

# TESIS DOCTORAL

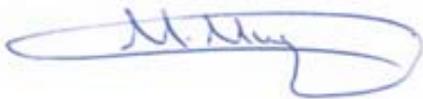
## UTILIDAD DE LA MEDICIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN AIRE ESPIRADO EN LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA

DOCTORANDA:

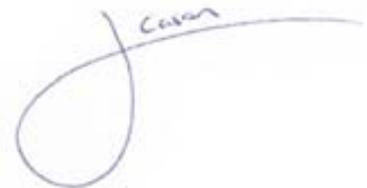
**ANA M<sup>a</sup> FORTUNA GUTIÉRREZ**

DIRECTORES

**Dra. Mercedes Mayos Pérez**



**Dr. Pere Casan Clarà**



2014

Programa de Medicina  
Departament de Medicina  
Facultat de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona



Barcelona, 20 de Septiembre de 2014

Departament de Medicina. Facultat de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

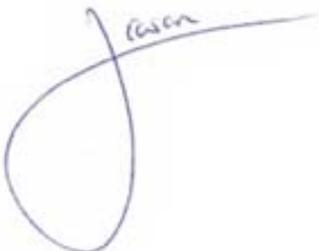
Edificio W - UD de Medicina de la Vall d'Hebron  
Paseo Vall d'Hebron, 119; 08035 Barcelona  
Tel. 93 489 40 96 / Fax.: 93 428 32 64  
doctorat.medicina@uab.cat

**Pere Casán Clará**, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Oviedo, y **Mercé Mayos Pérez**, Profesora de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona,

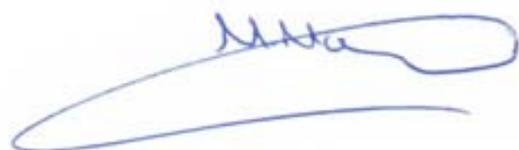
CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada "*Utilidad de la medición de óxido nítrico en aire espirado en la patología respiratoria*", presentada por **Ana M<sup>a</sup> Fortuna Gutiérrez**, inscrita en el Departamento de Medicina de la UAB, y realizada bajo su dirección, alcanza los objetivos fijados al inicio de la Tesis, representa una gran aportación al tema y reúne méritos suficientes para proceder a su lectura y defensa ante el Tribunal correspondiente para optar al Grado de Doctor de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Dr. Pere Casán Clará



Dra. Mercé Mayos Pérez





*A mis padres y hermana*



*"Cuando nos encontramos en la dirección correcta,  
lo único que debemos hacer es seguir caminando"*

*Proverbio budista*



## AGRADECIMIENTOS

La tesis doctoral que presento es el resultado del trabajo de investigación iniciado durante mi residencia de Neumología en Barcelona, ciudad que me atrapó desde que llegué hace 12 años para quedarme para siempre. Durante este tiempo he tenido la suerte de conocer a personas que me han hecho sentir muy especial, profesional y personalmente, que han creído en mi desde el principio y que de diferente forma han contribuido con sus conocimientos y esfuerzo, ánimo y dedicación más fiel a la realización de este proyecto. Gracias a todos ellos.

Gracias al tribunal por aceptar la valoración de esta tesis.

Gracias, a los directores de esta tesis:

Al Dr. Pere Casán, Pere, que te voy a decir. Los inicios en investigación y el porqué de esta tesis te los debo a ti, gracias por ello. Durante mi rotación en el Laboratorio de Función Pulmonar supiste inculcar en mí las ganas de saber más, de sospechar y de buscar, de inventar retos y conseguirlos, de no caer cuando te sientes vencido y de seguir luchando por conseguir lo que uno quiere. Gracias por hacerme sentir como en casa, por tus consejos y tus historias sobre la historia a veces olvidada. Gracias de corazón.

Y a la Dra. Mercé Mayos, Mercé, hace ya tiempo que pusiste tu confianza en mi y me permitieras hacer este viaje a tu lado, juntas en la *Unitat del Son*; gracias por ese confiar incondicional, por trasmitirme tus ganas de trabajar y de vivir, tu tesón y tu *querer es poder*. Gracias por tus conocimientos y consejos, por tu perfeccionismo y rigor, por buscar preguntas para encontrar respuestas, y por ayudarme cada día en ser mejor profesional pero sobre todo mejor persona. Jefa, compañera, amiga. Gracias por seguir soñando conmigo.

Al Dr. Vicente Plaza, Jefe de Servicio de Neumología. Gracias por confiar en mí para que continuara formando parte de un grupo de personas excepcional, por tu apoyo y tu dedicación al trabajo.

Gracias a todo el Servicio de Neumología por vuestro compañerismo, profesionalidad y respeto, en especial a Jose Manuel, Jesús, Abilio, Julio, Carmen P. y Carmen G., doctores de una generación irrepetible, por trasmitirme el amor al trabajo, por los conocimientos, consejos y experiencia, por la alegría y el *caliu*.

Gracias al personal del Laboratorio de Función Pulmonar: Mercedes, Teresa, y Esperanza (*in memoriam*), por los amplios conocimientos técnicos, y sobre todo a ti, Nuria, gracias por tu dedicación absoluta a la perfección en el trabajo y por no rendirte hasta conseguir lo que quieres.

Gracias al personal de la *Unitat del Son*: a las enfermeras de noche, Ariadna y Montse por su amistad e incondicional ayuda en los estudios; a la enfermera de día, Rosa Miralda, Rosita, gracias por trasmitirme la capacidad de trabajo, por tu cariño en el día a día, y por estar siempre siempre ahí.

Gracias a ti, Ludy, por tus consejos, tu cariño y por tu apoyo en todo momento. A Fátima, por su incondicionalidad; y a ti M<sup>a</sup> Angeles (*in memoriam*), gracias por acogerme desde el principio, por ayudarme en todo momento a mejorar profesionalmente, por tus sabias palabras y tu cariño, te echo de menos.

Gracias a “Neumopau”: Neus, Laura, Carme y Karina; vosotras sois el alma de esta tesis, me habéis acompañado desde el inicio, hemos compartido congresos, risas, conocimiento y duros momentos, todos ellos inolvidables, profesional y personalmente, compañeras, espejo en el que mirarme desde el comienzo de mi andadura, pero sobre todo **amigas**. Gracias por estar siempre a mi lado apoyándome y creyendo en mí. A Isabel, por el reencuentro, por el pasado y por el futuro.

A todos mis amigos, de diferentes lugares y en diferentes momentos; a ti Susana, porque desde la Facultad nos seguimos apoyando y queriendo; a ti Julia, por tu confianza profesional y tu amistad sincera y verdadera; a ti Cristina, por estar a mi lado en estos últimos años, disfrutar de la vida profesional a tu lado, con tu fuerza, dedicación e ilusión día a día, y de la vida personal llena de sonrisas, gracias por ser así. Y muy especialmente a ti Alicia (*in memoriam*), desde donde estés siempre me guiará tu sonrisa, generosidad y alegría.

A Antolín y a Conchi, por vuestro cariño en los últimos años.

A todas y cada una de aquellas personas que me han ayudado durante estos años, implicadas directamente o indirectamente en esta tesis y forman parte de ella.

Y finalmente pero lo más importante, mis agradecimientos a mi familia.

En primer lugar a ti, Jacobo, gracias por creer en mi desde el principio, por tu ayuda y apoyo en todos mis proyectos, por tu amor sincero y tranquilo, por hacerme sentir especial en cada momento, por compartir conmigo los pequeños y grandes momentos y disfrutar de una vida llena de felicidad. Y a ti Álvaro, mi pequeñín, por enseñarme qué es el **amor** por tu mirada y tu sonrisa que me dan la fuerza para seguir adelante.

A mi hermana Esther, por tus palabras y tus consejos, por ser mi amiga, siempre a mi lado con cariño y admiración. A Irene y a Violeta, por vuestros abrazos llenos de ternura.

Y especialmente a vosotros, mis padres, Mercedes y Anselmo, porque sin vosotros no estaría aquí ni sería quien soy, gracias por trasmitirme siempre buenos consejos, buenas maneras y buen hacer; por la confianza en mis posibilidades, por el respeto y el apoyo en todas mis decisiones, por la ayuda para conseguir mis sueños y creer en ellos, por vuestro amor y cariño, incondicional, puro y verdadero. Esta tesis es para vosotros. Os quiero.



## PRESENTACIÓN

Se presenta esta tesis doctoral según las directrices de la Normativa Académica de la Universitat Autònoma de Barcelona (RD 1393/2007 modificado a RD 861/2010) aprobado en Junta de Gobierno el 2 marzo de 2011, para la presentación de tesis doctorales en formato de compendio de publicaciones.

En la Introducción se revisan los conceptos fundamentales relacionados con las vías fisiológicas en las que interviene el óxido nítrico (NO) y las características de la técnica de su determinación en aire espirado. El desarrollo de estos conceptos permitirá justificar la hipótesis de trabajo de la tesis y los objetivos planteados en los diferentes artículos que la componen.

El núcleo de la tesis lo constituyen cuatro artículos originales publicados en revistas nacionales e internacionales en los que el doctorando es el primer autor.

En la primera parte se abordan aspectos técnicos relacionados con la determinación de NO en aire espirado. El primer artículo desarrolla la técnica de la determinación de la fracción espirada de NO en aire espirado a un flujo constante ( $FE_{NO}$ ) mediante un equipo portátil y el segundo, la técnica de espiración a múltiples flujos, una variación de la técnica anterior mediante la cual se puede obtener la concentración de óxido nítrico alveolar ( $CA_{NO}$ ).

En la segunda parte de la tesis se incluyen dos trabajos que analizan el uso de estas técnicas desde un punto de vista clínico. El tercer artículo evalúa la utilidad clínica de la determinación de  $FE_{NO}$  como marcador de inflamación, en pacientes con asma y su capacidad diagnóstica en pacientes con sospecha clínica. El último artículo evalúa la aplicación clínica de las dos determinaciones,  $FE_{NO}$  y  $CA_{NO}$ , como marcador de inflamación y de disfunción endotelial en pacientes con síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño (SAHS).

## **FINANCIACIÓN**

La actividad científica de esta tesis ha recibido financiación durante su realización:

- Ayudes a la investigación en neumología 2006 y 2007. Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP). Título del proyecto: *Determinación de óxido nítrico, en aire espirado y plasmático, en pacientes con síndrome de apnea hipopnea obstructiva del sueño (SAHS) y su relación con el riesgo cardiovascular.*

Fecha de inicio: 2006, Fecha final: 2008.

Responsabilidad: Investigador principal.

## **ACTIVIDAD CIENTÍFICA**

Los datos preliminares de esta tesis han sido presentados en encuentros científicos nacionales (39º y 41º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica, SEPAR; 25ª y 26ª Diada Pneumològica de la Societat Catalana de Pneumologia, SOCAP) e internacionales (18th y 19th European Respiratory Society Congress).

## **Otras aportaciones científicas relevantes**

- Manual de Procedimientos SEPAR N° 11. Pruebas para el estudio de inflamación de las vías aéreas. Capítulo 3. Medición de Óxido Nítrico en aire espirado. Barcelona, 2007.



# ÍNDICE GENERAL

## INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes históricos.....	25
2. Fisiología del NO.....	26
2.1. Síntesis de NO.....	26
2.1.1. Reacción de síntesis de NO.....	27
2.1.2. Enzimas: estructura molecular y tipos.....	28
2.1.2.a. NOS constitutivas.....	28
a1. cNOS neuronal o tipo 1 (nNOS o NOS 1).....	28
a2. cNOS endotelial o tipo 3 (eNOS o NOS 3).....	29
2.1.2.b. NOS inducible o tipo 2 (iNOS o NOS 2).....	29
2.1.3. Activación y regulación de las NOS.....	30
2.1.3.a. cNOS.....	30
2.1.3.b. iNOS.....	32
2.2. Funciones Moleculares del NO.....	32
2.3. Funciones biológicas del NO.....	33
2.3.1. Funciones No respiratorias.....	33
2.3.1.a. Hemostasia cardiovascular.....	33
a1. Sobre el endotelio.....	33
a2. NO y actividad plaquetaria.....	33
a3. NO y “shear stress”.....	34
2.3.1.b. Inflamación y actividad citotóxica.....	34
2.3.1.c. Función Neural.....	34
2.3.2. Funciones respiratorias.....	35
2.3.2.a. Función broncodilatadora.....	35
2.3.2.b. Hiperrespuesta de la vía aérea.....	35
2.3.2.c. Función vasodilatadora pulmonar.....	35
2.3.2.d. Respuesta inflamatoria-inmune en la vía aérea.....	36
d1. Mediador de inflamación.....	36
d2. Función de defensa.....	36
2.3.2.e. Secreción glandular de la vía aérea.....	36
2.3.2.f. Estrés oxidativo.....	37
3. Medición de NO en aire espirado.....	37

3.1. Introducción.....	37
3.2. Técnica de espiración a un flujo constante: fracción espirada de NO (FE <sub>NO</sub> ).....	39
3.2.1. Metodología.....	39
3.2.1.a. Características técnicas.....	39
3.2.1.b. Método de determinación.....	40
3.2.1.c. Repetibilidad y Reproducibilidad de la técnica.....	42
3.2.1.d. Equipo portátil de FE <sub>NO</sub> .....	43
3.2.2. Factores asociados a la determinación de FE <sub>NO</sub> .....	44
3.2.2.a. Sexo.....	44
3.2.2.b. Edad.....	44
3.2.2.c. Peso.....	44
3.2.2.d. Tabaco.....	44
3.2.2.e. Dieta.....	45
3.2.2.f. Otros.....	45
3.2.3. Valores de referencia de FE <sub>NO</sub> .....	45
3.3. Técnica de espiración a múltiples flujos: Concentración alveolar de NO (CA <sub>NO</sub> ).....	46
3.3.1. Introducción.....	46
3.3.2. Metodología.....	47
3.3.2.a. Modelos de medición.....	47
a1. Modelo bicompartimental.....	47
a2. Modelo axial.....	49
a3. Modelo bicompartimental-axial.....	50
3.3.2.b. La técnica.....	51
3.3.3. Valores de referencia de CA <sub>NO</sub> .....	51
4. Aplicación clínica de NO en aire espirado en la enfermedad respiratoria.....	51
4.1. Asma y FE <sub>NO</sub> .....	51
4.1.1. El asma: enfermedad inflamatoria.....	51
4.1.2. Síntesis de NO en el asma: iNOS.....	52
4.1.3. FE <sub>NO</sub> como marcador inflamatorio.....	53
4.1.3.a. FE <sub>NO</sub> y la inflamación eosinofílica.....	53
a1. FE <sub>NO</sub> y esputo inducido.....	53
a2. FE <sub>NO</sub> y eosinofilia en sangre.....	53

a3. FE <sub>NO</sub> y la biopsia bronquial.....	53
a4. FE <sub>NO</sub> y el lavado broncoalveolar (LBA).....	54
4.1.3.b. FE <sub>NO</sub> y la inflamación neutrofílica.....	54
4.1.3.c. FE <sub>NO</sub> y otros marcadores de actividad en el asma.....	54
4.1.4. FE <sub>NO</sub> y atopia.....	55
4.1.5. Utilidad de FE <sub>NO</sub> en el asma.....	56
4.1.5.a. FE <sub>NO</sub> en el diagnóstico de asma.....	56
4.1.5.b. FE <sub>NO</sub> en el control del asma.....	57
b.1. Predicción de exacerbaciones.....	57
b.2. Monitorización de la respuesta terapéutica.....	58
4.2. Síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño (SAHS) el NO en aire espirado.....	58
4.2.1. Introducción, concepto y definición de SAHS.....	58
4.2.2. Etiopatogenia del SAHS.....	61
4.2.2.a. Factores anatómicos.....	61
4.2.2.b. Factores mecánicos.....	61
4.2.2.c. Factores neurológicos.....	62
4.2.3. Mecanismos implicados en la disfunción endotelial.....	63
4.2.3.a. Inflamación.....	63
a1. Inflamación local.....	63
a1.a. Mecanismos.....	63
a1.b. Hallazgos histopatológicos de inflamación local en el SAHS.....	65
a2. Inflamación sistémica.....	66
a2.a. Factores de transcripción.....	66
a2.b. Moléculas de adhesión y citoquinas.....	66
a2.c. Reactantes de Fase Aguda.....	67
4.2.3.b. Estrés oxidativo. Mecanismos.....	68
b1. Disminución de la biodisponibilidad de NO.....	69
b2. Peroxidación lipídica.....	70
b3. Aumento de antioxidantes.....	71
4.2.3.c. Activación simpática.....	71
4.2.3.d. Alteraciones de la coagulación.....	71
4.2.4. Aplicación clínica de FE <sub>NO</sub> en el SAHS.....	72

4.2.5. Aplicación clínica de CA <sub>NO</sub> en el SAHS.....	73
4.2.5.a. Medición de disfunción endotelial: métodos habituales.....	73
4.2.5.b. Determinación de CA <sub>NO</sub> .....	75
b1. Difusión de NO.....	75
b2. Determinación de CA <sub>NO</sub> en pacientes con SAHS.....	76
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>79</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>83</b>
<b>ESTUDIOS PUBLICADOS</b> .....	<b>89</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>93</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>137</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>155</b>
<b>APÉNDICE</b> .....	<b>184</b>

## INDICE DE FIGURAS

- Fig.1 Estructura de Lewis de la molécula de NO
- Fig.2 Reacción de síntesis de NO a partir de arginina
- Fig.3 Estructura molecular de las 3 isoformas de NOS
- Fig.4 Activación enzimática de la cNOS
- Fig.5 Regulación Génica de la actividad de la cNOS
- Fig.6 Activación y regulación de la iNOS
- Fig.7 Reacción de quimioluminiscencia del  $FE_{NO}$
- Fig.8 Representación de la técnica de  $FE_{NO}$
- Fig.9 Equipo portátil de determinación de  $FE_{NO}$  (NIOX MINO<sup>®</sup>)
- Fig.10 Modelo Bicompartimental.
- Fig.11 Aplicación del Modelo Bicompartimental.
- Fig.12 Aplicación del modelo axial-trompeta
- Fig.13  $FE_{NO}$  en pacientes con exacerbación asmática
- Fig.14 Representación de la apnea en el SAHS
- Fig.15 Mecanismos etiopatogénicos del SAHS
- Fig.16 Interacciones patofisiológicas entre SAHS, mecanismos predisponentes a riesgo cardiovascular y enfermedad cardiovascular
- Fig.17 Etiología y factores implicados en la inflamación en el SAHS
- Fig.18 Derivados de NO antes y después del tratamiento con CPAP
- Fig.19 Intercambio pulmonar de NO



## ABREVIATURAS

AUC	Área bajo la curva
BH4	Tetrahidrobiopterina
Ca	Calcio
Ca <sup>2+</sup>	Calcio intracelular
CA <sub>NO</sub>	Concentración alveolar de óxido nítrico (ppb)
CAM	Calmodulina
Caw <sub>NO</sub>	Concentración de NO en la mucosa de la vía aérea (ppb)
CAT	Transportador de aminoácidos catiónico
CCI	Coeficiente de correlación intraclase
cNOS	Óxido Nítrico sintetasa constitutiva
CPAP	Presión positiva continua en la vía aérea superior
CT <sub>90</sub> (%)	Porcentaje de tiempo nocturno con saturación de O <sub>2</sub> inferior a 90%
Daw <sub>NO</sub>	Capacidad de difusión de NO de la vía aérea (ppb/s)
eNOS o NOS 3	Óxido Nítrico sintetasa endotelial o tipo 3
FAD	Dinucleótido de flavin adenina
FMN	Mononucleótido de flavina
FRDE	Factor relajante derivado de endotelio
GEMA	Guía Española del Asma
GM-FCS	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GMPc	Guanosil monofosfato cíclico
EI	Espujo Inducido
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
EPID	Enfermedad pulmonar intersticial difusa
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FE <sub>NO</sub>	Fracción espirada de NO
FEV <sub>1</sub> %	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FMD	Dilatación mediada por flujo
FQ	Fibrosis quística
Hb	Hemoglobina
HIF-1	Factor de transcripción inducible por hipoxia-1

HTA	Hipertensión arterial
H <sub>4</sub> B	Tetrahidrobiopterina
IAH	Índice de apnea-hipoapnea
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IF <sub>γ</sub>	Interferón γ
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
J'aw <sub>NO</sub>	Flujo de NO bronquial (pl/s)
K <sub>ca</sub>	Canales de potasio
iNOS o NOS 2	Óxido nítrico sintetasa inducible o tipo 2
LBA	Lavado broncoalveolar
LDLOX	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
Linfocitos-T Nk	Linfocitos-T Natural killer
LPS	Lipopolisacáridos
N	Nitrógeno
NADPH	Dinucleotido fosfato de nicotinamida adenina
NF-κβ	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
nNOS o NOS 1	Óxido nítrico sintetasa neuronal o tipo 1
NO	Óxido nítrico
NO <sup>+</sup>	Catión nitrosilo
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
NOS	Óxido nítrico sintetasa
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical libre superóxido
8-OHdG	8-hydroxy-2' -deoxyguanosina
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PD <sub>20</sub>	Concentración de metacolina a la que se detecta un descenso del 20% del FEV <sub>1</sub> % basal
PCR	Proteína C-reactiva
PKG	Proteína quinasa G
PPB	Partes por billón
PR	Poligrafía respiratoria

PSG	Polisomnografía convencional
RLO	Radicales libres de oxígeno
R-SON	Tionitritos
SAHS	Síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño
SOD	Superóxido dismutasa
Sat O <sub>2</sub> (%)	Saturación arterial de O <sub>2</sub> nocturna media
STAT-6	Signal transducer and activator of transcription
TMAD	Modelo bicompartimental en forma de trompeta-axial
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
VAS	Vía aérea superior
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1
V <sub>E</sub>	Flujo espiratorio de cada espiración (ml/s)
VEFG	Factor de crecimiento vascular endotelial
V <sub>NO</sub>	Concentración de NO para cada flujo utilizado (pl/s)
VR	Volumen residual



## **INTRODUCCIÓN**



El conocimiento sobre la patogenia de las enfermedades respiratorias ha experimentado un cambio notable en los últimos años, lo que en parte ha sido posible gracias a la utilización de biomarcadores que permiten un mayor acercamiento a la fisiopatogenia de la enfermedad. La determinación de NO, biomarcador inflamatorio, ha despertado un interés creciente en la comunidad científica, con utilidad y aplicaciones en el diagnóstico, el control y la monitorización de la respuesta terapéutica en diferentes procesos respiratorios.

## 1. Antecedentes históricos

El descubrimiento del NO como molécula fisiológica en el organismo se remonta al siglo XIX cuando a pesar de ser considerada un gas tóxico, presente en el cigarrillo y combustión de vehículos, se comenzaron a utilizar compuestos de nitroglicerina explosiva en el tratamiento de la angina de pecho (1879, W. Murrel). Los científicos de esta época desconocían exactamente los mecanismos de actuación pero suponían y aceptaban la posible relajación que ejercitaba sobre el músculo liso vascular favoreciendo así un mayor aporte de flujo sanguíneo al corazón. Durante los siguientes 100 años una línea de investigación prometedora se abría en diferentes laboratorios internacionales.

En 1977 Ferid Murad et al.<sup>1</sup> descubren que los efectos vasodilatadores de la nitroglicerina, nitroprusiato de sodio y otros compuestos nitrogenados, relajan el músculo liso vascular mediante la liberación de un metabolito muy inestable, el óxido nítrico, que aumenta la actividad de la guanil ciclasa soluble, enzima que modula la síntesis del guanosil monofosfato cíclico (GMPc), presente en el músculo liso de los vasos sanguíneos. Inmediatamente después los autores Furchgott y Zawadzki<sup>2</sup> utilizaron muestras de musculatura lisa vascular estimuladas por acetilcolina y observaron que ésta no actuaba como vasodilatador directo sino mediante la liberación de un factor vasodilatador de vida media muy corta y que a diferencia de las prostaciclina derivadas de endotelio, no se bloqueaba por inhibidores de la ciclooxigenasa. Esta sustancia la denominaron *factor relajante derivado de endotelio (FRDE)*. Se introdujo así el concepto de *vasodilatación dependiente de endotelio*.

Posteriormente los autores Ignarro et al.<sup>3,4</sup> y Furchgott et al.<sup>5</sup> presentaron de forma independiente sus publicaciones en las que aseguraban que el FRDE y el NO eran la misma molécula, hallazgos corroborados por Moncada et al.<sup>6</sup> al demostrar que el NO era producido por las células endoteliales y se trataba sin dudas del FRDE sintetizado a partir de L-arginina e implicado en la síntesis del GMP cíclico.<sup>7,8</sup>

A partir de ese momento el interés por la molécula de NO creció de forma exponencial con múltiples publicaciones sobre sus funciones fisiológicas y utilidades terapéuticas así como el reconocimiento a sus descubridores. En 1990 se concedió el *Premio Príncipe de Asturias a la Investigación Científica y Técnica* a Salvador Moncada. En 1992 fue considerada molécula del año por la prestigiosa revista *Science*<sup>9</sup> y en 1998, tres de los cuatro investigadores, Ferid Murad, Robert Furchgott y Louis Ignarro, con la polémica exclusión de Salvador Moncada, recibieron el *Premio Nobel de Medicina y Fisiología* por el descubrimiento del NO como el FRDE y su papel en el sistema cardiovascular.

