

ANALISIS DE LA PENDIENTE DOSIS-RESPUESTA COMO MEDIDA DE HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL

F.J. Alvarez Gutiérrez, T. Montemayor Rubio, J. A. Rodríguez Portal, F. Valenzuela Mateos, F. Ortega Ruiz y J. Castillo Gómez.

Servicio de Neumología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

RESUMEN

Analizamos si la pendiente de la curva dosisrespuesta (PDR) en el test de provocación con metacolina (TMC) es una medida útil para describir la reactividad bronquial y evaluamos su relación con la dosis acumulada de agonista que provoca una caída del FEV₁, del 20% (PD₂₀ o sensibilidad)

Se estudiaron 172 pacientes (139 con sintomatología bronquial y 33 con rinitis). Se calcula la pendiente por el método de O'Connor, modificado por Burrows: $\log_{10}((\text{FEV}_{1 \text{ inicial}} - \text{FEV}_{1 \text{ final}} / \text{FEV}_{1 \text{ inicial}} \times 100) / \log_{10} \text{ última dosis metacolina en mg/dl} + 10)$, obteniendo un índice de distribución normalizada (iPDR). Se relacionaron los anteriores parámetros con la sintomatología y el estado atópico (mediante IgE total y tests cutáneos).

Encontramos diferencias significativas en los valores medios del iPDR según la presencia o no de los síntomas bronquiales (sibilancias, disnea, tos, $p < 0.0001$), y en los valores de IgE total elevados y bajos ($p < 0.04$), o los tests cutáneos positivos y negativos ($p < 0.05$). No encontramos esta asociación con los valores de PD₂₀* Hallamos correlación lineal significativa entre los valores del iPDR y los de PD₂₀ ($r = -0,53$; $p = 0.001$). Encontramos relación entre sensibilidad (PD₂₀) y reactividad iPDR; los valores del iPDR se relacionan mejor con la sintomatología bronquial y el estado atópico del sujeto, añadiendo información y debiendo ser usado de forma preferente a los valores de PD₂₀ para describir la hiperreactividad bronquial y su gravedad, así como en el análisis epidemiológico de la población en función de los antecedentes respiratorios.

Palabras clave :

- Asma.
- Metacolina.
- Test de provocación bronquial.

SUMMARY

To analyze if the slope of the dose-response curve (PDR) in the bronchoprovocation test with methacholine is an useful measure to asses the bronchial hyperresponsiveness and to evaluate its relationship with the accumulated dose of agonist that provokes a 20 % fall in FEV₁ (PD₂₀ or sensibility).

We studied 172 patients (139 with bronchial symptoms and 33 with rhinitis). We estimated the slope by the method of O'Connor, modified by Burrows: $\log_{10}((\text{initial-FEV}_{1 \text{ final}} - \text{FEV}_{1 \text{ inicial}} / \text{initial-FEV}_{1 \text{ inicial}} \times 100) / \log_{10} \text{ last dose methacholine in mg/dl} + 10)$, obtaining an index with normal distribution (iPDR). We related this index with symptoms and the atopic status (through serum IgE and skin test).

We found significant differences in the medium values of the iPDR depending on the presence or absence of bronchial symptoms (wheezes, dyspnea, cough; $p < 0.0001$), the serum level of IgE (high or low ($p < 0.04$)), or the skin test (positive or negative ($p < 0.05$)). We did not find any relationship with PD₂₀. We found a significant linear correlation between iPDR and the PD₂₀ ($r = -0,53$; $p = 0.001$).

We find a relationship between sensibility PD_{20} and reactivity $iPDR$; the values of $iPDR$ were related with the bronchial symptoms and the atopic status, adding information.

The $iPDR$ should be done preferentially to PD_{20} for assessing bronchial hyperresponsiveness and its severity as well as in epidemiologic analysis of the high-risk population.

Key words:

- Asthma.
- Methacholine.
- Bronchial provocation testing.

