fácil de realizar en los niños más pequeños (6 a 12 meses), que no se cuestionan lo que sucede, y en los mayores del grupo (mayores de 2 años), que comprenden las explicaciones que se les dan sobre la prueba. En cuanto a las edades intermedias, es de gran ayuda la madre, que puede favorecer que el niño esté tranquilo, pues aunque ya hemos comentado que la prueba es segura, los niños la pueden vivir como una agresión (debido a las nebulizaciones y al tiempo de duración de la misma).

Los principales inconvenientes para conseguir la colaboración de los niños en la realización de la prueba son:

- La necesidad de utilizar una mascarilla facial para inhalar la metacolina, dado que al colocársela al niño se siente incómodo, lo que favorece el llanto.
- La sensación irritante de las vías aéreas provocada por la metacolina que a veces provoca tos, que altera al niño y/o a la familia. Sin embargo, la tos puede no ser un signo de obstrucción de las vías aéreas (ya que frecuentemente precede en 2 o más concentraciones a la obstrucción de la vía aérea que provoca la caída del FEV<sub>1</sub> o la aparición del parámetro utilizado en la medida de la hiperrespuesta bronquial, en nuestro caso los sibilantes). Nosotros hemos observado que en efecto, precede a la obstrucción de la vía aérea y a veces se da en inhalaciones de metacolina de forma aislada, cediendo al acabar dicha inhalación. Los pacientes más mayores (de 3 años) lo relacionan con discomfort más que con sensación de ahogo o dificultad respiratoria y asimismo sugieren que mejora con la ingesta de agua (aspecto no descrito) Como sugieren algunos autores<sup>17</sup>, posiblemente la tos indique un efecto dosis respuesta de la metacolina actuando como irritante sobre los receptores bronquiales y pulmonares más que un resultado de la broncoconstricción.
- La sensación de dificultad respiratoria creciente que puede notar el niño antes de que la prueba sea positiva, lo que lo puede inquietar, de forma que puede presentar una conducta de evitación durante las últimas inhalaciones.
- El tiempo de realización de la prueba.

Siguiendo el protocolo establecido por las recomendaciones de la American Thoracic Society<sup>153</sup> los niños tienen que inhalar primero una solución de suero salino para seguir con las inhalaciones de metacolina (durante dos minutos cada una). Después de cada inhalación, se valoran los parámetros de estudio, doblando la dosis del fármaco cada 5 minutos hasta que la prueba es positiva o hasta que se llega a la concentración máxima. Si llegan al final de la prueba, habrán realizado, según el protocolo estandarizado por la ATS, 10 inhalaciones, cosa que es difícil que los lactantes toleren de forma adecuada, sobre todo en las últimas dosis.

Por todo ello, como hemos hecho en nuestro estudio, en los niños es necesario realizar estudios con procedimientos acortados, que mejoren el confort del paciente durante la prueba, sin perder eficacia ni seguridad<sup>247</sup>. No obstante, hay estudios que sugieren que las pruebas de broncoprovocación cortas con menos número de dosis de metacolina, incurren en el riesgo de provocar una broncoconstricción exagerada incluso de un 10%, al saltar algunas dosis, que además podría ser más intensa en el grupo de pacientes graves<sup>248</sup>. Izbicki y cols.<sup>249</sup> revisaron los protocolos de acortamiento realizados previamente por otros autores, encontrando un riesgo de broncoconstricción grave del 3 al 38% según el protocolo, y aceptando en el suyo un riesgo de los más bajos, de 3,3%.

Para *acortar un protocolo*, se puede:

- a) Empezar a una concentración superior de metacolina, dado que la mayoría de respuestas positivas, salvo que los sujetos sean muy hiperreactivos, se dan por encima de la concentración de metacolina de 2 mg/ml.
- b) Utilizar un incremento de la concentración o dosis en inhalaciones sucesivas superior al habitual que suele ser del doble de la concentración o dosis anterior.
- c) Disminuir el tiempo de administración de la dosis.

Así por ejemplo, en pacientes con asma bronquial leve estables, que no precisan tratamiento con corticoides inhalados, el riesgo de broncoconstricción grave iniciando la prueba con dosis o concentraciones mayores de metacolina es mínimo, mientras que en pacientes inestables es necesario iniciarla con las dosis o concentraciones mínimas<sup>153</sup>.

Nosotros hemos utilizado una prueba acortada tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes, como hemos descrito en el apartado de pacientes y métodos, siguiendo las sugerencias propuestas por Izbicki y cols.<sup>249</sup>. En el grupo control de niños sanos, con un riesgo teóricamente bajo de presentar broncoconstricción, la prueba se inició con una concentración superior (0,5 mg/ml, con inhalación previa del suero salino isotónico) y posteriormente si no había clínica alguna, se usaron incrementos del doble de la concentración en las siguientes nebulizaciones, representando un total de 6 nebulizaciones. Así se favoreció la colaboración de este grupo, lo que pensamos que contribuyó a mejorar el cumplimiento y la motivación. También se acortó la prueba en el grupo de pacientes, iniciando la prueba a una dosis de 0,0625 mg/ml (la segunda dosis de las recomendadas por la American Thoracic Society), y realizando los 2 primeros incrementos al cuádruple de la concentración anterior y los 3 siguientes al doble de la concentración anterior, realizándose un total de 7 inhalaciones (tabla 14). Utilizando estos protocolos acortados no hubo ni en el grupo de pacientes ni en el grupo control, ningún caso de crisis grave de broncoconstricción, ni ninguna disminución importante de la SaO<sub>2</sub>.

Finamente, para conseguir la colaboración adecuada en la prueba, es muy importante informar a los padres que se trata de una prueba segura, fiable, pero de duración aproximada de 1 hora, en la que los niños pueden presentar alguna molestia (tos, sequedad de boca, leve tiraje subcostal, etc.). De esta forma los padres colaborarán y facilitarán la realización de la prueba por su hijo o hija.

En segundo lugar hemos demostrado que es una prueba segura. Hemos añadido, además de la valoración de la auscultación traqueal y torácica, tal como proponen

Springer y cols., dos criterios de respuesta a la metacolina<sup>17</sup> para aumentar la seguridad de la prueba: el descenso de la saturación de oxígeno y el incremento de la frecuencia respiratoria. Así, el descenso en la SaO<sub>2</sub> ≥ 5% y / o la aparición de polipnea (≥ al doble de la basal) fueron también indicación de positividad de la prueba de broncoprovocación y su aparición implicaba por tanto interrumpir las nebulizaciones de metacolina.

Desde el punto de vista clínico, no hemos objetivado ninguna complicación importante a mencionar en las 79 pruebas realizadas. En el grupo de pacientes, el descenso medio de la saturación de O<sub>2</sub> ha sido de 4,3%, encontrando sólo 3 pacientes en los que la SaO<sub>2</sub> disminuyó de forma muy transitoria por debajo del 90%, siendo la SaO<sub>2</sub> mínima del 88 %. En el grupo control solo se detuvo la prueba por caída en la saturación hasta 93% (de forma aislada, sin presentar sibilantes) en una niña a la concentración de 8 mg/ml, mientras en otros cuatro, se detuvo por presentar sibilantes traqueales, uno de ellos asociados también a descenso de la SaO<sub>2</sub>, pero también sólo hasta el 93%.

Por tanto el descenso de la SaO<sub>2</sub> fue en todos los casos discreto y reversible espontáneamente o al inhalar β-agonistas al finalizar la prueba. En cualquier caso, la monitorización de este parámetro incrementa sin duda la seguridad, al detectar el pequeño número de lactantes y niños pequeños que presentan desaturaciones sin llegar a presentar sibilantes.

En los estudios publicados en la literatura los descensos de la SaO<sub>2</sub> encontrados fueron del mismo rango que en nuestro trabajo. Así por ejemplo, Springer<sup>17</sup> observa una desaturación máxima de 89% (caída de 9,2%). Godfrey en un estudio del último año<sup>250</sup>, destaca una desaturación máxima de 7,1% (en un niño al que no se le auscultaron sibilantes), con una disminución media de la saturación de 5,4% en el grupo que presentó prueba de broncoprovocación positiva.

Hubo cierta controversia respecto al tema de la seguridad a mediados de los años noventa, cuando Wilson y cols.<sup>160</sup>, publicaron un estudio realizado en niños de 5 años, en el que habían comparado tres métodos: la caída de la presión transcutánea de oxígeno (PtcO<sub>2</sub>), el incremento en las resistencias respiratorias medido por la técnica de oscilación forzada y la determinación de sibilantes por auscultación. Concluyeron que la medición de resistencias respiratorias por la técnica de oscilación forzada no era fiable, la determinación de sibilancias (PCw) tampoco e incluso opinaban que podía ser peligrosa. Ellos encontraron que sólo un 16% de los 30 niños estudiados presentó sibilantes al final de la prueba y en algunos la PtcO<sub>2</sub> llegaba a descender un 33% sin presentar sibilantes. Posteriormente, este trabajo ha sido muy discutido.

Yong y cols.<sup>251</sup> en su estudio donde comparaban la auscultación, la PtcO<sub>2</sub> y la SaO<sub>2</sub>, constataron que al considerar positiva la prueba en el estudio de Wilson ante una caída de la PtcO<sub>2</sub> del 15% , es posible que se hubiese producido un sesgo en la prueba, dado que en su propio estudio, un 28% de los niños en los que momentáneamente cayó la PtcO<sub>2</sub> presentaron una recuperación de este parámetro a dosis mayores de metacolina, sin afectarse la saturación. Ello sugeriría que la caída en la PtcO<sub>2</sub> observada durante una prueba de broncoprovocación con metacolina no reflejaría puramente la relación dosis dependiente de la broncoconstricción. Otro aspecto criticado de este trabajo es que el 83% de los pacientes estudiados por Wilson no respondieron hasta llegar a concentraciones de metacolina de 16 o 32 mg/ml, respuesta que se considera normal en la población sana.

Gavriely<sup>252</sup> en un editorial, también señaló las limitaciones y precauciones de la técnica de auscultación traqueobronquial, pero comentaba que ello podría ser superado si se aplicaba monitorización simultánea de otros parámetros (como el control de la SaO<sub>2</sub> o PtcO<sub>2</sub>).

En la tabla 28 se resumen los principales trabajos de investigación realizados mediante el método de auscultación traqueal (simple o modificado).

**Tabla 28.-** Estudios de hiperrespuesta bronquial en niños usando la técnica de auscultación traqueal

<b>Autores</b>	<b>Sustancia</b>	<b>Técnica</b>	<b>Parámetros de medida</b>	<b>Nº sujetos</b>	<b>Edad</b>	<b>Resultados</b>
Avital <sup>16</sup> (1988)	Metacolina, nebulizador Hudson a volumen corriente	Auscultación Espirometría	PCW PCW/PC20	75 15	1-8 a 6-15 a	Técnica segura. Buena correlación entre PC20 y PCW
Novinski <sup>18</sup> (1991)	Metacolina, nebulizador Hudson a volumen corriente	Auscultación Espirometría	PCW/PC20 SaO <sub>2</sub> Tos Disnea, polipnea	15	5-8 a	Técnica segura. Buena correlación entre PC20 y PCW
Avital <sup>172</sup> (1991)	Metacolina, nebulizador Hudson a volumen corriente	Auscultación Espirometría	PCW/PC20 Tos, polipnea	76 71 35	1-6 a 7-11 a 12-17 a	No peligrosidad. Buena correlación Entre PC20 y PCW
Beck <sup>89,253</sup> (1992)	Histamina, nebulizador Hudson a volumen corriente	Análisis sonidos pulmonares Espirometría	PCW PC20	6 asma 6 asma 6 controles	9-16 a 2-5 a 2-5 a	Buena correlación PCW/PC20
Wilson NM <sup>160</sup> (1995)	Metacolina, nebulizador Wright a volumen corriente	Auscultación Oscilación forzada	PCW Rrs PC <sub>15</sub> PtcO <sub>2</sub> Tos	30	5 a	Resistencias no fiables PCW no fiable PtcO <sub>2</sub> más fiable
Avital <sup>254</sup> (1995)	Metacolina, adenosina nebulizados a volumen corriente	Auscultación	PCW	39 asma 15 COPD	3-6 a	Técnicas seguras La adenosina es más específica para el asma
Sprikkelman <sup>255</sup> (1996)	Metacolina nebulizador a volumen corriente	Grabación sonidos pulmonares Espirometría	Cambios sonidos pulmonares PD20	15 asma	8-15	Cambios en sonidos pulmonares corresponden con PD20. Sibilancias aisladas Menos fiables
Purohit <sup>19</sup> (1997)	Metacolina	Auscultación Grabación sonidos pulmonares Espirometría	PCW FEV <sub>1</sub> < 20%	54	6-59 a	Auscultación y espirometría se complementan.
Guirau <sup>21</sup> (1997)	Metacolina, nebulizador Hudson a volumen corriente	Auscultación	PCwheeze	51 20 controles	4-24 meses	Técnica segura Buena tolerancia.

PCW: PC wheeze: Concentración de metacolina que ocasiona sibilantes audibles, desaturación o polipnea  
PC<sub>20</sub>: Concentración de metacolina que ocasiona descenso del 20% del FEV<sub>1</sub>  
SaO<sub>2</sub>: Saturación arterial de Oxígeno  
PtcO<sub>2</sub>: Presión transcutánea de Oxígeno  
Rrs: Resistencias respiratorias  
Rint: Resistencias por interrupción

**Tabla 28 (cont.).** Estudios de hiperrespuesta bronquial en niños usando la técnica de auscultación traqueal.

Autores	Sustancia	Técnica	Parámetros de medida	Nº sujetos	Edad	Resultados
Sprikkelman <sup>256</sup> (1999)	Histamina nebulizada a volumen corriente	Grabación sonidos pulmonares Espirometría	Sonidos pulmonares PD20	15	9-15 a	Buena correlación ambos métodos
Yong <sup>251</sup> (1999)	Metacolina, nebulizador Hudson a volumen corriente	Auscultación PtcO <sub>2</sub> SaO <sub>2</sub>	PCW PtcO <sub>2</sub> SaO <sub>2</sub>	39	4-48 meses	Sa O <sub>2</sub> y PCW son seguras y sensibles PtcO <sub>2</sub> patrón errático y poco fiable
Springer <sup>17</sup> (2000)	Metacolina, nebulizador Hudson a volumen corriente	Auscultación Espirometría	PCW SaO <sub>2</sub> polipnea	146 30	2-8 a	Seguridad y alta eficacia (95%), combinado con frecuencia respiratoria y SaO <sub>2</sub>
de Frutos <sup>20</sup> (2002)	Metacolina, nebulizador Hudson a volumen corriente	Auscultación Espirometría	PCW/PC20	18	6-16 a	Técnica segura Buena correlación entre PC20 y PCW
Bez <sup>159</sup> (2003)	Metacolina	Auscultación SaO <sub>2</sub> PtcO <sub>2</sub> Rint	PCW SaO <sub>2</sub> PtcO <sub>2</sub> Rint	51	1-3 a	Técnica segura
Godfrey <sup>250</sup> (2004)	Adenosina, nebulizado a volumen corriente	Auscultación, Sa O <sub>2</sub> Grabación sonidos pulmonares	PCW SaO <sub>2</sub> polipnea	51	< 4 a	Técnica segura Buena correlación auscultación y grabación

PCW: PC wheeze: Concentración de metacolina que ocasiona sibilantes audibles, desaturación o polipnea

PC<sub>20</sub>: Concentración de metacolina que ocasiona descenso del 20% del FEV<sub>1</sub>

SaO<sub>2</sub>: Saturación arterial de Oxígeno

PtcO<sub>2</sub>: Presión transcutánea de Oxígeno

Rrs: Resistencias respiratorias

Rint: Resistencias por interrupción

Hemos demostrado también que el método de auscultación traqueal es eficaz y fiable para detectar la hiperrespuesta bronquial a la metacolina en los niños pequeños.

En nuestro estudio, la mayoría de las pruebas de provocación bronquial finalizaron por la audición de sibilantes traqueo bronquiales (en 48 de los 58 casos en los que la prueba fue positiva: 84%).