## 2. Fisiología del NO

El NO es un gas incoloro, lipofílico y con una vida media corta en solución (<1s) pero estable en la formación de complejos biológicos. Se produce de forma endógena por gran variedad de células y posee la capacidad para difundir fácil y rápidamente a través de membranas biológicas e interactuar con moléculas intracelulares, todo ello sin la necesidad de receptores de NO extracelulares ni transportador de membrana.<sup>10</sup>

### 2.1. Síntesis de NO

Es una molécula formada por dos átomos, oxígeno (O) y nitrógeno (N) que se aparean para formar NO y que presenta un electrón no apareado, característica que le confiere propiedades de radical libre pudiendo reaccionar ávidamente con otras moléculas como oxígeno, radicales superóxido y metales de transición. Al

perder el electrón no apareado y formar catión nitrosilo ( $\text{NO}^+$ ) el orden de enlace de la molécula aumenta y le confiere mayor facilidad para su oxidación, característica de gran importancia para sus funciones biológicas.<sup>10</sup>



Fig. 1 Estructura de Lewis de la molécula de NO

### 2.1.1. Reacción de síntesis de NO

La síntesis de NO se produce en una reacción de oxidación-reducción a partir del aminoácido L-arginina mediante la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La enzima NOS requiere para esta reacción, además del sustrato de L-arginina, la presencia de calmodulina, grupo Hemo y de 4 cofactores: mononucleótido de flavina (FMN), dinucleótido de flavin adenina (FAD), tetrahydrobiopterina ( $\text{H}_4\text{B}$ ) y dinucleotido fosfato de nicotinamida adenina (NADPH).<sup>11</sup> (Fig. 2)

La L-arginina es transportada al interior de la célula endotelial por un transportador específico y mediante la NOS se sintetiza L-citrulina y una molécula de NO en una reacción que se produce en dos procesos de monooxigenación. La producción de NO puede ser atenuada por inhibidores de la NOS derivados de la L-arginina.<sup>12</sup> (Fig. 2)

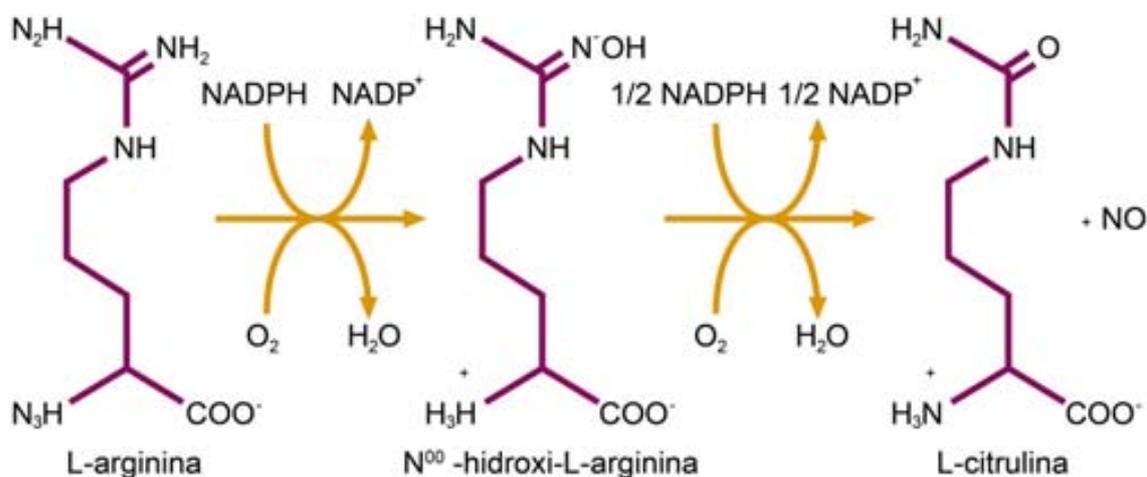


Fig. 2 Reacción de síntesis de NO a partir de arginina

### 2.1.2. Enzimas: estructura molecular y tipos

La estructura molecular de la NOS se compone de dos cadenas idénticas de aminoácidos, dímeros, formados por un dominio carboxi-terminal (dominio reductasa) que es homólogo al citocromo P450 y que contiene la zona de reconocimiento NADPH, FAD y FMN y un dominio amino-terminal (dominio oxidasa) de posición planar, esencial para la actividad de la NOS y que contiene el grupo Hemo, la tetrahidrobiopterina ( $H_4B$ ) y la zona de reconocimiento de la L-arginina.<sup>12,13</sup> (Fig. 3)

Se han identificado en las células del organismo humano 3 isoformas de la NOS, codificadas en 3 genes localizados en cromosomas diferentes que adquieren patrones de expresión específicos.<sup>12,13</sup>

De las 3 isoenzimas, 2 de ellas son constitutivas (cNOS) y una de ellas es inducible (iNOS). Las diferencias en su expresión y regulación génica favorecen que el NO pueda tener un papel fisiopatológico múltiple en el organismo. Recientemente se ha descrito una posible inducción de la cNOS mientras que iNOS puede ser constitutiva en algunas condiciones celulares.<sup>14,15</sup>

2.1.2.a. NOS constitutivas. Son enzimas que están presentes en todas las células del organismo y poseen capacidad de sintetizar NO como respuesta a diferentes estímulos. Son citosólicas y dependientes de calcio (Ca). Ante un aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular se unen a un tercer dominio afín a la calmodulina (CAM), proteína de bajo peso molecular que actúa como quelante del  $Ca^{2+}$  y “activador molecular” enzimático<sup>15</sup>. Sintetizan concentraciones bajas de NO durante periodos cortos de tiempo en respuesta a una estimulación física o de un receptor. Los prototipos de estas enzimas están presentes en el cerebro y en el endotelio. Se han identificado dos tipos de cNOS:

a1. cNOS neuronal o tipo 1 (nNOS o NOS 1). Está localizada en el citosol de las células nerviosas, con concentraciones elevadas en el cerebro (cerebelo, hipotálamo e hipocampo), médula espinal y sistema nervioso periférico, donde el NO interviene como neurotransmisor.<sup>12,16</sup> Fuera del sistema nervioso se ha

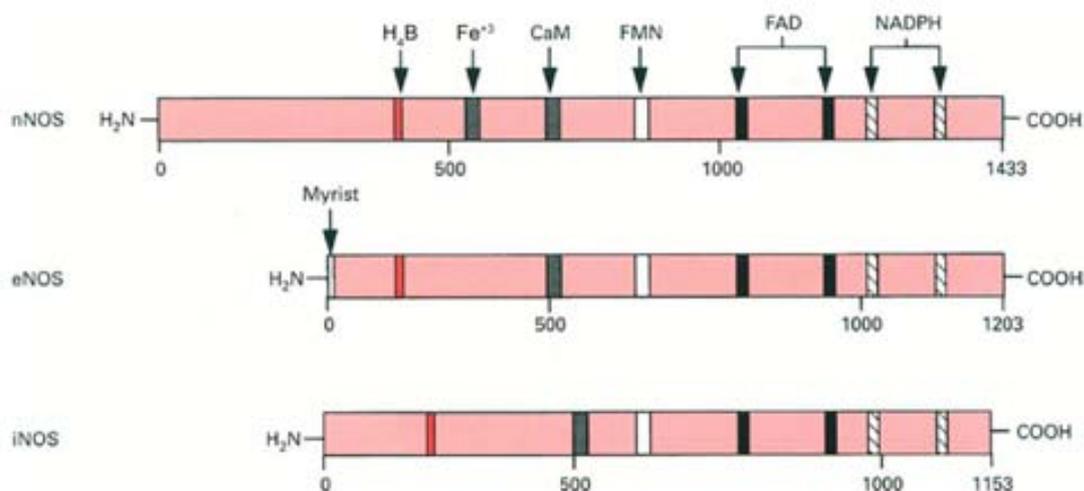
demostrado la expresión de nNOS en el músculo esquelético, en los neutrófilos y en los islotes pancreáticos. En el aparato respiratorio la nNOS se localiza en los nervios colinérgicos de las vías respiratorias, donde actúa como un antagonista funcional de la acetilcolina favoreciendo la broncodilatación. Además se expresa en las células epiteliales y neumocitos de tipo 1, pudiendo intervenir en el proceso inflamatorio y en el estrés oxidativo de enfermedades respiratorias.<sup>17</sup>

a2. cNOS endotelial o tipo 3 (eNOS o NOS 3). Se expresa en las células endoteliales donde actúa como regulador del tono vascular, permitiendo al NO diversas funciones como potencial vasodilatador, activador plaquetario, inmunomodulador y radical libre. Posee un sitio de miristoilación con el que se une a un ácido graso y le permite ser hidrosoluble y encontrarse libre en el citoplasma (a diferencia del resto de isoformas). Esta propiedad le permite difundir más rápidamente a la sangre y al músculo liso adyacente para intervenir en medios de estrés oxidativo.<sup>12,17</sup> En el aparato respiratorio se ha descrito en las células endoteliales bronquiales y en la circulación pulmonar donde regula el flujo vascular, así como en las células del endotelio alveolar y en las células epiteliales de la vía aérea donde interviene en la disminución de las secreciones de la vía aérea y regulación del aclaramiento mucociliar.<sup>18</sup>

2.1.2.b. NOS inducible o tipo 2 (iNOS o NOS 2). A diferencia de las enzimas constitutivas, la iNOS es Calcio independiente y no se encuentra en todas las células de forma fisiológica. Requiere para su completa actividad NADPH, FAD y FMN y en cierta medida H<sub>4</sub>B y glutatión siendo la calmodulina una subunidad más.<sup>15,17</sup>

Su activación permite la síntesis de hasta mil veces más de NO que las enzimas constitutivas, y cumple funciones citotóxicas, citostáticas y citoprotectoras. Se encuentra en diferentes células como los hepatocitos y el músculo liso, pero sobre todo está presente en las células del tracto respiratorio (eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales).<sup>12,17</sup> Su expresión en estas células puede ser inducida como respuesta a estímulos inmunológicos, por citocinas inflamatorias o por productos

bacterianos (endotoxinas), considerándose un marcador de inflamación y de citotoxicidad.<sup>19</sup>

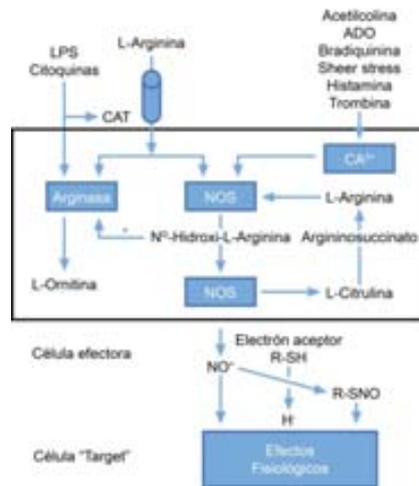


**Fig. 3** Estructura molecular de las 3 isoformas de NOS. (Adaptado de Marletta MA. *The Journal of biological chemistry* 1993<sup>12</sup>).

### 2.1.3. Activación y regulación de las NOS

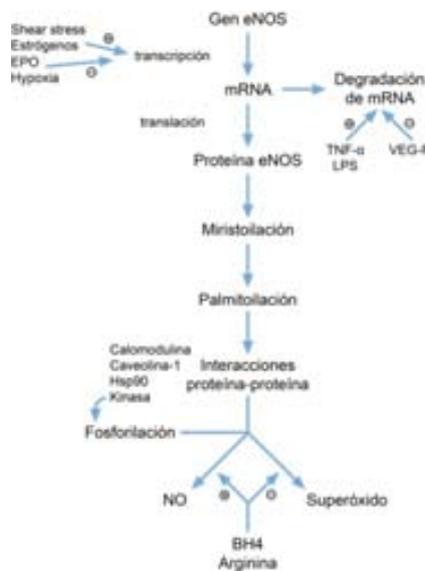
Las enzimas cNOS y la iNOS presentan mecanismos de activación y regulación diferentes.

2.1.3.a. cNOS. Para que se produzca el inicio de la síntesis de NO se requieren concentraciones adecuadas de lipopolisacáridos (LPS) y citocinas que activan al transportador de aminoácidos catiónico (CAT), responsable del transporte de la L-arginina al interior de la célula. Una vez en su interior puede ser metabolizada mediante dos enzimas, la Arginasa que producirá la síntesis de L-ornitina o la cNOS que mediante la reacción anteriormente descrita (en fig. 2) sintetizará NO.<sup>17</sup> Sin embargo para que la cNOS, y en especial la eNOS pueda realizar esta síntesis se requiere de una activación enzimática y regulación génica específicas.<sup>20,21</sup> (Fig. 4 y fig. 5)



**Fig. 4** Activación enzimática de la cNOS.

La cNOS es activada por las sustancias responsables del aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (bradiquinina, histamina, serotonina, acetilcolina, ADP, sheer stress o trombina). Los lipopolisacáridos (LPS) y varias citoquinas aumentan el transporte intracelular de la L-arginina y la actividad de la arginasa. NG-hidroxi-L-arginina disminuye la actividad de la arginasa. El NO se une a grupos tiol y forma tionitritos (R-SNO) que producen los efectos fisiológicos. (Adaptado de *Ricciardolo FL et al. Physiological Reviews 2004*<sup>17</sup>).



**Fig. 5** Regulación Génica de la actividad de la cNOS

La hipoxia, el incremento de estrógenos, o la presión de rozamiento (sheer stress) median la transcripción de la cNOS. Otros factores modulan la estabilidad de su mRNA, (factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) los LPS, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)). La eNOS sufre varias reacciones finales imprescindibles y decisivas para la síntesis del enzima (miristoilación que facilita la localización de la enzima en el dominio adecuado de la membrana; palmitoilación, que permite la inclusión de la enzima en las invaginaciones plasmáticas de la membrana llamadas caveolas). Tras una reacción de fosforilación e interacción específica con otras proteínas se sintetiza la eNOS activa, lista para sintetizar NO ante la presencia de L-arginina y del cofactor BH4 o si no es así, sintetizar superóxido. (Adaptado de *Govers R et al. Am J Physiol Renal Physiol 2001*<sup>21</sup>).

2.1.3.b. iNOS. La activación de la iNOS, que es transcripcional, se realiza mediante la enzima tirosina cinasa que activa la transcripción del mRNA del gen de iNOS (iNOS-mRNA), y facilita la translación y la formación de la iNOS activa que sintetizará el NO. La regulación génica de la iNOS se realiza mediante factores que modulan la iNOS-mRNA a nivel pretranslacional (LPS; el interferón  $\gamma$  (IF $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ )).<sup>17,21</sup>

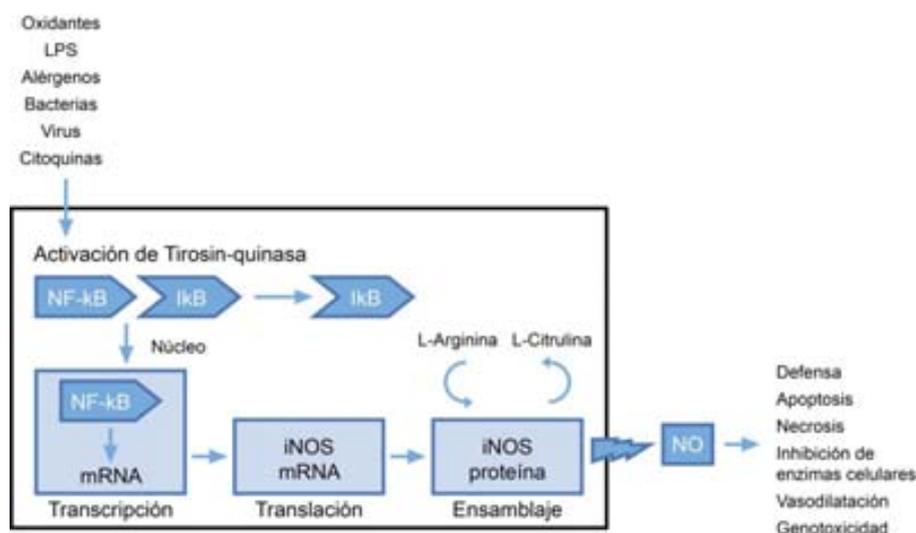


Fig. 6 Activación y regulación de la iNOS

Factores como oxidantes, LPS, alérgenos, bacterias, virus, citoquinas, etc activan la enzima tirosina cinasa a través del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), que entra en el núcleo de la célula donde activa la transcripción del mRNA del gen de iNOS activa para la síntesis de NO. La regulación pretranslacional de la iNOS la realizan los siguientes factores: los LPS inducen la iNOS-mRNA; el interferón  $\gamma$  (IF $\gamma$ ) desencadena la expresión y la activación de la casada de fosforilación tirosina-cinasa, crucial para la activación de la iNOS vía NF- $\kappa$ B; el TNF- $\alpha$  suprime la expresión de la iNOS al disminuir el mRNA. (Adaptado de Ricciardolo FL et al. *Physiological Reviews* 2004<sup>17</sup>).

## 2.2. Funciones moleculares del NO

Según el mecanismo de síntesis (cNOS o iNOS) las funciones del NO sobre las células diana serán diferentes.

La cNOS sintetiza concentraciones bajas de NO el cual tiene como objetivo principal la vía de transducción del GMPc. Mediante esta vía, el NO realiza las principales funciones fisiológicas: modular la función de otras enzimas y de ciertos

factores de transcripción, la activación, adhesión y adherencia de neutrófilos, agregación plaquetaria, vasodilatación del músculo liso vascular, expresión de citoquinas pro-inflamatorias (eNOS) o neurotransmisor en las células nerviosas (nNOS).<sup>22,23</sup>

En contraste el NO, sintetizado a altas concentraciones por la iNOS, interviene en procesos fisiológicos de defensa y también en procesos patológicos (apoptosis, necrosis, inhibición enzimática, proinflamación, citotoxicidad, vasodilatación y genotoxicidad). Esto se debe a la reacción del NO con otras moléculas que tienen al igual que él, electrones no apareados, como los radicales libres de oxígeno (RLO) (anión superóxido, radical peroxil) o metales de transición (el grupo hemo) interviniendo en procesos de inflamación, estrés oxidativo y disfunción endotelial.<sup>17</sup>

## **2.3. Funciones biológicas del NO**

### **2.3.1. Funciones no respiratorias**

2.3.1.a Homeostasia cardiovascular. El NO interviene en la homeostasis cardiovascular mediante la acción sobre diferentes órganos efectores.

a1. Sobre el endotelio. La vasodilatación mediada por NO provoca relajación de su citoesqueleto y aumento de la función de impermeabilidad selectiva. El endotelio por otro lado sintetiza compuestos vasoconstrictores como la endotelina-2, tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandina F<sub>2</sub>-α y anión superóxido. Un desbalance entre estas sustancias vasoconstrictoras y la síntesis de NO, vasodilatador, favorecerá la alteración de la regulación del tono vascular, y el desarrollo de la aterosclerosis e hipertensión arterial. Otras funciones del NO sobre el endotelio son el control de la inmunidad y citotoxicidad y la acción antitrombótica y fibrinolítica.<sup>24</sup>

a2. NO y actividad plaquetaria. Al igual que las células endoteliales, las plaquetas poseen una eNOS capaz de sintetizar NO plaquetario, con capacidad

para regular la función plaquetaria de forma potente y actuar como inhibidor de la agregación plaquetaria.<sup>24,25</sup>

a3. NO y “shear stress”. El mayor estímulo para la liberación de NO sobre el tono vascular es la shear stress o presión de rozamiento sobre la pared vascular que se genera por el aumento del flujo vascular arterial. Se trata de un estímulo físico a través de los mecanorreceptores de la pared vascular como consecuencia de la presión de rozamiento.<sup>26</sup>

2.3.1.b Inflamación y actividad citotóxica. La participación de NO en la respuesta inflamatoria y como regulador inmune ha sido demostrada tanto en modelos animales como en pacientes con enfermedades inflamatorias humanas. Bo et al.<sup>27</sup> Boulleme et al.<sup>28</sup> y Kolb et al.<sup>29</sup> observaron niveles elevados de NO en la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoidea. El NO interviene en la adhesión de polimorfonucleares al endotelio contribuyendo al mantenimiento de la integridad de la barrera microvascular, a la vez que disminuye la permeabilidad vascular y la formación de edema.<sup>30</sup> Por otro lado los receptores de linfocitos T para antígenos virales aumentan la síntesis de NO mediante la activación de citoquinas así como los macrófagos y linfocitos activados mantienen altos niveles de NO durante largos períodos de tiempo.

Los macrófagos secretan intermediarios químicos como son los intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) que junto con productos del NO como el peroxinitrito (ONOO-) y radicales de OH, implican al NO en la actividad citotóxica.<sup>20</sup>

2.3.1.c. Función neuronal<sup>12</sup>. La presencia del NO en el sistema nervioso permite la intervención en diferentes funciones como son la autorregulación del flujo vascular cerebral periférico y central mediante la activación de las fibras parasimpáticas, mecanismos de defensa ante infecciones cerebrales y la participación en procesos de aprendizaje y memoria.

### 2.3.2. Funciones respiratorias

Los principales efectos del NO en el aparato respiratorio están producidos por la asociación del NO con el grupo tiol para formar tionitritos (R-SNO), los cuales favorecen reacciones de nitrosilación en células del epitelio de la vía aérea, relajación del músculo liso vascular pulmonar y aumento de la señal neuronal para el aumento de la ventilación minuto en respuesta a hipoxia.<sup>17</sup>

La presencia de las 3 isoformas de NOS en el tracto respiratorio será determinante para regular principalmente el tono del músculo liso de la vía aérea y la respuesta inmunológica/inflamatoria, principales funciones en el aparato respiratorio.

2.3.2.a. Función broncodilatadora. El NO, de producción endógena o exógena, induce la relajación del músculo de la vía aérea principalmente mediante 2 mecanismos. Por un lado activa los canales de potasio ( $K_{CA}$ ) (vía del GMPc) y posteriormente activa la proteína kinasa G (PRKG), mediador último de la relajación bronquial. Por otro lado los R-SNO (síntesis vía GMPc independiente) están presentes en la vía aérea en una concentración suficiente para mantener el tono de la misma<sup>31,32</sup>. En pacientes asmáticos por ejemplo, se ha demostrado una disminución de la concentración de R-SNO así como una aceleración de la degradación de éstos, asociado a una deficiencia del mecanismo de broncodilatación que favorece el broncoespasmo refractario y severo.<sup>33</sup>

2.3.2.b. Hiperrespuesta de la vía aérea. El NO tiene un efecto atenuante de la hiperrespuesta bronquial. En pacientes con asma leve se ha demostrado un efecto broncoprotector del NO en respuesta a estímulos de broncoconstricción, como la metacolina o la bradicinina.<sup>34</sup>

2.3.2.c. Función vasodilatadora pulmonar. La liberación de NO mediante una mayor expresión de eNOS en las células endoteliales de la circulación bronquial está aumentada regulando el tono vascular pulmonar y contrarrestando la vasoconstricción hipóxica en procesos como la hipertensión pulmonar.<sup>35</sup>

### 2.3.2.d. Respuesta inflamatoria-inmune en la vía aérea.

d1. Mediador de inflamación. Los macrófagos pulmonares y alveolares sintetizan NO mediante la iNOS activada por citocinas y endotoxinas, que implican al NO en el mecanismo de defensa del organismo.

Durante la respuesta inflamatoria una gran cantidad de citocinas se expresan y se liberan a la vía respiratoria y al pulmón interviniendo en la modulación de la inflamación local y favoreciendo la síntesis de nitritos por diferentes vías, siendo la más importante el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que aumenta la síntesis de nitritos inducida por IFN- $\gamma$  en macrófagos alveolares.<sup>31</sup>

En los pacientes con asma, el NO expresado en el proceso inflamatorio interviene en amplificar y perpetuar la inflamación mediada por las células Th2. La propia infección vírica puede inducir a la iNOS de las células epiteliales de la vía aérea que aumenta la producción de NO durante las agudizaciones. Por otro lado la iNOS promueve inflamación alérgica en la vía aérea a través del IFN- $\gamma$  y de la síntesis de factores quimotácticos (quimosinas) en los eosinófilos.<sup>31,36</sup>

d2. Función de defensa. Otra de las funciones del NO en la vía aérea es la función de defensa inespecífica contra agentes patógenos en cuyo caso intervienen las células Th1 que liberan IFN- $\gamma$ , el cual aumenta en los macrófagos la síntesis de NO y otros patógenos. El NO inhibiría la secreción de IL2 y de IFN- $\gamma$  según los requerimientos de NO en un proceso de autorregulación implicado en múltiples patologías autoinmunes. La función final del NO sintetizado por la vía de activación de las células Th1 es la regulación de mecanismos como la muerte celular programada (apoptosis), la inflamación crónica y la defensa celular, entre otros.<sup>37,38</sup>

2.3.2.e. Secreción glandular de la vía aérea. El NO interviene en la secreción glandular de la vía aérea mediante la regulación de la NOS por sustancias como la metacolina o la bradiquinina. Además interviene en la motilidad ciliar bronquial mediante el aumento de la frecuencia del bateo ciliar y

regulación del transporte electrolítico pulmonar como mecanismo defensivo.<sup>31,39</sup> Se ha demostrado en pacientes con fibrosis quística una disminución de los niveles de NO en aire espirado y mejoría de la disfunción mucociliar tras el tratamiento con NO-L-arginina sublingual.<sup>40</sup>

2.3.2.f. Estrés oxidativo. En el estrés oxidativo están implicados los RLO como el anión superóxido y los radicales hidroxilo, formados a partir de reacciones enzimáticas y mecanismo oxidativos, presentes en la mayoría de células del organismo (mitocondrias, enzimas, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, etc.).<sup>41,42</sup> El NO interacciona con los RLO y forma las especies reactivas de nitrógeno (ERN) implicadas en diversos mecanismos fisiológicos y en sistemas de defensa.