INTRODUCCION

Las pruebas de provocación bronquial inespecífica a través de fármacos broncoconstrictores (histamina, metacolina ...) son, desde hace algunos años, utilizadas frecuentemente por los laboratorios de exploración funcional respiratoria para establecer o confirmar el diagnóstico de asma bronquial o, en todo caso, para describir la hiperreactividad de la vía aérea e investigar los posibles mecanismos causantes de ésta^(1,2,3). Los resultados de estas pruebas de provocación se expresan habitualmente mediante la PD_{20} o sea la dosis acumulada de agonista que provoca una caída del FEV_1 del 20%, o bien mediante la PD_{35sGAW} o dosis acumulada de agonista que provoca una caída del 35% en la conductancia específica ($sGAW$)^(3,4). Así, es conocido que para describir la existencia y gravedad de esta reactividad bronquial se utilizan frecuentemente de forma exclusiva los valores de PD_{20} , no teniendo presente la importancia de otros parámetros que pueden ser extraídos de la curva dosis-respuesta (CDR) y que deben ser estudiados, puesto que posiblemente describan de modo más fiable la broncomotricidad de la vía aérea. En esta línea ya hace años Orehek⁽⁵⁾ describía la importancia de analizar no solo la dosis umbral o PD_{20} , que él describía como «sensibilidad», sino también la pendiente de la curva o «reactividad», puesto que este último parámetro, según su estudio, caracterizaba mejor en términos de hiperreactividad bronquial a los asmáticos, no guardando relación alguna, según su experiencia con el primero. Otros trabajos posteriores no encuentran esta neta distinción entre sensibilidad y reactividad^(6,10).

En estudios publicados recientemente, como los realizados por Woolcock et al.,^(11,12) se indica además que los valores de esta pendiente, expresados como un índice de distribución normalizada ($iPDR$), aportan información adicional a los valores de PD_{20} puesto que pueden ser obtenidos en la mayor parte de los sujetos (incluso en los que no es posible cuantificar la PD_{20} por no ser suficiente la caída del FEV_1 tras cualquiera de las dosis durante el test de provocación), pudiendo discriminar además con mayor precisión a los grupos clasificados en función de los antecedentes respiratorios.

En el presente estudio nos propusimos analizar si la pendiente de la curva dosis-respuesta (CDR) en el test de provocación con metacolina es una medida útil para describir la hiperreactividad bronquial (HRB), estableciendo su relación con la sintomatología bronquial estudiada y con el grado de atopia (medido por los niveles de IgE y los tests cutáneos). Estudiamos además su relación con los valores de PD_{20} y su aportación al simple análisis de este último parámetro.

MATERIAL Y METODOS

POBLACION

Analizamos 172 personas sucesivas, (edad media: 26±12, rango 10-65 años), enviadas a nuestro servicio con sospecha de asma bronquial y/o rinoconjuntivitis alérgica por sintomatología altamente sugestiva. Se recogió

(siguiendo un protocolo basado en el cuestionario de enfermedades respiratorias de la American Thoracic Society)⁽¹³⁾ la presencia de historia de disnea, sibilancias y tos, además de sintomatología rinoconjuntival (rinorrea, congestión nasal, lagrimeo, enrojecimiento ocular, etc), antecedentes de eczema y, por último, hábito tabáquico actual o pasado.

Fueron descartadas otras patologías respiratorias asociadas, además de por la clínica, por radiología (se exigía radiografía de torax normal) y pruebas funcionales (espirometrías basales normales, según parámetros teóricos estandarizados por sexo, edad y talla). Por último se descartaron otras patologías generales, siendo eliminados del estudio aquellos pacientes que presentaron otras enfermedades que pudieran influir en los síntomas descritos.

PRUEBAS DE ALERGIA

Se estableció la presencia de atopia mediante la realización de test cutáneos, por el método de prick⁽¹⁴⁾, a los alérgenos comunes en nuestro medio (Abelló, Madrid). Se utilizó un control positivo de hidrocóloruro de histamina, a una concentración de 10 mg/cc y control negativo de suero salino. Los extractos utilizados fueron del tipo glicerinado al 50% y conservados en fenol, estandarizados en Unidades Biológicas (BU) Brighton. Tras la punción y depósito del extracto se efectuó la lectura del test transcurridos 20 minutos desde su aplicación, siendo medido el habón y no el eritema para evaluar la respuesta. Se consideró como positivos sólo los habones > 9 mm² de área y negativos los iguales o inferiores a dicha cifra.