Esta cifra difiere del trabajo de Wilson y cols.<sup>160</sup> que sólo encontraron sibilantes en un 16% de los niños de 5 años estudiados, y del trabajo de Sprikkelman y cols.<sup>255</sup> que en un grupo de niños de 8 a 15 años, sólo auscultaron sibilantes en un 33% de los niños con prueba de provocación positiva por espirometría. Sin embargo, este último grupo<sup>256</sup>, tres años después, demostró en otro estudio la presencia de sibilantes en el 88% de las pruebas positivas. También, Yong y cols.<sup>251</sup> auscultaron sibilantes al final de la prueba de broncoprovocación en el 90% de los niños estudiados (56 pruebas en 39 niños preescolares), y el grupo de Springer y Godfrey<sup>17</sup>, encontró este signo clínico en el 81% de 146 pacientes asmáticos estudiados (edad media 4 años).

La fiabilidad y utilidad de la prueba para determinar la hiperrespuesta bronquial se ha demostrado también en trabajos previos en niños mayores colaboradores. Se han realizado estudios en los que se estudia la concordancia entre la concentración de metacolina que produce un descenso del FEV<sub>1</sub> del 20% (PC<sub>20</sub>) y la concentración de metacolina que origina sibilantes audibles a la auscultación (PCw). Se ha observado que la concordancia entre PCw y PC<sub>20</sub> (mediante espirometría) es buena, siendo pues la determinación de la PCw útil en la evaluación de la hiperrespuesta bronquial<sup>16,18-20,256</sup>. Avital y cols., cuando describieron la prueba en 1988 estudiando un grupo de 15 individuos afectados de bronquitis, encontraron una buena correlación entre PCw y PC<sub>20</sub> y la variabilidad entre observadores a la auscultación (entre 3 investigadores) fue muy buena, existiendo solo un desacuerdo del 3% entre ellos<sup>16</sup>.

Novinski y cols., en 1991, con un grupo de 15 niños de 5 a 8 años, observaron también una buena correlación entre PCw y PC<sub>20</sub>, aunque en media, era mayor la PC<sub>20</sub>. Ello se describe en varios trabajos, y es debido a que el cálculo de PC<sub>20</sub> se hace por interpolación, mientras que la PCw es el valor de concentración de metacolina a la que se considera positiva la prueba de broncoprovocación. Con ello la PCw es consistentemente mayor que la PC<sub>20</sub>. Por tanto, hay un sesgo (conocido) al calcular por interpolación la PC<sub>20</sub> o al no hacer lo mismo con la PCw. Springer y cols.<sup>17</sup> en un grupo de 30 niños mayores, también destacan la concordancia y la elevada eficacia de la auscultación traqueo pulmonar en la detección de pruebas de broncoprovocación con metacolina positivas (95%).

En nuestro medio la concordancia entre la PC<sub>20</sub> y la PCw ha sido estudiada por el grupo de Pérez Yarza en niños mayores asmáticos colaboradores, entre 6 y 16 años, concluyendo al igual que los otros autores que es excelente<sup>20</sup>.

Por otro lado, hay un estudio reciente de Godfrey y cols<sup>250</sup> en el que comparan el hallazgo clínico de sibilancias en la auscultación, con la evaluación objetiva por medios acústicos informatizados (análisis de sonograma acústico) como punto final de la prueba de provocación bronquial con metacolina en 51 niños preescolares estudiados por asma. Concluyen que la observación clínica de sibilantes concuerda muy bien con la medición por sonograma (lo que ellos denominan el patrón de referencia) como punto final de la prueba de broncoprovocación con metacolina. Otros trabajos publicados previamente<sup>253</sup> validaban el método de auscultación usando el análisis computarizado de sonidos pulmonares, al compararlo en un grupo de niños mayores con la espirometría obteniendo también una buena concordancia entre ambas técnicas.

#### **1.1.1.- Aspectos metodológicos de la prueba**

Es clave insistir en la importancia de utilizar protocolos estandarizados, para que los resultados de los diferentes trabajos sean comparables entre sí y de esta forma sean también aplicables en la clínica médica. Revisando la bibliografía hemos observado que dentro de trabajos en la misma línea de investigación, se utilizan métodos dispares, como el tipo de nebulizador, el débito, el tiempo de nebulización, el volumen de la solución y la forma de calcular la PC<sub>20</sub> (tabla 29). Cockcroft y cols.<sup>165</sup> destacan en sus recomendaciones la importancia del tipo de nebulizador, del débito exacto, del correcto calibrado del nebulizador, del tiempo exacto de nebulización y del volumen a nebulizar para obtener resultados correctos y estandarizables.

El protocolo utilizado en nuestro trabajo, se ajusta a la última normativa publicada por la American Thoracic Society<sup>153</sup> respecto a las pruebas de provocación bronquial con metacolina. La prueba de broncoprovocación se realizó según el protocolo de Juniper<sup>165 247</sup>, tal y como se explica en el apartado de pacientes y métodos. Se utilizó uno de los nebulizadores recomendados en el protocolo, para asegurar una dosificación más exacta y se empleó, de acuerdo con las recomendaciones, un débito de 0,13 ml /min, calibrando para ello todas los lotes de nebulizadores utilizados.

Se utilizó la técnica de auscultación traqueal modificada<sup>18</sup>, técnica en la que como hemos visto existe ya amplia experiencia en la realización de pruebas de metacolina a niños pequeños (de 8 meses a 8 años).

Sin embargo a nivel metodológico, resulta difícil establecer si el niño pequeño con diferente tamaño pulmonar y distinta función pulmonar tiene que responder de igual forma, ante una prueba de broncoprovocación con metacolina, a la esperada en el niño mayor y el adulto (habiendo realizado la prueba en las mismas condiciones y con la misma metodología)<sup>4,120,123</sup>.

Parecería que la dosis del agonista inhalado se debería corregir en base al tamaño corporal, ya que sino parece que el niño inhalaría mayor cantidad de sustancia que un niño mayor o un adulto. Además el depósito de la sustancia a nivel pulmonar también varía con la vía de inhalación (nasal versus oral).

LeSouef y cols, concluyen que la forma de soslayar estos problemas de variabilidad en los niños pequeños, es utilizando un grupo control de similar edad y peso, de forma que la cantidad de sustancia inhalada sea comparable<sup>123</sup>

Nosotros utilizamos un grupo control comparable al grupo de pacientes (tal y como se ha descrito en el apartado de pacientes y métodos), al igual que han realizado otros autores<sup>21,119,253</sup>.

**Tabla 30.** Comparación entre la metodología de la prueba de metacolina recomendada por la American Thoracic Society y la metodología empleada en estudios que valoran la utilidad de la PCw en la valoración de la hiperrespuesta bronquial.

Autores	Nebulizador	Débito	Tiempo de nebulización	Volumen de solución
Avital <sup>16</sup>	Hudson	0,2 ml/min	2 min	2 ml
Novinski <sup>18</sup>	Hudson	0,19 ml/min	2 min	2 ml
Springer <sup>17</sup>	Hudson	0,4 ml/min	2 min	2 ml
Yong <sup>251</sup>	Hudson	-	2 min	-
Wilson <sup>160</sup>	Wright	0,14 ml/min	1 min	-
ATS <sup>153</sup>	Nebulizadores que proporcionen DMM de 1-3,6 micras	0,13 ml/min $\pm$ 10% (calibración)	2 min	3 ml (diluyente: suero fisiológico)

DMM:Diámetro de masa media

## 1.2.- POSIBLES MECANISMOS DE LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL EN NIÑOS DE CORTA EDAD

Nosotros hemos encontrado un elevado porcentaje de niños (84%) que presentan respuesta a la metacolina dentro del grupo de pacientes afectos de bronquitis sibilantes, aunque la hiperrespuesta bronquial no ha sido un dato constante en estos niños, ya que también había un grupo de no respondedores o no reactivos a la metacolina en este grupo (16%).

Más concretamente, en el grupo de pacientes con bronquitis sibilantes recurrentes, en 53/63 niños hubo respuesta a la metacolina, en 10 de estos niños la prueba fue positiva a concentraciones de metacolina de 8 mg/ml y en el resto (68%) lo fue a concentraciones menores. En el grupo control, tampoco fue uniforme la respuesta, hubo respuesta (¿hiperreactividad bronquial?) en 5/17 niños y en todos ellos la positividad se dio a la máxima concentración (8 mg/ml).

Nuestros resultados son similares a los comunicados por Guirau y cols.<sup>21</sup>. Guirau también encuentra 5/20 pruebas de broncoprovocación positivas entre los controles y 2/51 negativas (niños no reactivos) entre los pacientes.

Beck<sup>253</sup> en su trabajo no encuentra esta dualidad, quizás por el bajo número de niños implicados en el estudio (6 pacientes, todos hiperreactivos y 6 controles todos no reactivos a la metacolina).

En cuanto a las concentraciones de metacolina para determinar la positividad de la prueba de broncoprovocación no se ha descrito en ningún artículo publicado en la edad pediátrica un punto de corte claro<sup>14</sup>. Guirau y cols.<sup>21</sup> utilizan la concentración de metacolina de 5 mg/ml como punto de corte. Ellos observaron en niños mayores de 6 años, utilizando la técnica de auscultación traqueal, que la concentración de 4 mg/ml de metacolina inhalada diferenciaba pacientes asmáticos de controles sanos<sup>257</sup>. En nuestro trabajo el punto de corte, que distinguió entre los niños del grupo control y los niños del grupo con bronquitis sibilantes, se situó en 6 mg/ml. Utilizando este punto de corte, un 68% de los niños con bronquitis sibilantes de repetición de nuestro estudio presentaron hiperrespuesta bronquial.

Si revisamos la bibliografía publicada sobre hiperrespuesta bronquial en niños pequeños utilizando otras técnicas además de la auscultación traqueal, veremos que la interpretación de estos estudios en la infancia, es controvertida.

Algunos autores indican que la hiperrespuesta bronquial (independientemente del estímulo: a metacolina, histamina o aire frío) está presente en los lactantes sanos y

normales<sup>121,258</sup>. Ello implicaría que la hiperrespuesta bronquial sería un marcador poco útil en la infancia. Pero por otro lado, parece que estas diferencias entre sanos y enfermos, desaparecería rápidamente con la edad ya que se ha observado que la hiperrespuesta bronquial de los niños sanos y de menor edad desaparece al crecer. Prendiville y cols.<sup>259</sup> fueron de los primeros autores en demostrar hiperrespuesta a la histamina en un grupo de lactantes con sibilantes, pero no tenían grupo control para comparar si el nivel de reactividad bronquial difería en ambos grupos. Stick y cols.<sup>5</sup> no encontraron diferencias en función pulmonar ni en reactividad bronquial entre niños con historia de sibilantes y los sanos y Clarke y cols.<sup>260</sup> tampoco encontraron diferencias entre grupos (controles sanos y sibilantes) a los 6 meses de edad. Más recientemente los grupos de Mochizuki<sup>122,261</sup> y Delacourt<sup>14</sup> constatan que el grupo de niños con sibilantes presentan mayor reactividad bronquial respecto al grupo control de niños sanos.

Así nos preguntamos: ¿qué puede significar todo esto?, ¿por qué hay resultados dispares publicados?, ¿por qué hay niños sanos que frente a una prueba de broncoprovocación presentan signos de hiperrespuesta bronquial?, ¿por qué hay niños con bronquitis obstructivas que no presentan hiperrespuesta bronquial?

Parece a la vista de lo revisado en la bibliografía, que la hiperrespuesta bronquial podría responder a distintos mecanismos y por tanto depender de varios factores<sup>128,262</sup>:

#### 1- Tamaño bronquial.-

Está descrito que los lactantes tienen unas vías aéreas anatómicamente más pequeñas, en las que a veces puede sumarse un exceso de secreciones y otras alteraciones anatómicas como engrosamiento de la pared de la vía aérea, menor elasticidad pulmonar, bronquial o de la caja torácica. Por ello es importante considerar el impacto de la anatomía de la vía aérea a esta edad cuando interpretamos los resultados de la función pulmonar o de las pruebas de provocación bronquial<sup>263</sup>.

La disminución de calibre de la vía aérea origina un aumento exponencial de la resistencia al paso del aire que es inversamente proporcional a la cuarta potencia del radio (flujo laminar). Una situación basal de calibre disminuido de las vías determinará un mayor efecto aparente de los estímulos broncoconstrictores. En cierto modo podría hablarse de una pseudo hiperrespuesta bronquial, debida a un artefacto producido por el estrechamiento anatómico de las vías aéreas<sup>108</sup>.

En cambio, parece que este no sería el mecanismo en el asma bronquial, ya que muchos pacientes con asma e hiperrespuesta bronquial, no presentan disminución del calibre de las vías aéreas<sup>108</sup>.

Si este mecanismo fuera el principal determinante en los niños de nuestra serie, hubiéramos encontrado una mayor hiperrespuesta en los niños más pequeños, y por tanto con una vía aérea más pequeña, que en los más mayores, pero no encontramos diferencias significativas en relación a la edad, por lo que no parece que en nuestros niños pueda tratarse de una pseudo hiperrespuesta bronquial sino que esta es real. Además la hiperrespuesta la hemos encontrado comparando la respuesta de los niños con bronquitis con la de niños sanos de la misma edad.

## 2- Alteración del tono muscular

### 2.1 Congénita:

Como hemos visto previamente, en algunos estudios se ha visto que hay un grupo de niños a los que se les hace una prueba de provocación bronquial al mes de edad antes de haber presentado ninguna bronquitis ni infección vírica, y presentan hiperrespuesta bronquial<sup>121,264</sup>. Probablemente estos niños tendrían una alteración del diámetro basal de la vía aérea, que unido a un incremento del tono, originaría una respuesta bronquial aumentada. Esta hiperrespuesta no estaría asociada o influenciada por la atopia sino que estaría relacionada con factores constitucionales o genéticos<sup>265</sup>.

Martínez y cols. han relacionado este hecho con la aparición de sibilantes transitorios<sup>1</sup>, pero posteriormente otros trabajos lo han asociado con la presencia de sibilantes persistentes en etapas posteriores de la vida<sup>56 14</sup>.

### 2.2 Adquirida:

Las infecciones víricas pueden lesionar un pulmón en desarrollo o alterar la respuesta inmune del huésped<sup>266</sup>. Es conocido que el virus respiratorio sincitial induce respuestas tipo Th2 que pueden incrementar los cambios inflamatorios dando finalmente lesiones en el epitelio respiratorio, y liberando mediadores, haciendo que se desencadenen las respuestas asmáticas. No todo niño que padece una infección por virus respiratorio sincitial desarrolla este tipo de respuestas, por tanto coexisten otros factores que determinan la evolución hacia el asma.

Se discute si la infección por virus respiratorio sincitial deja una susceptibilidad o hiperrespuesta bronquial para toda la vida. En los últimos

estudios del Tucson Birth Cohort Study, se observó que los niños que habían presentado una bronquitis por virus respiratorio sincitial tenían una hiperrespuesta hasta 4 veces mayor a los 6 años, que luego se iba reduciendo hasta desaparecer a los 13 años<sup>52</sup>.

### 3- Inflamación

Se ha comprobado por técnicas directas (lavado broncoalveolar) y por técnicas indirectas (como la determinación del FE<sub>NO</sub>) que la inflamación es uno de los pilares del asma. Esta inflamación consiste en un infiltrado de células inflamatorias como eosinófilos, linfocitos, macrófagos. Estas células contribuirían a los cambios fisiológicos del asma mediante la liberación de mediadores químicos, citoquinas y quimoquinas. Parece que sería el mecanismo predominante en el asma atópico.

Durante tiempo se ha descrito que existía una relación entre hiperrespuesta bronquial y inflamación de la vía aérea; esto se basaba en la observación de que estímulos inflamatorios (virus, alergen) conducían a una hiperrespuesta bronquial a metacolina y en que el tratamiento con corticoides, reducía la hiperrespuesta bronquial. Sin embargo, cuando se relaciona la hiperrespuesta bronquial directa con estudios de lavado broncoalveolar, biopsias o esputo inducido, la relación es débil o no existe<sup>267</sup>.