Las funciones de los RLO y de las ERN son producir un estado de estrés oxidativo y nitrosativo sobre diferentes moléculas (lípidos, proteínas, residuos de tirosina, grupos hemo o DNA) y finalmente un efecto deletéreo pulmonar favoreciendo el proceso inflamatorio celular en diferentes enfermedades pulmonares como son el síndrome de distrés respiratorio del adulto, fibrosis quística (FQ), asma, etc.<sup>41,42</sup>

### **3. Medición de NO en aire espirado.**

#### **3.1. Introducción**

La evaluación y tipificación de la inflamación y del estrés oxidativo de las enfermedades respiratorias inflamatorias como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la FQ o la enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) permiten una aproximación a su patogenia y un mejor control clínico, evaluación del tratamiento antiinflamatorio y prevención de sus exacerbaciones.

En el estudio de la inflamación se pueden utilizar métodos como la biopsia bronquial y el lavado broncoalveolar, cuya naturaleza invasiva limita su utilización rutinaria. En la búsqueda de métodos no invasivos se han desarrollado técnicas que permiten la medición de biomarcadores, moléculas ampliamente utilizadas en

el estudio de procesos biológicos, fisiopatológicos o en la respuesta a tratamientos en múltiples enfermedades. Un biomarcador inflamatorio debe cumplir las siguientes características: 1. Debe ser liberado por células inflamatorias exclusivas de la enfermedad a estudio; 2. La medición debe ser sensible, específica y repetitiva sin modificarse por la técnica; 3. La concentración del biomarcador debe ser correlacionada con la actividad y gravedad de la enfermedad; 4. Debe ser modificable por el efecto del tratamiento; 5. La medición no debe ser invasiva.

La variabilidad técnica y biológica de los biomarcadores conocidos (determinación en orina y sangre, concentración de gases en el condensado de aire exhalado o el esputo inducido) sobre fenotipos de inflamación diferentes, ha obligado a la búsqueda de nuevos biomarcadores. De este modo, en las dos últimas décadas, el aumento exponencial de conocimientos sobre la molécula de NO, ha permitido el desarrollo de una técnica nueva que realiza la medición de NO en aire espirado. Inicialmente Gustafsson et al.<sup>43</sup> mostraron la presencia de NO en aire espirado en animales y posteriormente Alving et al.<sup>44</sup> y Kharitonov et al.<sup>45</sup> mostraron elevadas concentraciones de NO en aire espirado en pacientes con asma. A partir de este momento la investigación sobre esta técnica y su implicación en el estudio de inflamación en enfermedades como el asma y el EPOC ha permitido un mayor conocimiento de la etiopatogenia, el control clínico y la respuesta al tratamiento de estas enfermedades.

La mayor producción de NO en la vía aérea se produce en los senos paranasales donde grandes concentraciones de NO son sintetizadas por la iNOS constitutiva presente fundamentalmente en el epitelio sinusal y nasal<sup>46,47</sup>, a diferencia de una menor concentración de NO presente en el tracto respiratorio inferior dependiente de iNOS<sup>48</sup>. La eNOS también se expresa en el epitelio de la vía aérea pero la contribución a la síntesis de NO es mínima comparada con la de la iNOS. La eNOS se expresa fundamentalmente en la circulación bronquial y pulmonar aunque, como la pared vascular bronquial, se encuentra en la lámina propia, debajo del epitelio respiratorio, parte del NO endotelial podría traspasar y aparecer en la espacio aéreo contribuyendo a la presencia de NO en el aire

espirado. Esta contribución se produce fundamentalmente en la concentración de NO alveolar.

En el caso de la nNOS no contribuye a la concentración de NO en aire espirado ya que su actuación sobre neuronas postganglionares parasimpáticas está lejos de la luz de la vía aérea.

### **3.2. Técnica de espiración a un flujo constante: Fracción espirada de NO (FE<sub>NO</sub>)**

#### **3.2.1. Metodología**

3.2.1.a. Características técnicas. La determinación de NO en aire espirado es un técnica no invasiva que permite cuantificar la concentración de NO que se encuentra en la vía aérea mediante el cálculo de la fracción espirada de NO (FE<sub>NO</sub>). Fue la primera técnica que se desarrolló tras objetivar la presencia de grandes concentraciones de NO en la vía aérea y en especial en pacientes asmáticos.<sup>43,44</sup>

La medición se basa en una reacción de quimioluminiscencia en la que el NO espirado reacciona con el ozono para formar dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) en estado activo. Posteriormente este NO<sub>2</sub> vuelve al estado fundamental emitiendo un fotón que se mide por luminiscencia. La concentración de NO es proporcional a la luz emitida, es decir, el número de fotones emitidos corresponden a la concentración de NO en el aire espirado en partes por billón (ppb). Se trata de una técnica sencilla, no invasiva, rápida y que proporciona un resultado rápido y sensible pudiendo detectar concentraciones de NO inferiores a 1ppb. (Fig. 7)

La concentración de NO en el aire espirado dependerá de la producción de NO en las células de la vía aérea, de la difusión de NO desde el capilar y de la ventilación alveolar y flujo bronquial. Hay una serie de factores que pueden modificar la producción de NO en la vía aérea y por lo tanto su detección en aire espirado como son, la actividad de la enzima NOS, sobre todo de la iNOS que sintetiza la mayor parte de la concentración de NO en la vía aérea. Por otro lado,

la actividad de las enzimas reguladoras de la L-arginina y su inhibidor, y la presencia de enzimas catabólicas y modificaciones del pH favorecen la presencia de menor o mayor concentración de NO en aire espirado.<sup>49</sup>

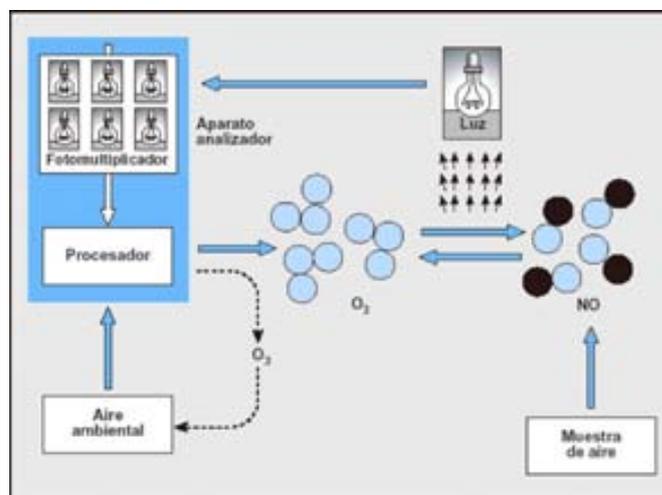


Fig. 7 Reacción de quimioluminiscencia del  $FE_{NO}$

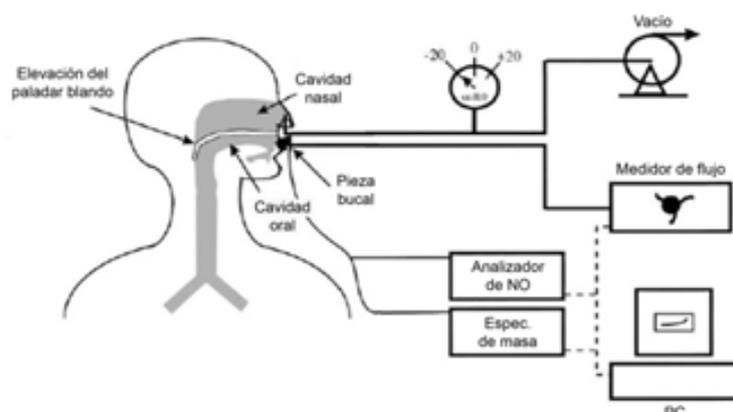
### 3.2.1.b. Método de determinación

Desde 1997 se han desarrollado recomendaciones internacionales sobre las características y aplicaciones de la determinación de NO en aire espirado actualizadas en 2005 y 2011.<sup>50-53</sup>

La técnica de espiración a un flujo constante puede ser de dos tipos:

- Método *off-line* en la que el aire espirado es almacenado en una bolsa y la medición de NO se realiza con posterioridad.
- Método *on-line*, facilita el cálculo de  $FE_{NO}$  a tiempo real mientras se realiza la maniobra de espiración. Es la técnica que se utiliza habitualmente en la práctica clínica y en los estudios de investigación y que se considera como *gold standard* para la medición de  $FE_{NO}$ .

El procedimiento es el siguiente:<sup>53</sup> el individuo debe estar sentado, de esta forma se permite un volumen de espacio muerto menor de 10ml con lo que se garantiza la recogida rápida de muestra de origen respiratorio. Se debe realizar una inspiración hasta capacidad pulmonar total, que se realiza en la mayoría de los equipos de quimioluminiscencia desde el equipo. Si se realiza desde el aire ambiente habrá que tener en cuenta la concentración de NO ambiental. Desde capacidad pulmonar total se realiza una espiración al interior del equipo, no forzada, de entre 6 y 10 segundos de duración manteniendo un flujo constante de 50 ml/s flujo en el cual la concentración de NO procede fundamentalmente de la difusión de NO en la vía aérea. Los niveles de NO espirado son flujo dependientes por eso el flujo de espiración debe ser estable y asegurado por el equipo pues a mayores flujos de espiración la concentración de  $FE_{NO}$  disminuiría. Además la espiración debe realizarse inmediatamente después de llegar a capacidad pulmonar total para evitar mantener la respiración, algo que favorecería la acumulación de NO en la orofaringe. (Fig. 8)



**Fig. 8** Representación de la técnica de  $FE_{NO}$ . El paladar blando se eleva con la presión negativa de la cavidad nasal (220 cm  $H_2O$ ); la velocidad del flujo en espiración se controla mediante la resistencia de espiración (Resistencia de Starling). La concentración de NO se mide mediante quimioluminiscencia, y la concentración de  $CO_2$  con espectroscopia de masas; PC: ordenador personal. (Adaptado de Tsoukias NM et al. *Journal of applied physiology* 1998<sup>98</sup>).

Se requieren para el cálculo de  $FE_{NO}$  2 determinaciones con una variabilidad  $<10\%$  entre ellas y la presencia de un *plateau* o meseta de 3 segundos para que la maniobra sea correcta. Se realizará una tercera determinación si las previas difieren en más de un 10%. Se recomienda realizar al

menos una espiración de 6 segundos en niños y de 10 segundos en adultos, pues si la espiración no se mantiene este tiempo no se alcanza un *plateau* válido y se pueden determinar menores concentraciones de  $FE_{NO}$  de las reales. Durante la espiración un marcador visual ofrecido por el software del equipo ayudará al paciente a mantener la espiración al flujo requerido. (Fig. 8)



El analizador posee una resistencia bucal de entre 5 y 20 cm  $H_2O$  que permite el cierre del velo del paladar. De esta forma se evita la comunicación con el NO que se encuentra en las fosas nasales. Además el equipo cuenta con un filtro que impide la contaminación con el NO ambiental.<sup>53</sup>

### 3.2.1.c. Repetibilidad y Reproducibilidad de la técnica

Diferentes estudios han confirmado la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica tanto en individuos sanos como en el paciente asmático. El estudio de Salome et al.<sup>54</sup> en población sana fue el primer estudio en mostrar una correcta repetibilidad de la técnica con un coeficiente de 4,58 ppb (coeficiente de correlación intraclase, (CCI) de 0,98). Kharitonov et al.<sup>55</sup> demostró una alta reproducibilidad de la técnica en sanos ( $FE_{NO}$  media  $1,83 \pm 0,75$ ppb) con un coeficiente de reproducibilidad de 2,11 ppb y un CCI de 0,99 (límites de concordancia del análisis de Bland-Altman fueron  $\pm 2,92$  ppb; fig. 9). Además con el fin de evaluar el número de determinaciones necesarias se comparó el valor de  $FE_{NO}$  al realizar tres mediciones obteniendo una diferencia en el peor de los casos de  $0,28 \pm 5,8$  ppb y la comparación entre la media de  $FE_{NO}$  de dos mediciones con el valor medio de  $FE_{NO}$  de las tres mediciones mostró diferencia de  $-0,26 \pm 2,92$  ppb (IC 95%). No se observaron diferencias estadísticamente

significativas entre el inicio y el final de la prueba que sugirieran efecto aprendizaje.<sup>55</sup>

#### 3.2.1.d. Equipo portátil de determinación de FE<sub>NO</sub>

El equipo de quimioluminiscencia que permite la determinación de FE<sub>NO</sub> según método on-line suele ser caro, de dimensiones grandes y de uso hospitalario, y requiere calibración exhaustiva diaria. Por estos motivos se ha desarrollado un equipo portátil, de pequeñas dimensiones y que permite la determinación de FE<sub>NO</sub> de forma ambulatoria y en el domicilio del paciente sin requerir calibración. (Fig. 9)

La diferencia con el equipo de quimioluminiscencia es que la medición se realiza a través de un sensor electroquímico que permite una medición más rápida y precisa que el equipo de quimioluminiscencia.<sup>56</sup> Alving et al.<sup>57</sup> mostró una concordancia entre los dos equipos con un CCI de 0,97 y de 0,98 para el equipo portátil y para el de quimioluminiscencia respectivamente. La repetibilidad en las medidas fue similar. El percentil 95 de distribución de repetibilidad para el equipo portátil fue de 4,6 ppb y en el de quimioluminiscencia de 3,3 ppb.<sup>57</sup> Estos datos fueron confirmados por otros estudios como el de Khalili et al.<sup>58</sup> en el que se observó una fuerte concordancia entre los equipos. Sin embargo otros trabajos han observado valores superiores con el equipo portátil respecto al equipo de quimioluminiscencia tanto en adultos como en niños<sup>57-59</sup> hallazgos que han justificado la realización de estudios para comprobar la concordancia entre ambos equipos y la presencia de puntos de corte.<sup>60-63</sup>



**Fig. 9** Equipo portátil de determinación de FE<sub>NO</sub> (NIOX MINO®)

### 3.2.2. Factores asociados a la determinación de $FE_{NO}$

Aunque la evidencia científica es contradictoria parece haber algunos factores que pueden influir en la en la medición y modificar la concentración de  $FE_{NO}$ :

3.2.2.a. Sexo. Múltiples estudios muestran resultados contradictorios respecto a la influencia del sexo en la determinación de  $FE_{NO}$ . El estudio de Olin et al.<sup>64</sup> objetivó al igual que otros estudios<sup>65,66</sup>, valores inferiores de  $FE_{NO}$  en mujeres respecto a los hombres. Esta menor concentración puede deberse entre otros factores a una menor síntesis endógena de  $NO$ ,<sup>67</sup> diferencias en la altura, factor que se asocia al  $FE_{NO}$ <sup>65,68</sup> y a un menor área de superficie de la vía aérea que favorece una disminución en la capacidad de difusión de  $NO$ .<sup>69</sup> La influencia del estado hormonal y el ciclo menstrual han sido estudiados con resultados contradictorios.<sup>70</sup> Sin embargo, la heterogeneidad de las muestras poblacionales así como los diferentes equipos y flujos de espiración utilizados en los estudios hacen que estos datos sean dispares y a veces contradictorios.

3.2.2.b. Edad. La mayoría de los estudios muestran valores de  $FE_{NO}$  superiores a medida que aumenta la edad.<sup>64,65</sup> Se ha observado una asociación entre la edad y los niveles de  $FE_{NO}$  cuando se comparan dos poblaciones de edades extremas,<sup>71</sup> o con significación en el grupo de edad superior a 60 años.<sup>72</sup> Algunos autores postulan el aumento de tamaño de la vía aérea con la edad o cambios en la difusión de  $NO$  como causas.<sup>73</sup>

3.2.2.c. Peso. Es un factor contradictorio y aunque en algunos estudios se ha observado una correlación positiva entre el peso y la concentración de  $FE_{NO}$ <sup>74,75</sup> así como una disminución en pacientes que perdieron peso,<sup>76</sup> no hay estudios poblacionales que demuestren esta asociación en sujetos sanos. Por otro lado sí se ha demostrado un aumento de niveles de  $FE_{NO}$  en pacientes obesos con asma grave de difícil control.<sup>77</sup>

3.2.2.d. Tabaco. Se han demostrado valores de  $FE_{NO}$  inferiores en los individuos fumadores respecto a los no fumadores.<sup>78,79</sup> Incluso se sugiere que la acción inmediata del tabaco previo a la determinación podría incidir sobre el resultado, disminuyendo las concentraciones reales de  $FE_{NO}$ .<sup>80</sup> Estos hallazgos

se han atribuido a la disminución de la actividad de la iNOS en las células epiteliales bronquiales y de eNOS en la células endoteliales por el efecto del tabaco.<sup>81,82</sup>

3.2.2.e. Dieta. Una dieta rica en nitratos puede aumentar las concentraciones de FE<sub>NO</sub> por lo que se recomienda evitarlas en las horas previas.<sup>83</sup>

3.2.2.f. Otros. Otros factores que podrían influir en la medición de FE<sub>NO</sub> son la ingesta de alcohol o café, el ritmo circadiano, infecciones de la vía aérea superior o el ejercicio.<sup>52</sup> Además se recomienda la realización de la medida de FE<sub>NO</sub> previa a la espirometría<sup>52</sup> aunque estudios posteriores no han demostrado una asociación significativa.<sup>84</sup> Por otro lado, diversas enfermedades no respiratorias que presentan en su patogenia alteraciones en la síntesis de NO pueden afectar a la concentración final de FE<sub>NO</sub>. Entre otras, enfermedades renales (glomerulonefritis crónica, insuficiencia renal crónica) o hepáticas (cirrosis hepática y síndrome hepatopulmonar).

### 3.2.3. Valores de referencia de FE<sub>NO</sub>

Diferentes autores han realizado ecuaciones de predicción con las que establecer valores de referencia de FE<sub>NO</sub> en las que han incluido los factores que pueden influir en la medición<sup>65,85</sup> y que han objetivado una gran variabilidad y un bajo valor predictivo, inferior incluso a las ecuaciones sobre valores espirométricos<sup>86</sup> justificado por los múltiples factores de confusión que interfieren en la determinación de FE<sub>NO</sub>. Sin embargo la alta reproductibilidad intrasujeto de la técnica<sup>87</sup> le confiere utilidad para la comparación intrasujeto.<sup>88,89</sup>

Por otro lado en los últimos 10 años varios estudios han mostrado valores de FE<sub>NO</sub> en una población superior a 50 sujetos sanos pero sin embargo solo 3 estaban diseñados para establecer valores de referencia en población sana. Olivieri et al.<sup>90</sup> en una muestra de 204 sanos, no fumadores, no atópicos y con edades entre 19 y 65 años estableció un valor medio de FE<sub>NO</sub> de 10,9 ± 4,7 ppb, y unos valores de referencia entre 3,8 y 19,7 ppb. Travers et al.<sup>66</sup> en una muestra poblacional de 193 individuos sanos mostraron valores de referencia entre 7,8 y 41,1 ppb independientemente de la edad y encontraron valores superiores en

hombres, en individuos con atopia y en no fumadores. Por último y muy recientemente un estudio de 13275 individuos sanos entre 6 y 80 años sitúa el percentil 95 de  $FE_{NO}$  entre 3,5 y 37 ppb.<sup>91</sup> En la población infantil se han demostrado valores entre 15 y 25 ppb, niveles que se elevan con la edad y con la presencia de rinitis y de conjuntivitis.<sup>92</sup> La utilización de equipos de determinación diferentes y los distintos criterios de selección de individuos pueden ser suficientes para explicar las diferencias y los amplios márgenes de los valores de referencia descritos.

Así, ante el escaso valor predictivo de las ecuaciones y los resultados dispares de los valores de referencia algunos autores proponen el uso de punto de corte como Shaw et al.<sup>93</sup> que sugieren un punto de corte de 26 ppb como valor clínicamente significativo al correlacionarse con un recuento de eosinófilos en esputo inducido >2%.

Por todos estos hallazgos, las últimas recomendaciones del 2011 consideran que la presencia de un punto de corte de 25 ppb presenta baja probabilidad de inflamación de la vía aérea y requiere otro diagnóstico alternativo (recomendación fuerte, evidencia moderada).<sup>53</sup>

### **3.3. Técnica de espiración a múltiples flujos: Concentración alveolar de NO ( $CA_{NO}$ )**

#### **3.3.1. Introducción**

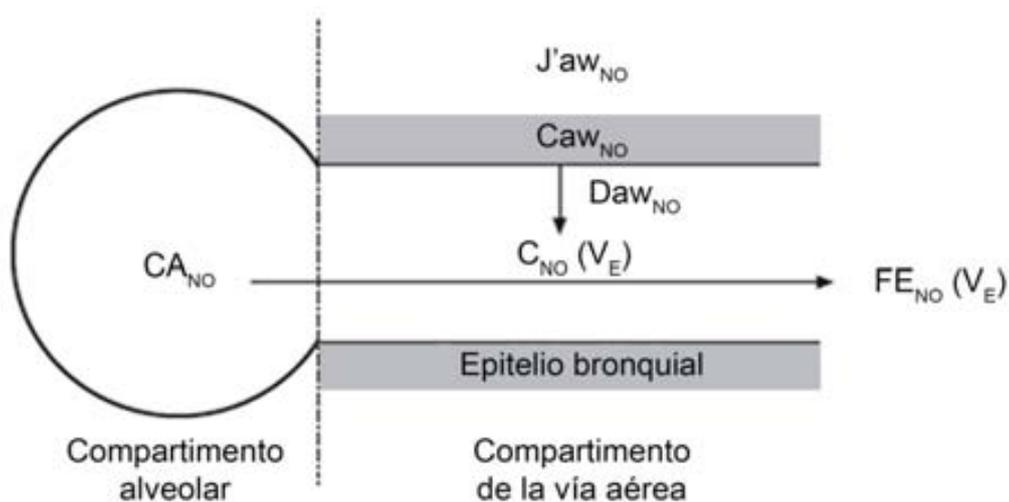
La producción de NO medido en aire espirado procede de múltiples orígenes en el pulmón, como por ejemplo la región alveolar. Esto hace que la concentración de NO en aire espirado siga una curva exponencial, es decir, está inversamente relacionada con el flujo de espiración dependiendo fuertemente de este parámetro. A mayores flujos de espiración el tiempo de contacto de la corriente de aire con la superficie que aporta el NO en la vía aérea se reduce y la concentración del gas es menor.<sup>94</sup> Se han demostrado así flujos de espiración entre 4 y 46 ml/s con concentraciones de  $FE_{NO}$  que varían desde 101,3 a 36,9 respectivamente.<sup>95</sup>

Por lo tanto el NO en aire espirado procede de dos fuentes fundamentalmente: tiene un origen bronquial (vía aérea grande), donde el NO medido en aire espirado difunde desde la pared de la vía aérea, y un origen en la vía aérea pequeña y región alveolar donde hay un estado de equilibrio.

### 3.3.2. Metodología

#### 3.3.2.a. Modelos de medición

a1. *Modelo bicompartimental*. Durante las últimas décadas hasta la actualidad se ha intensificado el estudio de los cambios dinámicos del NO en la vía aérea no solo bronquial sino hasta las regiones más distales del pulmón. Este conocimiento ha permitido el desarrollo de complejos modelos matemáticos y parámetros que permiten cuantificar estos cambios simplificándose en el denominado *modelo bicompartimental*. Este modelo asume que todos los alveolos se unen en un compartimento en forma de globo (compartimento alveolar) y el árbol bronquial en otro en forma de palo (compartimento bronquial).<sup>96,97</sup> En el *modelo bicompartimental* la relación entre el NO y el flujo de espiración es lineal y por encima de un umbral de 50 ml/s en adultos sanos. Cada compartimento está determinado por los siguientes parámetros.



**Fig. 10** *Modelo bicompartimental*.  $J'_{aw_{NO}}$ : flujo de NO máximo en la vía aérea grande;  $C_{aw_{NO}}$ : concentración de NO en la mucosa de la vía aérea;  $D_{aw_{NO}}$ : capacidad de difusión de NO de la vía aérea;  $CA_{NO}$ : concentración de NO en el alveolo;  $C_{NO}(V_E)$ : concentración de NO en fase gaseosa en la región de la vía aérea;  $FE_{NO}(V_E)$ : fracción espirada de NO. (Adaptado de Tsoukias NM et al. *J Appl Physiol* 2001<sup>97</sup>).

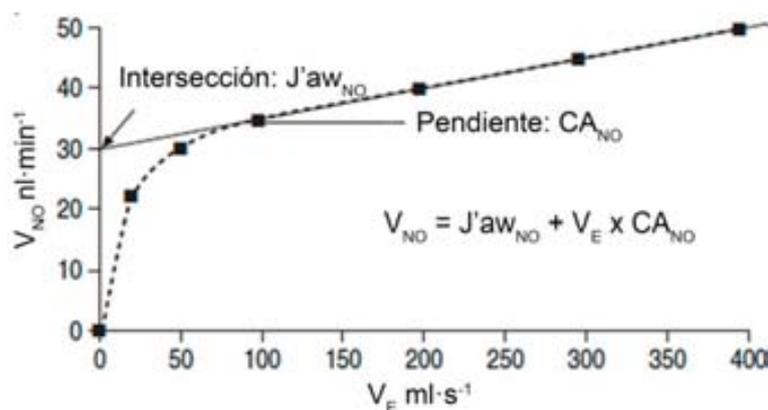
El compartimento de la vía aérea está determinado por:

- El flujo de NO bronquial, denominado  $J'_{awNO}$  (pl/s), representa el flujo de NO máximo en la vía aérea grande (116 generaciones bronquiales). Es el producto de la concentración de NO en la mucosa de la vía aérea ( $C_{awNO}$ ) y la capacidad de difusión de NO de la vía aérea ( $D_{awNO}$ , ppb/s).