Asimismo se determinaron los valores de IgE total por el método ELISA, siendo considerados independientemente de la edad, valores "altos" los mayores a 150 UI/ml y "bajos" los inferiores, siendo descartados para nuestro estudio los valores de 100 a 150 IU/ml.

TEST DE FUNCION PULMONAR

Realizamos el test de espirometría forzada mediante espirómetro de campana de 9 litros (Espirograph), aplicando los criterios de aceptabilidad de la ATS⁽¹⁵⁾ y SEPAR.

TEST DE PROVOCACION CON METACOLINA

Se realizó mediante nebulizador Devilbiss 35 B, con un diámetro de partículas de 2-3 micras, siendo administradas inicialmente cinco inhalaciones de suero salino tamponado (con fenol al 0,04% de conservante), como diluyente. La espirometría se llevó a cabo en el plazo de 2 minutos tras suministrarel aerosol. Posteriormente fueron administrados, según la técnica de Rosenthal⁽¹⁶⁾, 5 inhalaciones (desde FRC hasta TLC), de concentraciones crecientes (0.025, 0.25, 2.5, 10 y 25 mg/ce) de metacolina, con las que se obtienen Unidades Inhalatorias (JU) acumuladas de metacolina (0.125, 1.375, 13.88 y 188.88 UI acumulativas), siendo realizada la espirometría a los 2 minutos tras cada dosis. Se consideró test de metacolina positivo si tras cualquiera de las 5 dosis crecientes se producía una caída del 20% o más del FEV₁ con respecto al obtenido tras la inhalación del diluyente, que se tomó como el 100%. Así fue determinado el valor de PD₂₀, o sea la dosis acumulada de metacolina expresadas en U.I. que producía este descenso, calculado por interpolación lineal entre los dos puntos adyacentes.

CALCULO DEL INDICE Y ANALISIS ESTADISTICO

Se analizaron por separado en relación con la sintomatología, los valores de IgE total y tests cutáneos, por un lado los valores de PD₂₀ y por otro el iPDR. Este índice se calculó según el método de O'Connor⁽¹⁷⁾, modificado por

Burrows⁽¹⁸⁾, que consiste en evaluar la pendiente lineal de la curva; o sea % caída FEV₁ dividido por log última dosis de metacolina administrada, expresada en mg/dl. El resto de operaciones son modificaciones matemáticas para crear una distribución normal que facilite los análisis estadísticos. Así se aplicó la fórmula: $\log \left(\frac{FEV_1 \text{ inicial (tras diluyente)} - FEV_1 \text{ final (tras última dosis de metacolina)}}{FEV_1 \text{ inicial} \times 100} \right) / \log \text{ última dosis de metacolina en mg/dl} + 10$.

Los análisis estadísticos se realizaron por el programa informático EPI-INFO, con aplicación del test de ANOVA en los casos en que fue posible, y medidas no paramétricas en el resto. La correlación entre la PD₂₀ y el índice se realizó con el coeficiente de Pearson. Se consideró significativo a partir de p<0.05.

RESULTADOS

En el grupo de pacientes analizados, obtuvimos globalmente 139 personas con algún síntoma bronquial, que presentaban test de metacolina positiva en un 58% (80 sujetos) y negativa en un 42% (59 sujetos) y otro grupo compuesto por 33 personas con síntomas de rinoconjuntivitis pura, sin ningún síntoma bronquial asociado, con metacolina positiva en un 18 % (6 sujetos) y negativa en un 82% (27 sujetos). El número de pacientes con test de metacolina positivo y negativo fue similar en el total de nuestra población con 86 positivos y 86 negativos. La edad media, talla, función pulmonar y porcentaje de fumadores en los distintos grupos analizados quedan reflejados en la Tabla 1.

TABLA 1

CARACTERISTICAS DE LA POBLACION: SINTOMAS BRONQUIALES, RINITIS Y POSITIVIDAD O NO DELTEST DE METACOLINA

	Total	Sínt. bronq.	Rinitis	Metac.+	Metac.-
Nº	172	139	33	86	86
Edad	26±12	26±12	26±12	25±11	27±12
Talla	166±9	166±9	167±8	165±9	166±9
FVC*	103,6±14	102,9±13	106,5±17	102,3±12	104,8±16
FEV1*	100,9±13	100,1±13	104,1±15	98,2±13	103,3±13
Fum.(%)	21,1	20,9	22,2	23,9	18,4

* = % respecto a teóricos según edad, sexo y talla (C.E.C.A.).

