

CURVAS DOSIS-RESPUESTA A LA METACOLINA EN ASMATICOS Y SANOS: UTILIDAD DE LA DETERMINACION DEL PUNTO CRITICO DE SEPARACION ENTRE AMBAS

C. Pellicer Císcar, M. Perpiñá Tordera y V. Marco Martínez

Servicio de Neumología. Hospital la Fe. Valencia.

Hemos realizado un estudio comparativo de la curva dosis respuesta (CDR) a metacolina en 22 asmáticos y 15 sujetos normales, analizando cada punto de la curva y utilizando un análisis de la varianza, un test de la t y la determinación de la «least significant difference» (LSD). Nuestros resultados demuestran que el nivel crítico de separación de ambas curvas se sitúa a partir de la dosis 7,5 unidades inhalatorias de metacolina con un nivel de significación de $p < 0,01$ para los distintos métodos de análisis empleados. En nuestra opinión, esta forma de analizar la CDR permite la comparación de diferentes curvas a distintos niveles con la menor manipulación de los datos y abreviar, con la determinación de la LSD, el método de detección de hiperreactividad bronquial.

Arch Bronconeumol 1989, 25:56-60

Dose-response curves to methacholine in asthmatic patients and in healthy individuals: usefulness of the determination of the critical separation point between both

We have carried out a comparative study of the dose-response curve (DRC) to methacholine in 22 asthmatic patients and 15 healthy individuals, evaluating each point in the curve and using an analysis of variance, a t test and the measurement of the least significant difference (LSD). Our results show that the critical level of separation between both curves is located after the dose of 7,5 inhalatory units of methacholine, with a significant level of $p < 0,01$ for the different analysis methods. In our opinion, this type of evaluation of the DRC permits the comparison of different curves at different levels with the least data manipulation, and to shorten, by means of the LSD determination, the method of detection of bronchial hyperreactivity.

Introducción

La incorporación de las pruebas de provocación bronquial inespecíficas a los laboratorios de fisiología respiratoria ha contribuido eficazmente a facilitar la detección de hiperreactividad bronquial¹⁻⁴. Sin embargo, existe aún cierta controversia sobre cuál es la forma de presentación y tratamiento de los datos obtenidos que mejor refleje nuestra realidad biológica y facilite posteriormente la comparación entre curvas de un mismo individuo, grupos de población o diferentes laboratorios³⁻⁵. La mayor parte de los métodos de análisis de la relación dosis-respuesta hasta ahora utilizados: determinación de la dosis umbral⁶, reactividad⁷, estudio de la morfología y posición de la curva dosis-respuesta (CDR)^{8,9} entre otros, entrañan cierto grado de manipulación de los datos y por otro lado, su capacidad para discriminar el comportamiento entre asmáticos, riniticos o individuos sanos, no está aún bien establecida.

Diversos grupos de trabajo^{3,10} han recomendado el estudio de cada uno de los puntos obtenidos en la prueba de provocación bronquial pretendiendo de esta forma, no sólo obviar la manipulación que toda interpolación, ajuste o tratamiento matemático entraña, sino también comparar los distintos puntos obtenidos a cualquier nivel de la CDR.

Con este objetivo, diseñamos la construcción de CDR a metacolina en un grupo de sujetos asmáticos y sanos y comparamos los puntos obtenidos con cada dosis de agente broncoconstrictor administrado, utilizando diversos análisis estadísticos que nos permitieran posteriormente identificar el nivel crítico de separación entre ambas curvas.

Material y métodos

Sujetos:

El estudio se realizó en 22 sujetos que cumplieran criterios de asma bronquial¹¹. Doce eran mujeres y 10 hombres, con una edad media de 28 años (rango 12-46). En doce de ellos se consideró que su asma era extrínseca a juzgar por su historia clínica sugestiva de atopia, la valoración de las pruebas cutáneas y la determinación de los niveles de IgE en el suero, mientras que a los otros 10 restantes se

Recibido el 27-5-1988 y aceptado el 9-11-1988.