- La capacidad de difusión de NO a la luz bronquial,  $D_{awNO}$ . Según la Ley de Fick, la producción de NO en la vía aérea es proporcional a la diferencia entre la concentración existente en la luz y la concentración en la pared bronquial. A su vez la  $D_{awNO}$  dependerá de la concentración de NO en la pared bronquial.<sup>98</sup>

El compartimento alveolar está determinado por el tercer parámetro independiente del flujo, que es la concentración de NO en el alveolo,  $C_{A_{NO}}$  (ppb) que sufre modificaciones de forma dinámica y cíclica con la respiración y que refleja el equilibrio entre el NO producido localmente y el que se difunde a la vía aérea.

La producción de NO desde su origen en el alveolo es conducido por la vía aérea durante la espiración de tal forma que la concentración final de NO en la vía aérea grande será la suma del transporte longitudinal desde la luz alveolar y la concentración del transporte trasversal desde la pared de la vía aérea. Con la utilización de este modelo y sus parámetros se puede predecir la concentración de NO a cualquier flujo espiratorio. Con el fin de facilitar esos cálculos se desarrollaron posteriormente ecuaciones matemáticas adecuadas para el *modelo bicompartimental* que estiman de forma reproducible y fiable los parámetros requeridos para su uso práctico. En la descripción inicial del modelo se utilizaron 2 flujos de espiración, entre 100 y 500 ml/s y se calcularon los parámetros  $J'_{awNO}$  y  $C_{A_{NO}}$  que se obtienen de contrastar la concentración de NO para cada flujo utilizado ( $V_{NO}$ , pl/s) con el flujo espiratorio de cada espiración ( $V_E$ , ml/s) de tal forma que la pendiente de la recta resultante es  $C_{A_{NO}}$  y la intersección es  $J'_{awNO}$ .<sup>97,99</sup> La ecuación de Silkoff et al. permitió la determinación de la difusión de NO en la vía aérea: ( $D_{awNO} = J'_{awNO} \times C_{A_{NO}}$ ).<sup>99</sup>



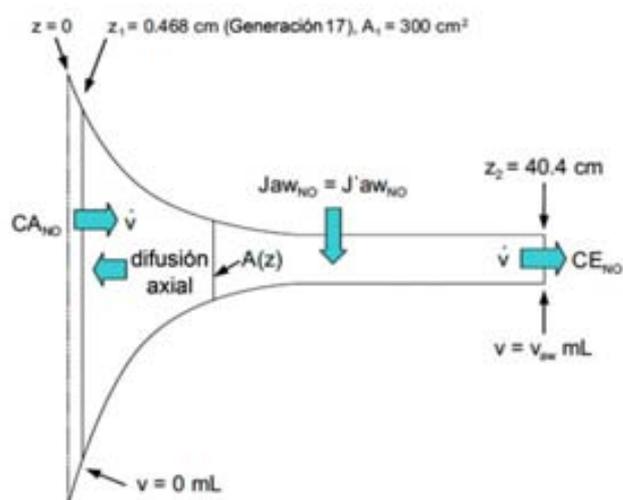
**Fig. 11** Aplicación del *modelo bicompartimental*.  $J'aw_{NO}$ : flujo de NO máximo en la vía aérea grande;  $Caw_{NO}$ : concentración de NO en la mucosa de la vía aérea;  $CA_{NO}$ : concentración de NO en el alveolo;  $V_{NO}$ : concentración de NO para cada flujo utilizado;  $V_E$ : flujo espiratorio.

Sobre este mismo modelo otros autores posteriormente desarrollaron nuevas fórmulas y ecuaciones con ligeras modificaciones en cuanto a los flujos utilizados pero con el mismo fundamento para caracterizar la producción de NO y el intercambio en la vía respiratoria<sup>100,101</sup> que fueron finalmente revisados por George et al.<sup>102</sup>

a2. *Modelo axial*. Posteriormente a la introducción del *modelo bicompartimental* según las ecuaciones de Silkoff y Tsoukias, otros autores como Shin y George han demostrado la incorporación de la *difusión axial* en un modelo unidimensional de intercambio gaseoso pulmonar en forma de trompeta. Este modelo predice una *back diffusion* de NO desde la vía aérea hacia la región alveolar, contraria a la dirección de espiración, comportando una pérdida significativa de NO en el aire espirado.<sup>103</sup> El resultado es una subestimación del flujo máximo de NO de la vía aérea y de la concentración de NO en la pared de la vía aérea pudiendo dar falsamente valores elevados de  $CA_{NO}$  e infraestimar valores de  $J'aw_{NO}$ . Ésta sólo será una pérdida significativa si la producción de NO es considerablemente pequeña en la vía aérea más distal. La incorporación de este método sobre el *modelo bicompartimental* incluye ecuaciones y algoritmos modificados más complejos. Así para tener en cuenta la *difusión axial* se añade un factor de corrección: en la determinación de  $CA_{NO}$  se añade  $J'aw_{NO}/0.53$  y en la determinación de  $J'aw_{NO}$  éste se multiplica por 1.7.<sup>104,105</sup>

a.3. *Modelo bicompartimental-axial*. Posteriormente Condorelli et al.<sup>106</sup> desarrollaron un algoritmo que caracteriza el intercambio del NO mediante el *modelo bicompartimental* en forma de trompeta e incluyendo la *difusión axial* (*trumpet model with axial diffusion [TMAD]*). Este modelo fue probado en sujetos sanos mediante flujos de 100, 150, 200 y 250 ml/s. En comparación con el *modelo bicompartimental* simple se obtuvieron valores de  $J'_{aw_{NO}}$  superiores y valores de  $CA_{NO}$  inferiores. El nuevo modelo mostró que el valor de NO en la vía aérea proximal es mayor de lo predicho con anterioridad y que en los bronquiolos y alveolos se acerca a 0.<sup>106</sup> (Fig. 12)

En su conjunto todos estos modelos demuestran que el NO en aire espirado varía según el flujo de espiración de tal forma que a mayores flujos el tiempo de contacto de la corriente de aire con la superficie por la que difunde el NO en la vía aérea se reduce y la concentración del gas es menor. Desde el punto de vista práctico la determinación de  $FE_{NO}$  según las recomendaciones internacionales y la técnica a un solo flujo de 50ml/s es un *sustituto fiable* de  $J'_{aw_{NO}}$  para la medición del NO procedente del árbol bronquial. Por otro lado la determinación de  $CA_{NO}$  permite una aproximación a la vía aérea pequeña y a la región alveolar.



**Fig. 12** Aplicación del *modelo axial-trompeta*.  $A(z)$ : la sección transversal del área en la posición  $z$ ;  $CA_{NO}$ : concentración de NO en aire alveolar,  $CE_{NO}$ : concentración de NO en el aire espirado;  $J_{aw_{NO}}$ : flujo de NO que se añade a la luz desde la pared de la vía aérea;  $J'_{aw_{NO}}$ : flujo de NO máximo en la vía aérea;  $v$ : flujo de NO (hacia la boca),  $v_{aw}$  = volumen de la vía aérea;  $z_2$  = posición boca. (Adaptado de Condorelli P et al. *Journal of applied physiology* 2007<sup>106</sup>).

3.3.2.b. La técnica. La técnica es similar a la que se utiliza para la determinación de  $FE_{NO}$  pero requiere un sensor de quimioluminiscencia. La diferencia entre las dos técnicas se encuentra en la necesidad de realizar la espiración a diferentes flujos y no solo a 50 ml/s, el utilizado para la determinación de  $FE_{NO}$ . El margen de los flujos debe ser entre 10 y 500 ml/s y se elegirán entre 3 o 4 flujos según la ecuación utilizada para el cálculo. El trazador nos mostrará la concentración de NO para cada flujo espirado ( $V_{NO}$ , pl/s). A partir de aquí y según las ecuaciones antes descritas se puede calcular la  $J'_{awNO}$ , la  $CA_{NO}$  y la  $Daw_{NO}$ .<sup>52</sup>

### 3.3.3. Valores de referencia de $CA_{NO}$

Aunque sí hay estudios que aportan valores de  $CA_{NO}$  en diferentes enfermedades, como en el asma y en la EPID, hay escasa literatura que muestre valores de referencia en población sana. Hogman et al.<sup>107</sup> mostró valores entre 0 y 4 ppb y Gelb et al.<sup>72</sup> rangos entre 0,8 y 6,6 ppb y diferencias significativas con la edad.

## 4. Aplicación clínica de NO en aire espirado en la enfermedad respiratoria

### 4.1. Asma y $FE_{NO}$

#### 4.1.1. El asma: enfermedad inflamatoria

El asma se define como una *“enfermedad inflamatoria crónica en cuya patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos y que cursa con hiperrespuesta bronquial y obstrucción variable al flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente, y que en último término es causante de los síntomas”*. Sin embargo, la relación entre los procesos que intervienen así como entre la intensidad de la inflamación y la gravedad de la enfermedad no están bien definidas y puede haber diferencias fisiopatológicas entre los diferentes fenotipos de asma.<sup>108,109</sup>

Desde el punto de vista patogénico, en la inflamación crónica del asma están implicadas múltiples células que se encuentran aumentadas en la vía respiratoria sobre la cual interaccionan (*mastocitos* y *macrófagos*; *linfocitos Th2* y *Linfocitos-T Nk*, *eosinófilos* y *neutrófilos* en algunos pacientes con asma grave) y que mediante la acción de diferentes mediadores de inflamación (*quimiocinas*, *cisteinileucotrienos*, *interleucinas*)<sup>110</sup> dan lugar a un conjunto de reacciones, activaciones y mecanismos de regulación responsables en definitiva del proceso inflamatorio (incluido el remodelado bronquial), la obstrucción al flujo aéreo y la hiperreactividad bronquial.

#### 4.1.2. Síntesis de NO en el asma: iNOS

En el estudio inicial de Alving et al.<sup>44</sup> los pacientes con atopia y asma que no habían recibido nunca tratamiento corticoide presentaban concentraciones superiores de FE<sub>NO</sub> respecto a sujetos sanos. Estos hallazgos tienen diferentes explicaciones.

En los pacientes con asma con y sin atopia existe una sobrerregulación de la iNOS en el epitelio bronquial<sup>111</sup> que se correlaciona con los niveles de FE<sub>NO</sub> en pacientes,<sup>112</sup> y una menor concentración de iNOS en pacientes tratados con corticoides.<sup>111</sup> El aumento de expresión de la iNOS en el epitelio de la vía aérea está regulado por un sistema alternativo no dependiente del *factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas* (NF- $\kappa$ ), mediado por citocinas inflamatorias producidas por los linfocitos Th2. Estas citoquinas son las responsables mediante factores de transcripción como el STAT-6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) de estimular la expresión de iNOS epitelial en la respuesta inflamatoria del asma.<sup>113,114</sup> Se ha descrito además la presencia de polimorfismos del gen de la iNOS asociados a una mayor gravedad de la enfermedad, mayor eosinofilia sanguínea y elevación de los niveles de NO circulante<sup>115</sup> y de FE<sub>NO</sub><sup>116</sup>. En pacientes con asma grave y en sujetos sanos la regulación en la formación de NO se realiza también por la disponibilidad del sustrato L-arginina.<sup>117,118</sup>

### 4.1.3. FE<sub>NO</sub> como marcador inflamatorio

La asociación entre FE<sub>NO</sub> e inflamación en los pacientes con asma se basa fundamentalmente en la evidencia científica que muestra la asociación entre la determinación de FE<sub>NO</sub> y la inflamación presente en el asma.

#### 4.1.3.a. FE<sub>NO</sub> y la inflamación eosinofílica

a1. FE<sub>NO</sub> y esputo inducido. Los primeros estudios dirigidos a evaluar el FE<sub>NO</sub> como marcador de inflamación en el asma lo compararon con el esputo inducido (EI) y observaron una buena correlación entre las dos determinaciones en pacientes con asma estable en tratamiento únicamente con *β2 agonistas*.<sup>119</sup> Los pacientes que tuvieron una exacerbación leve ante la reducción del tratamiento corticoide presentaron aumento de eosinófilos en el esputo inducido y de FE<sub>NO</sub> que se correlacionaba con el cambio en el FEV<sub>1</sub>% y el aumento del tratamiento de rescate broncodilatador.<sup>120</sup>

Berry et al.<sup>121</sup> mostraron una correlación significativa aunque moderada y no lineal entre FE<sub>NO</sub> y eosinofilia en 56 adultos con asma independientemente de factores de confusión como la edad, el sexo, la presencia de atopia, estado funcional respiratorio o tabaquismo. Por otro lado Beerlyne et al.<sup>122</sup> encontraron correlación positiva en pacientes con sospecha clínica de asma que nunca habían recibido tratamiento corticoideo, en pacientes con bronquitis eosinofílica y sujetos atópicos en consonancia con otros estudios con los mismos resultados.<sup>123-125</sup>

a2. FE<sub>NO</sub> y eosinofilia en sangre. Se ha demostrado en múltiples estudios en adultos y niños correlación positiva entre eosinofilia en sangre y valores elevados de FE<sub>NO</sub> tanto en pacientes con asma como en individuos con atopia.<sup>126,127</sup>

a3. FE<sub>NO</sub> y la biopsia bronquial. La biopsia bronquial ha permitido mostrar la utilidad del FE<sub>NO</sub> para predecir persistencia de eosinofilia en asma severa refractaria a tratamiento. Valores de FE<sub>NO</sub> superiores a 73 ppb presentaron una

sensibilidad y especificidad de 1 en identificar eosinofilia persistente en mucosa bronquial.<sup>128</sup>

Además, en respuesta al tratamiento corticoide se observó una reducción significativa de la inmunorreactividad de los eosinófilos de la submucosa bronquial que se asoció a una disminución de los valores de FE<sub>NO</sub> y mejora de los datos espirométricos.<sup>129</sup>

a4. FE<sub>NO</sub> y el lavado broncoalveolar (LBA). Hay múltiples estudios que correlacionan la eosinofilia del LBA con la determinación de FE<sub>NO</sub><sup>129</sup> incluso mejor que con la eosinofilia del esputo inducido, sobre todo después del tratamiento corticoide.<sup>130</sup> Además la determinación de FE<sub>NO</sub> presenta una alta sensibilidad y especificidad como método diagnóstico de inflamación en la vía aérea.<sup>131,132</sup>

4.1.3.b. FE<sub>NO</sub> y la inflamación neutrofílica. Un 50% de los pacientes con asma pueden presentar una inflamación no eosinofílica.<sup>133</sup> Lo que sugiere la presencia de un subgrupo de pacientes con síntomas clínicos de asma pero con predominio de inflamación neutrofílica en la vía aérea y sin respuesta al tratamiento con corticoides.<sup>133,134</sup> La presencia de neutrofilia se ha mostrado sobre todo en el asma grave<sup>134</sup> comparado con individuos sanos y con pacientes con asma leve. La asociación entre inflamación neutrofílica y gravedad del asma podría estar relacionada con la mayor producción de nitritos y de L-citrulina en vez de L-arginina con la consiguiente disminución de NO<sup>135</sup> por lo que los pacientes con inflamación neutrofílica presentan valores de FE<sub>NO</sub> disminuídos.

Los pacientes asmáticos con hábito tabáquico activo presentan también una inflamación neutrofílica y por lo tanto la determinación de FE<sub>NO</sub> tendría un uso limitado.<sup>136,137</sup>

4.1.3.c. FE<sub>NO</sub> y otros marcadores de actividad en el asma. Se ha demostrado la ausencia de correlación entre FE<sub>NO</sub> y el estado funcional<sup>138</sup> en pacientes asmáticos recién diagnosticados de asma y sin tratamiento previo con corticoides. Se observó en pacientes con asma moderada/grave y síntomas frecuentes con requerimiento de tratamiento con broncodilatador B2, niveles

aumentados de  $FE_{NO}$ , mientras que los datos espirométricos presentaban escasa sensibilidad para detectar la falta de control del asma.<sup>44,45</sup> Esta falta de asociación fue confirmada por Langley et al.<sup>139</sup> que no encontró correlación entre  $FE_{NO}$  y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo ( $FEV_1\%$ ) en pacientes con asma de diferente gravedad.<sup>139</sup> Otros estudios muestran una positiva pero débil asociación entre  $FE_{NO}$  y  $FEV_1\%$ .<sup>123</sup>

Aunque débil si se ha demostrado correlación entre  $FE_{NO}$  y otras medidas de función pulmonar diferentes al  $FEV_1\%$  como es el *volumen residual* (VR) y los *mesoflujos*. Lo que sugiere relación entre el  $FE_{NO}$  y el atrapamiento aéreo y la enfermedad de pequeña vía aérea.

Aunque con resultados contradictorios, se ha demostrado una correlación entre la determinación de  $FE_{NO}$  y la presencia de *hiperreactividad bronquial* medida por la concentración de metacolina a la que se detecta un descenso del 20% del  $FEV_1\%$  basal ( $PD_{20}$ ), en pacientes jóvenes con asma atópica y no atópica para inhalación con histamina.<sup>119,139</sup>

#### 4.1.4. $FE_{NO}$ y atopia

La atopia, característica frecuente en el asma, es una condición determinada genéticamente sobre la presentación clínica de los individuos respondedores a *anticuerpos IgE*. Los individuos sanos están influenciados por la tendencia personal o familiar a producir *IgE* en respuesta a bajas dosis de alérgenos y puede hacer desencadenar síntomas típicos de asma, rinoconjuntivitis, dermatitis o eczema. Diferenciar a los pacientes atópicos de los no atópicos influirá en el impacto de las consecuencias terapéuticas.

La determinación de  $FE_{NO}$  presenta una fuerte correlación con la presencia de atopia en pacientes con y sin asma.

Los pacientes sanos con atopia presentan valores de  $FE_{NO}$  superiores respecto a individuos no atópicos estableciendo una asociación independiente entre la inflamación y la atopia sin presencia de asma, tanto en adultos como en niños<sup>140,141</sup> y respecto a pacientes con asma sin atopia<sup>142</sup>. La relación entre  $FE_{NO}$

y asma atópica además se ha observado ser dosis creciente, según el mayor número de reacciones cutáneas al alérgeno.<sup>142,143</sup>

En los pacientes atópicos no asmáticos el FE<sub>NO</sub> podría ser utilizado como predictor de futuro desarrollo de asma y discriminar entre población atópica o asmática o incluso dentro de población asmática aquella con fenotipo atópico asociado.<sup>144</sup>

#### 4.1.5. Utilidad de FE<sub>NO</sub> en el asma

4.1.5.a. FE<sub>NO</sub> en el diagnóstico de asma. Las herramientas utilizadas habitualmente en el diagnóstico de asma como la espirometría y la prueba broncodilatadora son variables funcionales y no inflamatorias, que presentan variabilidad en el tiempo, sensibilidad baja sobre todo en aquellos sujetos con enfermedad moderada y escasa correlación con los síntomas por lo que su utilidad clínica es limitada.<sup>145,146</sup>

Los primeros datos sobre el uso del FE<sub>NO</sub> en el cribaje de pacientes con asma, mostraron una buena capacidad discriminatoria aunque con resultados dispares debido al punto de corte de FE<sub>NO</sub> óptimo seleccionado y por diferentes definiciones de asma o diferentes flujos de espiración utilizados en la técnica.

El primer estudio fue el de Dupont et al.<sup>147</sup> en el que a puntos de corte mayores aumentaba la especificidad siendo del 100% para un punto de corte de 20 ppb. En otros estudios como el poblacional de Henriksen et al.<sup>148</sup> y el de Deykin et al.<sup>149</sup> se observaron puntos de corte tan dispares como 8 o 30 ppb, respectivamente.<sup>149</sup>

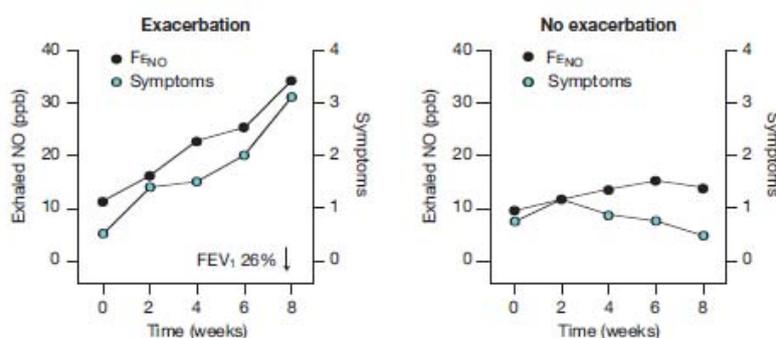
El estudio de Smith et al.<sup>150</sup> demostró que la presencia de una concentración de FE<sub>NO</sub> >20 ppb presentaba una sensibilidad de 88% para el diagnóstico de asma en pacientes con sospecha clínica sin antecedentes de tratamiento con corticoides. Además la determinación de FE<sub>NO</sub> presentó mayor capacidad diagnóstica en comparación con las pruebas convencionalmente utilizadas como son la prueba *broncodilatadora positiva e hiperreactividad*

*bronquial*. Posteriormente otros estudios como el de Heffler et al.<sup>151</sup> corroboraron los hallazgos de Smith et al.

#### 4.1.5.b. FE<sub>NO</sub> en el control del asma

b.1. Predicción de exacerbaciones. La determinación de FE<sub>NO</sub> puede ser útil en la predicción de la exacerbación asmática. La presencia de eosinofilia en el esputo inducido y niveles elevados de FE<sub>NO</sub> se ha relacionado con la presencia de exacerbaciones en pacientes asmáticos en tratamiento con corticoide inhalado.<sup>120,152,153</sup> (Fig. 13)

Diversos estudios aleatorizados a doble ciego que evalúan la utilidad del FE<sub>NO</sub> en el manejo del control del asma<sup>154-156</sup>, coinciden en la utilidad de FE<sub>NO</sub> en predecir y detectar la presencia de exacerbaciones. En comparación con los métodos convencionales de control (síntomas, presencia de hiperreactividad bronquial, función pulmonar y esputo inducido) se ha demostrado que la presencia de valores de FE<sub>NO</sub> elevados precede a estas medidas y por lo tanto puede ser un marcador precoz de predicción de exacerbación.<sup>157,158</sup>



**Fig. 13** FE<sub>NO</sub> en pacientes con exacerbación asmática. (Adaptado de Jatakanon A et al. *AJRCCM* 2000<sup>120</sup>).

La mayoría de estos estudios muestran como el grupo de pacientes controlado con la determinación de FE<sub>NO</sub> presentó menor número de exacerbaciones y requirió menor dosis de tratamiento con corticoides para mantener el control del asma que el grupo controlado de por los métodos convencionales.<sup>93,154-156</sup> Algunos resultados contradictorios como el estudio de

Szeffler et al.<sup>159</sup> no han mostrado sin embargo diferencias entre la utilidad de FE<sub>NO</sub> o la clínica.