TABLA 2

VALORES MEDIOS DEL INDICE DE LA PENDIENTE (RANGO 0,97-2,00), SEGUN SINTOMATOLOGIA, HABITO TABAQUICO Y POSITIVIDAD O NO DEL TEST DE METACOLINA

	Si	No	p*
Algún síntoma bronquial	1,210±0,178	1,10±0,090**	<0,0001
Tos	1,214±0,179	1,099±0,089	<0,0001
Disnea	1,222±0,182	1,100±0,088	<0,0001
Sibilancias	1,219±0,178	1,113±0,121	<0,0001
Eczema	1,164±0,124	1,155±0,120	ns
Tabaco	1,257±0,0196	1,299±0,134	ns
Metacolina	1,306±0,172	1,075±0,048	<0,0001
	(positiva)	(negativa)	

* = Test no paramétrico (U Mann-Whitney).

** = Grupo de riniticos puros (sin ninguna sintomatología bronquial).

En cuanto a los valores del iPDR, calculado según el método descrito anteriormente, (Tabla 2) el rango iba de 0,97 a 2,00, con media global de 1, 1 9±0,17. Se demuestran diferencias significativas (p<0.0001), entre los que presentaban globalmente alguna sintomatología bronquial y ninguna (o sea el grupo de riniticos puros). Como era obvio igualmente, existían diferencias significativas (p<0.0001) entre los que tenían metacolina positiva y negativa. Al analizar las diferentes medias del iPDR según la presencia o no de los distintos síntomas evaluados, se aprecia asociación estadística por separado con la presencia de sibilancias, disnea y tos (p<0.0001 en los tres síntomas), mientras no se demostró asociación con antecedentes de eczema (p<0.732) o el hábito tabáquico (p<0.225).

Por otro lado, (Tabla 3) la media global de PD₂₀ fue de 67,31±65,22 U.I. acumuladas, con medias según grupo con síntomas bronquiales o rinoconjuntivitis pura como se indica, no existiendo diferencias significativas entre el grupo de pacientes con síntomas bronquiales y el grupo de rinitis pura. Asimismo, como hicimos anteriormente para el iPDR, analizando las diferentes medias de PD₂₀ según la presencia o no de los distintos síntomas evaluados, no se

aprecia asociación estadística significativa con la presencia de sibilancias, disnea, tos ni como en el caso del iPDR con el hábito tabáquico o el antecedente de eczema.

TABLA 3

VALORES MEDIOS DE PD₂₀*, SEGUN SINTOMATOLOGIA Y HABITO TABAQUICO

	Si	No	p**
Algún sintoma bronquial	66,08±73,92	83,08±73,42	ns
Tos	66,41±67,20	83,08±73,42	ns
Disnea	66,14±67,32	81,36±70,51	ns
Sibilancias	68,25±67,21	62,42±72,89	ns
Eczema	59,05±53,20	93,49±83,22	ns
Tabaco	85,22±78,73	63,21±64,44	ns

* = PD₂₀ expresadas en UI acumuladas.
 ** = Test no paramétrico (U Mann-Whitney).
 En el grupo de algún sintoma bronquial «No», se recogen riniticos puros (sin ninguna sintomatología bronquial).

Al estudiar la asociación del iPDR y la PD₂₀ con el estado atópico del individuo (establecido por la determinación de la IgE total y los tests cutáneos, (Fig 1 y 2), obtuvimos que en el caso del iPDR existía asociación significativa tanto con los tests cutáneos positivos (p<0.05), como con los valores de IgE total altos (mayores de 150 U.I./ml, con p<0.04), mientras que para la PD₂₀ no era significativa.