les consideró portadores de un asma intrínseca. En todos ellos la situación clínica era estable, su volumen espirado forzado en el primer segundo (FEV_1) era superior al 80 % del valor teórico de referencia¹² y para el control clínico de su sintomatología sólo requerían transitoriamente la utilización de agentes agonistas adrenérgicos beta-2 y/o metilxantinas de efecto retardado, de forma que la medicación pudo ser suprimida durante el intervalo de tiempo recomendado antes de la realización de la prueba de provocación bronquial^{2,3}. El grupo de individuos sanos estudiado estaba compuesto por 7 mujeres y 8 hombres no fumadores, de edades comprendidas entre 18 y 36 años ($\bar{x} = 27,4$) cuyas características antropométricas eran similares a las del grupo de asmáticos. Ningún sujeto había presentado historia de infecciones respiratorias en las seis semanas previas a la realización de la prueba y en el grupo de asmáticos extrínsecos no se recogían antecedentes recientes de exposición a sus alérgenos específicos. Todos los individuos estudiados estaban familiarizados con la mecánica de las pruebas de provocación bronquial, dando su consentimiento a la realización de las mismas.

Procedimiento experimental:

Las exploraciones se realizaron por la mañana en nuestro laboratorio por personal técnico entrenado y estando el sujeto en ayunas. Antes de iniciar las pruebas de provocación bronquial se les realizó a cada individuo una exploración funcional respiratoria basal que consistió en la obtención de un espirograma forzado y curvas de flujo-volumen. En el grupo de sujetos asmáticos se determinaron además los volúmenes pulmonares y se calculó la resistencia de las vías aéreas y la conductancia específica.

La prueba de provocación bronquial se realizó siguiendo las recomendaciones de la American Thoracic Society². Se utilizó un nebulizador Hudson modelo 1720 (Temecula, CA) y un compresor EEL 230 (Evans, Electroelenium, Essex) a un flujo de 9-10 L/m con lo cual el 75 % de las partículas que se generan tienen un tamaño entre 0,5 y 3 micras. Como agente broncoconstrictor utilizamos metacolina (Sigma, St. Louis, MD) que se preparó en concentraciones crecientes de 0,5; 1; 10 y 20 mg/ml. De cada preparación se realizaron cinco inhalaciones lentas desde capacidad residual funcional hasta capacidad pulmonar total, incrementándose las concentraciones de forma gradual y manteniendo la misma secuencia en el número de unidades inhalatorias acumulativas de metacolina (UIM) administradas (1 UIM = 1 inhalación de una solución que contiene 1 mg/ml de metacolina). Transcurridos entre 2 y 3 minutos después de la inhalación de cada dosis de metacolina se obtuvieron al menos 3 espirogramas forzados en un espirómetro seco OHIO 840 (Aircro, Wis). Se eligió el FEV_1 como parámetro para valorar la respuesta broncomotora, seleccionándose el del valor más alto toda vez que la determinación de la capacidad vital forzada en dichos registros no presentaba variaciones superiores al 5 %. La exploración finalizó en el grupo de los sujetos normales tras haber sido administrativas 482 UIM y en el grupo de asmáticos tras haber obtenido al menos 6 puntos que la CDR o bien haber inducido una broncoconstricción que resultara en claro, disconfort del paciente. Posteriormente, a todos los sujetos se les administró 1,2 mg de fenoterol en aerosol para revertir los efectos broncoconstrictores. Los puntos así obtenidos se situaron en un eje de coordenadas en escala semilogarítmica. En el eje de abscisas se recogió el logaritmo de las dosis acumulativas de metacolina y en el eje de ordenadas los descensos porcentuales del FEV_1 calculados a partir del valor de este parámetro obtenido tras la inhalación de suero fisiológico y según la ecuación:

$$\% \text{ descenso } FEV_1 = \frac{FEV_1 \text{ postsalino} - FEV_1 \text{ postmetacolina}}{FEV_1 \text{ postmetacolina}} \times 100$$

Posteriormente se trazó la correspondiente CDR.