### **1.3.- HIPERRESPUESTA BRONQUIAL Y PREDICCIÓN DE ASMA**

La patología respiratoria con sibilantes es una de las causas de visita mas frecuentes en la práctica habitual del pediatra o del neumólogo pediátrico, especialmente en los primeros años de la vida. Pero sólo una parte de estos niños que presentan sibilantes los presentarán a la edad escolar<sup>1</sup>.

Identificar factores que predigan la evolución de estos niños hacia asma sería importante para prevenir el remodelamiento bronquial y adecuar el tratamiento en cada caso.

Dado que la hiperrespuesta bronquial es una manifestación frecuente del asma en niños mayores y adultos, y hemos demostrado la presencia de hiperrespuesta bronquial en nuestros pequeños afectos de sibilantes, es necesario plantearse la posible relación entre hiperrespuesta bronquial en la primera infancia y el asma o los sibilantes persistentes.

Así nos hacemos la pregunta : ¿Es la hiperrespuesta bronquial, medida en nuestro caso con una prueba de provocación bronquial con metacolina, capaz de discriminar entre niños con sibilantes que evolucionarán a asma y niños con sibilantes transitorios?

En nuestro estudio, la prueba de broncoprovocación con metacolina, discriminó eficazmente entre el grupo de pacientes que habían presentado sibilantes previamente y el grupo control de niños sanos ( $p < 0,001$ ). Demostramos que la PCw en niños con sibilantes es claramente inferior (5,84mg/ml) a la del grupo control (13,5 mg/ml). El seguimiento de estos niños durante los próximos años, determinando si pertenecen al grupo de sibilantes transitorios o persistentes nos permitirá valorar la relación entre la presencia de hiperrespuesta bronquial en los primeros años de la vida y el desarrollo posterior de asma persistente atópico o no.

Muchos autores han tratado de relacionar la presencia de sibilantes en la primera infancia con la hiperrespuesta bronquial y el asma, basándose en lo que sucede en el adulto y el niño mayor (la relación demostrada entre hiperrespuesta bronquial inespecífica y asma)<sup>268</sup>.

Como hemos visto en el apartado previo hay cierta controversia en cuanto al tema de la hiperrespuesta bronquial. Pero, recientemente varios grupos de investigación en estudios longitudinales concluyen que la medición de la reactividad bronquial es o puede ser útil como predictor de asma en un futuro.

Mochizuki y cols.<sup>261</sup> realizan la prueba de broncoprovocación a 48 niños con sibilantes y a 27 controles, y tras un seguimiento de 10 años concluyen que hay una tendencia entre los niños con sibilantes de presentar hiperrespuesta bronquial, y que si esta se asocia a sibilantes persistentes puede prever un posterior desarrollo de asma.

Delacourt<sup>14</sup> en un estudio prospectivo, determina la reactividad bronquial cada 6 meses en niños con sibilantes recurrentes diagnosticados antes de los 2 años. Observó que 4 años después persistía la hiperrespuesta bronquial en todos, pero que niños con sibilantes persistentes tenían PD<sub>15</sub> menores que los que ya no presentaban clínica y que esto se observaba ya a los 30 meses. Sin embargo, tampoco pudo encontrar un punto de corte eficaz para diferenciar entre ambos grupos.

Palmer<sup>56</sup>, intentando profundizar en las causas primarias del asma, estudia de forma prospectiva, la relación entre hiperrespuesta bronquial al mes de vida y asma, atopia, infecciones del tracto respiratorio inferior y la función pulmonar a los 6 años. Es el primero que sugiere que la hiperrespuesta bronquial en la primera infancia identifica un grupo de niños con mayor riesgo de asma y sibilantes en edades tardías y podría ser

el indicador fisiológico más precoz de la predisposición del niño al asma. Sugiere que la hiperrespuesta bronquial temprana puede ser resultado de factores genéticos, prenatales y ambientales. Esta predisposición a presentar hiperrespuesta bronquial precedería a las infecciones víricas y por tanto éstas serían un factor coadyuvante pero no básico<sup>169</sup>.

En este trabajo se constata la falta de asociación entre la hiperrespuesta bronquial al mes de vida y a los 6 años, cuestión insinuada ya por Delacourt y probada en un trabajo reciente por Turner<sup>265</sup>. Ello sugiere que los factores que contribuyen a la hiperrespuesta bronquial en edades tempranas pueden ser diferentes de los que contribuyen posteriormente. Así, en los menores podría haber una base inmune y una estructura pulmonar en desarrollo que podrían influir sobre la reactividad bronquial, mientras que la atopia influiría más posteriormente. La hiperrespuesta bronquial al mes identificaría un grupo de niños con sibilantes persistentes con disfunción de la vía aérea, con alteraciones congénitas de la regulación del calibre de la vía aérea. En cambio, la hiperrespuesta bronquial a los 6 años, reflejaría la influencia de la inflamación de la vía aérea inducida por atopia e identificaría el grupo de riesgo de asma atópica. Independientemente de ello, como grupo concluyen que los niños afectados de hiperrespuesta bronquial en ambas edades son los de máximo riesgo de desarrollar asma.

#### **1.4.- DETERMINANTES PRECOCES DE LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL: (EVIDENCIA FISIOLÓGICA Y EPIDEMIOLOGICA)**

Hemos investigado mediante un análisis secundario, los distintos factores que podrían influir en obtener o no respuestas de hiperrespuesta bronquial positivas. No hemos encontrado diferencias significativas entre las diferentes variables estudiadas en relación con la respuesta a la metacolina en el grupo de niños con bronquitis sibilantes de repetición, con excepción de la edad a la que presentaron la primera bronquitis. Puede que esta falta de resultados positivos esté condicionada porque el estudio no estaba específicamente diseñado para evaluar los factores que podían modificar o condicionar la hiperrespuesta bronquial, y por tanto el tamaño de la muestra no era suficiente.

##### **1.4.1.- Relación entre edad de presentación de la primera bronquitis y la presencia de hiperreactividad bronquial**

Hubo una relación estadísticamente significativa entre la *edad* de presentación de la primera bronquitis y la PCw ( $r=0,26$ ,  $p=0,04$ ), de forma que los que la presentaron a una edad menor, respondieron a una dosis menor de metacolina.

Los niños que debutaron de forma más precoz con sibilantes podrían tener una menor PCw (o sea una mayor reactividad) por la confluencia de varios mecanismos como por ejemplo un menor tamaño bronquial de tipo constitucional, que por el mecanismo de pseudo hiperreactividad bronquial que ya hemos descrito llevaría a una menor PCw<sup>108</sup>. O bien, este hecho podría estar relacionado con la producción de insulto mayor por el virus que produce la bronquitis en los niños más pequeños, lesionando el bronquio (a nivel muscular, o a nivel neurogénico) provocando una mayor broncoconstricción ante menores estímulos.

Por otro lado es conocido que la edad de presentación de la primera bronquitis (junto a la determinación de IL-R en sangre)<sup>75,269</sup> predicen de forma bastante fiable la posterior persistencia de los sibilantes.

#### **1.4.2.- Género y positividad de la prueba de provocación bronquial con metacolina**

No hemos encontrado una diferencia significativa según el género, aunque hubo una tendencia a haber más varones hiperreactivos.

Este hallazgo, ya se observa desde el periodo neonatal, lo que sugiere que las diferencias entre ambos sexos, en cuanto a la estructura de las vías aéreas y a la respuesta bronquial, están presentes ya tras el nacimiento. Asimismo se constata en la literatura una mayor reactividad bronquial en niños entre los que padecen bronquitis<sup>120</sup>.

#### **1.4.3.- Antecedentes familiares de atopia y prueba de broncoprovocación positiva**

En nuestro trabajo, no hubo relación entre la respuesta a la metacolina y los antecedentes de atopia en padres y/o hermanos de los pacientes. Podría existir un sesgo dado el número limitado de pacientes y que la recogida de estos datos se realizó por historia clínica a los padres. No se procedió a realizar tests cutáneos o pruebas de broncoprovocación a los padres como se ha hecho en otros estudios.

Hay muchos trabajos que destacan la relación entre asma y atopia<sup>1,2,29,73,270,271</sup>.

Young sugiere en sus trabajos que la historia familiar de asma contribuye a aumentar la reactividad bronquial en los niños a edades tempranas<sup>35,40,272</sup>.

Hay otros estudios que relacionan la presencia de asma y/o atopia en los padres con un aumento en la hiperrespuesta bronquial y en la posibilidad de que los sibilantes sean persistentes<sup>3</sup>.

Otros autores lo relacionan más con la presencia de hiperrespuesta bronquial en los padres, que con la mera presencia de atopia determinada por test cutáneos, IgE o eosinofilia<sup>56,273</sup>.

Turner y cols. en un trabajo muy reciente que culmina un estudio longitudinal de 12 años, con 234 niños, concluyen que en los niños pequeños, la presencia de sibilantes y de hiperrespuesta bronquial estaría más relacionada con un factor constitucional (VmaxFRC reducida) que con un factor de atopia, siendo éste el factor que influiría en la hiperrespuesta bronquial más tarde (a los 6 – 11 años) Esta quizás sería la explicación de que no encontrásemos diferencias entre los niños con sibilantes que presentaron hiperrespuesta bronquial en cuanto a los antecedentes familiares de atopia<sup>265</sup>.

#### **1.4.4.- Tabaco en el embarazo y tabaquismo pasivo postnatal**

Hay múltiples trabajos que relacionan el tabaquismo durante la gestación con una mayor prevalencia de sibilantes. Lo que no está claro es si ello conllevaría una mayor posibilidad de asma en adulto o solo implicaría más facilidad para presentar sibilantes transitorios precoces<sup>269,274,275</sup>.

Hay muchas publicaciones que relacionan el tabaquismo pasivo con incremento de sibilantes en la infancia.

Se ha demostrado que el tabaco es perjudicial para el desarrollo pulmonar del feto durante la gestación, pero en la etapa postnatal, si bien está claro que puede desencadenar crisis en niños asmáticos o agravar éstas, no se ha podido demostrar que sea en sí un factor etiológico del asma.

A pesar de estos datos no encontramos en nuestros niños relación entre el tabaquismo prenatal o posnatal y la presencia de hiperrespuesta bronquial.

#### **1.4.5.- Relación entre *peso al nacer* y hiperreactividad bronquial**

No hubo diferencias significativas en cuanto al peso al nacer en el grupo de bronquitis y la reactividad bronquial, aunque hay que tener en cuenta que sólo incluíamos niños a término con peso al nacer dentro de la normalidad. En la literatura sí se relaciona bajo peso al nacer y mayor prevalencia de sibilantes<sup>29</sup>.

#### **1.4.6.- Lactancia materna**

No encontramos diferencias significativas entre los niños que habían tomado lactancia materna y los que habían seguido lactancia artificial en cuanto al grado de respuesta bronquial entre el grupo de sibilantes. En la literatura no hemos encontrado referencias que relacionen hiperrespuesta bronquial y lactancia.

Se ha estimado que la lactancia materna protegería frente a la aparición de asma y atopia<sup>276</sup>, pero en los últimos años se ha constatado en algunos estudios epidemiológicos que esto no es así, siendo controvertidos estos datos<sup>29,277</sup>.

En un estudio llevado a cabo en Nueva Zelanda con una cohorte de 1037 recién nacidos, seguidos durante 26 años, se constató que la lactancia materna no protege a los niños frente a atopia o asma e incluso podría incrementar el riesgo<sup>278</sup>.

#### **1.4.7.- Asistencia a guardería. Número de hermanos**

No hubo diferencias significativas en nuestro trabajo, entre los que acudieron pronto a la guardería y la PCw, ni tampoco hubo relación entre el número de hermanos y la reactividad bronquial. Von Mutius, estudió la relación entre el número de hermanos, las pruebas cutáneas y la atopia, concluyendo que a mayor número de hermanos, menor atopia<sup>54</sup>.

En cuanto a acudir precozmente a la guardería como hemos visto previamente, tiene según múltiples autores un efecto protector<sup>29,47,67</sup> sobre el desarrollo de asma.

#### **1.4.8.- Número de episodios de bronquitis en el último año**

No hubo relación en nuestro estudio entre el número de episodios de bronquitis en el último año y el grado de hiperrespuesta bronquial, lo que coincide con lo encontrado por Clough<sup>75</sup>. No se valoró en nuestro estudio la relación entre la gravedad de las crisis y la prueba de broncoprovocación. En la literatura se observa en varios trabajos relación entre el grado de severidad de los episodios (hospitalización, necesidad de UCIP) y la presencia de mayor hiperrespuesta bronquial y de sibilantes persistentes y asma<sup>125</sup>.

#### **1.4.9.- Positividad en la detección del virus respiratorio sincitial (VRS) en la primera bronquitis**

Hubo una tendencia a tener una mayor hiperrespuesta entre los niños en los que se detectó el virus respiratorio sincitial, sin llegar a ser significativa, dado el escaso número de pacientes.

En la literatura, se constata que la causa más frecuente de obstrucción de la vía aérea en la infancia, es la infección vírica, más frecuentemente causada por VRS<sup>2</sup>. Stein y cols, demuestran en un estudio longitudinal, que los niños que han presentado bronquiolitis por VRS presentan una hiperrespuesta que puede durar hasta los 12 años, desapareciendo después. La infección por VRS, aumentó el riesgo de padecer bronquitis con sibilantes hasta los 10 años, pero a los 13, ya no había diferencias significativas. También constataron que el antecedente de bronquiolitis por VRS, no se asociaba con mayor positividad de las pruebas cutáneas ni mayores niveles de IgE en edades posteriores. Así pues, no hay relación entre la infección por VRS y la sensibilización alérgica<sup>52</sup>.

#### **1.4.10.- Edad a la que se realizó la prueba**

Este es un tema controvertido, pero se ha sugerido que a menor edad, mayor hiperrespuesta bronquial. En cambio otros trabajos defienden que el grado de hiperrespuesta bronquial está asociado con la gravedad del cuadro clínico, pero no con la edad<sup>172</sup>. En nuestro estudio no encontramos diferencias entre el grado de hiperrespuesta bronquial y la edad de los niños.

Le Souef sugiere que, dada la variación con la edad durante la infancia en el tamaño de las vías aéreas y aun más del patrón respiratorio, hasta que las dosis de agonista inhaladas no puedan ser corregidas de acuerdo con el tamaño del niño, los resultados de las pruebas de broncoprovocación, deberían tener un valor orientativo cualitativo (positivo o negativo), pero no cuantitativo<sup>4</sup>. Así pues para la demostración de hiperrespuesta bronquial en niños pequeños con bronquitis de repetición, comenta, sería necesario un grupo control de la misma edad, como hemos hecho en nuestro estudio.

## **2.- DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO EN NIÑOS NO COLABORADORES**

La medición del óxido nítrico exhalado ( $F_{E}NO$ ; fracción espirada de óxido nítrico) es un método simple y no invasor que refleja la inflamación bronquial y que puede estar elevado desde edades muy tempranas

Este estudio fue diseñado para determinar el óxido nítrico exhalado en niños pequeños menores de 4 años, no colaboradores, afectados de bronquitis sibilantes de repetición, mediante una técnica off-line a volumen corriente.

Se trata de un estudio novedoso, pues hay varios estudios publicados en neonatos, edad en la que es posible determinar el  $F_{E}NO$  sin necesidad de sedar al niño, durante su sueño normal, mediante la recogida con mascarilla a volumen corriente (con un patrón de respiración estable)<sup>188</sup> pero, en nuestro conocimiento, es el primer trabajo en España, que realiza determinaciones de  $F_{E}NO$  en lactantes y niños pequeños no colaboradores, no sedados. Muchos de los estudios publicados hasta ahora trabajan generalmente con niños sedados (aprovechando otros estudios de función pulmonar) o con niños algo más mayores, a partir de 3 años, en los que la colaboración es parcial<sup>195,196</sup>.

En nuestro trabajo hemos demostrado que es posible realizar de una forma fiable la medición del  $F_{E}NO$  en niños menores de 4 años de edad no sedados, hemos determinado los valores de normalidad en este rango de edad y hemos encontrado que los niños menores de 4 años de edad con bronquitis sibilantes de repetición presentan un incremento del  $F_{E}NO$  con respecto a los niños sanos.