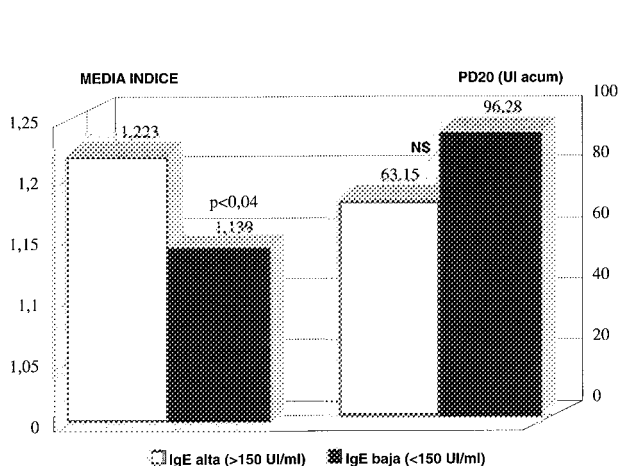


Fig. 1. Valores medios del índice de la pendiente y de PD₂₀ en U.I. acumuladas, según valores de IgE total —elevados— (>150 U.I./ml.) o —bajos— (<150 U.I./ml.). *Diferencias significativas (test ANOVA).

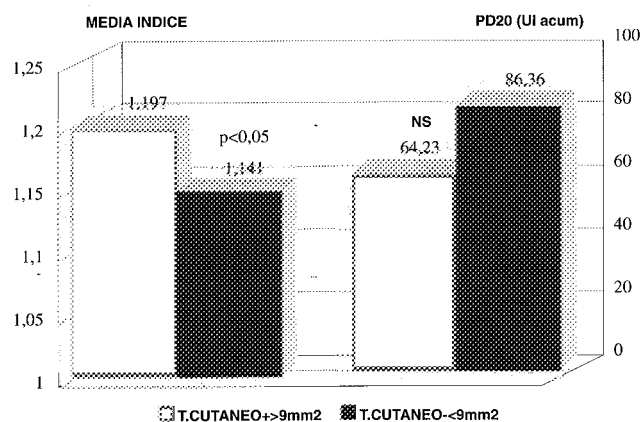


Fig. 2. Valores medios del índice de la pendiente y de PD₂₀ en U.I. acumuladas, según tests cutáneos positivos (>9mm² de área), o negativos (<9mm²). *Diferencias significativas (test ANOVA).

Por último encontramos correlación lineal significativa (coeficiente correlación de Pearson -0.533, p<0.001) entre los valores del iPDR y de PD₂₀.

DISCUSIÓN

La hiperreactividad bronquial definida como la capacidad de las vías aéreas para reaccionar de forma exagerada ante estímulos provocadores diversos (específicos o inespecíficos), que se manifiesta como obstrucción al flujo aéreo, es una característica funcional básica del paciente asmático, aunque no exclusiva del mismo (puede

presentarse tanto en personas asintomáticas, como en otras patologías). Esta HRB puede ser cuantificada midiendo el efecto de la inhalación de fármacos broncoconstrictores (histamina, metacolina, entre otros). Las modificaciones en la magnitud de la HRB pueden indicar, de forma indirecta, los cambios inflamatorios (que acontecen en la vía aérea, como se ha demostrado por la correlación altamente significativa entre la respuesta a la metacolina y el número de células inflamatorias (eosinófilos, linfocitos, mastocitos, etc.), cuantificadas en lavado broncoalveolar (BAL)^(19,20,21,22), así como de los mediadores liberados por ellas⁽²⁰⁾. Sin embargo, la cuantificación de la HRB no es el indicador más específico de la inflamación bronquial de los pacientes asmáticos, puesto que puede ser normal en los mismos, o bien anormal en sujetos sin inflamación (v.g. fumadores).

Así, mientras en algunos estudios transversales se han demostrado correlaciones entre la HRB, la obstrucción variable del flujo aéreo medidos por índices seriados de pico flujo espiratorio y los síntomas clínicos, en otros estudios longitudinales más recientes la correlación entre el asma clínico y los cambios en la reactividad de la vía aérea no está clara, por lo que se puede afirmar que el grado de HRB no expresa necesariamente la gravedad del asma⁽²³⁾. Esto quizás sea debido a que los parámetros utilizados hasta ahora (PD₂₀ o dosis umbral), no evalúen de forma exacta el grado de esta HRB.