Tratamiento estadístico:

La comparación de curvas entre asmáticos y sanos se llevó a cabo mediante un análisis individualizado de los puntos obtenidos con cada dosis de agente contracturante administrado, utilizando para ello diversas pruebas estadísticas: a) un análisis de la varianza; b) un test de la t de Student para muestras no apareadas y c) el cálculo de la «least significant difference» (LSD) en conexión con la prueba de la t y según la fórmula $LSD = t(x) \sqrt{\frac{1}{n} EMS}$. Esta fórmula expresa que el valor de LSD depende del nivel de probabilidad fijado en la prueba de la t multiplicado por la $\sqrt{\frac{1}{n} EMS}$, donde n es el tamaño de

la muestra y EMS es el error cuadrático medio o varianza dentro de los grupos¹³. Esta prueba establece un valor único que fija, para un determinado nivel de significación, la mínima separación que debe mostrar una pareja de medias para considerar que representan a dos poblaciones diferentes y por tanto identifica el punto crítico a partir del cual se separa la CDR de los sujetos asmáticos de la del grupo de individuos normales.

Resultados

La tabla I recoge las características antropométricas y la exploración funcional respiratoria basal de los sujetos estudiados. Los descensos del FEV_1 inducidos con la prueba de provocación bronquial se recogen en la tabla II. En la tabla III se muestran los resultados obtenidos al comparar cada punto de la CDR del grupo de asmáticos con el correspondiente punto de la CDR del grupo control. Todos los datos se expresan como valores medios \pm el error típico de la media (SE). Como puede observarse, con la administración de 2,5 UIM, ninguno de los tres métodos estadísticos utilizados detectó diferencias significativas para ambos grupos. Para esa dosis, los valores F y t fueron no significativos y el valor de la LSD (2,22) fue superior a la diferencia entre el descenso del FEV_1 de los asmáticos y de los sanos, no permitiéndonos por este motivo establecer diferencias entre las dos curvas a ese nivel. Sin embargo, con la dosis de

TABLA I
Características antropométricas y funcionales basales de los sujetos estudiados

	Asmáticos	Sanos
Sexo: V	12	7
M	10	8
Edad media (años)	28,3	27,4
(rango)	(12-46)	(18-36)
Peso (kg)	61,7	66,6
Talla (cm)	163,2	170,2
FEV_1	98* (2,07 SE)	102,6* (2,7 SE)
FVC	96* (3,1 SE)	101* (3,5 SE)
SGaw ($\text{seg}^{-1} \text{cmH}_2\text{O}^{-1}$)	0,25 (0,12 SE)	0,31 (0,09 SE)

FEV_1 : volumen espirado forzado en el primer segundo. FVC: capacidad vital forzada. SGaw: conductancia específica. V: varones. M: mujeres. SE: error típico de la media. * Valores expresados en % del teórico de referencia^{12,14,15}.

TABLA II
Descensos del FEV_1 obtenidos con la prueba de provocación bronquial

Descensos del FEV_1 *		
UIM	Asmáticos	Sanos
2,5	1,9 (0,6 SE)	0,6 (0,3 SE)
7,5	4,6 (0,9 SE)	1 (0,4 SE)
32,5	12,6 (2 SE)	1,5 (0,5 SE)
57,5	22,3 (3 SE)	1,8 (0,5 SE)
82,5	26,1 (1,1 SE)	2,6 (0,5 SE)
132,5	29,3 (1,7 SE)	3,4 (0,5 SE)
182,5	28,2 (2,4 SE)	4,6 (0,5 SE)
282,5	26 (2,2 SE)	5,5 (0,8 SE)
382,5		5,8 (0,8 SE)
482,5		6,7 (0,7 SE)

UIM: unidades inhalatorias de metacolina. SE: error típico de la media. * Valores expresados en % del teórico de referencia¹².