Posiblemente la mayoría de los estudios que utilizan el FE<sub>NO</sub> para el control clínico y predicción de exacerbaciones, establecen valores de corte definidos a priori para la población estudiada y tienen un importante grado de heterogeneidad clínica (diferente definición de exacerbación, duración del estudio y variabilidad en el punto de corte de FE<sub>NO</sub>), lo que justifica la necesidad de establecer valores intraindividuo que permitan comparar diferentes situaciones clínicas respecto al valor basal en el mismo paciente.<sup>158</sup>

b.2. Monitorización de la respuesta terapéutica. El tratamiento antiinflamatorio con corticoides inhalados<sup>160,161</sup> y sistémicos<sup>162-164</sup>, reduce las concentraciones de FE<sub>NO</sub> de forma rápida, y dosis dependiente permitiendo su utilidad en el control del asma.<sup>165</sup> Es un buen predictor de respuesta al tratamiento corticoideo<sup>166</sup> ya que es útil para identificar a los pacientes que tienen probabilidad de responder al tratamiento antiinflamatorio.<sup>154,167</sup>

La falta de disminución de los niveles de FE<sub>NO</sub> en pacientes asmáticos en tratamiento con corticoide permite además detectar en la práctica clínica la necesidad de optimizar el tratamiento, evaluar el cumplimiento y detectar la resistencia a los esteroides.<sup>168</sup>

## **4.2. Síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño (SAHS) y el NO en aire espirado**

### **4.2.1. Introducción, concepto y definición**

El síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño (SAHS) es una enfermedad muy prevalente que afecta a entre el 4 y 6% de los varones y a entre el 2 y 4% de las mujeres en la población adulta, aunque se considera que aproximadamente el 24% de los hombres y el 9% de las mujeres en la población general presenta un trastorno respiratorio del sueño con o sin clínica asociada, lo que supone un problema de salud pública y coste económico.<sup>169-171</sup>

El SAHS se caracteriza por la presencia durante el sueño de episodios repetidos de disminución o interrupción del flujo oronasal debido al colapso parcial (hipoapnea) o completo (apnea) de la vía aérea superior. Estos episodios se acompañan de: desaturaciones cíclicas nocturnas en forma de hipoxia/reoxigenación (hipoxia intermitente crónica), aumento de la actividad neurovegetativa y cambios en la presión intrapleural.<sup>172</sup> (Fig. 14) La hipoxia intermitente y el aumento de la actividad simpática favorecen la aterogénesis por diferentes vías patogénicas<sup>173</sup> asociando el SAHS a un mayor riesgo de desarrollar hipertensión arterial (HTA)<sup>174-176</sup>, síndrome metabólico<sup>177</sup>, enfermedad cardiovascular<sup>178</sup>, cerebrovascular<sup>179,180</sup> y aumento de la mortalidad vascular y global.<sup>181-184</sup>

Por otro lado y como consecuencia de los eventos respiratorios nocturnos pueden producirse despertares transitorios corticales (*arousals*) que fragmentan la arquitectura del sueño dando lugar a sueño no reparador.<sup>185,186</sup>

La perpetuación en el tiempo de este conjunto de fenómenos de forma crónica es responsable del cuadro clínico del SAHS caracterizado por ronquidos, pausas respiratorias nocturnas, excesiva somnolencia diurna<sup>187</sup>, alteración de las funciones cognitivas (falta de concentración, pérdida de memoria, dificultad de coordinación)<sup>188</sup>, deterioro de la calidad de vida<sup>188</sup> y aumento de la tasa de accidentes de tráfico y laboral.<sup>189,190</sup>

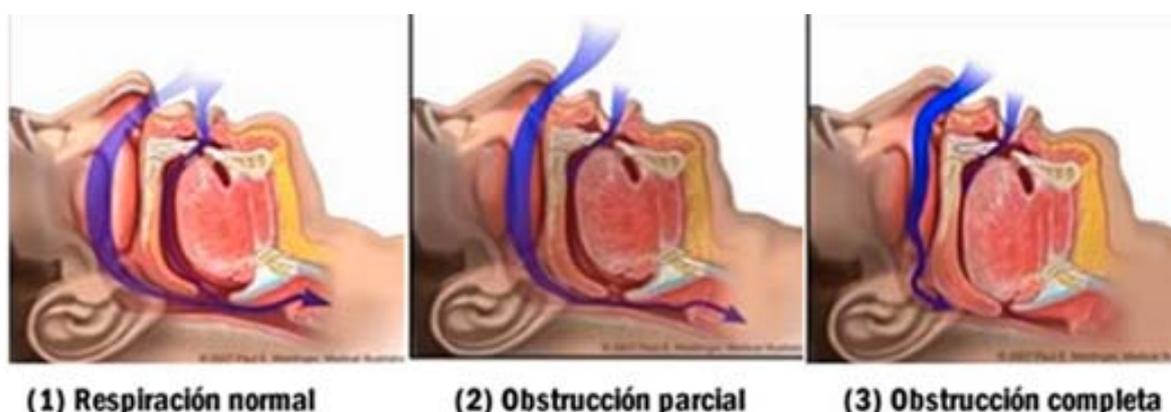


Fig. 14 Representación de la apnea en el SAHS.

Los factores de riesgo que predisponen el desarrollo de SAHS son entre otros, la edad, el género masculino y la obesidad, principal factor de riesgo en la población adulta. Otros factores como el alcohol, el tabaquismo o la posición en decúbito supino lo agravan, y la presencia de alteraciones craneofaciales, endocrinopatías (acromegalia, hipotiroidismo), la menopausia y factores genéticos aumentan la probabilidad.<sup>172</sup>

Para el diagnóstico de SAHS se requiere la realización de un estudio nocturno, siendo la polisomnografía convencional (PSG) el método de referencia, que mediante el registro de variables neurofisiológicas, respiratorias y cardíacas permite analizar las fases de sueño, la detección de los eventos respiratorios nocturnos, los episodios de desaturación arterial y los despertares transitorios.<sup>191-193</sup>

La poligrafía respiratoria (PR) es un método igualmente válido que permite el diagnóstico de hasta un 80% de los pacientes con sospecha clínica de SAHS; sus ventajas sobre la PSG son la sencillez del montaje y de la interpretación. No permite, sin embargo, el estudio de las variables neurofisiológicas por lo que su uso como método diagnóstico requiere de una cuidadosa selección del paciente.<sup>192</sup>

El diagnóstico de SAHS se realiza mediante una historia clínica sugestiva y un estudio nocturno compatible (PSG o PR). Para ello se ha definido la presencia y la severidad del SAHS mediante el índice de apnea-hipoapnea (IAH), que es la suma de apneas e hipoapneas que se realizan divididas por las horas de sueño (PSG) o de estudio (PR). Los criterios para estandarizar la evaluación de los eventos respiratorios establecen la siguiente clasificación del SAHS: un IAH < 5 no es patológico; SAHS leve (IAH: 5-14,9), SAHS moderado (IAH: 15-29,9) y SAHS grave (IAH > 30).<sup>172,193</sup>

El tratamiento del SAHS grave o clínicamente muy sintomático fue descrito por primera vez en 1981. Se realiza mediante un equipo de aplicación nocturna de presión positiva continua en la vía aérea superior (CPAP) por vía nasal, para contrarrestar las fuerzas de oclusión aumentadas en el SAHS. El objetivo del tratamiento es evitar el colapso de la vía aérea superior y eliminar los eventos

respiratorios nocturnos, la desaturación arterial nocturna, normalizar el IAH y la eficiencia y arquitectura del sueño, y en consecuencia, tratar los síntomas del paciente, mejorar la calidad de sueño y de vida y disminuir el riesgo de complicaciones asociadas.<sup>172,194,195</sup> El tratamiento con CPAP ha demostrado ser efectivo, mejorando la clínica, disminuyendo las cifras de tensión arterial,<sup>196</sup> la resistencia a la insulina,<sup>197</sup> y la mortalidad cardiovascular.<sup>181</sup>

La indicación de tratamiento con CPAP se establece según la normativa en aquellos pacientes con un SAHS grave (IAH>30) o un SAHS moderado (IAH 15-29,9) con síntomas y/o comorbilidad importante.<sup>4,192</sup> En los pacientes con SAHS menos grave se recomienda individualizar la indicación. Hay evidencia científica que demuestra que un IAH>15 comporta un mayor riesgo cardiovascular independientemente de los síntomas, aumentando claramente este riesgo si el IAH es >30.<sup>181,183</sup>

#### **4.2.2. Etiopatogenia del SAHS**

El mecanismo etiopatogénico del SAHS es multifactorial y ha sido objeto de una amplia investigación en la última década. Se han identificado una serie de factores que contribuyen en último término al aumento de la inestabilidad y la colapsabilidad de la vía aérea superior (VAS).<sup>198</sup> (Fig. 15)

4.2.2.a. Factores anatómicos: LA VAS de los pacientes con SAHS es más pequeña en su luz, estrecha lateralmente, sobre todo en la región retropalatal y de mayor longitud, características anatómicas que favorecen el colapso y que se asocian a la gravedad del SAHS.<sup>199,200</sup> Presentan mayor cantidad de tejido blando en proporción al espacio disponible, sobre todo de tejido muscular o en las mujeres, de predominio graso.<sup>201</sup>

4.2.2.b. Factores mecánicos: La actividad de los músculos dilatadores de la faringe, sobre todo del hipogloso, fundamental para mantener la estabilidad de la VAS, disminuye durante el sueño favoreciendo el desarrollo de colapso de la misma en pacientes con SAHS.<sup>202</sup>

4.2.2.c. Factores neurológicos: El control de los músculos dilatadores de la VAS se realiza a través de una serie de vías neurógenas que pueden encontrarse alteradas en el SAHS y favorecer el colapso de la VAS.<sup>203</sup>

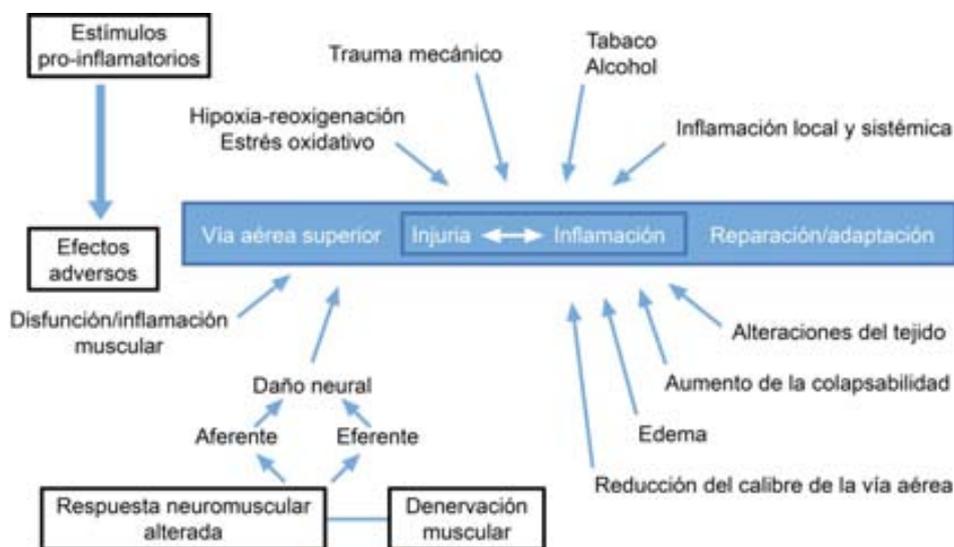
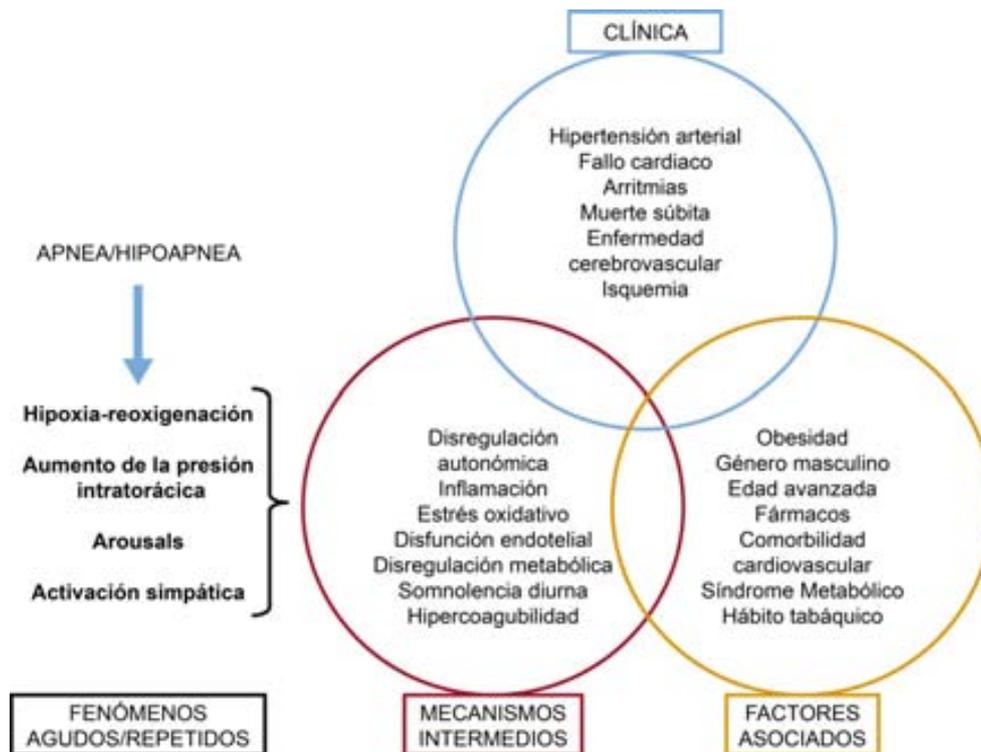


Fig. 15 Mecanismos etiopatogénicos del SAHS

El colapso repetido de la VAS condiciona episodios de hipoxia-reoxigenación, despertares nocturnos transitorios (*arousals*), aumento de la presión intratorácica negativa y un aumento de la actividad neurovegetativa y del estado simpático.<sup>121</sup> Estos eventos agudos nocturnos repetitivos cada noche de forma crónica favorecen la activación de diferentes mecanismos intermedios como son la *disregulación autonómica y metabólica*, la inflamación, *el estrés oxidativo*, la *disfunción endotelial* y la *hipercoagulabilidad* que intervienen como factores patogénicos multifactoriales en el desarrollo de arteriosclerosis y enfermedad cardiovascular (hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares, arritmias, insuficiencia cardíaca crónica y mortalidad cardiovascular).<sup>176,181,182</sup> La interacción de estos mecanismos con diferentes factores de riesgo individuales (género masculino, obesidad, tabaquismo o perimenopausia, o la presencia de síndrome metabólico, resistencia a la insulina e hiperlipidemia)<sup>204,205</sup> pueden dar lugar a los diferentes fenotipos individuales de pacientes con SAHS.<sup>206</sup> (Fig. 16)



**Fig. 16** Interacciones patofisiológicas entre SAHS, mecanismos predisponentes a riesgo cardiovascular y enfermedad cardiovascular. (Adaptado de *Caples SM, et al. Sleep 2007*).

#### 4.2.3. Mecanismos implicados en la disfunción endotelial.

La hipoxia intermitente es el elemento fundamental que favorece la producción de mecanismos intermedios relacionados entre sí y que en última instancia favorecen la disfunción endotelial, el desarrollo de arteriosclerosis y el riesgo cardiovascular. Se describirán brevemente cada uno de estos mecanismos haciendo hincapié en la inflamación y en el estrés oxidativo, relacionados con el NO.

##### 4.2.3.a. Inflamación (Fig. 17)

###### a1. Inflamación local

a1.a. Mecanismos. El SAHS se caracteriza por la presencia de un proceso inflamatorio local, que afecta a la VAS y a la vía respiratoria bronquial. Los principales mecanismos implicados son:

- Episodios de *hipoxia-reoxigenación*. Los episodios de cierre y apertura repetitiva de la VAS favorecen la producción de episodios de *hipoxia-reoxigenación*, los cuales desencadenan la liberación de radicales libres, estrés oxidativo y daño endotelial. Se liberan también mediadores inflamatorios sistémicos y locales en la propia vía aérea que producirán el proceso inflamatorio local.<sup>206</sup>

- La *colapsabilidad de la VAS*. La presión negativa que se asocia al inicio de la inspiración favorece una disminución del lumen de la VAS y un aumento de la resistencia al flujo. Este mecanismo persistente y repetido en el tiempo sobre una VAS de mayor resistencia, requiere de una mayor presión negativa inspiratoria lo que favorece la obstrucción de la VAS y la colapsabilidad. Como consecuencia se generan alteraciones estructurales y funcionales locales que dan lugar a un proceso inflamatorio local en la VAS, la cual favorece aún más la obstrucción de la VAS y promueve la disfunción neuromuscular.<sup>207-209</sup> La pérdida de la sensibilidad faríngea podría alterar el reflejo de inspiración de la VAS en respuesta al aumento de presión intraluminal negativa, lo que aumenta la *colapsabilidad de la VAS*.<sup>208</sup>

- *Trauma mecánico*. El estrés mecánico local que se desarrolla secundariamente a la oclusión repetida de la VAS, al ronquido, la vibración y el colapso durante las apneas provoca daño tisular e inflamación local.<sup>208</sup>

En el estudio de Puig et al.<sup>210</sup> se demuestra como la aplicación de un estímulo vibratorio similar al ronquido, puede favorecer una respuesta inflamatoria en las células del epitelio bronquial mediante la cascada inflamatoria de la interleucina-8 (IL-8). Almendros et al.<sup>211</sup> demostraron en un modelo animal agudo de SAHS, una sobreexpresión génica de mediadores inflamatorios como la proteína inflamatoria MIP-2, TNF- $\alpha$ , la interleucina-1b y la P-selectina en el tejido laríngeo, con resultados similares en el tejido de paladar blando. Estos hallazgos podrían explicar el predominante efecto del colapso, cierre y reapertura de la VAS en el proceso inflamatorio local.<sup>211</sup>

### a1.b. Hallazgos histopatológicos de inflamación local en el SAHS

- Inflamación de la VAS

La estructura anatómica favorece la obstrucción de la VAS en los pacientes con SAHS, observándose un estrechamiento de la VAS secundario a un mayor grosor de la pared faríngea por aumento de partes blandas que no siempre se asocia a una anomalía ósea o a depósito de grasa.<sup>212</sup> El aumento de partes blandas en la faringe del paciente con SAHS podría ser secundario a depósito inflamatorio. La presencia de cambios morfológicos como edema en la lámina propia con congestión y dilatación vascular e hipertrofia de partes blandas en muestras faríngeas de pacientes con SAHS, y en menor medida, en roncoadores en comparación con individuos control, apoya estas hipótesis.<sup>213</sup>

Sekosan et al.<sup>214</sup> objetivaron infiltración celular plasmática extensa a expensas de un acúmulo leucocitario y edema intersticial en la lámina propia de la mucosa de la úvula de pacientes con SAHS moderado-intenso. La reducción del tejido conectivo subepitelial de la úvula hipotéticamente producido por el efecto mecánico de la vibración, podría contribuir a la inestabilidad de la vía aérea mediante la pérdida de la conexión entre el tejido epitelial y subepitelial.<sup>209</sup> Rubinstein et al.<sup>215</sup> observó en el lavado nasal de pacientes con SAHS comparado con individuos sanos, una infiltración de leucocitos polimorfonucleares, bradikinina y péptido vasoactivo intestinal.

La ausencia de inflamación en pacientes con SAHS posicional y roncoadores importantes descritos en el estudio reciente de Hauber et al.<sup>216</sup> sugieren posiblemente estadios iniciales del proceso inflamatorio o la existencia de diferentes fenotipos de SAHS.

- Inflamación bronquial

El gradiente de presión causado por la obstrucción intermitente de la VAS es transmitida a todo el árbol respiratorio lo que asociado a la activación de receptores neuronales por neuropéptidos y péptidos que provocan edema

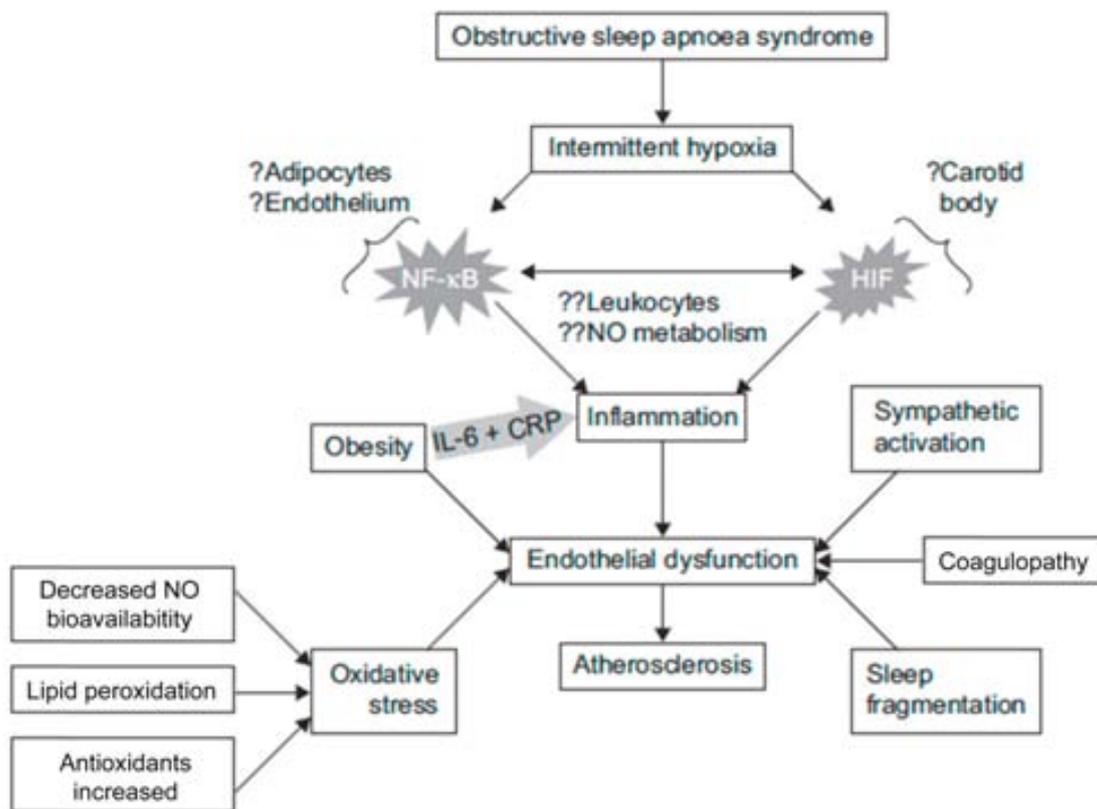
bronquial e hiperactividad muscular de la VAS, favorece el desarrollo de inflamación bronquial. Se ha demostrado implicación de la IL-8 y del factor de crecimiento vascular endotelial (VEFG) en el desarrollo de la inflamación bronquial de los pacientes con SAHS.<sup>217,218</sup>

a2. Inflamación sistémica. Los episodios de hipoxia-reoxigenación cíclicos y crónicos que se producen durante los episodios de apneas son los responsables de activar el proceso inflamatorio sistémico y la disfunción endotelial secundaria mediante la estimulación de factores de transcripción, moléculas de adhesión y citoquinas pro-inflamatorias y reactantes de fase aguda.<sup>219</sup> (Fig. 17)

a2.a. Factores de transcripción. La hipoxia intermitente activa los mecanismos inflamatorios a través de dos factores de transcripción sensibles a la hipoxia, el  $NF-\kappa\beta$  y el *factor de transcripción inducible por hipoxia-1* (HIF-1). De la interacción entre ambos factores surge la respuesta inflamatoria a la hipoxia.<sup>220-222</sup> (fig. 17)

a2.b. Moléculas de adhesión y citoquinas.

- Moléculas de adhesión. La activación y expresión de las moléculas de adhesión en los leucocitos y plaquetas aumentan y favorecen la interacción con las células endoteliales, la síntesis de radicales libres y una mayor capacidad citotóxica contra el endotelio, incrementando así el proceso inflamatorio y la disfunción endotelial.<sup>223</sup> En los pacientes con SAHS los monocitos, células polimorfonucleares (PMN) y varias subpoblaciones de células T expresan altos niveles de moléculas de adhesión (p-selectinas, molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), y molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y una mayor adherencia a las células endoteliales, niveles que disminuyen después del tratamiento con CPAP.<sup>223,224</sup>



**Fig. 17** Etiología y factores implicados en la inflamación en el SAHS. (Adaptado de Ryan S et al. *Circulation* 2005<sup>219</sup>).