Así pues, podemos constatar varios problemas a la hora de interpretar los tests de broncoprovocación: por un lado que aunque la HRB es característica constante del asma, otras patologías que también pueden presentarla (EPOC, sarcoidosis, bronquiectasias, inhalación de gases tóxicos, infecciones víricas, tabaquismo, etc.) y que aunque en general, con las salvedades descritas, pueda existir una correlación buena entre el grado de hiperreactividad bronquial y la severidad clínica del asma, en los casos en que la hiperreactividad es ligera, existe un solapamiento entre individuos asmáticos y normales que dificulta su discriminación.

Las curvas dosis-respuesta de los pacientes con asma pueden diferir de los normales por su posición (dosis umbral o «sensibilidad»), pendiente o «reactividad» y respuesta máxima «meseta o plateau».

En diversos trabajos se ha afirmado^(24,25) que la PD₂₀ identifica la posición de las CDR, pero en otros recientes^(26,27), se indica la ausencia de esta conexión, por la inexistencia a su vez de relación entre este parámetro y la EC50 (concentración de metacolina que produce el 50% de la respuesta máxima), siendo posiblemente este último el verdadero parámetro que identifica la posición real en las curvas completas⁽²⁶⁾. Asimismo, parece que no puede mantenerse en la actualidad que HRB y PD₂₀ sean términos sinónimos^(24,27,28), ni que la PD₂₀ pueda ser utilizada para valorar la gravedad del asma^(27,29), como marcador de hiperrespuesta bronquial en las investigaciones epidemiológicas¹⁰, o para identificar el riesgo de evolución a asma en pacientes con rinitis alérgica^(31,32).

Por otro lado, la presencia de meseta se aceptó como aspecto característico de las CDR en no asmático^(10,28,33-36), sin embargo en diversos estudios parece que también esta morfología puede aparecer en pacientes asmáticos^(10,28,33-36) por lo que su capacidad discriminatoria queda reducida.

El estudio de la relación entre sensibilidad PD₂₀ y reactividad PDR ha arrojado resultados contradictorios en los diversos trabajos realizados, desde los iniciales de Orehek⁽⁵⁾, que no encuentra relación entre la PDR a carbacol y la PD₂₀ hasta otros estudios posteriores que sí indican esta relación, tanto en individuos asmáticos^(6,7,9), como con rinitis alérgica⁽⁶⁾ o sanos⁽⁹⁾.

En nuestro grupo, compuesto por pacientes con sintomatología bronquial y otros con síntomas exclusivamente rinoconjuntivales, encontramos buena correlación entre ambos parámetros (cuantificación del iPDR a metacolina y valores de PD₂₀). Así pues, nuestros hallazgos parecen confirmar que sí hay un nexo entre sensibilidad y reactividad. Sin embargo hay que tener presente que ésto no establece necesariamente una relación causal entre estos dos parámetros, sino que sólo indica la existencia de una correlación cuantitativa entre ambas variables, sin poderse demostrar el carácter de esta asociación.

Por otro lado nosotros descubrimos, en consonancia con algunos de los hallazgos de Woolcok et al.^(11,12), una asociación significativa independiente entre los valores del iPDR y los síntomas propios del asma, así como con el estado atópico del sujeto (valorado por los niveles de IgE total y la positividad de los tests cutáneos). Esta asociación no la encontramos con los valores de PD₂₀ lo que es contradictorio con los resultados de otros trabajos^(39,40,41) que indican que la sensibilidad bronquial puede reflejar con exactitud la situación clínica del paciente a diferencia de la reactividad bronquial que cursa de forma más variable. En el trabajo de Woolcok se indica, por otro lado, asociación significativa con el hábito tabáquico y no con la limitación crónica del flujo aéreo. En nuestro estudio no encontramos asociación con el hábito tabáquico, quizás debido a que la proporción de fumadores es pequeña, probablemente por la edad inferior de nuestra población.