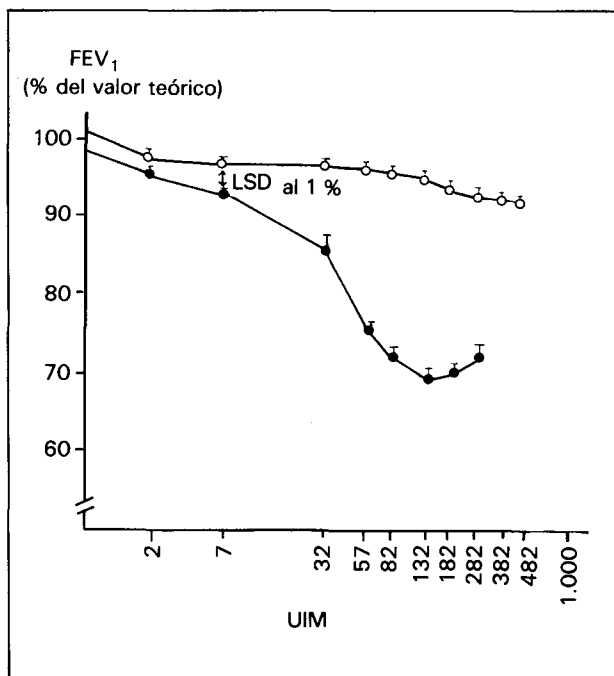


Fig. 1. Curva dosis-respuesta a metacolina en 22 sujetos asmáticos (●) y 15 controles sanos (○). UIM: unidades inhalatorias de metacolina. LSD: least significant difference.

7,5 UIM, tanto el valor F como el de la t, indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el comportamiento de los asmáticos y el grupo control; asimismo, el valor de la LSD (3,64) fue inferior a la diferencia entre nuestros valores medios de descenso del FEV₁ de ambos grupos (3,68), marcando por tanto el nivel crítico donde se inicia la separación de la CDR de los asmáticos y el grupo control (fig. 1). A partir de este punto, el comportamiento de ambas curvas analizado con cualquiera de los métodos estadísticos descritos, demostró claras diferencias entre ambos grupos con niveles de significación superiores al 1 %.

Discusión

De entre las principales críticas que se han hecho a los métodos habitualmente utilizados para analizar las respuestas obtenidas en las pruebas de provocación bronquial, cabría resaltar algunas fundamentales. En primer lugar, muchos autores señalan que la determinación de un solo punto de la curva dosis-respuesta, a saber la dosis umbral, como índice discriminativo para separar el comportamiento de los sujetos asmáticos y sanos, presenta un amplio intervalo de variabilidad, lo que condiciona la existencia de amplias zonas de solapamiento entre individuos riniticos, normales o asmáticos¹⁶⁻¹⁸. Por otro lado y dado que las CDR de estos sujetos no presentan una disposición paralela, la información obtenida con este parámetro puede resultar equívoca. En segundo lugar, tanto el cálculo de la PD₂₀, PC₂₀ o SGaw₃₅ obtenidas generalmente por interpolación, como la determinación de la

TABLA III
Estudio comparativo de cada punto de la curva dosis-respuesta de asmáticos y sanos e identificación de su nivel crítico de separación

Metacolina	Análisis de varianza	Test de Student	LSD	Diferencia de descensos del FEV ₁ entre asmáticos (\bar{x}_1) y sanos (\bar{x}_2)
(UIM)	(F)	(t)	($p < 0,01$)	($\bar{x}_1 - \bar{x}_2$)
2,5	2,65	-1,63	2,22	1,30
7,5	7,87	-2,80	3,64	3,68
32,5	17,21	-4,15	7,42	11,05
	($p < 0,01$)	($p < 0,01$)		
	($p < 0,01$)	($p < 0,01$)		

UIM: unidades inhalatorias de metacolina. LSD: least significant difference.

reactividad o búsqueda de la ecuación de regresión que mejor se adapte a los puntos obtenidos^{6-9,19}, entrañan, sea cual sea el método utilizado, una clara manipulación de los datos y por tanto, sus resultados debieran ser interpretados con cierta precaución. Se estima finalmente que cuando la indicación fundamental de la prueba de provocación bronquial es clínica o epidemiológica, la determinación de la PD₂₀ (o PC₂₀) puede ser el parámetro con mayor capacidad para discriminar entre la población asmática y los sujetos sanos²⁰. Sin embargo, si el objetivo de las pruebas de provocación es investigar los mecanismos de la hiperreactividad bronquial o estudiar las respuestas ante posibles fármacos, el análisis de las CDR debiera realizarse utilizando parámetros precisos que permitan estudiar el comportamiento de la curva a lo largo de todo su trazado^{3,4}.

En el presente trabajo hemos realizado un estudio individualizado de cada punto obtenido en la construcción de la CDR a metacolina y nuestros resultados demuestran que esta forma de analizar las respuestas permite la comparación de curvas obviando algunos de los problemas anteriormente comentados. Así pues, con esta metodología es posible comparar CDR a distintos niveles de su construcción, independientemente de su morfología y de que sean o no paralelas, tanto si pertenecen a un mismo individuo como si representan a distintos grupos de población o diferentes laboratorios, toda vez que los datos obtenidos no requieren la manipulación que precisan los métodos clásicamente utilizados en el estudio de la hiperreactividad bronquial.