### **2.1.- VIABILIDAD y UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DEL OXIDO NÍTRICO EXHALADO EN NIÑOS PREESCOLARES**

#### **2.1.1.- Viabilidad de la determinación de óxido nítrico en niños preescolares**

Hemos demostrado que la determinación del óxido nítrico exhalado ( $F_{E}NO$ ) por la técnica off- line a volumen corriente es factible.

Se realizó con éxito la determinación del  $F_{E}NO$  en 62/63 pacientes (98,5%), en 12 de los 16 controles – 75% (a los que posteriormente se realizó la prueba de broncoprovocación con metacolina), y en un grupo de otros 30 niños sanos. En este último grupo, se desestimaron 5 determinaciones por problemas técnicos (por tanto se realizó sin problemas en el 86,5% de los niños).

Hubo mayores dificultades para obtener muestras de aire exhalado en el grupo control de niños sanos que en el grupo de pacientes. Los niños afectados de bronquitis sibilantes están habituados a recibir medicamentos inhalados mediante cámara espaciadora con mascarilla, y el aparato de recogida de muestras de  $F_{E}NO$  es similar a una cámara espaciadora. En cambio, los niños sanos jamás habían utilizado una cámara espaciadora, y al colocarles el aparato de toma de muestras, la reacción de rechazo es mayor en algunos de ellos, con llanto incoercible que imposibilitaba la realización de la prueba.

Sin embargo, creemos que la recogida de aire exhalado para la determinación del óxido nítrico es un método no invasor, rápido y fácil técnicamente de realizar en la mayoría de los casos en los niños de corta edad, aunque a veces incomode algo a nuestros pequeños pacientes, incrementando la dificultad de la prueba, más por el manejo del niño para que la prueba sea valorable técnicamente que por la complejidad de la misma.

### **2.1.2.- Valores normales del óxido nítrico exhalado**

Los valores del  $F_{E}NO$ , varían dependiendo de los métodos de recogida y de los analizadores utilizados<sup>24</sup>.

Asimismo, los valores variarán según la recogida del  $F_{E}NO$  se realice off- line (mediante un reservorio especial) o on-line, mediante la exhalación simple o mediante espiración a volumen corriente.

Por otro lado se pueden usar distintos flujos y presiones que también pueden modificar los resultados de los “valores normales” . Se pueden obtener tres valores de  $F_{E}NO$  según la técnica empleada:

- a)  $F_{E}NO$  en la mezcla del volumen exhalado (técnica off-line).
- b) Valor pico, que corresponde al  $F_{E}NO$  de la 1ª parte de la exhalación (con mayor contaminación nasal).
- c)  $F_{E}NO$  en la fase meseta que representa el  $F_{E}NO$  bronquial, sobre todo si se usa la técnica contra resistencia que elimina la contaminación nasal.

Debido a todo ello existen en la literatura varias publicaciones de “valores normales”, algunos concordantes y otros divergentes entre sí<sup>24,191,192,197,201,279-281</sup>.

En nuestro caso, los valores medios normales fueron 4,39 ppb. Existen pocas publicaciones en las que se determine el  $F_{E}NO$  en niños de estas edades (tabla 30). Baraldi en un estudio similar al nuestro usando la técnica off-line, obtuvo valores medios de 5,6 ppb<sup>199</sup>. Avital obtuvo valores algo inferiores, de 2,2 ppb<sup>282</sup>, Buchvald en

niños de 2 a 5 años, controlando el flujo (respirando a volumen corriente) obtuvo un valor medio de  $F_{E}NO$  de 3 ppb<sup>195</sup>. Malmberg utilizando una técnica on-line en niños de 4 a 7 años observó valores de 5,3 ppb<sup>210</sup> y Franklin en un trabajo muy reciente comparando los métodos de respiración única on-line y el de respiración a volumen corriente off-line, en niños sanos, obtuvo unos valores medios de  $F_{E}NO$  de 23,2 y 13,8 ppb respectivamente<sup>283</sup>. Brussee<sup>284</sup> determinó la  $F_{E}NO$  en 429 niños de 4 años usando la técnica off line a flujo constante (50 ml /sg), entre los sanos, el valor medio fue de 7,7ppb.

**Tabla 30.-** Metodología y resultados de la determinación del óxido nítrico exhalado (F<sub>E</sub>NO) en niños menores de 7 años.

<b>Autor</b>	<b>Técnica</b>	<b>Resultados F<sub>E</sub>NO</b>	<b>Número pacientes</b>	<b>Edad</b>
Baraldi <sup>199</sup>	Respiración corriente off-line	Control: 5,6 ± 0,5 ppb Bronquitis aguda: 14,1 ± 1,8 ppb	19	10-20 m
Wildhaber <sup>192</sup>	Respiración única on-line Sedación (asociada a compresión tóracoabdominal)	Control: 18,8 ppb Sibilantes: 31,8 ppb	30	3-24 m
Avital <sup>223</sup>	Respiración corriente off-line	Control: 2,2 ppb Bronquitis: 5,6 ppb	84	2-7 a
Buchvald <sup>195</sup>	Respiración corriente on-line (a flujo fijo)	Control: 2-4 ppb Bronquitis: 3-8 ppb	51	2-5 a
Martinez T <sup>207</sup>	Respiración única on-line Sedación (asociada a compresión tóracoabdominal)	A flujos de: - 50, 25, 15 ml/seg: - 24, 40, 60 ppb	5	7-31 m
Franklin <sup>285</sup>	Respiración corriente off-line	Control 13,8 ppb Bronquitis 15,7 ppb	71	6-50 m
	Respiración única on-line	Control 23,2 ppb Bronquitis 32,9 ppb (p=0,01)		
Silkoff <sup>196</sup>	Respiración única on-line (con control flujo)	Niños sanos: 8,8 (± 6,2)ppb (Flujo:50ml/s) 13,2 (± 8,8)ppb (Flujo: 30ml/s)	32	24-71m
Brussee <sup>284</sup>	Respiración corriente off-line con restrictor de flujo	Control 7,7 ppb Bronquitis 10 ppb	426	4 a

m: meses; a: años

### 2.1.3.- Utilidad de la determinación de óxido nítrico exhalado

Se han propuesto diversas utilidades de la determinación de óxido nítrico exhalado, algunas de las cuales hemos podido valorar en el grupo de edad de nuestro estudio:

#### - Ayuda en el diagnóstico de asma

La determinación de óxido nítrico exhalado puede ser de ayuda en el diagnóstico de asma. Malmberg y cols. en un grupo de niños de 3 a 7 años observaron que con un punto de corte de 9,6 ppb la sensibilidad para el diagnóstico de asma era del 86% y la especificidad del 92%, para distinguir el niño enfermo del control sano<sup>210</sup>.

En nuestro estudio el valor medio del  $F_{E}NO$  en el grupo de niños afectados de sibilantes (en fase estable) fue de 5,28 ppb, mientras que en el grupo control, fue de 4,55 ppb, siendo la diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, hubo una superposición de valores muy importante entre el grupo de pacientes y el grupo control, por lo que la determinación del  $F_{E}NO$  en niños pequeños con bronquitis sibilantes recurrentes en fase estable, no permite discriminar adecuadamente la población sana de estos niños. El  $F_{E}NO$  es principalmente un marcador de inflamación eosinofílica y es posible que en muchos de estos niños pequeños la inflamación en los bronquios sea primariamente de tipo neutrofílico.

#### - Ayuda en la caracterización de la enfermedad

Se ha propuesto que la determinación del  $F_{E}NO$  podría ser una herramienta útil para distinguir dentro de los niños pequeños afectados de sibilancias, los que corresponderían a asma<sup>180</sup>.

En la literatura hay varios trabajos que sugieren que el  $F_{E}NO$  podría diferenciar de forma incruenta los diferentes fenotipos de asma, reflejando la inflamación eosinofílica de la vía aérea<sup>212</sup>. Nosotros, al igual que en el último trabajo publicado por el grupo de de Jongste<sup>284</sup> observamos valores más elevados de  $F_{E}NO$  entre los niños que presentaron una cifra de eosinófilos, superior a 400/mm<sup>3</sup>. También los 7 pacientes en los que los tests cutáneos o el RAST fue positivo, tenían un valor de  $F_{E}NO$  superior (6,7 versus 5,2 ppb) aunque las diferencias no fueron significativas, dado el escaso número de niños que reunían este requisito. Es posible que el seguimiento de estos niños nos permita valorar si aquellos que acabarán desarrollando un asma atópico IgE dependiente tenían un valor de  $F_{E}NO$  más elevado en nuestro estudio.

- Ayuda en estudios epidemiológicos. En nuestro estudio, una amplia parte de los niños del grupo control fue extraída de la población sana que acudía al control de niño

sano a un área básica de salud de la periferia de Barcelona donde se tomaban 2 muestras que luego eran medidas en el laboratorio de función pulmonar. Tan solo se desestimaron 5 pacientes por resultados incongruentes entre las 2 muestras, probablemente más por un problema en la toma de muestras que por una contaminación durante el transporte.

Dada esta fácil recogida, y la posibilidad de realizarla off-line, este método puede ser una herramienta útil en estudios epidemiológicos fuera del ámbito hospitalario del laboratorio de función pulmonar, pues el aparato de quimioluminiscencia no es transportable, pero sí el kit para la toma de muestras, junto a la bolsa de Mylar (cuyo contenido es el que luego se medirá).

- *Ayuda en la monitorización de la enfermedad y del tratamiento.* Nosotros observamos que los niños con bronquitis sibilantes que no llevaban tratamiento, tenían un valor mayor de  $F_{E}NO$  que los que llevaban tratamiento con corticoides, aunque las diferencias no fueron significativas. En nuestro centro, trabajando con un grupo de niños mayores de 6 años, se constató previamente que los valores del  $F_{E}NO$  (elevados en asmáticos), se normalizaban al emplear corticoides inhalados<sup>178</sup>. De hecho en nuestro estudio los niños con bronquitis sibilantes de repetición que no tomaban corticoides inhalados tenían un valor de  $F_{E}NO$  superior a los niños sanos, mientras que en los que estaban en tratamiento con corticoides inhalados no existían diferencias con los niños sanos. Parece que el  $F_{E}NO$  es el marcador inflamatorio más sensible al tratamiento ya que es el primero en normalizarse al tomar corticoides inhalados (antes que los eosinófilos en el esputo)<sup>209</sup>.

## **2.2.- LIMITACIONES DE LA DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO EN NIÑOS PREESCOLARES**

A pesar de que la técnica es de fácil realización, existe una variabilidad cuando se comparan datos de diferentes estudios entre sí y sobre todo al comparar con estudios realizados con otras técnicas (on-line). Esto limita su valor, pero creemos no invalida el método, aunque obliga a trabajar siempre con un grupo control de iguales características, para definir valores normales con la técnica de recogida y sistema de medición propios.

Entre los factores que influyen en la determinación del  $F_{E}NO$  encontramos:

a) las contaminaciones por NO externo o nasal, no son aparentes porque no se monitorizan los perfiles de NO, pero influyen en el NO medido en la mezcla aérea recogida.

b) el  $F_{E}NO$ , varía con el flujo; a menor flujo, mayor  $F_{E}NO$ . Una limitación de nuestro estudio que viene dada por el propio método de recogida a respiración corriente, es la imposibilidad de realizar la misma a un flujo constante (50 ml/s como recomienda la ATS).

c) la frecuencia respiratoria afecta inversamente (a mayor frecuencia, mayor flujo y menor  $F_{E}NO$ ).

d) también puede existir contaminación de la exhalación previa (en el espacio muerto anatómico y del aparato) . Parece que si la frecuencia respiratoria es estable (respiración pausada, sin llanto, etc.), se descarta el espacio muerto.

Aunque la *técnica* es muy sencilla, pues solo se tiene que aplicar el aparato con su mascarilla (similar a una cámara de inhalación convencional) sobre la cara y nariz del paciente (lleva membrana separadora) y dejarlo respirar normalmente, el inconveniente es que frecuentemente, sobre todo los niños de 1 a 2'5 años, se incomodan y lloran, lo que puede alterar el resultado, probablemente por los cambios en la frecuencia respiratoria y en el flujo inspiratorio durante el llanto, aunque en un trabajo reciente, parece que éste no influiría <sup>190</sup>).

Otro problema con la técnica está relacionado con el número de respiraciones que se precisa que realicen los niños a través del sistema de recogida. A veces es difícil que hagan 5 respiraciones a través del filtro cero (y en nuestro ambiente, donde frecuentemente el  $F_{E}NO$  ambiental es elevado, ésto es necesario) para luego continuar con de 2 a 6 respiraciones para llenar la bolsa. Han realizado la técnica hasta bebés de 5 meses obteniendo valores fiables, pero en el grupo de los más pequeños, a veces les cuesta llenar los 50 ml necesarios para poder medir el  $F_{E}NO$ .

Es importante asegurar que la mascarilla esté bien ajustada, para evitar contaminación ambiental. Creemos que la contaminación nasal a estas edades es muy pequeña y que con la presión del aparato (necesaria pues favorece el cierre del velo del paladar) y la toma de la muestra excluyendo el contenido nasal (mediante la mascarilla con membrana separadora), se puede eliminar prácticamente <sup>180</sup> .

e) Reproducibilidad. En nuestro trabajo, se practicaron dos determinaciones seriadas, separadas por aproximadamente cinco minutos, en cada individuo; con ello no podemos determinar la reproducibilidad. Esta se ha estudiado en estudios previos

286,287 288,289 290

Kharitonov y cols, practicaron a 40 niños, de 7 a 13 años, 3 determinaciones de  $F_{E}NO$  en dos ocasiones (a primera hora de la mañana y de la tarde). La medición se realizó siguiendo las recomendaciones de la ATS <sup>25</sup>, recogándose en cada sesión 3 exhalaciones correctamente practicadas. La reproducibilidad fue analizada estadísticamente, concluyendo que la reproducibilidad de la medida del  $F_{E}NO$  en un

día es mayor a la observada con cualquiera de los otros métodos convencionales para medir la inflamación de la vía aérea. Con ello se sugiere que 2 medidas serían suficientes (que es lo que practicamos nosotros).

Philipp y cols. hallaron mayor variabilidad, probablemente porque utilizaron un analizador diferente con un flujo mayor y no usaron un filtro cero para NO. Quizás su hallazgo más importante para la clínica sea que sugieren que una variabilidad > a 4 ppb sería sugestiva de inflamación más que de fallo técnico<sup>289</sup>. Jobsis y cols.<sup>291</sup> en su muestreo off-line, también refieren una excelente reproducibilidad con 2 muestras obtenidas a un flujo de 100 ml/s .

Dada la importancia de la monitorización del F<sub>E</sub>NO en niños mayores y adultos para el diagnóstico y buen control del asma y dada la razonable facilidad técnica, se han realizado y están realizando múltiples estudios para lograr un sistema que obvие todas las limitaciones antes relatadas.

### **2.3.- ANÁLISIS DE FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO**

#### **2.3.1.- Influencia del método de recogida del aire exhalado**

Tal y como se puede entrever al revisar la bibliografía no hay existen discrepancias en cuanto al método usado para la determinación del F<sub>E</sub>NO en niños no colaboradores y a la posterior interpretación de los resultados. La ATS y la ERS han hecho un verdadero esfuerzo en consensuar unas pautas o recomendaciones para la estandarización de la medición del F<sub>E</sub>NO<sup>25</sup>. Nosotros hemos seguido estas recomendaciones en lo que concierne a la medida del F<sub>E</sub>NO mediante técnica off-line a volúmen corriente.

Hay pocos métodos validados para niños menores de 4 años, y de hecho hay pocos trabajos publicados en los que se determine el F<sub>E</sub>NO a estas edades. Se puede hacer la determinación de dos formas distintas:

a) *On line*: adaptando la técnica a la edad.

Baraldi y cols describen (2000) un método<sup>193</sup> para niños a partir de 5 años en la que utilizan un regulador de flujo para que el niño no tenga que mantener el flujo durante ≥ 3 segundos, de forma que todos los niños sean capaces de realizar la técnica on-line.