Así pues, en conclusión, nuestros datos parecen apoyar, como los trabajos de Woolcok et al, que los valores de la pendiente deberían ser usados preferentemente a los valores de PD₂₀ para describir la gravedad de la reactividad bronquial en las poblaciones y que, en todo caso, pueden aportar información adicional a los valores de PD₂₀ en la descripción de la HRB, así como que son útiles en el análisis epidemiológico de las poblaciones en función de los antecedentes respiratorios. Estamos de acuerdo, como se apunta en recientes publicaciones^{24,27,28}, que la PD₂₀ aporta una información escasa y limitada de la hiperrespuesta bronquial.

Todo lo anterior indica la importancia de analizar en las CDR, no sólo los valores de PD₂₀ o dosis umbral, sino también los otros parámetros, y sobre todo la PDR o reactividad, puesto que pueden aportar más información para el diagnóstico diferencial de la HRB inespecífica y de la gravedad clínica de la misma.

BIBLIOGRAFIA

1. Orehek J, Gayrard P. Les tests de provocation bronchique non-spécifiques dans l'asthme. Bull Europ Physiopath Resp 1981; 12:565-598.
2. Cropp GJA, Berstein IL, Boushey HA et al. Guidelines for bronchial inhalation challenges with pharmacologic and antigenic agents. ATS News, Spring 1980; 6:11-19.
3. Eiser NM, Kerrebijn KF, Quanjer PH. Guidelines for standardization of bronchial challenges with (nonspecific) bronchoconstricting agents. Bull Europ Physiopath Resp 1983; 19: 495-514.
4. Rosenthal RR. The emerging role of bronchoprovocation. J. Allergy Clin Immunol 1979; 64: 584-588.
5. Orehek J, Gayrard P, Smith AP, Grimaud C, Charpin J. Airway response to carbachol in normal and asthmatic subjects: distinction between bronchial sensitivity and reactivity. Am Rev Respir Dis 1977; 115: 937-943.
6. Crockroft DW, Berschied BA. Slope of the dose-response curve: usefulness in assessing bronchial responses to inhaled histamine. Thorax 1983; 38: 55-61.
7. Perpífid Tordera M, Pellicer Ciscar C, Marco Martínez V. Sensibilidad y Reactividad bronquial en los sujetos asmáticos: su interrelación y significado. Arch Bronconeumol. 1986; 22: 223-226.
8. Chung KF, Morgan B, Keyes SJ, Snashall PD. Histamine Dose Response relationships in normal and asthmatic subjects. The importance of starting airway caliber. Am Rev Respir Dis 1982; 126: 849-854.
9. Malo JL, Cartier A, Pineau L, Gagnon G, Martin RR. Slope of the dose-response curve to inhaled histamine and methacholine and PC₂₀ in subjects with symptoms of airway hyperexcitability and in normal subjects. Am Rev Respir Dis 1985; 132:644-647.
10. Prieto L, Bertó JM, López San Martín M, Peris A. Hiperrespuesta bronquial inespecífica. Análisis de la relación entre sensibilidad, reactividad y respuesta máxima. Arch Bronconeumol 1993; 29: 57-63.
11. Peat JK, Salome CH M, Berry G, and Woolcock AJ. Relation of Dose-Response slope to respiratory symptoms in a population of Australian school children. Am Rev Respir Dis 1991; 144: 663-667.