Por otro lado, con los datos así presentados, se puede determinar la LSD y establecer el punto crítico a partir del cual la separación entre dos curvas es objetivable. En nuestro estudio, este punto se fijó con un nivel de significación de $p < 0,01$ en la dosis de 7,5 unidades inhalatorias de metacolina y las dosis progresivas administradas confirmaron la creciente separación entre la CDR de los sujetos sanos y la del grupo de asmáticos. Así pues, la determinación de la LSD en nuestro grupo de sujetos estudiados permitió detectar con rapidez el nivel de separación entre asmáticos y sanos de forma que éste, se sugiere, podría ser considerado un método abreviado de detección de hiperreactividad bronquial.



En la actualidad, diversos autores investigan la adopción de métodos más rápidos de exploración y análisis de la respuesta broncomotora que resulten lo suficientemente sencillos y sensibles como para poder realizar estudios epidemiológicos y de despistaje de la hiperreactividad bronquial en los distintos colectivos de estudio (sanos, fumadores, riniticos, asmáticos, bronquíticos crónicos)²¹⁻²⁷.

Al igual que Chatham et al²², algunos autores^{21,23,24} utilizan una forma abreviada de realizar la prueba de provocación bronquial, en cuyo caso únicamente se aporta rapidez en la realización de la prueba broncomotora. Otros autores^{25,26} utilizan la regresión lineal de todos los puntos al objeto de obtener una mayor información sobre el comportamiento global de la curva de una forma rápida y sencilla. Recientemente, Neukirch et al²⁷, proponen un modelo de análisis que resuma toda la información que pueda proporcionar la curva, basándose en la ley *log-logistic*; estos autores, aunque concluyen que éste es un útil instrumento para la investigación epidemiológica, reconocen también la necesidad de simplificar su propio modelo.

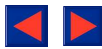
La metodología expuesta en este trabajo permite calcular con relativa sencillez el punto a partir del cual se pueden separar individuos asmáticos de la población sana. Sin embargo, y ésta quizá puede ser considerada una crítica potencial a nuestro método, es escasa la información que aporta sobre la globalidad de la curva y la posición de ésta en los ejes de coordenadas. En un trabajo previo⁹, dirigido a estudiar la morfología de la CDR de sujetos asmáticos y controles sanos, concluimos que probablemente lo que diferencia a estos dos grupos de población no era tanto la morfología de su curva, sino más bien la posición de la CDR en los ejes de coordenadas. Desgraciadamente esta es una información que no se puede obtener con la metodología empleada en este trabajo.

En nuestra opinión, cada método de análisis aporta información sobre aspectos parciales de la CDR global que puede incluso ser complementaria. Por tanto, la elección del método más adecuado para interpretar las pruebas de provocación bronquial debiera realizarse teniendo en cuenta el objetivo buscado. Cuando la indicación de la prueba broncomotora sea el estudio de los mecanismos implicados en la hiperreactividad bronquial, será prioritario obtener el máximo número de puntos posibles de la relación dosis-respuesta, analizando tanto su comportamiento individual como el trazado y posición de la CDR global. Cuando de lo que se trata es de separar los individuos asmáticos de los sanos desde la perspectiva de la hiperreactividad bronquial, nuestro estudio sugiere que el cálculo de la LSD tras un análisis de varianza, puede constituir un método abreviado y simple de diagnóstico. El pequeño número de enfermos estudiado limita la posibilidad de calcular con rigor la sensibilidad y especificidad del método y no nos permite establecer conclusiones definitivas. Sin embargo, apunta la necesidad de profundizar en la utilización de este parámetro tan escasamente estudiado en la literatura y de planificar estudios prospectivos dirigidos

a comparar el comportamiento de las CDR entre individuos normales, asmáticos con grados diversos de severidad, riniticos y con otras patologías en las que concurra la presencia de hiperreactividad bronquial. Sólo de esta manera se podrá determinar si esta forma de analizar las respuestas broncomotoras no sólo aporta rapidez en el diagnóstico sino también sensibilidad y especificidad suficientes como para convertirse en una práctica habitual de estudio de la hiperreactividad bronquial.