- **Citoquinas inflamatorias.** Las citocinas son moléculas sintetizadas y liberadas por muchos tipos celulares, que regulan el sistema inmune mediante reacciones complejas en las que intervienen factores de transcripción que facilitan la activación de macrófagos, la proliferación celular, la disminución de la actividad del NO y la activación de las células endoteliales, mecanismos todos ellos implicados en la progresión de la aterosclerosis.<sup>225</sup> En los pacientes con SAHS la hipoxia intermitente facilita la expresión de citoquinas pro-inflamatorias mediante la activación de NF- $\kappa$ B, como la interleucina 6 (IL-6), IL-8 y el TNF- $\alpha$ , cuyos niveles están aumentados y decrecen después del tratamiento con CPAP.<sup>226</sup>

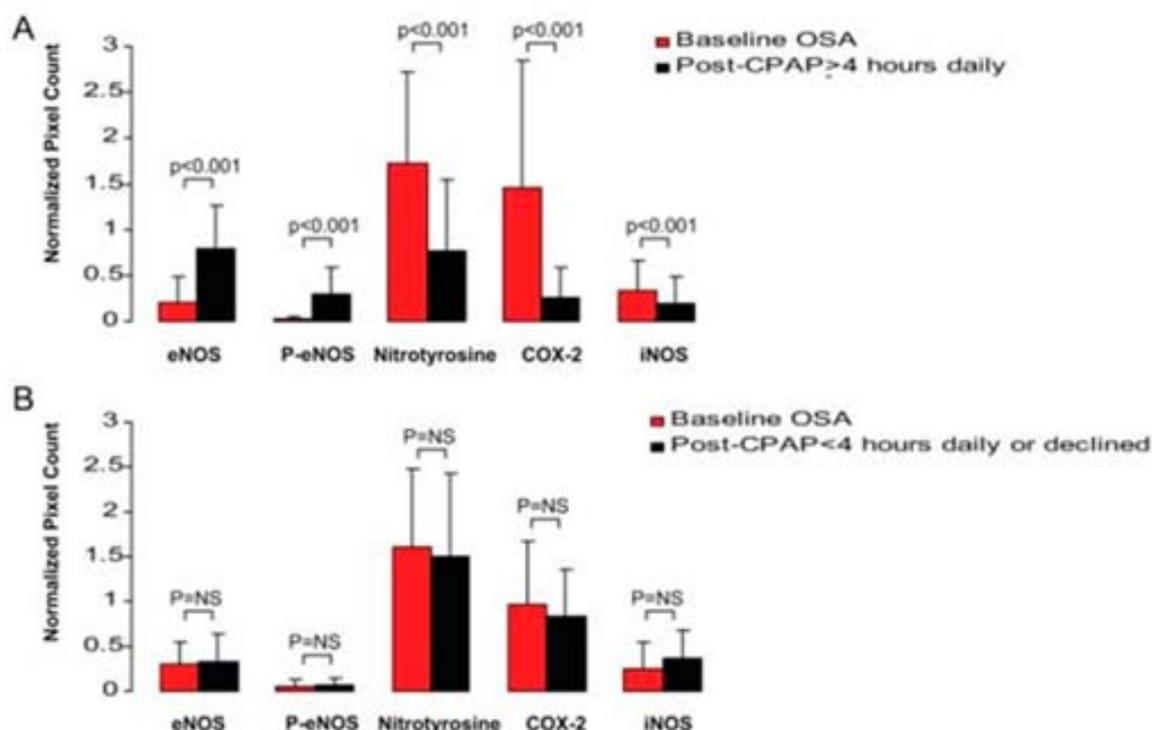
a2.c. **Reactantes de Fase Aguda.** La proteína C-reactiva (PCR) es una proteína activada principalmente por la IL-6 en condiciones de estrés oxidativo y secretada por el hígado. La PCR induce la expresión de moléculas de adhesión

en células endoteliales e inhibe la vasodilatación dependiente de NO endotelial,<sup>227,228</sup> por lo que se asocia con inflamación y aterosclerosis, siendo un fuerte predictor de eventos coronarios y enfermedad arterial periférica en población sana.<sup>229</sup> En los pacientes con SAHS existen niveles altos de PCR y de IL-6 comparado con sujetos sanos y sus niveles se correlacionan con la severidad del SAHS y disminuyen con el tratamiento con CPAP.<sup>230-232</sup>

4.2.3.b. Estrés oxidativo. Mecanismos. Uno de los mecanismos fundamentales que originan la disfunción endotelial en el SAHS es el *estrés oxidativo endotelial*, en el que los episodios de hipoxia-reoxigenación se acompañan de cambios en la vasoregulación del tono vascular, lo que promueve el aumento de síntesis de RLO y de las ERN. Su producción excesiva favorece procesos de daño tisular y vascular mediante vías anómalas de señalización, activación de vías inflamatorias y procesos de oxidación de macromoléculas biológicas (DNA, proteínas, carbohidratos y lípidos), generando un estado de estrés oxidativo.<sup>233</sup>

El radical libre superóxido ( $O_2^-$ ) es el RLO más abundante del organismo e interviene mediante la reacción con el NO en la formación de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), fundamental en el desarrollo de estrés endotelial. El peroxinitrito, la ERN más importante del organismo, nitrosila residuos de tirosina produciendo nitrotirosina en las células endoteliales que favorece el daño vascular.<sup>234</sup>

Los grupos de Schulz et al.<sup>236</sup> y Dyugovska et al.<sup>223</sup> demostraron un aumento de marcadores plasmáticos de estrés oxidativo a partir de neutrófilos y monocitos estimulados en pacientes con SAHS comparado con individuos controles que fueron neutralizados después del tratamiento con CPAP. En el estudio de Jelic et al.<sup>235</sup> se demostró un aumento de los niveles de nitrotirosina respecto a controles sanos que disminuyó después del tratamiento con CPAP. (Fig. 18) Los mecanismos de estrés oxidativo en el SAHS son los siguientes:



**Fig. 18** Derivados de NO antes y después del tratamiento con CPAP. (Adaptado de *Jelic S et al. Circulation 2008*<sup>235</sup>).

#### b1. Disminución de biodisponibilidad de NO.

- El NO es un potente vasodilatador que regula y mantiene la vasodilatación y atenúa la expresión de moléculas de adhesión, propiedades que permiten prevenir la vasoconstricción e inhibir la interacción entre leucocitos y células endoteliales, para mantener así un endotelio funcionalmente sano. La hipoxia intermitente y los RLO favorecen mediante diferentes mecanismos una disminución de la biodisponibilidad del NO. Por una parte, el aumento de RLO, que rápidamente reacciona con el NO y una disminución de la disponibilidad del sustrato L-Arginina por acción de la arginasa-II, cuya actividad está aumentada por la hipoxia intermitente, contribuyen al déficit de NO. Por otro lado, se produce una disminución de la actividad y/o síntesis de la eNOS por diferentes mecanismos. Uno de ellos, el más importante, el desacoplamiento de la eNOS. La eNOS es una enzima citocromo p450 reductasa, que requiere del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), para que a través de su forma oxigenasa, (forma acoplada de eNOS) realice la síntesis de NO desde L-arginina. Sin embargo, la

eNOS en su forma reductasa (forma desacoplada de eNOS), no utiliza BH<sub>4</sub>, sino NADPH. En aquellas situaciones en que haya un déficit o una alteración en la función de la BH<sub>4</sub> la eNOS adopta un estado desacoplado, pasa a forma reductasa y genera en vez de NO, superóxido.<sup>237,238</sup> En los pacientes con SAHS el peroxinitrato, que se encuentra aumentado, produce la oxidación de la BH<sub>4</sub>, inutilizándola para intervenir en la síntesis de NO endotelial y favoreciendo la forma desacoplada de la eNOS.<sup>239</sup> El desacoplamiento de la eNOS, además de disminuir al biodisponibilidad del NO favorecerá el estrés oxidativo en el paciente con SAHS al aumentar la síntesis de superóxido, contribuyendo a un déficit de NO y a mayor estrés oxidativo.<sup>240</sup> En el estudio de Stroes et al.<sup>241</sup> el tratamiento con BH<sub>4</sub> restableció la función endotelial pudiendo ser ésta una diana terapéutica.

Otro factor es la activación del factor inducible de hipoxia-2 que actuará a nivel trascricional sobre el mRNA de la eNOS disminuyendo su síntesis y actividad. A nivel postrascricional y mediante la Rho quinasa desestabilizará el mRNA de la eNOS alterando su actividad. Jelic et al. demostraron en pacientes con SAHS una menor actividad de eNOS en las células endoteliales.<sup>242</sup> El aumento en la síntesis del inhibidor de la eNOS en pacientes con SAHS se correlaciona directamente con la alteración en la vasodilatación mediada por flujo.<sup>243</sup>

b2. Peroxidación lipídica. El O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el OONO<sup>-</sup> son los responsables de la peroxidación lipídica, marcador de estrés oxidativo ampliamente utilizado para valorar disfunción endotelial en pacientes con SAHS. La oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) interviene en el proceso de arteriosclerosis al alterar la respuesta vasomotora, y favorecer el proceso inflamatorio.

En los pacientes con SAHS se han objetivado un aumento de los niveles circulantes de LDL y aumento de excreción urinaria de 8-hidroxi- 2'-deoxyguanosina (8-OHdG) que se atenúan tras el tratamiento con CPAP.<sup>244,245</sup>

Hoffman et al.<sup>246</sup> demostró en pacientes con SAHS cambios en los genes implicados en la regulación de las enzimas que intervienen en la peroxidación lipídica, como la superóxido dismutasa y la catalasa.

b3. Aumento de antioxidantes. Los mecanismos de defensa antioxidante, sistemas de la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa catalasa y glutatión, moléculas como la vitamina C y E, el glutatión y el ácido úrico, regulan un estado de oxidación-reducción en equilibrio e impiden una excesiva formación de radicales libres que favorezca el daño tisular. Cuando esta propiedad se pierde se produce una excesiva producción de radicales libres que alteran la actividad y función celular de diferentes moléculas como el DNA, lípidos y proteínas o hidratos de carbono.<sup>247</sup>

En los pacientes con SAHS se ha descrito una disminución de niveles de Vitamina A y E.<sup>248</sup> El tratamiento de pacientes con SAHS con antioxidantes como el inhibidor de la xantina oxidasa, el alopurinol o mediante inyección de vitamina C mejoraron la disfunción endotelial de estos pacientes,<sup>249,250</sup> así como el tratamiento con CPAP restableció en el estudio de Faure et al.<sup>251</sup> los niveles séricos de albúmina.

#### 4.2.3.c. Activación simpática.

En los pacientes con SAHS la hipoxia intermitente crónica activa el sistema nervioso simpático mediante estimulación cerebral y periférica de los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo, lo que condiciona cambios en el sistema autonómico, humoral, neurohormonal y hemodinámico, dando lugar a mayor vasoconstricción y aumento del gasto cardiaco y de la presión arterial.<sup>252</sup>

#### 4.2.3.d. Alteraciones de la coagulación.

Los pacientes con SAHS presentan un estado de hipercoagulabilidad (aumento de fibrinógeno y de algunos factores de coagulación, mayor viscosidad sanguínea y hematocrito).<sup>253</sup> Además presentan una mayor activación de las plaquetas que favorece una mayor adherencia y agregación plaquetaria. Algunos

estudios han demostrado como el tratamiento con CPAP mejora la coagulaopatía presente en el SAHS.<sup>254,255</sup>

#### **4.2.4. Aplicación clínica de FE<sub>NO</sub> en el SAHS.**

El estudio de la inflamación de la VAS en el SAHS se ha realizado principalmente en muestras de uvulopalatofaringoplastia y recuentos celulares de bronoscopias o lavados faringolaríngeos. En los últimos años se han desarrollado técnicas no invasivas de monitorización de la inflamación en pacientes con SAHS de una forma fiable, no invasiva y reproducible.

A diferencia del asma la presencia de eosinófilos en el esputo inducido no ha sido consistente en los pacientes con SAHS. Solo se ha observado una mayor incidencia de SAHS en los pacientes que tienen síndrome de eosinofilia con rinitis alérgica, en los que se favorece un aumento de resistencia de la VAS y por lo tanto predisposición a presentar SAHS.

La inflamación celular predominante en pacientes con SAHS es la neutrofílica, células de primera línea en la defensa inmunológica que intervienen en el desarrollo de citoquinas inflamatorias, mediadores lipídicos y péptidos antibacterianos. Diferentes estudios han mostrado un incremento de neutrófilos en el esputo inducido de pacientes con SAHS. El estudio de Depalo et al.<sup>217</sup> puso de manifiesto un predominio celular de neutrófilos en los pacientes con SAHS respecto controles, que se correlacionaba con la gravedad del SAHS. El estudio de Salerno et al.<sup>218</sup> muestra en un grupo de pacientes con SAHS un aumento de la celularidad en el esputo de predominio neutrofílico, a diferencia del predominio de macrófagos en el grupo control.

El estudio de Olapade et al.<sup>256</sup> en la década de los 90 fue el primero en valorar la concentración de óxido nítrico en aire espirado en pacientes con SAHS.<sup>64</sup> Se objetivaron niveles superiores de NO en el cavidad nasal y oral en los pacientes con SAHS comparado con los individuos sanos. Además ambos niveles fueron mayores por la mañana lo que sugiere un incremento de la inflamación de la vía aérea superior durante las horas de sueño. La inflamación nasal se

correlacionó con la gravedad del SAHS, de forma que los pacientes moderados-graves presentaban mayor concentración de NO nasal.

Estudios posteriores han mostrado resultados contradictorios en la utilización de FE<sub>NO</sub>, Depalo et al.<sup>217</sup> objetivó niveles de FE<sub>NO</sub> elevados en los pacientes con SAHS y que se correlacionaban con la gravedad mientras que Petrosyan et al.<sup>257</sup> y recientemente Foresi et al.<sup>258</sup> no hallaron diferencias en la concentración de FE<sub>NO</sub> en los pacientes con SAHS comparados con los controles.

La inflamación en el SAHS se prolonga más allá de la VAS y afecta también al árbol bronquial. La IL-8 regula la inflamación bronquial en el asma grave<sup>259</sup> y se ha demostrado que también lo hace en el SAHS. El grupo de Devouassoiz et al.<sup>260</sup> demostró inflamación bronquial en pacientes con SAHS de predominio neutrofílico, que se correlacionaba con la presencia de IL8 en el esputo inducido, asociado a una mayor gravedad del SAHS y a valores elevados de FE<sub>NO</sub>.

El papel de la obesidad es siempre un factor de confusión en el SAHS.<sup>71</sup> El tejido adiposo, fundamentalmente la grasa visceral, produce citoquinas y múltiples factores implicados en la inflamación local y sistémica que podría contribuir a una mayor inflamación local en los pacientes con SAHS. La presencia de niveles de FE<sub>NO</sub> elevados en individuos obesos sin patología respiratoria asociada lo corrobora. Depalo et al.<sup>217</sup> y Carpagnano et al.<sup>261</sup> compararon pacientes con SAHS con individuos obesos sin SAHS y con controles no SAHS-no obesos; los pacientes con obesidad presentaban valores de FE<sub>NO</sub> superiores a los controles, aunque no tan elevados como los pacientes con SAHS. Sin embargo a pesar de que otros estudios como el de Petrosyan et al.<sup>257</sup> muestran resultados similares, por el momento, no hay datos concluyentes sobre el papel de la obesidad en el desarrollo de inflamación de la VAS en los pacientes con SAHS.

#### **4.2.5. Aplicación clínica de CA<sub>NO</sub> en el SAHS.**

4.2.5.a. Medición de disfunción endotelial: métodos habituales. Los estudios con modelos animales que sugieren alteraciones en la expresión y

actividad de la eNOS muestran resultados contradictorios, en algunos casos aumentada, disminuida en otros, e incluso sin cambios en alguno de ellos. Esta disparidad es el resultado de la dificultad de medir la actividad del enzima en situación de hipoxia e hipoxia-reoxigenación.<sup>262-264</sup> Los modelos que simulan condiciones de hipoxia presentan diferencias metodológicas en cuanto al tiempo de exposición, en algunos casos muy corto, o diferentes lechos vasculares y de especie. Uno de los modelos crónicos de hipoxia intermitente más estables (ciclos de 30 segundos durante 6-8 h/d, durante 35 días) objetivó una menor respuesta vasodilatadora en respuesta a acetilcolina, estimulador de liberación de NO endotelial, hallazgos que apoyan la menor biodisponibilidad de NO en el SAHS.<sup>265</sup>

En estudios clínicos se ha demostrado una menor concentración de los productos estables derivados de NO circulantes (nitratos/nitritos) en pacientes con SAHS respecto a controles sanos en múltiples estudios. Además existe una correlación con la vasoreactividad mediada por flujo alterada, hecho que apoya la implicación del déficit de NO endotelial en el riesgo cardiovascular de los pacientes con SAHS. La técnica mide la dilatación de la arteria braquial mediada por flujo (*flow mediated dilation, FMD*) que pone en evidencia el grado de vasoreactividad endotelial en el que interviene el NO.<sup>266</sup> Múltiples estudios que evalúan esta técnica han demostrado cómo los pacientes con SAHS presentan vasodilatación mediada por flujo alterada, reflejo directo de la menor disponibilidad de NO endotelial en estos pacientes.<sup>267-269</sup> Otros hallazgos como la medición de la isoforma eNOS oxigenasa, disminuida en los pacientes con SAHS<sup>270</sup> o la presencia de un aumento del grosor de la íntima y media arterial y ateromas calcificados arteriales, el depósito de peroxinitrito en la microcirculación, y defectos en la transcripción de la eNOS, permiten medir también la disfunción endotelial del SAHS.

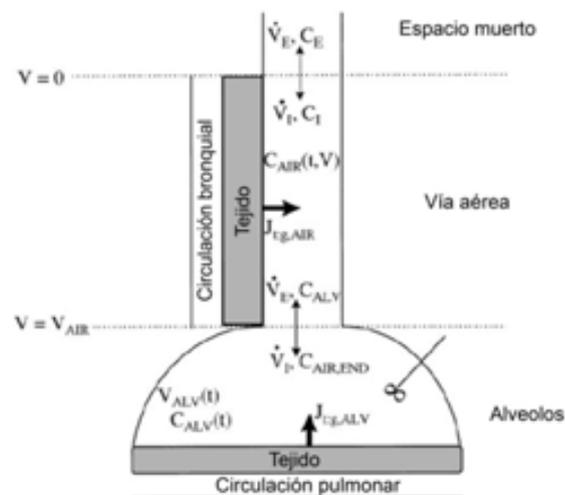
Múltiples estudios que evalúan la disfunción endotelial muestran el efecto terapéutico beneficioso de la CPAP sobre ésta<sup>271-276</sup> mediante el restablecimiento de los mecanismos de injuria endotelial,<sup>277,278</sup> y aunque algunos estudios no han demostrado diferencias entre pacientes con SAHS y controles sanos posiblemente la gravedad del SAHS y la influencia de factores asociados, como la obesidad influyan en estas diferencias.<sup>279</sup>

4.2.5.b. Determinación de  $CA_{NO}$ 

b.1. Difusión de NO. La mayor expresión de eNOS y por lo tanto de síntesis de NO endotelial se produce en la circulación bronco-pulmonar, aunque como la pared vascular bronquial se encuentra en la lámina propia, debajo del epitelio respiratorio, parte del NO endotelial difunde al espacio aéreo contribuyendo a la presencia de NO en el aire espirado.<sup>280,281</sup>

Por otro lado la ventilación en el tracto inferior de la vía aérea remueve el NO a este nivel que difunde a la sangre a través de la membrana alveolo-capilar donde se une a la hemoglobina (Hb) con gran afinidad y permite la perfusión de tejido alveolar. La difusión de NO determinará las funciones del NO en la circulación pulmonar como la regulación del tono vascular e inhibición de la adhesión y agregación plaquetaria.<sup>282</sup> (Fig. 19)

Para llevar a cabo estas funciones el NO desde el alveolo, atraviesa la barrera epitelial hasta la célula muscular lisa donde realiza la relajación muscular. A su vez, parte del NO difunde a través de la célula endotelial hacia el lumen vascular donde se une a la Hb o a las plaquetas. Su función vasodilatadora es dependiente de endotelio y presenta una gran afinidad por la Hb y una gran difusión.<sup>283,284</sup>



**Fig. 19** Intercambio pulmonar de NO.  $\dot{V}_E$ : flujo espiratorio;  $\dot{V}_I$ : flujo inspiratorio;  $C_E$ : concentración espiratoria;  $C_I$ : concentración inspiratoria;  $C_{air}$ : concentración de NO en la vía aérea;  $C_{alv}$ : concentración de NO en la región alveolar;  $V_{air}$ : volumen de la vía aérea;  $V_{alv}$ : volumen alveolar;  $J_{t,g,air}$ : flujo de NO desde el tejido a la vía aérea;  $J_{t,g,alv}$ : flujo de NO desde el tejido a la región alveolar;  $t$ : tiempo;  $V$ : volumen. (Adaptado de Tsoukias NM et al. *J Appl Physiol*1998<sup>98</sup>).

### b2. Determinación de $CA_{NO}$ en pacientes con SAHS.

La técnica de espiración a múltiples flujos permite cuantificar los niveles de  $CA_{NO}$ , reflejo de los cambios patogénicos que se producen en las vías aéreas distales y en la membrana alveolo capilar de los pacientes con SAHS.

En los pacientes con SAHS la menor biodisponibilidad de NO en el alveolo produciría una menor difusión de NO en la membrana alveolo capilar y una menor concentración de  $CA_{NO}$ , pudiendo alterar las funciones vasodilatadoras del NO y favorecer la disfunción endotelial en estos pacientes.

El estudio de Foresi et al.<sup>258</sup> refleja una disminución de los niveles de  $CA_{NO}$  en pacientes con SAHS y su restablecimiento después del tratamiento con CPAP. Además la presencia de niveles de  $CA_{NO}$  menores en pacientes con HTA respecto a los pacientes sin HTA permite asociar el déficit de biodisponibilidad de NO con el riesgo cardiovascular.

La determinación de  $CA_{NO}$  sería entonces un reflejo del NO endotelial convirtiéndose en una forma no invasiva e indirecta de medir la disfunción endotelial en los pacientes con SAHS.





**HIPÓTESIS**



**• HIPÓTESIS GENERAL**

La determinación de óxido nítrico en el aire espirado, a flujo constante ( $FE_{NO}$ ) y a múltiples flujos ( $CA_{NO}$ ) es una técnica no invasiva, sencilla y útil, que permite el estudio de la inflamación de la vía respiratoria en enfermedades como el asma y el SAHS.

**• HIPÓTESIS CONCRETAS**

- El equipo portátil de determinación de  $FE_{NO}$ , NIOX-MINO<sup>®</sup>, es una alternativa a los equipos clásicos de quimioluminiscencia.

- El modelo bicompartimental de NO permite, mediante la técnica de espiración a múltiples flujos, la medición de la concentración alveolar de NO ( $CA_{NO}$ ).

- La capacidad diagnóstica de la determinación de  $FE_{NO}$  es superior a la de los métodos habituales de diagnóstico en pacientes con sospecha clínica de asma.

- En pacientes con SAHS la determinación de  $FE_{NO}$  es un biomarcador del estado inflamatorio de las vía respiratoria y la de  $CA_{NO}$  de difusión de NO endotelial.



## **OBJETIVOS**



**• OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de la investigación fue evaluar la técnica de la determinación de NO en aire espirado, en sus diferentes métodos, su utilidad como medida no invasiva de inflamación en el manejo diagnóstico del asma, y como medida indirecta de inflamación de la vía aérea y de disfunción endotelial en el SAHS.

**• OBJETIVOS CONCRETOS****• OBJETIVOS DEL ESTUDIO 1**

- Descripción del método y procedimiento del nuevo equipo de determinación de FE<sub>NO</sub> portátil, NIOX-MINO<sup>®</sup>.

- Determinar la correlación de los valores de FE<sub>NO</sub> mediante el equipo portátil NIOX-MINO<sup>®</sup> respecto a los valores obtenidos mediante el sensor clásico de quimioluminiscencia.

- Establecer valores de referencia de FE<sub>NO</sub> en población sana mediante el equipo portátil NIOX-MINO<sup>®</sup>.

**• OBJETIVOS DEL ESTUDIO 2**

- Desarrollo del *modelo bicompartimental* de NO para la determinación de CA<sub>NO</sub>.

- Descripción del método y procedimiento de la determinación de CA<sub>NO</sub> mediante la técnica de espiración a múltiples flujos.

- Establecer valores de referencia de CA<sub>NO</sub> en población sana.

**• OBJETIVOS DEL ESTUDIO 3**

- Analizar la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos de la determinación de  $FE_{NO}$  en el diagnóstico de asma.

- Comparar la capacidad diagnóstica de la determinación de  $FE_{NO}$  en pacientes con clínica sugestiva de asma respecto a los métodos convencionales de diagnóstico (espirometría, prueba broncodilatadora y prueba de provocación bronquial con metacolina) y del esputo inducido.

- Determinar si el uso de la determinación de  $FE_{NO}$  asociado a la realización del esputo inducido aumenta la capacidad diagnóstica de asma, respecto a la determinación de  $FE_{NO}$  aislada y de los métodos convencionales.

**• OBJETIVOS DEL ESTUDIO 4**

- Determinar los valores de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$  en un grupo de pacientes con SAHS y su comparación con un grupo de individuos sanos.

- Evaluar la asociación de los valores de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$  con la gravedad del SAHS y con los factores cardiovasculares asociados.

- Evaluar el efecto del tratamiento con CPAP durante 3 meses sobre la concentración de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$ .





**ESTUDIOS PUBLICADOS**



- 1) Fortuna AM, Feixas T, Casan P. Determinación de óxido nítrico en aire espirado (FENO) mediante un equipo portátil (NIOX-MINO® Aerocrine) en población sana. Arch Bronconeumol. 2007 Mar;43(3):176-9.
- 2) Fortuna AM, Feixas T, González M, Casan P. Diagnostic utility of inflammatory biomarkers in asthma: exhaled nitric oxide and induced sputum eosinophil count. Respir Med. 2007 Nov;101(11):2416-21. Epub 2007 Aug 21.
- 3) Fortuna AM, Balleza M, Calaf N, González M, Feixas T, Casan P. Determinación de la concentración de óxido nítrico alveolar en aire espirado: procedimiento y valores de referencia en personas sanas. Arch Bronconeumol. 2009 Mar;45(3):145-9.
- 4) Fortuna AM, Miralda R, Calaf N, González M, Casan P, Mayos M. Airway and alveolar nitric oxide measurements in obstructive sleep apnea syndrome. Respir Med. 2011 Apr;105(4):630-6.



## **RESULTADOS**



## **ESTUDIO 1**



# Determinación de óxido nítrico en aire espirado (FE<sub>NO</sub>) mediante un equipo portátil (NIOX-MINO<sup>®</sup> Aerocrine) en población sana

Ana María Fortuna, Teresa Feixas y Pere Casan

Unidad de Función Pulmonar. Departamento de Neumología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España.

La determinación de óxido nítrico en aire espirado (FE<sub>NO</sub>) es una técnica no invasiva que se utiliza en la evaluación clínica y el tratamiento del asma. El objetivo de este estudio ha sido determinar los valores de referencia de FE<sub>NO</sub> en un grupo de voluntarios sanos mediante la utilización de un nuevo equipo portátil (NIOX-MINO<sup>®</sup> Aerocrine), así como determinar el grado de relación que presenta con el equipo de determinación habitual en nuestro laboratorio de función pulmonar (sensor de quimioluminiscencia N-6008<sup>®</sup> SIR). Según los resultados obtenidos, los valores de FE<sub>NO</sub> que da el equipo portátil son siempre superiores a los que ofrece el sensor habitual, con un valor de corte de 34 ppb (media + 2 desviación estándar). Existe un relación directa y significativa de la determinación de FE<sub>NO</sub> entre ambos equipos ( $r = 0,92$ ;  $p = 0,001$ ) con un factor de corrección de: FE<sub>NO</sub> (NIOX-MINO<sup>®</sup>) =  $10 + 1,5 \text{ FE}_{\text{NO}} \text{ (N-6008<sup>®</sup>)}$ . La relación entre los valores de FE<sub>NO</sub> y la edad, el sexo, el índice de masa corporal y los valores espirométricos no fue estadísticamente significativa.