Buchvald y Bisgaard (2001)<sup>195</sup> proponen un método similar para determinar el óxido nítrico on-line a un flujo constante durante respiración a volumen corriente en niños de 2 a 5 años de edad. El operador fija un flujo (sobre 50 ml/s) mediante el reajuste

continuo de la resistencia espiratoria, y el  $F_{E}NO$  se mide al final de la exhalación. Según los autores esta técnica es factible en niños de estas edades y distingue niños sanos de asmáticos (3 vs 5-6 ppb). Comparando en niños mayores con el método de la respiración única on-line, arguyen que los resultados son superponibles y que la sensibilidad es mayor que mediante la técnica off-line. De todos modos requiere que el niño respire lenta y regularmente, cosa que en nuestra experiencia es difícil sobre todo en los menores de 3 años, a los que es difícil o imposible explicar la técnica y además lo más frecuente es que ante la mascarilla se pongan nerviosos de forma que la respiración es agitada.

#### *b) Off-line*

Fue la técnica elegida por nosotros, dada la edad de los pacientes y que se quería realizar sin sedación.

Baraldi y cols, estudian en 1999<sup>199</sup> el  $F_{E}NO$  por vez primera en niños menores de 2 años, mediante la exhalación a través de un dispositivo con mascarilla en una bolsa de recogida que luego conectan a un analizador de quimioluminiscencia. Constataron como en estudios previos en niños mayores y adultos que el  $F_{E}NO$  era mayor en niños con bronquitis recurrentes que en los sanos, que era mayor en el episodio de bronquitis aguda que en los niños asintomáticos y que disminuía al iniciar tratamiento con corticoides.

Visser y cols.<sup>292</sup> ante la imposibilidad de practicar la maniobra de exhalación simple desde capacidad pulmonar total, en los niños pequeños desarrollaron un método para medir el  $F_{E}NO$  en gas exhalado mixto, respirando los niños (de 4 a 14 años) durante 5 minutos a volumen corriente, obteniendo resultados similares a los previos. Sin embargo, opinamos que en nuestro grupo sería muy difícil mantener a los niños respirando con mascarilla este tiempo de forma pausada y tranquila.

En el 2001 Avital y cols.<sup>223</sup> realizaron un trabajo similar al nuestro, en el que medían el  $F_{E}NO$  en niños de 2 a 7 años mediante una bolsa de Mylar, recogiendo el aire espirado de 2 a 5 espiraciones. Obtuvieron unos resultados similares a los nuestros, y como nosotros no midieron el flujo espiratorio. Sin embargo, utilizaron un grupo control de iguales características que el de estudio, que permitió obtener conclusiones al hacer estudios comparativos.

En el 2002, Pijnenburg y cos.<sup>198</sup> también diseñaron un instrumento para medir el  $F_{E}NO$  off-line con restricción del flujo dinámica, que mantenía el flujo a 50 ml/s, eliminando el espacio muerto. Sus resultados eran congruentes con medidas realizadas on-line en adultos. Los niños espiraban en un tubo desde capacidad pulmonar total; se obviaban los primeros 4 segundos de la espiración y se recogía el aire espirado los últimos 3

segundos. Esta técnica puede ser útil en niños mayores de 4 años a los que es posible explicársela, pero no en pequeños que son incapaces de colaborar, y de realizar la maniobra desde capacidad pulmonar total.

Como hemos comentado, la concentración de óxido nítrico exhalado es bastante dependiente del flujo a que se produce la exhalación debido a la producción de óxido nítrico en la vía aérea. Se están aplicando técnicas especiales de análisis del óxido nítrico durante la respiración a volumen corriente, que pretenden identificar el óxido nítrico procedente de los diferentes compartimentos pulmonares, vía aérea y alvéolos, soslayando este problema<sup>293</sup>. Esto facilitaría las determinaciones en niños pequeños, pudiendo disminuir así la variabilidad en las determinaciones del F<sub>E</sub>NO en este grupo etario.

### **2.3.2.- Factores técnicos**

Existen varios determinantes técnicos que pueden condicionar los valores de óxido nítrico exhalado y que hemos tenido en cuenta para realizar nuestro estudio:

#### **2.3.2.1.- Ritmo circadiano**

Existen algunos trabajos que demuestran que existe un ritmo circadiano en la producción de óxido nítrico exhalado constatándose que a primeras horas de la mañana es mayor<sup>294</sup>. Por eso, en nuestro estudio todas las determinaciones fueron realizadas por la mañana para evitar posibles factores de confusión.

#### **2.3.2.2.- NO ambiental**

La existencia de contaminación ambiental por óxido nítrico a partir de concentraciones de 5 – 10 ppb puede afectar la medición del F<sub>E</sub>NO off-line. Dado que en nuestro laboratorio el nivel de óxido nítrico ambiental es muy variable (entre 5 y 40 ppb), los niños hacían, previamente a la recogida de la muestra de aire exhalado, 5 respiraciones a través de un filtro cero de óxido nítrico para evitar este problema.

#### **2.3.2.3.- Contaminación por óxido nítrico nasal**

Aunque hay autores que consideran que esto no es importante dado que los senos paranasales a esta edad está poco neumatizados y por tanto la contaminación es mínima, hemos descartado la exhalación de aire nasal mediante una mascarilla especial con tabique nasal, colocando la mascarilla sobre boca y nariz. Por otro lado, al cerrar la válvula del sistema de recogida, la resistencia del sistema genera una

presión de al menos 3-5 cm H<sub>2</sub>O, que ayuda a cerrar el paladar blando, y contribuye también a evitar la contaminación nasal y paranasal.

### **2.3.3.- Factores fisiológicos, ambientales y patológicos**

Además de estos factores técnicos existen parámetros fisiológicos como la edad y el género, ambientales como el tabaco, y patológicos que podrían influenciar los niveles de óxido nítrico exhalado:

#### **2.3.3.1.- Edad**

En los niños normales sanos no hemos encontrado relación entre la edad de los niños y el valor del F<sub>E</sub>NO. Esto concuerda con los resultados obtenidos en niños en edad escolar por Cobos y cols.<sup>24</sup> y Baraldi y cols.<sup>201</sup>. En cambio, Franklin y cols.<sup>281</sup> encontraron que los valores de F<sub>E</sub>NO eran mayores en los niños de más edad, estudiando una población de niños sanos entre 7 y 13 años de edad y Kissoon y cols, también observaron un incremento con la edad en adolescentes entre 15 y 17 años<sup>295</sup>. En el grupo de niños con bronquitis de nuestro estudio hubo una tendencia a presentar valores mayores en los niños de mayor edad, pero sin alcanzar la significación estadística (r= 0,24; p=0,061). Esto pudo tener relación con la presencia de una mayor proporción de niños con inflamación de tipo eosinofílico en los niños con bronquitis de repetición de más edad.

#### **2.3.3.2.- Género**

Hay discrepancias respecto al grado de influencia del género y el por qué de éste. Nosotros encontramos unos niveles de F<sub>E</sub>NO significativamente mayores (5,68 vs 3,96 ppb) en el sexo femenino respecto al masculino en el grupo control; no existiendo tal diferencia en el grupo de niños afectados de bronquitis.

Pijnenburg<sup>198</sup> al medir el F<sub>E</sub>NO en niños de 4 a 8 años y Franklin<sup>283</sup> en su último trabajo encuentran también niveles significativamente mayores en niñas. Cobos y cols.<sup>24</sup> y Baraldi y cols.<sup>201</sup> en niños escolares no hallaron diferencias.

#### **2.3.3.3.- Tabaquismo**

Nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a los niveles de F<sub>E</sub>NO en relación con la exposición o no al tabaco, tanto en el grupo de niños con bronquitis sibilantes como en el grupo de niños sanos (en el que incluimos algunos sujetos con antecedentes de tabaquismo para valorar posibles diferencias). En la literatura se ha relacionado el tabaquismo prenatal con valores más bajos de F<sub>E</sub>NO,

pero no así el posnatal, por lo que supone que actuarían por diferente mecanismo<sup>281,296,297</sup>.

#### **2.3.3.4.- Atopia**

Diversos trabajos han investigado las posibles diferencias en los niveles de F<sub>E</sub>NO en niños asmáticos atópicos y no atópicos. Parece que hay acuerdo en que el F<sub>E</sub>NO sería mayor en niños asmáticos de base alérgica, incluso en presencia de similar función respiratoria<sup>298,299</sup>. En el estudio de Barreto y cols. se confirma este dato, añadiendo que el F<sub>E</sub>NO aún es mayor si la alergia es a los ácaros del polvo<sup>297</sup>.

Nosotros encontramos como en la bibliografía<sup>286,300,301</sup> una relación directa entre F<sub>E</sub>NO y eosinofilia (5,08 vs 6,20 ppb en el grupo que presentaba eosinófilos elevados, p=0,01). En cambio dicha relación no se mantuvo con el nivel de IgE total.

En la bibliografía también se asocia la positividad del prick a neuroalergenos con mayores niveles de F<sub>E</sub>NO. En nuestro caso, aunque los valores de F<sub>E</sub>NO fueron superiores en los niños afectados de bronquitis con prick o IgE específica positiva, la diferencia no fue significativa, lo que puede estar influido por el escaso número de niños (7) con estas pruebas positivas; recordemos la corta edad de nuestros pacientes.

En cuanto a los antecedentes de atopia, hay estudios que al igual que con la hiperrespuesta bronquial, opinan que los antecedentes familiares, sobre todo maternos de atopia, inciden en el resultado del F<sub>E</sub>NO<sup>192,302</sup>, pero parece que existe una compleja interacción entre los factores maternos y ambientales de cara al desarrollo de patología de la vía aérea. En nuestro caso se registró en la historia clínica de los niños el antecedente de asma en padres o hermanos, pero no hubo relación entre este dato y los niveles de F<sub>E</sub>NO en los niños con bronquitis de repetición.

#### **2.4.- RELACIÓN ENTRE NIÑOS AFECTOS DE SIBILANCIAS, PRESENCIA DE HIPERRESPUESTA BRONQUIAL Y NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO**

Hemos visto en nuestro estudio que los niños pequeños con bronquitis sibilantes de repetición presentan mayor hiperrespuesta bronquial que los niños sanos, y niveles mayores de óxido nítrico exhalado. En cambio, no hemos encontrado relación entre la presencia de hiperrespuesta bronquial o su grado y los niveles de F<sub>E</sub>NO.

Ello podría explicarse por el hecho de que la positividad de la metacolina, no dependiera de la inflamación bronquial, al menos la representada por el aumento del óxido nítrico de tipo fundamentalmente eosinofílico, sino de otros factores como el tono muscular, el remodelamiento de la pared bronquial, o la disfunción autonómica.

Los resultados en nuestro trabajo no pueden ser atribuidos a infecciones víricas como en el estudio de de Gouw que concluía que las infecciones víricas provocaban incrementos del  $F_{E}NO$  que coincidían con aumentos de la hiperrespuesta bronquial<sup>200,303</sup>, ya que se excluyeron los pacientes que habían padecido cuadros de posible etiología vírica en las 3 semanas previas

En los estudios realizados en adultos y en niños mayores la relación entre niveles elevados de  $F_{E}NO$  y presencia de hiperrespuesta bronquial no ha sido constante, encontrando con frecuencia una disociación entre la presencia de inflamación bronquial valorada mediante el  $F_{E}NO$  y de hiperrespuesta bronquial:

Dupont y cols.<sup>209</sup> en dos de sus publicaciones, concluyen que en un grupo de pacientes con clínica de sibilantes sin tratamiento con corticoides, el  $F_{E}NO$  permite distinguir entre pacientes con y sin hiperrespuesta en una prueba de broncoprovocación con histamina (el primer grupo tendrá niveles mayores de  $F_{E}NO$ ).

Salomé y cols.<sup>304</sup> en dos estudios realizados en 1999 y en 2002, encuentran que la medida del  $F_{E}NO$  está relacionado con la hiperrespuesta bronquial (con histamina) y con la presencia de sibilantes habituales, por lo que parece que el  $F_{E}NO$  sería algo más que un marcador de atopia.

Crimi y cols.<sup>139</sup> en cambio, en un estudio de 71 pacientes, en los que estudiaban la inflamación de la vía aérea por métodos indirectos y directos (biopsia y lavado broncoalveolar), concluyen que hay una disociación entre inflamación bronquial e hiperrespuesta bronquial a metacolina en el asma. Haley<sup>305</sup> en un editorial reflexiona sobre la posible interrelación entre ambos factores, sugiriendo que en la hiperrespuesta bronquial pueden influir la respuesta bronquial motora, el sistema nervioso, el epitelio, el remodelamiento, etc. y que la inflamación a través de la liberación de sustancias también actuaría por distintas vías implicando ello una complejidad a la hora de relacionar las anomalías funcionales y la inflamación en el asma.

También Silvestri y cols.<sup>306</sup> en un estudio en niños asmáticos adolescentes encontraron que los niveles de  $F_{E}NO$  no eran predictores del grado de hiperrespuesta bronquial a la metacolina.

Piacentini y cols.<sup>307</sup> observaron una discordancia entre el  $F_{E}NO$  y el grado de hiperrespuesta bronquial a metacolina en niños tratados con corticoides inhalados, que basaron en que los corticoides podían prevenir la inflamación bronquial de origen vírico pero no la hiperrespuesta bronquial en un plazo corto de tiempo y que el  $F_{E}NO$  quizás sería un parámetro demasiado sensible para la evaluación del niño asmático (ya que aunque se normalice el  $F_{E}NO$ , puede que aún exista una inflamación subclínica que explicaría la hiperrespuesta bronquial presente).

# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1.- El método de la auscultación traqueal modificado constituye un método sencillo, adecuado y seguro para valorar la presencia de hiperrespuesta bronquial a la metacolina en niños menores de 4 años de edad, sin necesidad de utilizar sedación.

2.- Dos tercios de los niños sanos menores de 4 años, no responden a la metacolina, mientras que un tercio lo hace a la concentración máxima utilizada de 8 mg/mL. Este comportamiento es independiente de la edad de los niños.

3.- Los niños menores de 4 años de edad con bronquitis sibilantes de repetición presentan, considerados como grupo, hiperrespuesta bronquial en relación con los niños sanos de la misma edad.

Sin embargo, un pequeño porcentaje de los niños con bronquitis de repetición no responde a la metacolina (16%), o lo hace a concentraciones de 8 mg/mL (16%), igual que algunos niños del grupo control. Dos tercios (68%) de los niños con bronquitis de repetición responden a la metacolina a concentraciones inferiores a las observadas en los niños sanos.

4. No existe relación entre la edad de los niños, en el momento de la realización de la prueba, y el grado de respuesta a la metacolina.

5.- Existe una relación entre la edad a la que los niños presentaron su primer episodio de bronquitis y la respuesta a la metacolina, de forma que los niños que debutaron con bronquitis a una edad menor tuvieron una mayor probabilidad de responder a una dosis menor de metacolina.

6.- La medición del óxido nítrico exhalado mediante el método de recogida off-line a volumen corriente es sencilla y no precisa de la colaboración activa de los niños.

7.- No existe relación entre la edad de los niños en el momento de realizar la recogida del aire exhalado, y los niveles de óxido nítrico encontrados, ni en el grupo control de niños sanos, ni en el grupo de niños con bronquitis de repetición.

8.- Los niños menores de cuatro años afectados de bronquitis sibilantes recurrentes en fase asintomática presentan una inflamación bronquial, reflejada por un aumento de

concentración de óxido nítrico exhalado, en relación con los niños sanos de la misma edad.

8.- Al comparar los valores de óxido nítrico exhalado, entre el grupo control y los pacientes con bronquitis de repetición según recibieran o no tratamiento con corticoides inhalados, la diferencia fue significativa entre los pacientes que no recibían tratamiento con corticoides inhalados y los del grupo control, pero no entre los pacientes que sí recibían tratamiento con corticoides y el grupo control.

9.- Hay una zona de superposición de valores de óxido nítrico exhalado entre niños sanos y afectados de bronquitis sibilantes recurrentes por lo que el resultado no discrimina adecuadamente los niños sanos de los que padecen bronquitis.

10.- Son necesarios estudios longitudinales de seguimiento de estos pacientes para valorar si la hiperrespuesta bronquial a la metacolina y el óxido nítrico exhalado pueden ayudar a discriminar los pacientes que desarrollarán asma bronquial atópico de los que presentan bronquitis sibilantes transitorias.

# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995; 332:133-138.
2. Taussig LM, Wright AL, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Martinez FD. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:661-675.
3. Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics* 2002; 109:362-367.
4. Le Souef PN. Validity of methods used to test airway responsiveness in children. *Lancet* 1992; 339:1282-1284.
5. Stick SM, Arnott J, Turner DJ, Young S, Landau LI, LeSouef PN. Bronchial responsiveness and lung function in recurrently wheezy infants. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1012-1015.
6. Stick SM, Turner DJ, LeSouef PN. Lung function and bronchial challenges in infants: repeatability of histamine and comparison with methacholine challenges. *Pediatr Pulmonol* 1993; 16:177-183.
7. Hall GL, Hantos Z, Wildhaber JH, Petak F, Sly PD. Methacholine responsiveness in infants assessed with low frequency forced oscillation and forced expiration techniques. *Thorax* 2001; 56:42-47.
8. Springer C, Godfrey S, Vilozni D, Bar-Yishay E, Noviski N, Avital A. Comparison of respiratory inductance plethysmography with thoracoabdominal compression in bronchial challenges in infants and young children. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:665-669.
9. Klug B, Bisgaard H. Assessment of bronchial hyperresponsiveness in preschool children: methodological issues. *Pediatr Allergy Immunol* 1996; 7:25-27.
10. Rusconi F, Gagliardi L, Aston H, Silverman M. Respiratory inductive plethysmography in the evaluation of lower airway obstruction during methacholine challenge in infants. *Pediatr Pulmonol* 1995; 20:396-402.
11. Benoist MR, Brouard JJ, Rufin P, Delacourt C, Waernessyckle S, Scheinmann P. Ability of new lung function tests to assess methacholine-induced airway obstruction in infants. *Pediatr Pulmonol* 1994; 18:308-316.
12. Klug B, Bisgaard H. Measurement of lung function in awake 2-4-year-old asthmatic children during methacholine challenge and acute asthma: a comparison of the impulse oscillation technique, the interrupter technique, and transcutaneous measurement of oxygen versus whole-body plethysmography. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21:290-300.
13. Mochizuki H, Shigeta M, Arakawa H, Kato M, Tokuyama K, Morikawa A. Bronchial hyperresponsiveness before and after the diagnosis of bronchial asthma in children. *Pediatrics* 2000; 106:1442-1446.

14. Delacourt C, Benoist MR, Waernessyckle S et al. Relationship between bronchial responsiveness and clinical evolution in infants who wheeze: a four-year prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1382-1386.
15. Mochizuki H, Ohki Y, Nako Y, Morikawa A. Bronchial reactivity to inhaled methacholine in infants with asthma and age-matched controls. *J Asthma* 1999; 36:503-509.
16. Avital A, Bar-Yishay E, Springer C, Godfrey S. Bronchial provocation tests in young children using tracheal auscultation. *J Pediatr* 1988; 112:591-594.
17. Springer C, Godfrey S, Picard E et al. Efficacy and safety of methacholine bronchial challenge performed by auscultation in young asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:857-860.
18. Novinski N, Cohen L, Springer C, Avital A, Godfrey S. Bronchial provocation determined by breath sounds compared with lung function. *Arch Dis Child* 1991; 66:952-955.
19. Purohit A, Bohadana A, Kopferschmitt-Kubler MC, Mahr L, Linder J, Pauli G. Lung auscultation in airway challenge testing. *Respir Med* 1997; 91:151-157.
20. de Frutos MC, Gonzalez Perez-Yarza E, Aldasoro RA, Emparanza Knorr JI, Callen BM, Mintegui AJ. Medida de la respuesta bronquial a la metacolina en niños asmáticos mediante la auscultación traqueal. *An Esp Pediatr* 2002; 56:304-309.
21. Guirau LM, Sole D, Naspitz CK. Bronchoprovocation with methacholine in children under two years old: a follow-up study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1997; 7:110-114.
22. Moreno A. Marcadores de la enfermedad asmática: de la función pulmonar al aire espirado. *An Pediatr, Monogr* 2004; 2:37-47.
23. Koshland D. The molecule of the year. *Science* 1992; 258:1891-1892.
24. Cobos N, Reverté C, Gartner S, Liñán S, Quintó L. Oxido nítrico exhalado y nasal en niños normales y asmáticos. *An Esp Pediatr* 1998; 49:241-247.
25. Recommendations for standardized procedures for the on-line and off-line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:2104-2117.
26. Kharitonov SA, Alving K, Barnes PJ, ERS T. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. *Eur Respir J* 1997; 10:1683-1693.
27. Young S, Arnott J, O'Keefe PT, Le Souef PN, Landau LI. The association between early life lung function and wheezing during the first 2 yrs of life. *Eur Respir J* 2000; 15:151-157.
28. Kuehni C, Davis SD, Brooke AM, Silverman M. Are all wheezing disorders in very young children increasing in prevalence? *Lancet* 2001; 357:1821-1825.

29. Rusconi F, Galassi C, Corbo GM et al. Risk factors for early, persistent and late-onset wheezing in young children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1617-1622.
30. Perez Yarza E. El niño silbante y el niño asmático. En: Casan P, editor. *Avances en asma*. Barcelona: Prous, 1999.
31. Kemp J. *Manual clínico del asma pediátrico*. London: Science Press, 2002.
32. Martinez FD, Godfrey S. *Wheezing disorders in the preschool child*. London: Martin Dunitz, 2003.
33. Martinez FD. Asthma phenotypes: wheezy infants and wheezy children. *Immunol Allergy Clin North Am* 1998; 137:302-307.
34. Stein R, Holberg CJ, Morgan W et al. Peak flow variability, methacholine responsiveness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood. *Thorax* 1997; 52:946-952.
35. Young S, Le Souef PN, Geelhoed GC, Stick SM, Turner KJ, Landau LI. The influence of a family history of asthma and parental smoking on airway responsiveness in early infancy. *N Engl J Med* 1991; 324:1168-1173.
36. Martinez FD, Cline MG, Burrows B. Increased incidence of asthma in children of smoking mothers. *Pediatrics* 1992; 89:21-26.
37. Stein RT, Holberg CJ, Sherrill D et al. Influence of parental smoking on respiratory symptoms during the first decade of life: the Tucson Children's Respiratory Study. *Am J Epidemiol* 1999; 149:1030-1037.
38. Ehrlich R, Du Toit D, Jordaan E. Risk factors for childhood asthma and wheezing. Importance of maternal and household smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:681-688.
39. Bergmann R, Lau S, Luck W, Dannermann A, Bauer C. Atopic diseases in infancy. The German MAS. *Pediatr Allergy Immunol* 1995; 5:19-25.
40. Dezateux C, Stocks J, Dundas I, Fletcher M. Impaired airway function and wheezing in infancy (The influence of maternal smoking and a genetic predisposition). *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:403-410.
41. Martinez FD, Morgan W, Wright A. Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants. *N Engl J Med* 1988; 319:1112-1117.
42. Frey U, Makkonen K, Wellman T, Beardsmore C, Silverman M. Alterations in airway wall properties in infants with a history of wheezing disorders. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1825-1829.
43. Clarke C, Salmon B, Silverman M. Bronchial responsiveness in the neonatal period as a risk factor for wheezing in infancy. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1434-1440.
44. ISAAC Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of atopic diseases: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Lancet* 1998; 351:1225-1232.

45. Mochizuki H, Shigeta M, Morikawa A. Development of Bronchial Hyperresponsiveness during Childhood. *J Asthma* 2001; 38:1-21.
46. Hoo A, Dezateux C, Hanrahan J. Sex specific prediction for Vmax(FRC) in infancy: a multicenter collaborative study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1084-1092.
47. Illi S, von Mutius E, Lau S et al. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 2001; 322:390-395.
48. Jarvis D, Chinn S, Lucynska C, Burney P. The association of family size with atopy and atopic disease. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:210-213.
49. Gold D, Burge H, Carey V. Predictors of repeated wheeze in the first year of life: the relative roles of cockroach, birthweight, LRI and maternal smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:227-236.
50. Wright A, Holberg CJ, Martinez FD. Breast feeding and LRTI in the first year of life. *Br Med J* 1989; 299:946-949.
51. Katan M. Epidemiologic evidence of increased airway reactivity in children with a history of bronchiolitis. *J Pediatr* 1999; 135:8-13.
52. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999; 354:541-545.
53. Burrows B. Relation of the course of bronchial responsiveness from age 9 to age 15 to allergy. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1302-1308.
54. von Mutius E, Martinez FD, Frizsch C, Nicolai T. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 1994; 308:692-695.
55. Eder W, von Mutius E. Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4:113-7.
56. Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA, Burton PR, Landau LI, LeSouef PN. Airway responsiveness in early infancy predicts asthma, lung function, and respiratory symptoms by school age. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:37-42.
57. Colasurdo G, Hemming V, Prince G. Human Respiratory Syncytial Virus produces prolonged alterations of neural control in airways of developing ferrets. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1506-1511.
58. Illi S, von Mutius E, Lau S. The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:709-714.
59. Karakoc F, Remes K, Martinez FD, Wright A. The association between persistent eosinophilia and asthma in children is independent of atopic status. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:51-56.
60. Reijonen T, Korppi M, Kuikka L. Serum eosinophil cationic protein as a predictor of wheezing after bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 1997; 23:397-403.

61. Stevenson E, Turner G, Heaney L. Bronchoalveolar lavage findings suggest two different forms of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 27:1027-1035.
62. Martinez FD. Immunology of wheezing disorders in infants and preschool children. In: Martin Dunitz, editor. *Wheezing disorders in the preschool children*. London: 2003: 31-54.
63. Castro-Rodriguez JA, Martinez FD. Epidemiología del asma y de las sibilancias en pediatría. 2003: 567-576.
64. von Mutius E. Infection: friend or foe in the development of atopy and asthma? The epidemiological evidence. *Eur Respir J* 2001; 18:872-881.
65. Kimpen J. Viral infections and childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:S108-112.
66. Kramer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann H. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* 1999; 353:450-454.
67. Illi S, von Mutius E, Bergmann R. Upper respiratory tract infections in the first year of life and asthma in children up to 7 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:704-706.
68. Celedón J, Litonjua A, Weiss S, Gold DR. Day care attendance in the first year of life and illness of the upper and lower respiratory tract in children with a family history of atopy. *Pediatrics* 1999; 104:495-500.
69. Strachan D. Family size, infection and atopy; the first decade of the hygiene hypothesis. *Thorax* 2000; 55:S2-10.
70. Bodner C, Golden D, Seaton A. Family size, childhood infections and atopic diseases. *Thorax* 1998; 53:28-32.
71. Oswald H, Pelan P, Lanigan A, Hibbert M. Childhood asthma and lung function in mild adult life. *Pediatr Pulmonol* 1997; 16:S90-91.
72. Taussig L. Wheezing in infancy: when is it asthma? *Pediatr Pulmonol* 1997; 16:S90-91.
73. Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1403-1406.
74. Martinez FD. Recognizing early asthma. *Allergy* 1999; 54:24-28.
75. Clough J, Keeping K, Edwards L, Freeman J, Warner J. Can we predict which wheezy infants will continue to wheeze? *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1473-1480.
76. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Wiecek E, Taylor DR, Flannery EM. A longitudinal Population based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003; 349:1422.
77. Marguet C, Dean T, Warner J. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1533-1540.

78. Le Bourgeois M, Goncalves M, Le Clainche. Broncoalveolar cells in children < 3 years old with severe recurrent wheezing. *Chest* 2002; 122:761-763.
79. Krawiec M, Westcott J, Chua HL. Persistent wheezing in very strong young children is associated with lower respiratory inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:290-291.
80. Azevedo I, de Bie J, Vargaftig B. Increased eosinophil cationic protein levels in broncoalveolar lavage from wheezy infants. *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12:65-72.
81. Konning H, Baert M. T cell subsets and cytokines in allergic children. Analysis of IL4, IFN gamma and IL13 mRNA expression and protein production. *Cytokine* 1997; 9:416-426.
82. Lench S, Price J, Holmes B, Kerneny D. Nonatopic wheezy children have reduced interferon gamma. *Allergy* 2000; 55:74-78.
83. Bont L, Heijjonen C, Kavelaars A. Monocyte, IL10 production during respiratory SRV bronchiolitis is associated with recurrent wheezing in one year follow up study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1518-1523.
84. Grunstein N, Leiter J. Autocrine signalling by IL-10 mediates altered responsiveness of atopic sensitized airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Molec Physiol* 2001; 281:L1130-1137.
85. Jones C, Warner J. Regulating a regulator: IFN gamma production by the neonate. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:865-868.
86. Martinez FD, Holt PG. Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* 1999; 354 (suppl2):12-15.
87. Laporte J, Moore P, Baraldo S. Direct effects of IL13 on signalling pathways for physiological responses in cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:141-148.
88. Doucet C, Brouty Bove D, Pottin Clemenceau C. IL4 and IL 13 act on human lung fibroblasts. Implications in asthma. *J Clin Invest* 1998; 101:2129-2139.
89. Ernst P, Ghezzi, Becklake MR. Factores de riesgo de hiperreactividad bronquial en la infancia tardía y adolescencia precoz. *Eur Respir J* 2002; 20:635-639.
90. von Mutius E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(suppl 6):S525-532.
91. Martinez FD, Holt PG. Role of antimicrobial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* 1999; 354:12-15.
92. Cobos N, Perez Yarza E. Tratado de Neumología Infantil. Madrid: Ergon, 2003.
93. Wohl M, Mead J. Age as a factor in respiratory disease. Disorders of the respiratory tract of the children. Philadelphia: Saunders Co, 1998: 175-182.

94. Perez J, Perez E, Cordon A, Rodriguez M. La espirometría forzada. Perez Yarza E, editor. III Curso sobre función pulmonar, 19-28. 2001. Madrid, Ergon.
95. Garmendia A. Test de broncodilatación. En: González Perez-Yarza E, editor. I Curso sobre la función pulmonar en el niño. Madrid: Ergon, 1997: 45-47.
96. Casan Clarà P. La espirometría forzada. En: González Perez-Yarza E, editor. IV Curso sobre la función pulmonar en el niño. Madrid: Ergon, 2003: 51-54.
97. González Perez-Yarza E. La función pulmonar en el lactante. En: González Perez-Yarza E, editor. II Curso sobre la función pulmonar en el niño. Madrid: Ergon, 1999: 32-38.
98. Villa Asensi J, Zuriarrain Reyna Y. Niños no colaboradores: resistencias oscilatorias y por interrupción. En: González Perez-Yarza E, editor. IV Curso sobre la función pulmonar en el niño. Madrid: Ergon, 2003: 63-68.
99. Plaza Moral V, Álvarez Gutiérrez FJ, Casan Clarà P, Cobos Barroso N, López Viña A, Llauger Roselló MA, et al. Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA). Arch Bronconeumol 2003; 39: 3-42.
100. González Perez-Yarza E, Aldasoro A. *El asa flujo volumen a respiración corriente* En: González Perez-Yarza E, editor. III Curso sobre la función pulmonar en el niño. Madrid: Ergon, 2001: 37-40.
101. Aston H, Clarke C, Silverman M. Are tidal breathing indices useful in infant bronchial challenge tests? *Pediatr Pulmonol* 1994; 17:225-230.
102. Liñán Cortés S, Reverté Bover C, Cobos Barroso N. Exploración funcional respiratoria en el niño colaborador: pletismografía corporal. En: Cobos N, G. Pérez-Yarza E, editores. Tratado de Neumología Infantil. Madrid: Ergon, 2003: 151-182.
103. Nielsen K. Discriminative capacity of broncodilator response measured with three different lung techniques in asthmatic and healthy children aged two to five years. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:554-559.
104. ATS/ ERS. The Raised Volume rapid thoracoabdominal compresión technique. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1760-2. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 161:1760-1762.
105. Wilson NM, Silverman M. Bronchial responsiveness. *Childhood Asthma and other Wheezing disorders*. London: Arnold, 2002: 114-172.
106. Casan P. Mecanismos y características de la hiperreactividad bronquial en el asma. *Avances en asma*. Barcelona: Prous, 1999.
107. Mitjavilla A, Martorell A, Sole D. Test de la metacolina para el estudio de la hiperreactividad bronquial inespecífica en la edad pediátrica. *An Esp Pediatr* 1986; 25:411-416.
108. Cockcroft DW. Airway responsiveness. *Asthma*. Philadelphia: Lippincot Raven, 1997: 1253-1266.