BIBLIOGRAFIA

1. Chai H, Farr RS, Froehlich LA et al. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56:323-327.
2. Cropp GJA, Berstein IL, Boushey HA et al. Guidelines for bronchial inhalation challenges with pharmacologic and antigenic agents. *ATS News*, Spring 1980; 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. Valencia Rodríguez A, Casan Clara P, Díaz Fernández M, Perpiñá Tordera M, Sebastián Gil MD. Normativa para los tests de provocación bronquial. Ed Doyma, SA Barcelona, 1987.
5. Orehek J. Relations dose-response et tests pharmacologiques de provocation bronchique. *Bull Europ Physiopath Resp* 1981; 17:329-332.
6. Cockcroft DW, Murdock KY, BSN, Mink JT. Determination of histamine PC₂₀. Comparison of linear and logarithmic interpolation. *Chest* 1983; 84:505-506.
7. 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.
8. Woolcock AJ, Salome CM, Yan K. The shape of the dose response curve to histamine in asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:71-75.
9. Pellicer Ciscar C, Perpiñá Tordera M, Jorquera Nieto JJ, Marco Martínez V. Morfología de la curva dosis-respuesta a la metacolina: diferencias entre sujetos asmáticos y normales. *Arch Bronconeumol* 1987; 23:128-132.
10. Eiser NM, Mac Rae KD, Guz A. Evaluation and expression of bronchial provocation tests. *Bull Europ Physiopath Resp* 1981; 17:427-440.
11. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:225-243.
12. Morris JF, Koski A, Johnson LC. Spirometric standards for healthy nonsmoking adults. *Am Rev Respir Dis* 1971; 103:57-67.
13. Sokal RR, Rohlf FI. *Biometry, the principles and practice of statistics in biological research*. WH Freeman and Co, San Francisco, 1969.
14. Cherniack RM, Raber MB. Normal standards for ventilatory function using an automated wedge spirometer. *Am Rev Respir Dis* 1972; 106:38-46.
15. Cotes JE. *Lung function. Assessment and application in medicine*. 3 ed. Oxford. Blackwell, 1975.
16. Cockcroft DW, Berscheid BA, Murdock KY. Unimodal distribution of bronchial responsiveness to inhaled histamine in a random human population. *Chest* 1983; 83:751-754.
17. Orehek J, Gayrard P. Les tests de provocation bronchique non-spécifique dans l'asthme. *Bull Europ Physiopath Resp* 1976; 12:565-598.



18. Malo JL, Pineau L, Cartier A, Martin RR. Reference values of the provocative concentrations of methacholine that cause 6 % and 20 % changes in forced expiratory volume in one second in a normal population. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:8-11.
19. 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.
20. Pratter RM, Irwin RS. The clinical value of pharmacologic bronchoprovocation challenge. *Chest* 1984; 85:260-265.
21. Parker CD, Bibo RE, Reed CE. Methacholine aerosol as test for bronchial asthma. *Arch Intern Med* 1965; 115:452-458.
22. Chatham M, Bleecker ER, Norman P, Smith PL, Mason P. A screening test for airways reactivity. An abbreviated methacholine inhalation challenge. *Chest* 1982; 1:15-18.
23. Heredia JL, Casan P, Palmer A et al. Test abreviado con metacolina en el diagnóstico del asma. *Arch Bronconeumol* 1985; 21 (suppl)A: 47A.
24. Ferrari M, Olivieri M, Gaspieri MDe, Morosin P. A short methacholine challenge for measurement of bronchial reactivity. *Bull Europ Physiopath Respir* 1987; 23:318 s.
25. O'Connor G, Sparrow D, Taylor D, Segal M, Weiss S. Analysis of dose-response curves to methacholine. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:1.412-1.417.
26. Enarson DA, Schulzer M, Vedal S, Chan-Yeung M. Summarizing methacholine bronchoprovocation data in epidemiological surveys. *Bull Europ Physiopathol Respir* 1987; 23:387-389.
27. Neukirch F, Maccario J, Palmer A et al. Analysis of the methacholine dose-response curve: Usefulness of a simplified log-logistic model in epidemiological studies. *Bull Europ Physiopath Respir* 1987; 23:383-386.