**Palabras clave:** Óxido nítrico en aire espirado. Asma. Inflamación.

## Introducción

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas, que cursa con obstrucción e hiperrespuesta bronquial<sup>1</sup>. En los últimos años se ha estudiado la posibilidad de disponer de varios métodos que permitan evaluar la cualidad y la magnitud de esta inflamación y que puedan utilizarse para el seguimiento y el diagnóstico de la enfermedad<sup>2,3</sup>. En este contexto, han aparecido marcadores de actividad inflamatoria como la cuantificación del número de eosinófilos en el esputo inducido y la determinación de la fracción espiratoria de óxido nítrico (FE<sub>NO</sub>). Sabemos que en el asma hay un aumento de la síntesis de óxido nítrico (NO) inducible por la actividad de las células inflamatorias y demostrable también en el aire espirado. Así, algunos estudios<sup>4,5</sup>

## Measurement of Fraction of Exhaled Nitric Oxide With the Portable NIOX-MINO Monitor in Healthy Adults

Measurement of the fraction of exhaled nitric oxide (FE<sub>NO</sub>) provides a noninvasive way to monitor asthma treatment in clinical practice. The aim of this study was to determine FE<sub>NO</sub> reference values for measurements recorded with the portable NIOX MINO monitor in a group of healthy volunteers. We also assessed the association between values recorded by the portable monitor and the N-6008 chemiluminescence analyzer used in our pulmonary function laboratory. The FE<sub>NO</sub> values obtained with the portable monitor were consistently higher than those recorded by the N-6008 analyzer; the cutoff value for the portable monitor was 34 ppb (mean + 2 SD). We detected a direct correlation ( $r=0.92$ ) between the FE<sub>NO</sub> measurements recorded by the 2 monitors ( $P=0.001$ ). The following equation expresses the relationship between measurements from the 2 devices: FE<sub>NO</sub>(NIOX MINO) =  $10 + [1.5 \text{ FE}_{\text{NO}} \text{ (N-6008)}]$ . We did not observe statistically significant correlations between FE<sub>NO</sub> measurements and age, sex, body mass index, or spirometry.

**Key words:** Fraction of exhaled nitric oxide. Asthma. Inflammation.

demuestran que una determinación aumentada de FE<sub>NO</sub> sería un indicador sensible de inflamación y, en el contexto adecuado, permitiría una aproximación diagnóstica del asma, monitorización clínica y la comprobación del cumplimiento farmacológico, así como el ajuste de dosis del tratamiento corticoide<sup>6-8</sup>.

La determinación de FE<sub>NO</sub> se realiza a través de un detector lumínico (quimioluminiscencia) en el que el NO, al reaccionar con el ozono, produce dióxido de nitrógeno y emite, al estabilizarse, una radiación lumínica proporcional a la concentración de NO en el aire espirado. El método *on-line* es el más utilizado y el procedimiento está plenamente introducido en la literatura médica<sup>9</sup>. Hasta ahora los equipos disponibles son generalmente complejos, caros, difíciles de utilizar en niños y de uso hospitalario. Además, los valores de FE<sub>NO</sub> publicados en diversos estudios presentan gran variabilidad según el laboratorio. Por estas razones, en los últimos años se ha introducido en el mercado un equipo portátil, sencillo y más económico para el control de la inflamación respiratoria: NIOX-MINO<sup>®</sup> Aerocrine.

Correspondencia: Dr. P. Casan.

Unidad de Función Pulmonar. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. St. Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. España.  
Correo electrónico: pcasan@hsp.santpau.es

Recibido: 14-3-2006; aceptado para su publicación: 21-5-2006.

El objetivo de nuestro trabajo es aportar información útil sobre el método y el procedimiento habitual del nuevo equipo NIOX-MINO®, así como presentar los valores de referencia obtenidos en nuestro centro utilizando un analizador de este tipo y su correlación con la determinación de  $FE_{NO}$  mediante el sensor de quimioluminiscencia habitualmente utilizado en nuestro hospital.

## Métodos

### Descripción de la técnica

El equipo habitual en nuestro laboratorio para la determinación de  $FE_{NO}$  es un sensor de quimioluminiscencia (N-6008® SIR, Madrid, España). La técnica *on-line*, según las recomendaciones internacionales<sup>9</sup>, consiste en que el paciente realiza una espiración desde capacidad pulmonar total a un flujo constante de 50 ml/s a través de una boquilla con una resistencia de 5-20 cmH<sub>2</sub>O (para asegurar el cierre del velo del paladar y evitar la contaminación con el NO nasal) y con un filtro que reduce la concentración de NO ambiental. El resultado se ofrece en una gráfica en la que el trazador desestima el pico inicial de espiración y mide el *plateau* (meseta  $\geq 3$  s y gradiente de variabilidad  $\leq 10\%$ ). Es necesario realizarlo en 3 ocasiones y se promedian 3 determinaciones válidas según las recomendaciones internacionales<sup>9</sup>. El equipo tiene una precisión del  $\pm 1\%$  y un margen de lectura entre 0 y 500 ppb. Requiere una calibración de NO a 0 ppb antes de cada prueba; comprobación diaria de circuitos; calibración de la bombona de NO cada 2-3 días; calibración semanal de anhídrido carbónico, flujo y volumen, y del analizador cada 3-4 meses. Se precisa asimismo la utilización de filtros y controles bacteriológicos.

El nuevo equipo (NIOX-MINO® Aerocrine, Solna, Suecia) es un aparato portátil de pequeñas dimensiones y ligero (24 × 13 × 10 cm; peso: 800 g), constituido por un sensor que analiza el NO a partir de una reacción electroquímica (a diferencia del sensor de quimioluminiscencia habitual). Las principales diferencias con la técnica habitual consisten en que el paciente realiza una inspiración profunda desde el interior del equipo a través de un filtro y hasta capacidad pulmonar total (en el sensor de quimioluminiscencia se realiza desde el aire ambiente). A continuación se realiza una espiración al interior del equipo a un flujo mantenido de 50 ml/s, controlado por un sensor lumínico y acústico para facilitar y asegurar el flujo. Este procedimiento sigue las recomendaciones del fabricante, requiere una única determinación y el resultado se expresa en la pantalla digital del equipo, con la posibilidad de guardar en una tarjeta digital los resultados de las diferentes determinaciones de cada paciente. El equipo tiene una precisión inferior al 3% en determinaciones de menos de 30 ppb e inferior al 10% en valores mayores de 30 ppb, y un margen de lectura entre 5 y 300 ppb. No necesita calibración (fig. 1).

### Voluntarios

Se seleccionó a 28 voluntarios sanos (7 varones y 21 mujeres) no fumadores, con valores espirométricos dentro del margen de referencia, que no presentaban enfermedades intercurrentes ni seguían tratamiento habitual. Las características antropométricas del grupo se describen en la tabla I.

A cada voluntario se le realizaron en orden aleatorio la determinación de  $FE_{NO}$  con el sensor de quimioluminiscencia habitual N-6008® SIR, efectuando 3 determinaciones según método *on-line*<sup>9</sup>, y una sola determinación con el equipo NIOX-MINO®, según las instrucciones del fabricante. Todas las determinaciones se llevaron siempre a cabo en la misma franja horaria y 2 h después de la última ingesta alimentaria. Finalmente se realizó a todos los individuos una espirometría.



Fig. 1. Equipo de determinación de óxido nítrico en aire espirado NIOX-MINO® Aerocrine.

### Análisis estadístico

Para la descripción de los valores de  $FE_{NO}$  se facilitan valores medios  $\pm$  desviación estándar. La comparación entre valores medios se llevó a cabo mediante un test de Mann-Whitney. La comparación de los resultados individuales se analizó mediante la correlación de Pearson. En todos los casos la aproximación ha sido bilateral y el nivel de significación el habitual del 5% ( $\alpha = 0,05$ ). El programa informático empleado en el análisis fue el paquete estadístico SPSS versión 11.5.

## Resultados

El valor medio ( $\pm$  desviación estándar) de  $FE_{NO}$  con el equipo NIOX-MINO® fue de  $20 \pm 7$  ppb (rango: 8-41 ppb), y con el sensor N-6008, de  $7 \pm 5$  ppb (rango: 1-19 ppb). Como valores de referencia de NO para el sensor de quimioluminiscencia se emplearon los previamente publicados, que consideran un valor patológico cuando el  $FE_{NO}$  es mayor o igual a 20 ppb<sup>10</sup> (fig. 2).

Se observó una correlación directa y estadísticamente significativa de la determinación de  $FE_{NO}$  entre ambos

TABLA I  
Características antropométricas de la población (n = 28)

Edad (años)	35,29 $\pm$ 11,8
Sexo	
Varones	7
Mujeres	21
Talla (cm)	163,85 $\pm$ 7,8
Peso (kg)	67,43 $\pm$ 16,46
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	30,32 $\pm$ 14,07
FEV <sub>1</sub> (% v. ref.)	103,57 $\pm$ 10,02
FVC (% v. ref.)	137,36 $\pm$ 20,63
FEV <sub>1</sub> /FVC (% v. ref.)	83,32 $\pm$ 7,6

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar o número de individuos. FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada.

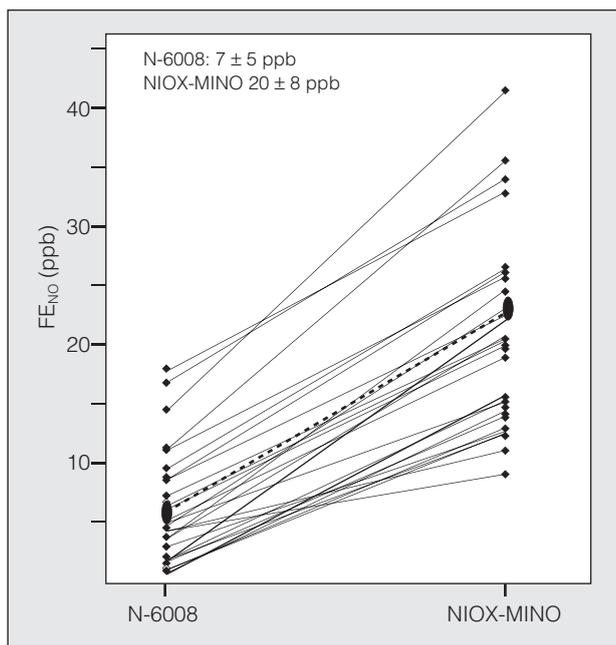


Fig. 2. Comparación de los valores de óxido nítrico en aire espirado ( $FE_{NO}$ ) obtenidos con el equipo N-6008® SIR (sensor de quimioluminiscencia) y el equipo portátil NIOX-MINO®. Se observan valores de  $FE_{NO}$  superiores en cada individuo al utilizar el equipo NIOX-MINO®. La línea intermitente indica las medias de los valores obtenidos con cada aparato.

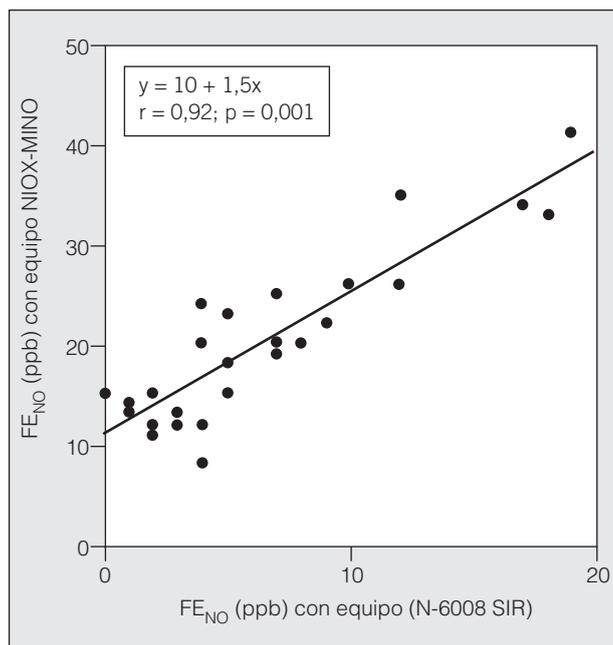


Fig. 3. Correlación de óxido nítrico en aire espirado ( $FE_{NO}$ ) entre la determinación con los equipos N-6008® SIR (sensor de quimioluminiscencia) y NIOX-MINO® (método de electroquímica) en voluntarios sanos. La correlación de Pearson muestra la curva de regresión lineal entre ambos equipos ( $y = FE_{NO}$  [ppb] con equipo NIOX-MINO®;  $x = FE_{NO}$  [ppb] con el equipo N-6008® SIR).

equipos ( $r = 0,92$ ;  $p = 0,001$ ). Los valores de  $FE_{NO}$  con el equipo NIOX-MINO® siempre fueron superiores a los obtenidos con el equipo N-6008®. Además, la curva de regresión lineal demostró un factor de corrección de:  $FE_{NO}$  (NIOX-MINO®) =  $10 + 1,5 FE_{NO}$  (N-6008®) (fig. 3). La relación entre los valores de  $FE_{NO}$  y la edad, el sexo, el índice de masa corporal y los valores espirométricos no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

## Discusión

A la vista de los resultados, los valores obtenidos en nuestro medio con el equipo NIOX-MINO® son moderadamente superiores a los habitualmente utilizados con el equipo N-6008®, y puede apreciarse un sesgo en el primer aparato al comparar la distribución de las diferencias entre ambas determinaciones según el valor de referencia (lectura media superior en 14 ppb) (fig. 2).

Al comparar los 2 equipos y métodos se constata que existe una muy buena correlación de cada determinación de  $FE_{NO}$  para ambos equipos, con un factor de corrección entre los valores de los 2 equipos de  $\times 1,5 + 10$  para cada valor de  $FE_{NO}$  obtenido con el equipo N-6008 (figs. 2 y 3), lo que coincide con los valores obtenidos por otros autores<sup>11-13</sup>.

El valor de corte de  $FE_{NO}$  de 17 ppb (media + 2 desviación estándar) para el equipo N-6008 se encuentra dentro de los valores de referencia obtenidos por otros laboratorios y recomendados en las guías internacionales<sup>9,11</sup>, al igual que ocurre con el equipo NIOX-MINO®, cuyo valor de corte de 34 ppb (media + 2 desviación es-

tándar) se halla dentro de los valores de referencia establecidos por otros autores<sup>12,13</sup>. La determinación de  $FE_{NO}$  mediante el nuevo equipo NIOX-MINO® no se modifica según las características antropométricas de la población ni con la espirometría (no se halló una relación estadísticamente significativa con la edad, el sexo, el índice de masa corporal ni con los valores espirométricos), al igual que lo descrito en otros estudios<sup>11-13</sup>.

El equipo NIOX-MINO® ofrece las siguientes ventajas con respecto al sensor de quimioluminiscencia: disminuye el riesgo de contaminación ambiental con NO, dado que el paciente realiza la inspiración desde el interior del equipo, y garantiza así la inspiración de aire sin NO, a diferencia del sensor de quimioluminiscencia N-6008, con el que el paciente inspira del aire ambiente.

La determinación de valores de referencia de  $FE_{NO}$  para cada laboratorio permite la utilización de este marcador de inflamación en pacientes con enfermedades inflamatorias respiratorias como el asma, lo que facilita de forma sencilla, rápida y reproducible la cuantificación de la inflamación y la posibilidad de tratar mejor al paciente. Resulta muy útil en el seguimiento clínico, del tratamiento y del cumplimiento terapéutico por parte del paciente. Con la incorporación de estos aparatos se permitirá en un futuro inmediato la posible utilización de la determinación de  $FE_{NO}$  para el control domiciliario del asma.

En cuanto a las limitaciones del equipo NIOX-MINO®, cabe señalar que no reproduce la gráfica de la morfología del  $FE_{NO}$  para hallar la meseta correspondiente a la fracción bronquial de NO (a diferencia del sensor de quimioluminiscencia), sino que emite el valor de  $FE_{NO}$  de forma

digital; esto hace que el observador no tenga control sobre el resultado final de FE<sub>NO</sub>, sino que es el equipo el que lo determina, lo que puede influir sobre la reproducibilidad de la técnica, aunque se recomiende una sola determinación. Otras limitaciones serían las derivadas de las maniobras respiratorias y de la falta de colaboración. No se han descrito contraindicaciones.

El equipo NIOX-MINO® se presenta con una capacidad para realizar 1.500 determinaciones, cada una de las cuales se estima costaría 12 €; para el uso de este equipo sea rentable y equiparable al del sensor de quimioluminiscencia el fabricante recomienda la realización de unas 3.000 determinaciones al año.

En conclusión, la determinación de FE<sub>NO</sub> es un método no invasivo, rápido e inocuo, que permite disponer de un marcador inflamatorio en enfermedades respiratorias como el asma. En el ámbito clínico permite la cuantificación de la inflamación subyacente, el seguimiento clínico del paciente, del ajuste de las dosis y del cumplimiento del tratamiento, así como una aproximación inflamatoria al diagnóstico del asma. Es necesario disponer de valores de referencia para cada laboratorio y con sus propios equipos a fin de ajustar mejor los datos de este tipo de determinaciones biológicas. Es de esperar que en los próximos años puedan utilizarse los equipos portátiles como el descrito (NIOX-MINO®) en ámbitos no sólo hospitalarios, sino también ambulatorios, en el propio domicilio del paciente o en estudios epidemiológicos.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention NHLBI/WHO Workshop Report 2002. Disponible en: <http://www.ginasthma.com>
2. Jatakanon A, Sim L, Kharitonov S, Chung K, Barnes P. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax*. 1998;53:91-5.
3. Strunk RC, Szeffler SJ, Phillips B, Zeiger R, Chinchilli VM, Larsen G, et al. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003;112:883-92.
4. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, MacLachlan C, Monti-Sheedan G, Jackson P, et al. Comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:473-8.
5. Deykin A, Massaro AF, Drazen JM, Israel E. Exhaled nitric oxide as a diagnosis test for asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1597-601.
6. 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;21:443-8.
7. Smith AD, Cowan JO, Brasslet KP, Herbison P, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med*. 2005;352:2163-73.
8. De Jongste JC. Yes to NO: the first studies on exhaled nitric oxide-driven asthma treatment. *Eur Respir J*. 2005;26:379-81.
9. American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:912-30.
10. Calaf N, De Lerma JB, Feixas T, González M, Codina E, Casan P. Concentración de NO en el aire espirado: valores de referencia en población sana. *Arch Bronconeumol*. 2004;40 Supl 2:66.
11. Silkoff Philip E, Carlson M, Bourke T, Katial R, Ögren E, Szeffler SJ. Aerocrine exhaled nitric oxide monitoring system NIOX is cleared by de US Food and Drug Administration for monitoring therapy is asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1241-56.
12. Kharitonov S. NIOX-MINO®, a new handheld exhaled NO device. *Actas de European Respiratory Society 15<sup>th</sup> Annual Congress*; 2005, septiembre 17-21; Copenhagen. Copenhagen: European Respiratory Society; 2005.
13. Hemmingsson T, Linnarsson D, Gambert R. Novel hand-held device for exhaled nitric oxide analysis in research and clinical applications. *Actas de Breath Gas Analysis for Medical Diagnosis*; 2004, septiembre 23-26; Dornbirn.



## Determinación de óxido nítrico en aire espirado ( $FE_{NO}$ ) mediante un equipo portátil (NIOX-MINO<sup>®</sup> Aerocrine) en población sana

---

Ana María Fortuna, Teresa Feixas y Pere Casan

- El equipo portátil NIOX-MINO<sup>®</sup> permite la determinación de  $FE_{NO}$  mediante una técnica sencilla y con ventajas respecto al equipo clásico de quimioluminiscencia: no requiere calibración, sólo precisa de una determinación, tiene portabilidad y la posibilidad de autorrealización por parte del paciente.
- Los valores de  $FE_{NO}$  medidos con el equipo portátil NIOX-MINO<sup>®</sup> en un grupo de 28 individuos sanos fueron superiores a los valores de  $FE_{NO}$  medidos con el equipo de quimioluminiscencia N-6008, (valor medio  $\pm$  desviación estándar:  $20 \pm 7$  ppb (rango: 8-41 ppb) vs  $7 \pm 5$  ppb (rango: 1-19 ppb), respectivamente).
- Se observó una correlación directa y estadísticamente significativa de la determinación de  $FE_{NO}$  entre ambos equipos ( $r = 0,92$ ;  $p = 0,001$ ).
- Se establece un factor de corrección para equiparar los valores de  $FE_{NO}$  entre ambos equipos de:  $FE_{NO} \text{ (NIOX-MINO}^{\text{®}}) = 10 + 1,5 FE_{NO} \text{ (N-6008}^{\text{®}})$
- Los valores de  $FE_{NO}$  no presentaron asociación significativa con la edad, el sexo, el índice de masa corporal y los valores espirométricos ( $p > 0,05$ ).



**ESTUDIO 2**





## Técnicas y procedimientos

# Determinación de la concentración de óxido nítrico alveolar en aire espirado: procedimiento y valores de referencia en personas sanas

Ana María Fortuna\*, Marco Balleza, Núria Calaf, Mercedes González, Teresa Feixas y Pere Casan

Unidad de Función Pulmonar, Departamento de Neumología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 9 de abril de 2008  
Aceptado el 22 de mayo de 2008  
On-line el 14 de febrero de 2009

#### Palabras clave:

Óxido nítrico en aire espirado  
Concentración alveolar de óxido nítrico  
Modelo bicompartimental  
Espiración a múltiples flujos

#### Keywords:

Fraction of exhaled nitric oxide  
Alveolar concentration of nitric oxide  
Two-compartment model  
Exhalation, multiple flow rates

### RESUMEN

La producción de óxido nítrico (NO) se describe mediante un modelo bicompartimental que relaciona la producción y la movilidad de NO desde los alvéolos hacia las vías aéreas. La espiración a múltiples flujos permite deducir la concentración alveolar de NO ( $C_{ANO}$ ), marcador indirecto del estado inflamatorio de las zonas distales del pulmón. El objetivo fue determinar los valores de referencia de  $C_{ANO}$ . En 33 individuos sanos se determinaron la concentración espirada de NO ( $F_{ENO}$ ) a 50 ml/s y la  $C_{ANO}$  a 10, 30, 100 y 200 ml/s mediante un sensor de quimioluminiscencia (NIOX Aerocrine). El valor medio ( $\pm$  desviación estándar) de  $F_{ENO}$  fue de  $15 \pm 6$  ppb y de  $C_{ANO}$  fue de  $3,04 \pm 1,30$  ppb. Los valores de  $C_{ANO}$  obtenidos en individuos sanos permitirán analizar el comportamiento inflamatorio alveolar en procesos respiratorios y sistémicos.

© 2008 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Determining the Alveolar Component of Nitric Oxide in Exhaled Air: Procedures and Reference Values for Healthy Persons

### ABSTRACT

Nitric oxide (NO) production has been described using a 2-compartment model for the synthesis and movement of NO in both the alveoli and the airways. The alveolar concentration of NO ( $C_{ANO}$ ), an indirect marker of the inflammatory state of the distal portions of the lung, can be deduced through exhalation at multiple flow rates. Our objective was to determine reference values for  $C_{ANO}$ . The fraction of exhaled NO ( $F_{ENO}$ ) was measured in 33 healthy individuals at a rate of 50 mL/s; the subjects then exhaled at 10, 30, 100, and 200 mL/s to calculate  $C_{ANO}$ . A chemiluminescence analyzer (NIOX Aerocrine) was used to perform the measurements. The mean (SD)  $F_{ENO}$  was 15 (6) ppb. The mean  $C_{ANO}$  was 3.04 (1.30) ppb. These values of  $C_{ANO}$  measured in healthy individuals will allow us to analyze alveolar inflammatory behavior in respiratory and systemic processes.

© 2008 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

El óxido nítrico (NO) es un gas lipofílico y de vida media muy corta, que se sintetiza en el epitelio respiratorio, fundamentalmente por la enzima NO sintetasa inducible o tipo 2 (iNOS), enzima constitutiva que activan citocinas inflamatorias, macrófagos y ciertas moléculas de adhesión. De esta forma el NO interviene en el proceso inflamatorio de diferentes enfermedades respiratorias, además de participar como inmunomodulador, inhibidor plaquetario y potente vasodilatador. Se ha demostrado asimismo una sobreactividad de la enzima iNOS en ciertos

procesos, lo que se refleja en un incremento de la producción de NO<sup>1</sup>.

En los últimos años, el desarrollo de un procedimiento no invasivo y sencillo para determinar la concentración de NO en aire espirado ( $F_{ENO}$ ) ha permitido cuantificar indirectamente y de forma rápida y fiable la magnitud de la inflamación en ciertas enfermedades respiratorias como el asma<sup>2</sup>. Se han objetivado valores elevados de  $F_{ENO}$  en pacientes con asma y una disminución después del tratamiento con corticoides. La sencillez y la fiabilidad de esta técnica la han convertido en una herramienta útil en el diagnóstico del asma, en el control y en el cumplimiento terapéutico, así como en la prevención de agudizaciones, ya permite detectar y tratar de inmediato los incrementos de actividad inflamatoria<sup>3,4</sup>.