109. Jansen D. Assymptomatic bronchial hyperresponsiveness and asthma. *Respir Med* 1997; 91:121-134.
110. Martorell A, Sanz J, Alvarez V. Hiperreactividad Bronquial en la infancia. *An Esp Pediatr* 1993; 39:124.
111. González Perez-Yarza E. La hiperrespuesta bronquial: principios. En: González Perez-Yarza E, editor. III Curso sobre la función pulmonar en el niño. Madrid: Ergon, 2001: 51-54.
112. Sterck P. Bronchial hyperresponsiveness: definition and terminology. *Pediatr Allergy Immunol* 1996; 7:7-9.
113. Spahn J, Szeffler SJ. The etiology and control of bronchial hyperresponsiveness in children. *Current opinion in Pediatrics* 1996; 8:591-596.
114. Wilson NM, Dore CJ, Silverman M. Factors relating to the severity of symptoms at 5 yrs in children with severe wheeze in the first 2 yrs of life. *Eur Respir J* 1997; 10:346-353.
115. Nielsen K, Bisgaard H. Lung function response to cold air challenge in asthmatic and healthy children of 2-5 years of age. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1805-1809.
116. Pattemore P, Holgate S. Bronchial hyperresponsiveness and its relationship to asthma in childhood. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:886-900.
117. Chinn S, Lucynska C, Burney P, Jarvis D. Variations in bronchial responsiveness in the ECRHS. *Eur Respir J* 1997; 10:2495-2501.
118. Studnicka M, Frischer T, Weiss S, Dockery D, Speizer F. Seasonal and allergenic predictors of bronchial responsiveness with distilled water. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1460-1466.
119. 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; 50:511-516.
120. Le Souëf P, Sears MR, Sherrill D. The effect of size and age of subject on airway responsiveness in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:576-579.
121. Tepper RS. Airway reactivity in infants: a positive response to methacholine and metaproterenol. *J Appl Physiol* 1987; 62:1155-1159.
122. Mochizuki H, Shigeta M, Kato M, Maeda S, Shimizu T, Mirokawa A. Age - related changes in bronchial hyperreactivity to metacholine in asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:906-910.
123. Le Souef PN. Can measurements of airway responsiveness be standardised in children? *Eur Respir J* 1993; 6:1085-1087.
124. Stick SM, Turnbull S, Chua HL, Landau LI, LeSouef PN. Bronchial responsiveness to histamine in infants and older children. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:1143-1146.

125. Martinez FD, Helms P. Types of asthma and wheezing. *Eur Respir J* 1998; 12(suppl):S3-S8.
126. von Mutius E. Towards prevention. *Lancet* 1997; 350 (SII):14-17.
127. Turner SW, Palmer LJ, Rye PJ et al. Infants with flow limitation at 4 weeks: outcome at 6 and 11 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1294-1298.
128. Wilson NM, Silverman M. Bronchial Responsiveness. In: Silverman M, editor. *Childhood asthma and other wheezing disorders*. London: Arnold, 2002: 144-172.
129. Valencia A, Casan P, Perpiñá M, Gil S. Normativa SEPAR para los tests de provocación bronquial inespecífica. *Arch Bronconeumol* 1998; 1.
130. Martin J, Dureot A, Eidelman D. The contribution of smooth muscle to airway narrowing and airway responsiveness. *Eur Respir J* 2000; 16:349-354.
131. Fernandes D, Mitchell R, Lakser O, Dowell M, Stewart A, Solway J. Airway Hyperresponsiveness: From Molecules to Bedside Invited Review: Do inflammatory mediators influence the contribution of airway smooth muscle contraction to airway responsiveness in asthma? *J Appl Physiol* 2003; 95:844-853.
132. Cockcroft DW. Airway Hyperresponsiveness to inhaled histamine in chronic obstructive airway disease Chronic bronchitis vs emphysema. *Chest* 1988; 94:457.
133. James A, Pare P, Hogg J. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:242-246.
134. Barnes P. Is asthma a nervous disease. *Chest* 1995; 107:119S-124S.
135. Lammers J, Barnes P, Chung K. Non-adrenergic non-cholinergic airway inhibitory nerves. *Eur Respir J* 1992; 5:239-246.
136. Barnes P. Pathophysiology of asthma. *Asthma* 2003; 8:84-113.
137. Gibson P, Saltos N, Borgas T. Airway mast cells and eosinophils correlate with clinical severity and airway hyperresponsiveness in corticosteroid treated asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:752-759.
138. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov S, Chung K, Barnes P. Correlation between exhaled nitric oxide , sputum eosinophils and metacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1988; 53:91-95.
139. Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind P, Rossi G, Brubasco V. Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:4-9.
140. Iredale M, Wanklin S, Philips I, Krausz T. Noninvasive assessment of bronchial inflammation in asthma: no correlation between eosinophilia of induced sputum and bronchial responsiveness to inhaled hypertonic saline. *Clin Exp Allergy* 1994; 24:940-945.

141. Trabetti E, Cusin V, Malerba G. Association of the Fc epsilon R1-beta gene with bronchial hyperresponsiveness in an Italian population. *J Med Genet* 1998; 35:680-681.
142. Li-Kam-Wa T, Mansur A. Association between 308 tumour necrosis factor promoter polymorphism and bronchial hyperreactivity in asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1204-1208.
143. Longo G, Strinatti r, Poli F, Fumi F. Genetic factors in non specific bronchial hyperreactivity. *Am J Dis Child* 1987; 141:331-334.
144. Hopp R, Bewra A, Bivan R, Nair N. Bronchial reactivity pattern in nonasthmatic parents of asthmatics. *Ann Allergy* 1988; 61:184-186.
145. Lötvall J, Inman M, O'Byrne P. Measurements of airway hyperresponsiveness: new considerations. *Thorax* 1998; 53:419-424.
146. Van Velzen E, Van der Bos W, Benkhuijssen J. et al. Effect of allergen avoidance at high altitude on direct and indirect bronchial hyperresponsiveness and markers of inflammation in children with allergic asthma. *Thorax* 1996; 51:582-584.
147. Cockcroft DW, Killan D, Mellon J, Hargreave F. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Allergy* 1977; 7:235-243.
148. Phagoo S, Wilson N, Silverman M. Repeatability of metacholine challenge in asthmatic children measured by change in transcutaneous oxygen tension. *Thorax* 1992; 47:804-808.
149. Chai H, Far R, Froelik L. Standardisation of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56:323-327.
150. Yan K, Salomé C, Woodcock A. Rapid method for measuring bronchial responsiveness. *Thorax* 1983; 38:760-765.
151. Smith C, Anderson S. Inhalation provocations using nonisotonic aerosols. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:781-790.
152. Juniper E, Cockcroft DW, Frith P, Dunnet C, Hargreave F. Reproducibility and comparison of responses to inhaled histamine and metacholine. *Thorax* 1978; 33:705-710.
153. ATS. Guidelines for Metacholine and exercise challenge testing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:309-329.
154. Joos G, O'Connor B. Indirect airway challenges. *Eur Respir J* 2003; 21:1050-1068.
155. Zach M, Polgar G, Kump H, Kroisel P. Cold air challenge of airway hyperreactivity in children: practical application and theoretical aspects. *Pediatr Res* 1984; 18:469-478.
156. Wojnarowski C, Storm V, Riedler J, Eichler I, Gartner C. Comparison of bronchial challenge with ultrasonic nebulized distilled water and hypertonic saline in children with mild to moderate asthma. *Eur Respir J* 1994; 9:1896-1901.

157. ISAAC Steering Committee. World wide variation in the prevalence of asthma symptoms: the ISAAC. *Eur Respir J* 1998; 12:315-335.
158. Riedler J, Reade T, Dalton M, Holst D, Robertson C. Hypertonic saline challenge in an epidemiologic survey of asthma in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:1632-1639.
159. Bez C, Sach G, Jarisch A, Rosewich M, Reichenbach J, Zielen S. Safety and tolerability of methacholine challenge in infants with recurrent wheeze. *J Asthma* 2003; 40:795-802.
160. Wilson NM, Phagoo S, Bridge PD, Silverman M. The measurement of metacholine responsiveness in 5 year old children : 3 methods compared. *Eur Respir J* 1996; 8:364-370.
161. Godfrey S, Uwyyed K, Springer C, Avital A. Is clinical wheezing reliable as the endpoint for bronchial challenges in preschool children? *Pediatr Pulmonol* 2004; 37:193-200.
162. Silverman M. Childhood asthma and other wheezing disorders. London: Chapman & Hall Medical, 1995.
163. Van Schoor J, Joos G, Pauwels R. Indirect bronchial hyperresponsiveness in asthma mechanisms, pharmacology and implications for clinical research. *Eur Respir J* 2000; 16:514-533.
164. Avital A, Godfrey S, Springer C. Exercise, methacholine, and adenosine 5'-monophosphate challenges in children with asthma: relation to severity of the disease. *Pediatr Pulmonol* 2000; 30:207-214.
165. Juniper E, Cockcroft DW, Hargreave F. Histamine and metacholine inhalation tests: tidal breathing method. *Laboratory procedure & standarization Astra* 1994;1-34.
166. Frischer T, Meinert R, Karmaus W, Urbaneck R, Kuehr J. Relationship between atopy and frequent bronchial response to exercise in school children. *Pediatr Pulmonol* 1994; 17:320-325.
167. Bardin P, Johnston S, Pattemore P. Viruses as precipitants of asthma symptoms. *Clin Exp Allergy* 1992; 22:809-822.
168. Stark J, Lemanske RF, Jr. The impact of respiratory infections on asthma. *Pediatr Clin North Am* 1982; 39:1259-1277.
169. Martinez FD. Respiratory syncytial Virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:S76-S82.
170. Busse W. The role of infections in airway responsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:579.
171. Wennergren G. Impact of viral infection on bronchial hyperresponsiveness. *Pediatr Allergy Immunol* 1996; 7:10-13.
172. Avital A, Noviski N, Bar-Yishay E, Springer C, Levy M, Godfrey S. Nonspecific bronchial reactivity in asthmatic children depends on severity but not on age. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:36-38.

173. Zach M, Karner U. Sudden death in asthma. *Arch Dis Child* 1989; 64:1446-1450.
174. GINA. Global initiative for asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NHLBI/WHO Workshop Report 2002.
175. Haley K, Drazen J. Inflammation and airway function in asthma What you see is not necessarily what you get. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1-3.
176. Haley K, Drazen J. Clinical implications of inflammation in young children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:S11-14.
177. Bousquet J, Busse W, Jeffrey P, Johnson M, Vignola A. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodelling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1720-1745.
178. Cobos N. Oxido nítrico exhalado: aplicación en pediatría. *Arch Bronconeumol* 1998; 34:371-373.
179. Koshland D. The molecule of the year. *Science* 1992; 258:1891.
180. Baraldi E, de Jongste JC. Measurement of exhaled nitric oxide in children, 2001. *Eur Respir J* 2002; 20:223-237.
181. Roger N, Barbera J. Oxido nítrico: una molécula importante en las enfermedades respiratorias. *Arch Bronconeumol* 1994; 9:454-461.
182. Kharitonov S, Barnes P. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1693-1722.
183. Cobos N, Reverté C. Oxido nítrico exhalado: un nuevo marcador de la inflamación. En: Cobos N. Ed. *Asma: enfermedad crónica infantil*. Madrid: Doyma, 1999: 19-42.
184. Cobos N, Reverté C. Determinación del óxido nítrico en el estudio de la inflamación de la vía aérea. *Manual de técnicas y procedimientos en asma*. Barcelona: Prous Science, 2000: 137-156.
185. Jörres R. Modelling the production of nitric oxide within the human airways. *Eur Respir J* 2000; 16:555-560.
186. Lundberg J, Weitzberg E, Alving K. Nitric oxide in exhaled air. *Eur Respir J* 1996; 9:2671-2680.
187. Prieto L. Determinación de las concentracones de óxido nítrico exhalado en el asma: Aspectos técnicos y utilidad clínica. *Alergol Inmunol Clin* 2002; 17:72-87.
188. Figueras J, Rodriguez-Miguel JM, Jordan Y, Botet F, Moreno J, Jimenez R. A different methodology for evaluating exhaled endogenous nitric oxide in newborns. *Acta Paediatr* 1999; 88:471-472.
189. Tsoukias N, George S. A two compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol* 1998; 85:653-666.
190. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Li A, Bush A. Effect of inhalation times on exhaled NO. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38:335-338.

191. Kissoon N, Duckworth LJ, Blake KV et al. Exhaled nitric oxide concentrations: online versus offline values in healthy children. *Pediatr Pulmonol* 2002; 33:283-292.
192. Wildhaber JH, Hall GL, Stick SM. Measurements of exhaled nitric oxide with the single-breath technique and positive expiratory pressure in infants. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:74-78.
193. Baraldi E, Scollo M, Zaramella C, Zanconato S, Zacchello F. A simple flow-driven method for online measurement of exhaled NO starting at the age of 4 to 5 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1828-1832.
194. Jobsis Q, Schellekens S, Kroerbergen A, Hop WC, de Jongste JC. Sampling of ENO in children: end expiratory plateau, ballloon and tidal breathing methods compared. *Eur Respir J* 1999; 13:1406-1410.
195. Buchvald F, Bisgaard H. FeNO measured at fixed exhalation flow rate during controlled tidal breathing in children from the age of 2 yr. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:699-704.
196. Silkoff PE, Bates CA, Meiser JB, Bratton DL. Single-breath exhaled nitric oxide in preschool children facilitated by a servo-controlled device maintaining constant flow. *Pediatr Pulmonol* 2004; 37:554-558.
197. Jobsis Q, Raatgeep HC, Hop WC, de Jongste JC. Controlled low flow off line sampling of exhaled nitric oxide in children. *Thorax* 2001; 56:285-289.
198. Pijnenburg MW, Lissenberg ET, Hofhuis W et al. Exhaled nitric oxide measurements with dynamic flow restriction in children aged 4-8 yrs. *Eur Respir J* 2002; 20:919-924.
199. Baraldi E, Dario C, Ongaro R et al. Exhaled nitric oxide concentrations during treatment of wheezing exacerbation in infants and young children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1284-1288.
200. Ratjen F, Kavuk I, Gartig S, Wiesemann HG, Grasemann H. Airway nitric oxide in infants with acute wheezy bronchitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2000; 11:230-235.
201. Baraldi E, Azzolin N, Cracco A, Zacchello F. Reference values of exhaled nitric oxide for healthy children 6-15 years old. *Pediatr Pulmonol* 1999; 27:54-58.
202. Terada A, Fujisawa T, Togashi K et al. Exhaled nitric oxide decreases during exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1879-1884.
203. Scollo M, Zanconato S, Ongaro R, Zaramella C, Zacchello F, Baraldi E. Exhaled nitric oxide and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1047-1050.
204. Dupont L, Maurits D, Verleden G. ENO correlates with airway responsiveness in steroid naive patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 15:894-898.
205. Lierl MB. ENO: A useful aide in pediatric asthma management. *J Pediatr* 2003; 142:461-462.