12. Peat JK, Salome CH M, Berry G, and Woolcock AJ. Relation of Dose-Response slope to respiratory symptoms and lung function in a population study of adults living in Busselton, Western Australia. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 860-8-65.
13. Ferris BG. Epidemiology standardization project: adult questionnaire. *Am Rev Respir Dis* 1978; 11 8(suppl): 10-27.
14. Dreborg S. Skin Tests used in type I allergy testing. Munksgaard Copenhagen, 1989. *Allergy Suplemento* 10, volumen 44.
15. American Thoracic Society. Standardization of spirometry. 1987 Update. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 1285-1289.
16. Rosenthal R. Metodología aceptada en la prueba de provocación con metacohna. *Allergy proceeding* 1990; vol 4, num 2:12-32.
17. O'Connor G, Sparrow D, Taylor D, Segal M, Weiss S. Analysis of Dose-Response curves to Methacholine. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 1412-1417.
18. Burrows B, Sears MR, Flannery EM, Herbison GP, Holdaway MD. Relationships of bronchial responsiveness assessed by methacholine to serum IGE, lung function, symptoms, and diagnoses in 11-year-old New Zealand children. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 376-385.
19. Kirby JG, Hargreave FE, Gleich GJ, O'Byrne PM. Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 379-83.
20. Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 62-69.
21. Kelly C, Ward C, Stenton CS, Bird G, Hendrick DJ, Walters EH. Number and activity of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid in asthma and their relation to airway responsiveness. *Thorax* 1988; 43: 684-92.
22. Casale TB, Wood D, Richardson HB, Trapp S, Metzker WJ, Zavala D, Hunninghake GW. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with methacholine bronchial hyperresponsiveness. *J Clin Invest* 1987; 79: 1197-1203.
23. Kerrebijn KF, Howell JBL, Jongejan RC, Postma DS, Sears MR, Woolcock AJ. El papel de los procesos inflamatorios en la hiperreactividad de las vías aéreas. Holgate ST ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1991 (edic. española); pag 6.
24. Sterk PJ, Bel EH. Bronchial Hyperresponsiveness: the need for a distinction between hypersensitivity and excessive airway narrowing. *Eur Respir J* 1989; 2: 267-274.
25. Boonsawat W, Salome ChM, Woolcock AJ. Effect of allergen inhalation on the maximal response plateau of the dose response curve to methacholine. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 565-569.
26. Eiser NM. Bronchial provocation tests. Ed Nadel JA, Pauwels R, Snashall PD, Eds. *Bronchial hyperresponsiveness*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1987; 173-254.
27. Prieto L, Bertó JM, Peris A, Hernández MI. Características de la respuesta de las vías aéreas a la inhalación de concentraciones altas de metacolina en pacientes con rinitis y PC20 en rango asmático. *Arch Bronconeumol* 1993; 29: 212-219.
28. Moreno RH, Hogg JC, Pare PD. Mechanics of airway narrowing. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 1.1711.180.
29. Hargreave FE, Dolovich J. Nonspecific bronchial responsiveness. *Chest* 1982; 82(supl): 22-23.
30. Brand PLP, Postma DS, Kerstjens HAM, Ko'ter GH, and the Dutch CNSLD Study Group. Relationship of airway hyperresponsiveness to respiratory symptoms and diurnal peak flow variation in patients with obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 916-921.

31. Braman SS, Barrows AA, De Cotiis BA, Settipane GA, Corrao WM. Airway hiperresponsiveness in allergic rhinitis; a risk factor for asthma. *Chest* 1987; 91: 671-674.
32. Guiazdowski R. Perennial atopic rhinitis as an early stage of bronchial asthma. *Acta Otolaryngol* 1979; 88: 257-267.
33. Townley RG, Ryo UY, Kolotkin BM, Kang B. Bronchial sensitivity to metbacholine in current and former asthmatic and allergic rhinitis patients and controls subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56: 429-442.
34. Woolcock AJ, Salome CM, Yan K. The shape of the doseresponse curve to histamine in asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 71-75.
35. Prieto L, Marín J. Measurement of response to methacholine inhalation challenge in asthma and allergic rhinitis. PC20 or PC35 FEV1?. *Allergol Immunopathol* 1990; 18: 285-289.
36. Sterk PJ, Daniel EE, Zamel N, Hargreave FE. Limited bronchoconstriction to methacholine using partial flowvolume curves in nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 272-277.
37. Hopp RJ, Weiss SJ, Nair NH, Bewtra AK, Townley RG. Interpretation of the results of methacholine inhalation challenge test. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 821-830.
38. Townley RG, Hopp RJ. Measurement and interpretation of nonspecific bronchial reactivity. *Chest* 1989; 94: 452-453.
39. Cockcroft DW, Kilfian DN, Mellon JJA, Hargreave FE. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Allergy* 1977; 7: 235-243.
40. Hargreave FE, Ryan G, Thomson NC et al. Bronchial responsiveness to histamine or metacholine in asthma: measurement and clinical significance. *J Allergy Chn Immunol* 1981; 68: 347-353.
41. Beaupre A, Malo JL. Histamine dose-response curves in asthma: relevance of the distinction between PC20 and reactivity in characterising clinical state. *Thorax* 1981; 36: 731-736.