206. Baraldi E, Azzolin N, Zanconato S, Dario C, Zachello F. Corticosteroids decrease exhaled nitric oxide in children with acute asthma. *J Pediatr* 1997; 131:381-385.
207. Martinez T, Weist A, Williams T, Clem C, Silkoff P, Tepper RS. Assessment of exhaled nitric oxide kinetics in healthy infants. *J Appl Physiol* 2003; 94:2384-2390.
208. Chatkin J, Ansarin K, Silkoff P, McClean P, Gutierrez C. Exhaled nitric oxide as a noninvasive assessment of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1810-1813.
209. Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest* 2003; 123:751-756.
210. Malmberg LP, Pelkonen AS, Haahtela T, Turpeinen M. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. *Thorax* 2003; 58:494-499.
211. Payne D, Wilson N, James A. Evidence for different subgroups of difficult asthma in children. *Thorax* 2001; 56:345-350.
212. Baraldi E, Zanconato S. The labyrinth of asthma phenotypes and exhaled NO. *Thorax* 2001; 56:333-335.
213. Franklin PJ, Turner SW, Le Souef PN, Stick SM. Exhaled nitric oxide and asthma: complex interactions between atopy, airway responsiveness, and symptoms in a community population of children. *Thorax* 2003; 58:1048-1052.
214. Jones S, Kittelson J, owan JO. The predictive value of ENO measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:738-743.
215. Kharitonov S, Barnes P. Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 2000; 16:781-796.
216. Covar RA, Szeffler SJ, Martin RJ et al. Relations between exhaled nitric oxide and measures of disease activity among children with mild-to-moderate asthma. *J Pediatr* 2003; 142:469-475.
217. Bisgaard H, Loland L, Oj N. NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene antagonist receptor montelukast. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1227-1231.
218. Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002; 7:1-32.
219. Lanz M, Leung D, Mc Cormick D, Harbeck R, Szeffler SJ, White C. Comparison of ENO, SECAP and soluble IL2 receptor in exacerbations of pediatric asthma. *Pediatr Pulmonol* 1997; 24:305-311.
220. Godfrey S. Ups and downs of nitric oxide in chesty children. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:438-439.
221. Stirling R, Kharitonov SA, Campbell D, Robinson D. Increase in ENO levels in patients with difficult asthma and correlation with symptoms and disease

- severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. *Thorax* 1998; 53:1030-1034.
222. Griese M, Koch M, Latzin P, Beck J. Asthma severity , recommended changes of inhaled therapy and exhaled nitric oxide in children: a prospective blinded trial. *Eur J Med Res* 2000; 5:334-340.
  223. Avital A, Uwyed K, Berkman N, Godfrey S, Bar-Yishay E, Springer C. Exhaled nitric oxide and asthma in young children. *Pediatr Pulmonol* 2001; 32:308-313.
  224. Jakatanon A, Kharitonov S, Lim S, Barnes P. Efect of differing doses of inhaled budesonide on markers of airway inflamation in patients with mild asthma. *Thorax* 1999; 54:108-114.
  225. Henriksen AH, Sue-Chu M, Lingaas-Holmen T, Langhammer A. Exhaled and nasal NO levels in allegic rhinitis: relation to sensitization, pollen season and bronchial hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 1999; 13:301-303.
  226. Uasuf C, Jakatanon A, James A, Kharitonov SA, Wilson NM, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide in childhood asthma. *J Pediatr* 1999; 135:569-574.
  227. Paredi P, Leckie M, Horvath I, Allegra L, Kharitonov SA, Barnes PJ. Changes in exhaled carbon monoxide and nitric oxide levels following allergen challenge in patients with asthma. *Eur Respir J* 1999; 13:48-52.
  228. Reijonen T, Korppi M, Kuikka L, Savolainen K. Serum eosinophil cationic protein as a predictor of wheezing after bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 1997; 23:397-403.
  229. Pin I, Gibson P, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg J, Hargreave F. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 2005; 47:25-29.
  230. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *Eur Respir J* 2000; 16:1008-1015.
  231. Magnussen H, Holz O. Monitoring airway inflammation in asthma by induced sputum. *Eur Respir J* 1999; 13:5-7.
  232. Pavord I, Pizzichini M, Pizzichini E, Haargreave F. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997; 52:498-501.
  233. Cai Y, Carty K, Henry RL, Gibson PG. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J* 1998; 11:848-853.
  234. Fahy J, Liu J, Wong Z, Boushey K. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:1126-1131.
  235. Kips J, Peleman R, Pauwels R. Methods of examining induced sputum: do differences matter? *Eur Respir J* 1998; 11:529-533.

236. Gotendorst D, Sont J, Wilems L, Kluin J, Van Kriehen J, et al. Comparison of inflammatory cell counts in asthma induced sputum vs BAL and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:769-779.
237. Twaddell S, Gibson P, Carty K, Woolley K, Henry RL. Assessment of airway inflammation in children with acute asthma using induced sputum. *Eur Respir J* 1996; 9:2104-2108.
238. Gibson P, Simpson H, Hankin R, Powell H, Henry R. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* 2003; 58:116-121.
239. Pizzichini E, Pizzichini M, Dolovich J, Haargreave F. Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and ECP in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:539-544.
240. Zayasu K, Sekizawa K, Okinaga S, Yamahama m, Sasaki H. Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Crit Care Med* 1997; 156:1140-1143.
241. Horvarth I, Donnelly L, Paredi P, Kharitonov S, Barnes P. Elevated levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma : a new marker of chronic inflammation. *Thorax* 1998; 53:668-672.
242. Stirling R, Lim S, Kharitonov S, Chung K, Barnes P. Exhaled breath carbon monoxide is minimally elevated in severe but not mild atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:A922.
243. Uasuf C, Jakatanon A, James A, Kharitonov S, Wilson N, Barnes P. Exhaled carbon monoxide in childhood asthma. *J Pediatr* 1999; 135:569-574.
244. von Pohle W, Anholm J, McMillan J. Carbon dioxide and oxygen partial pressure in expiratory water condensate are equivalent to mixed expired carbon dioxide and oxygen. *Chest* 1992; 101:1601-1604.
245. Noviski N, Cohen L, Springer C, Bar-Yishay E, Avital A, Godfrey S. Bronchial provocation determined by breath sounds compared with lung function. *Arch Dis Child* 1991; 66:952-955.
246. Baldacci S, Omenaas E, Oryszczyn M. Allergy markers in respiratory medicine. *Eur Respir J* 2001; 17:773-790.
247. Cockcroft DW, Marciniuk DD, Hurst TS et al. Methacholine challenge: test-shortening procedures. *Chest* 2001; 120:1857-1860.
248. Troyanov S, Malo J, Cartier A, Gautrin D. Frequency and determinants of exaggerated bronchoconstriction during shortened methacholine challenge tests in epidemiological and clinical set-ups. *Eur Respir J* 2000; 16:9-14.
249. Izbicki G, Bar-Yishay E. Methacholine inhalation challenge: a shorter, cheaper and safe approach. *Eur Respir J* 2001; 17:46-51.
250. Godfrey S, Uwytyed K, Springer C, Avital A. Is clinical wheezing reliable as the endpoint for bronchial challenges in preschool children? *Pediatr Pulmonol* 2004; 37:193-200.

251. Yong S, Smith C, Wach R, Kurian M, Primhak R. Metacholine challenge in preschool children: metacholine induced wheeze vs transcutaneous oximetry. *Eur Respir J* 1999; 14:1175-1178.
252. Gavriely N. Analysis of breath sounds in bronchial provocation tests. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1469-1471.
253. Beck R, Dickson U, Montgomery GL, Mitchell I. Histamine challenge in young children using computerized lung sounds analysis. *Chest* 1992; 102:759-763.
254. Avital A, Picard E, Uwyied K, Springer C. Comparison of adenosine 5'-monophosphate and methacholine for the differentiation of asthma from chronic airway diseases with the use of the auscultative method in very young children. *J Pediatr* 1995; 127:438-440.
255. Sprikkelman A, Grol M, Lourens M, Guerritsen J, Heymans H, van Aald W. Use of tracheal auscultation for the assessment of bronchial responsiveness in asthmatic children. *Thorax* 1996; 51:317-319.
256. Sprikkelman A, Schouten J, Heymans H, van Aald W, Lourens M. Agreement between spirometry and tracheal auscultation in assessing bronchial responsiveness in asthmatic children. *Respir Med* 1999; 93:102-107.
257. Mallozi MC, Sole D, Naspitz CK. Bronchial provocation with metacholine in young children: a simplified method. *Rev Paul Med* 1992; 110:89-90.
258. Le Souef PN, Geelhoed GC, Turner DJ, Landau LI. Response of normal infants to inhaled histamine. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:62-66.
259. Prendiville A, Maxwell D, Rose A, Silverman M. Histamine induced airway obstruction in infancy. Changes in oxygenation. *Pediatr Pulmonol* 1988; 4:164-168.
260. Clarke JR, Silverman M, Reese A. Comparison of the squeeze technique and to oxygen tension for measuring the response to bronchial challenge in normal and wheezy infants. *Pediatr Pulmonol* 1993; 15:244-250.
261. Saga R, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A. Relationship between bronchial hyperresponsiveness and development of asthma in wheezy infants. *Chest* 2001; 119:685-690.
262. Pathophysiology of common respiratory problems in infancy: lung function tests in wheezy children. ERS school; Nice (France): 2004.
263. Anatomical and developmental respiratory physiology in healthy infants. ERS school; Nice (France): 2004.
264. Tepper RS, Steffan M. Airway responsiveness in infants: comparison of inhaled and nasally instilled methacholine. *Pediatr Pulmonol* 1993; 16:54-58.
265. Turner SW, Palmer LJ, Rye PJ et al. The Relationship Between Infant Airway Function, Childhood Airway Responsiveness and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004.
266. Martinez FD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:S76-S82.

267. Ward C, Pais M, Bish R, Reid D, Walters E. Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Thorax* 2002; 57:309-316.
268. Haargreave F, Dolovich J. Bronchial responsiveness to histamine and metacholine in asthma: measurement and clinical significance. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68:347-355.
269. Landau LI. Parental smoking: asthma and wheezing illnesses in infants and children. *Paediatr Respir Rev* 2001; 2:202-206.
270. Halonen M, Stern DA, Lohman C, Wright AL, Brown MA, Martinez FD. Two subphenotypes of childhood asthma that differ in maternal and paternal influences on asthma risk. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:564-570.
271. Guilbert T, Morgan W, Zeiger RS, Bacharier L, Boehmer S, Krawiec M. Atopic characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1282-1287.
272. Murray C, Pipis S, McArdle E, Lowe L, Custovic A, Woodcock A. Lung function at one month of age as risk factor for infant respiratory symptoms in a high risk population. *Thorax* 2002; 57:388-392.
273. Koh YY, Jeong JH, Kim CK et al. Atopic status and level of bronchial responsiveness in parents of children with acute bronchiolitis. *J Asthma* 2000; 37:709-717.
274. Tager I, Hanrahan J. Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:977-983.
275. Tager I, Hanrahan J, Tosteson T et al. Lung function, pre and postnatal smoke exposure and wheezing in the first years of life. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:811-817.
276. Gdalevich M, Minouni D, Mimouni M. Breast feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: A systematic review with meta-analysis of prospective studies. *J Pediatr* 2001; 139:261-266.
277. Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM, Martinez FD. Factors influencing the relation of infant feeding to asthma and recurrent wheeze in childhood. *Thorax* 2001; 56:192-197.
278. Sears MR, Greene JM, Willan AR et al. Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet* 2002; 360:901-907.
279. Artlich A, Hagenah H, Jonas S, Arhens P, Gortner L. Exhaled nitric oxide in childhood asthma. *Eur J Pediatr* 1996; 155:698-701.
280. Balboa DP, Rueda ES, Aleo LE, Rodriguez TG. [Exhaled nitric oxide in healthy and asthmatic children]. *An Esp Pediatr* 2002; 57:12-17.
281. Franklin P, Taplin R, Stick SM. A community study of exhaled nitric oxide in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:69-73.

282. Avital A, Uwyyed K, Berkman N, Bar-Yishay E, Godfrey S, Springer C. Exhaled nitric oxide is age-dependent in asthma. *Pediatr Pulmonol* 2003; 36:433-438.
283. Franklin PJ, Turner SW, Mutch RC, Stick SM. Comparison of single-breath and tidal breathing exhaled nitric oxide levels in infants. *Eur Respir J* 2004; 23:369-372.
284. Brussee J, Smit H, Kerkhof M, Koopman L, Postma D, de Jongste JC. Exhaled nitric oxide in 4 year old children. Relationship with asthma and atopy. *Eur Respir J* 2005; 25:455-461.
285. Franklin PJ, Turner SW, Mutch RC, Stick SM. Measuring exhaled nitric oxide in infants during tidal breathing: methodological issues. *Pediatr Pulmonol* 2004; 37:24-30.
286. Salome CM, Roberts A, Brown N, Dermand J, Marks G, Woolcock A. Exhaled nitric oxide measurements in a population sample of young adults. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:911-919.
287. Purokivi M, Randell J, Hirvonen M, Tukiainen H. Reproducibility of measurements of exhaled nitric oxide and cell count and cytokine concentrations in induced sputum. *Eur Respir J* 2000; 16:242-246.
288. Barreto M, Villa MP, Martella S et al. Off-line exhaled nitric oxide measurements in children. *Pediatr Pulmonol* 2001; 32:159-167.
289. Philipp L, Julia B, Matthias G. ENO in healthy children: variability and lack of correlation with atopy. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13:37-46.
290. Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, Meah S, Barnes PJ. Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J* 2003; 21:433-438.
291. Jobsis Q, Schellekens SL, Kroesbergen A, Hop WC, de Jongste JC. Off-line sampling of exhaled air for nitric oxide measurement in children: methodological aspects. *Eur Respir J* 2001; 17:898-903.
292. Visser MJ, de Wit MC, van Aalderen WM, Postma DS, Brand PL. Exhaled nitric oxide in children measured by tidal breathing method: differences between asthmatics and nonasthmatic controls. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29:434-437.
293. Condorelli P, Shin HW, George SC. Characterizing airway and alveolar nitric oxide exchange during tidal breathing using a three-compartment model. *J Appl Physiol* 2004; 96:1832-1842.
294. Mattes J, Storm van's GK, Moeller C, Moseler M, Brandis M, Kuehr J. Circadian variation of exhaled nitric oxide and urinary eosinophil protein X in asthmatic and healthy children. *Pediatr Res* 2002; 51:190-194.
295. Kisson N, Duckworth LJ, Blake KV, Murphy SP, Taylor CL, Silkoff PE. FE(NO): relationship to exhalation rates and online versus bag collection in healthy adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:539-545.
296. Hall GL, Reinmann B, Wildhaber JH, Frey U. Tidal exhaled nitric oxide in healthy, unsedated newborn infants with prenatal tobacco exposure. *J Appl Physiol* 2002; 92:59-66.

297. Barreto M, Villa MP, Martella S et al. Exhaled nitric oxide in asthmatic and non-asthmatic children: influence of type of allergen sensitization and exposure to tobacco smoke. *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12:247-256.
298. Silvestri M, Sabatini F, Spallarossa D et al. Exhaled nitric oxide levels in non-allergic and allergic. *Thorax* 2001; 56:857-862.
299. van Amsterdam JG, Janssen NA, de Meer G et al. The relationship between exhaled nitric oxide and allergic sensitization in a random sample of school children. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:187-191.
300. Henriksen A, Sue-Chu M, Lingaas T, Langhammer A, Bjermer L. Exhaled and nasal NO levels in allergic rhinitis: relation to sensitization, pollen season and bronchial hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 1999; 13:301-306.
301. Silvestri M, Sabatini F, Sale R et al. Correlations between exhaled nitric oxide levels, blood eosinophilia, and airway obstruction reversibility in childhood asthma are detectable only in atopic individuals. *Pediatr Pulmonol* 2003; 35:358-363.
302. Frey U, Kuehni C, Roiha H et al. Maternal Atopic Disease Modifies Effects of Prenatal Risk Factors on Exhaled Nitric Oxide in Infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2004.
303. de Gouw H, Grunberg K, Schot R, Kroes A, Dick E, Sterk P. Relationship between exhaled nitric oxide and airway hiperresponsiveness following experimental rhinovirus infection in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1998; 11:126-132.
304. Leuppi JD, Downs SH, Downie SR, Marks GB, Salome CM. Exhaled nitric oxide levels in atopic children: relation to specific allergic sensitisation, AHR, and respiratory symptoms. *Thorax* 2002; 57:518-523.
305. Haley K, Drazen J. Inflammation and airway function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1-3.
306. Silvestri M, Spallarossa D, Battistini E, Brusasco V, Rossi GA. Dissociation between exhaled nitric oxide and hyperresponsiveness in children with mild intermittent asthma. *Thorax* 2000; 55:484-488.
307. Piacentini GL, Bodini A, Costella S et al. Exhaled nitric oxide, serum ECP and airway responsiveness in mild asthmatic children. *Eur Respir J* 2000; 15:839-843.