Sin embargo, desde el punto de vista fisiológico, el NO del aire espirado tiene múltiples orígenes en el pulmón y su

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [afortuna@santpau.cat](mailto:afortuna@santpau.cat) (A.M. Fortuna).

determinación depende en gran medida del flujo espiratorio, a diferencia de otros gases endógenos como el nitrógeno. Para realizar una mejor aproximación teórica a su determinación, se ha descrito un modelo del pulmón que se basa en la existencia de 2 compartimientos bien diferenciados, el bronquial y el alveolar, y que ayudaría a entender los cambios dinámicos del NO en el aire espirado<sup>5-7</sup>. De esta forma, frente a la determinación habitual de la  $F_{ENO}$ , que se realiza a un determinado flujo aéreo de una manera fija y que "marca" la actividad inflamatoria bronquial, se ha propuesto que la concentración alveolar de NO ( $C_{ANO}$ ) podría reflejar indirectamente la situación inflamatoria del territorio más distal (membrana alveolocapilar) y ser un indicador de lo que acontece en el ámbito endotelial. Este procedimiento se encuentra aún en una fase preclínica y, por ello, el objetivo de nuestro estudio ha sido desarrollar el modelo bicompartimental de NO, mediante la técnica de espiración constante a múltiples flujos, describir las características del procedimiento de obtención y establecer valores de referencia de  $C_{ANO}$  en personas sanas.

## Descripción de la técnica y procedimiento

### Determinación de la concentración de óxido nítrico en aire espirado: espiración a un flujo constante

La determinación de  $F_{ENO}$  se realizó mediante la técnica de espiración constante a un flujo (50 ml/s) con un sensor de quimioluminiscencia (NIOX<sup>®</sup> Aerocrine AB, Estocolmo, Suecia), según recomendaciones internacionales<sup>8</sup>. El paciente realizaba una inspiración desde el equipo hasta alcanzar la capacidad pulmonar total y, a continuación, una espiración a un flujo constante de 50 ml/s a través de una boquilla con una resistencia de 20 cmH<sub>2</sub>O (para asegurar el cierre del velo del paladar y evitar la contaminación con el NO nasal). El trazador del equipo desestima el pico inicial de espiración y mide el *plateau* (meseta de 3 s y gradiente de variabilidad del 10%) dando como válida la medición. El procedimiento se realizaba en 3 ocasiones y se promediaban las determinaciones válidas<sup>8</sup>.

### Determinación de la concentración de óxido nítrico alveolar: técnica de espiración a múltiples flujos

La técnica de espiración a múltiples flujos se realiza de forma similar que la determinación de  $F_{ENO}$  a un solo flujo (50 ml/s) y con el mismo sensor de quimioluminiscencia. La diferencia radica en que el paciente, en vez de una sola espiración, efectúa varias espiraciones desde capacidad pulmonar total a 3 o 4 flujos de espiración constante que se encuentran entre 10 y 500 ml/s. De esta forma el trazador muestra una concentración de NO para cada flujo espiratorio utilizado ( $V_{NO}$ , pl/s)<sup>9</sup>. En nuestro estudio se realizó la espiración constante a 4 flujos (10; 30; 100, y 200 ml/s). Para el cálculo de los parámetros se determinaron los valores correspondientes a 2 de ellos, 100 y 200 ml/s, y se utilizaron las ecuaciones de Tsoukias y George<sup>6</sup> y Silkoff et al<sup>7</sup> para realizar el cálculo matemático de los parámetros independientes del flujo necesarios: la  $C_{ANO}$ , el flujo máximo de NO en la vía aérea

( $J'_{awNO}$ )

y la capacidad de difusión de NO a la luz ( $D_{awNO}$ )<sup>9</sup>.

### Sujetos

Se seleccionó a 36 voluntarios sanos (16 varones y 20 mujeres), no fumadores, sin antecedentes de atopia, que presentaban valores espirométricos dentro del margen de referencia, no habían

tenido enfermedades intercurrentes en los últimos 6 meses ni recibían tratamiento farmacológico de ningún tipo.

Se les determinó la  $F_{ENO}$  a un flujo fijo (50 ml/s) utilizando un sensor de quimioluminiscencia. Además se midió la  $C_{ANO}$  según la técnica de espiración constante a múltiples flujos (10; 30; 100, y 200 ml/s). Todas las determinaciones se efectuaron siempre en la misma franja horaria y 2 h después de la última ingesta alimentaria.

### Análisis estadístico

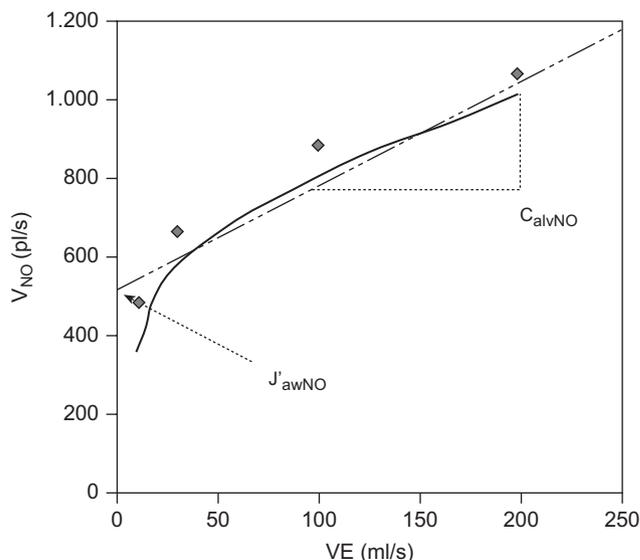
Para la descripción de los valores de  $F_{ENO}$ ,  $C_{ANO}$ ,  $J'_{awNO}$  y  $D_{awNO}$  se facilitan los valores medios y su desviación estándar. La comparación entre valores se llevó a cabo mediante la correlación lineal de Pearson. En todos los casos la aproximación fue bilateral y el valor de significación el habitual del 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Para el análisis se empleó el paquete estadístico SPSS (versión 11.5; SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.).

## Resultados

De los 36 individuos que iniciaron el estudio, se excluyó a 3 porque no realizaron correctamente la técnica de espiración. Se estudió, pues, a los 33 restantes (17 mujeres y 16 varones), todos ellos no fumadores, con una edad media ( $\pm$  desviación estándar) de  $36 \pm 11$  años, índice de masa corporal medio de  $23,8 \pm 2,8$  kg/m<sup>2</sup> y función respiratoria dentro del margen de referencia: volumen espiratorio forzado en el primer segundo del  $106 \pm 11\%$ , capacidad vital forzada del  $102 \pm 10\%$  y cociente de ambos parámetros del  $81 \pm 6\%$ .

El valor medio de  $F_{ENO}$  fue de  $15 \pm 6$  ppb (rango: 5,5-27 ppb), el de  $C_{ANO}$  de  $3,04 \pm 1,30$  ppb (rango: 1,45-6,31 ppb), el de  $J'_{awNO}$  de  $573 \pm 145$  pl/s (113-1.755) (fig. 1) y el de  $D_{awNO}$  de  $4,49 \pm 3$  ppb/s. La relación entre los valores de  $F_{ENO}$  y  $C_{ANO}$  respecto a la edad, el sexo, el índice de masa corporal y los valores espirométricos no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la determinación de  $F_{ENO}$  y  $C_{ANO}$  en este grupo de individuos ( $p = 0,4$ ;  $r = 0,1$ ).



**Figura 1.** Determinación de la concentración alveolar de óxido nítrico ( $C_{ANO}$ ).  $J'_{awNO}$ : flujo máximo de óxido nítrico en la vía aérea; VE (ml/s): flujo de espiración;  $V_{NO}$  (pl/s): flujo máximo de óxido nítrico que se consigue al realizar la espiración a un determinado flujo.

## Discusión

El modelo bicompartimental utilizado para explicar mejor los cambios dinámicos del NO<sup>5-7</sup> se basa en la existencia de 2 zonas teóricamente bien diferenciadas, que definirían la procedencia del NO en el aire espirado, el compartimiento de la vía aérea y el compartimiento alveolar, definidos a su vez por 3 parámetros independientes del flujo. El compartimiento de la vía aérea está determinado por el  $J'_{awNO}$  y por  $D_{awNO}$ . Según la ley de Fick, la producción de NO en la vía aérea es proporcional a la diferencia entre la concentración existente en la luz y la concentración en la pared bronquial. A su vez, la  $D_{awNO}$  dependerá de la concentración de NO en la pared bronquial<sup>10</sup>. Por otro lado, el compartimiento alveolar está definido por el tercer parámetro independiente del flujo, la  $C_{alNO}$ , que sufre modificaciones de forma dinámica y cíclica con la respiración y que refleja el equilibrio existente entre el NO producido localmente y el que se difunde a la vía aérea (fig. 2).

El NO alveolar es conducido por la vía aérea durante la espiración, de tal forma que la concentración final de NO en la vía aérea será la suma del transporte longitudinal desde la luz alveolar y la concentración del transporte transversal de toda la vía aérea<sup>9</sup>. Con este modelo, y utilizando estos parámetros, se puede predecir la concentración de NO a cualquier flujo espiratorio desestimando el NO procedente de los senos paranasales (fig. 2).

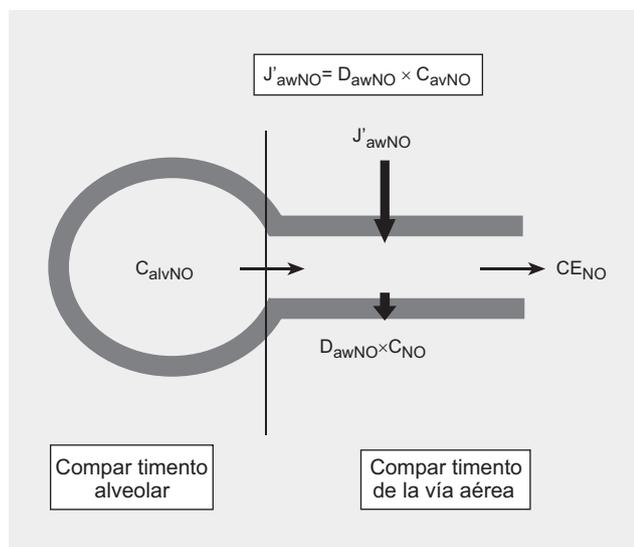
La técnica para determinar los 3 parámetros independientes del flujo descritos con anterioridad se realiza mediante la espiración constante a diferentes flujos, método descrito y estandarizado pero no utilizado en la clínica práctica de forma habitual<sup>5-7</sup>. Para efectuar esta técnica es necesario disponer del sensor de quimioluminiscencia que se emplea habitualmente para determinar la  $F_{ENO}$  y que debe permitir la espiración a diferentes flujos.

A fin de facilitar el cálculo de los parámetros independientes del flujo que nos facilita el sensor, un grupo de autores desarrolló en la década de los ochenta un modelo matemático mediante técnicas y ecuaciones analíticas que estiman de forma reproducible y fiable los parámetros necesarios para la utilización práctica del modelo bicompartimental<sup>9</sup>. Tsoukias y George<sup>6</sup> utilizaron una técnica de espiración con 2 flujos, entre 100 y 500 ml/s. Si se

contrasta en una gráfica la concentración de NO para cada flujo espiratorio utilizado ( $V_{NO}$ ) con el flujo espiratorio de cada espiración ( $V_E$ , ml/s), nos da una recta de la que matemáticamente pueden obtenerse 2 de los parámetros: la pendiente de la recta será la  $C_{alNO}$  y la intersección, el  $J'_{awNO}$  (fig. 1). Por otro lado, la ecuación de Silkoff et al<sup>7</sup> permite determinar la difusión de NO en la vía aérea ( $D_{awNO} = J'_{awNO} \times C_{alNO}$ ). Como puede observarse en la tabla 1, otros autores realizan operaciones matemáticas más complejas para el cálculo de los parámetros.

El valor medio de  $C_{alNO}$  obtenido en nuestro estudio ( $3,04 \pm 1,30$  ppb) se encuentra dentro de los valores de referencia descritos en la literatura médica para personas sanas ( $1,0-5,6$  ppb)<sup>11,12</sup> y muestra correlación con los valores de  $C_{alNO}$  medidos en la vía aérea distal mediante lavados broncoalveolares con fibrobroncoscopia en personas sanas<sup>12</sup>. Asimismo, nuestros resultados de  $C_{alNO}$  son equiparables a los obtenidos en individuos sanos incluidos en estudios de casos y controles sobre enfermedades respiratorias inflamatorias como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)<sup>10</sup>. Por otro lado, los valores de  $J'_{awNO}$  (573 pl/s) y de  $D_{awNO}$  (4,49 ppb/s) se encuentran dentro del margen de referencia establecido en la literatura científica<sup>5-11</sup> (420-1.280 pl/s y 3,1-9,2 ppb/s, respectivamente).

La técnica de espiración a múltiples flujos mediante un sensor de quimioluminiscencia adecuado permite determinar de forma sencilla, fiable y precisa los valores de  $C_{alNO}$  y establecer valores de referencia en individuos sanos. Como la  $C_{alNO}$  refleja un estado inflamatorio periférico y distal, a diferencia de la  $F_{ENO}$ , que muestra inflamación bronquial, en los últimos años múltiples estudios han intentado establecer los valores de  $C_{alNO}$  en las enfermedades respiratorias con inflamación distal. De esta forma se han objetivado valores patológicos de  $C_{alNO}$  en fumadores o en pacientes con asma, EPOC o enfermedad intersticial, asociada o no a esclerodermia<sup>13-16</sup>. Lehtimäki et al<sup>11</sup> realizaron un estudio de casos y controles en el que incluyeron a pacientes asmáticos, pacientes con alveolitis e individuos sanos. En los pacientes con asma los valores de  $J'_{awNO}$  fueron superiores a los obtenidos en personas sanas y en los afectados de alveolitis (2,5 frente a 0,1 y 0,7 ppb, respectivamente)<sup>11</sup>. En cambio, la  $C_{alNO}$  era superior en los pacientes con alveolitis (4 ppb), mientras que los sanos y los pacientes con asma presentaban valores inferiores y similares entre sí (1 ppb). La presencia de pacientes asmáticos con escasa afectación de la función pulmonar (asma leve), sin tratamiento y de diagnóstico reciente, que presentaban inflamación bronquial pero poca inflamación periférica, podría explicar la diferencia en los valores de  $C_{alNO}$  y el aumento de los de  $J'_{awNO}$  en el grupo de pacientes con asma. En consonancia con este estudio, Brindici et al<sup>17</sup> encontraron que los pacientes con asma grave y sin control terapéutico presentaban valores de  $C_{alNO}$  superiores a los individuos sanos y a los pacientes con asma leve. Sin embargo, la concentración de NO bronquial era superior en los pacientes con asma leve que en aquellos con asma grave. Se han obtenido resultados similares en otros estudios<sup>14-18</sup>. Además, se ha demostrado que existe una correlación negativa y positiva entre la gravedad de los síntomas de los pacientes asmáticos y la determinación de NO bronquial y alveolar, respectivamente<sup>18</sup>. Estos resultados demuestran que la situación clínica de los pacientes con asma grave y/o resistente al tratamiento está determinada en mayor grado por la inflamación alveolar que por la inflamación bronquial, de tal forma que la determinación de  $C_{alNO}$  en estos pacientes podría ser muy útil para el control terapéutico de la enfermedad y tendría mayor precisión que la utilización de  $F_{ENO}$ . Por todo ello, la determinación de la  $C_{alNO}$  es útil para conocer la situación de inflamación alveolar en enfermedades respiratorias con afectación distal en el pulmón (asma grave, neumopatía intersticial, EPOC), cuantificar el daño alveolar y seguir el curso de la enfermedad.



**Figura 2.** Modelo bicompartimental de óxido nítrico (NO). La concentración de NO en aire espirado ( $CE_{NO} = F_{ENO}$ ) es la suma de las concentraciones de NO en la región alveolar y la vía aérea que viene determinada por 3 parámetros independientes del flujo: flujo máximo de NO en la vía aérea ( $J'_{awNO}$ ), capacidad de difusión de NO a la luz ( $D_{awNO}$ ) y concentración alveolar de óxido nítrico ( $C_{alNO}$ ).

**Tabla 1**  
Técnicas de espiración constante a múltiples flujos y los modelos matemáticos analíticos\*

	Parámetros independientes del flujo			Técnica de espiración a múltiples flujos
	$J'_{awNO}$	$D_{awNO}$	$C_{ANO}$	
Tsoukias y George <sup>6</sup>	Sí		Sí	Dos espiraciones a un flujo entre 100 y 500 ml/s
Pietropaoli et al <sup>5</sup>	Sí	Sí		Dos espiraciones a un flujo entre 100 y 500 ml/s
Silkoff et al <sup>7</sup> , 2 flujos	Sí	Sí		Una espiración a un flujo entre 15-50 ml/s
Silkoff et al <sup>7</sup> , 9 flujos	Sí	Sí	Sí	Nueve espiraciones a un flujo entre 4,2 y 1.550 ml/s
George et al <sup>9</sup>	Sí	Sí	Sí	Tres espiraciones a un flujo entre 5 y 500 ml/s

Modificada de George et al<sup>9</sup>.

$C_{ANO}$  (ppb): concentración media de óxido nítrico (NO) en el tejido alveolar;  $C_{awNO}$ : concentración media de NO en la pared bronquial;  $C_{ENO}$  (ppb) =  $F_{ENO}$ : fracción o concentración espirada de NO a un flujo determinado;  $D_{awNO}$ : capacidad de difusión del compartimiento de la vía aérea;  $J'_{awNO}$  (pl NO/s): flujo máximo total de NO en el compartimiento de la vía aérea;  $V_E$  (ml/s): flujo de espiración realizado en cada maniobra (10, 30, 100, etc.);  $V_{NO}$  (pl/s): flujo máximo de óxido nítrico que se consigue al realizar la espiración a un determinado flujo.

\* Ecuaciones:  $C_{ENO} = (J'_{awNO} \times 1/V_E) + C_{ANO}$  (de Pietropaoli et al<sup>5</sup>);  $V_{NO} = (C_{ANO} \times V_E) + J'_{awNO}$  (de Tsoukias y George<sup>6</sup>);  $D_{awNO} = V_E \times (C_{ENO} - C_{ANO}) / (C_{awNO} - C_{ANO})$  (de Hogman citado en George<sup>6</sup>); and  $J'_{awNO} = D_{awNO} \times C_{awNO}$  (de Silkoff et al<sup>7</sup>). Para la determinación del  $C_{ANO}$  se utilizan 2 flujos, entre los cuales (100-500) se determina la pendiente de la recta de confrontación entre el  $V_E$  y  $V_{NO}$ . La pendiente será la determinación de  $C_{ANO}$ <sup>9</sup>.

En cuanto a las limitaciones de la técnica, cabe mencionar que uno de los factores más importantes que modifican las concentraciones de NO en la vía aérea es el tabaco. Respecto a las concentraciones de  $F_{ENO}$  los estudios publicados muestran resultados variables, dispares e incluso en ocasiones contradictorios. En algunos, los fumadores presentan valores de  $F_{ENO}$  menores que los no fumadores, y estos valores aumentan cuando abandonan el hábito tabáquico, aunque no lleguen a alcanzar los valores de referencia<sup>13,14</sup>. Asimismo, los fumadores presentan valores de  $C_{ANO}$  menores que los exfumadores (0,93 frente a 1,41 ppb) y que los no fumadores (1,32 ppb), resultados que se explican por la asociación entre disfunción endotelial y el efecto tóxico del tabaco<sup>19,20</sup>. Los cigarrillos contienen un gran número de radicales libres y sustancias pro-oxidantes que generan una disminución de la bioactividad del NO y favorecen un estado de estrés oxidativo. Además, los fumadores presentan un déficit de la síntesis de un cofactor necesario para que la NOS endotelial, la tetrahidrobiopterina, debido a la absorción de aminas aromáticas que inhiben la producción de este cofactor<sup>21</sup>, favoreciendo así la síntesis de moléculas superóxido que contribuyen al estado de estrés oxidativo<sup>19</sup>. Por otro lado, el tabaco contiene el aminoácido N-nitrosamina, con poder inhibidor de los macrófagos alveolares para la producción de NO<sup>19</sup>. Todo ello explicaría que los valores de  $F_{ENO}$  y de  $C_{ANO}$  en pacientes con EPOC fumadores o exfumadores empedernidos puedan estar disminuidos<sup>20</sup>. De esta forma su utilidad se verá limitada en pacientes fumadores, pues el resultado estará influido por el hábito tabáquico y no será valorable en el momento de tomar decisiones diagnóstico-terapéuticas. Otras limitaciones de la técnica son las derivadas de la maniobra respiratoria, de la dificultad para realizarlas según el tipo de paciente y de la falta de colaboración. No se han descrito contraindicaciones.

En resumen, el modelo bicompartimental para la determinación de parámetros independientes del flujo permite analizar la procedencia y el intercambio dinámico de NO en la vía aérea y en la región alveolar, 2 partes anatómicamente alejadas en el espacio y responsables de enfermedades respiratorias diferentes. Además, permite describir mejor los cambios metabólicos y estructurales que se producen en enfermedades que afectan a alguno de los 2 compartimientos. El parámetro independiente del flujo más relevante para la descripción del estado de inflamación distal del aparato respiratorio es la  $C_{ANO}$ . El método de espiración a múltiples flujos que describe el modelo bicompartimental es una técnica no invasiva y sencilla, que permite determinar la  $C_{ANO}$  de forma rápida y fiable. Una vez establecidos los valores de referencia de  $C_{ANO}$ , se requiere la determinación de  $C_{ANO}$  en

pacientes con enfermedades respiratorias que presenten inflamación distal. De esta forma la determinación de  $C_{ANO}$  podría ser un marcador del estado inflamatorio y una herramienta útil en el control clínico, terapéutico e incluso pronóstico de pacientes con asma grave, asma refractaria al tratamiento o con enfermedad intersticial.

## Bibliografía

- Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, et al. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet*. 1993;342:1510-3.
- Kharitonov, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*. 1994;343:133-5.
- Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, et al. Comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:473-8.
- De Jongste JC. Yes to NO: the first studies on exhaled nitric oxide-driven asthma treatment. *Eur Respir J*. 2005;26:379-81.
- Pietropaoli AP, Perillo IB, Torres A, Perkins PT, Frasier LM, Utell MJ, et al. Simultaneous measurement of nitric oxide production by conducting and alveolar airways of humans. *J Appl Physiol*. 1999;87:1532-42.
- Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol*. 1998;85:653-66.
- Silkoff PE, Sylvestre JT, Zamel N, Permutt S. Airway nitric oxide diffusion in asthma. Role in pulmonary function and bronchial responsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1218-28.
- American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:912-30.
- George SC, Hogman M, Permutt S, Silkoff PE. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. *J Appl Physiol*. 2004;96:831-9.
- Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, Kaneko F, Hutte R, Stuehr DJ, et al. Nitric oxide synthesis in the lung: regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *J Clin Invest*. 1998;101:660-6.
- Lehtimäki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, Hahtola P, Järvenpää R, Koivula T, et al. Extended exhaled NO measurement differentiates between alveolar and bronchial inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1557-61.
- Shin HW, Rose-Gotttron CM, Pérez F, Cooper DM, Wilson AF, George SC. Flow-independent nitric oxide exchange parameters in healthy adults. *J Appl Physiol*. 2001;91:2173-81.
- Brindicci C, Ito K, Resta O, Pride NB, Barnes PJ, Kharitonov SA. Exhaled nitric oxide from lung periphery is increased in COPD. *Eur Respir J*. 2005;26:52-9.
- Malinovsky A, Janson C, Holmkvist T, Norbäck D, Meriläinen P, Högman M. Effect of smoking on exhaled nitric oxide and flow independent nitric oxide exchange parameters. *Eur Respir J*. 2006;28:339-45.
- Berry M, Hargadon B, Morgan A, Shelley M, Richter J, Shaw D, et al. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. *Eur Respir J*. 2005;25:986-91.
- Malerba M, Radaeli A, Ragnoli B, Airo P, Corradi M, Ponticello A, et al. Exhaled nitric oxide levels in systemic sclerosis with and without pulmonary involvement. *Chest*. 2007;132:575-80.
- Brindicci C, Kazuhiro I, Barnes PJ, Kharitonov SA. Differential flow analysis of exhaled nitric oxide in patients with asthma of differing severity. *Chest*. 2007;131:1353-62.

18. Van Veen IH, Sterk PJ, Schot R, Gauw SA, Rabe KF, Bel EH. Alveolar nitric oxide versus measures of peripheral airway dysfunction in severe asthma. *Eur Respir J*. 2006;27:951–6.
19. Wever RM, Van Dam T, Van Rijn HJ, De Groot F, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237:340–4.
20. Therriault MJ, Proulx LI, Castonguay A, Bissonnette EY. Immunomodulatory effects of the tobacco-specific carcinogen, NNK, on alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2003;132:232–8.





Técnicas y procedimientos

## Determinación de la concentración de óxido nítrico alveolar en aire espirado: procedimiento y valores de referencia en personas sanas

Ana María Fortuna \*, Marco Balleza, Núria Calaf, Mercedes González, Teresa Feixas y Pere Casan

- La técnica de espiración a múltiples flujos se realiza siguiendo el mismo procedimiento que la técnica de espiración constante a 50 ml/s pero a 4 flujos diferentes (10, 30, 100 y 200 ml/s).
- La técnica de espiración a múltiples flujos ha permitido el desarrollo del *modelo bicompartimental* para la determinación de los valores de  $CA_{NO}$ , el flujo máximo de NO en la vía aérea ( $J'aw_{NO}$ ), y la capacidad de difusión de NO a la luz ( $Daw_{NO}$ ) mediante las ecuaciones de Tsoukias y George<sup>96</sup> y de Silkoff et al.<sup>99</sup>
- Se establecieron valores de referencia de  $CA_{NO}$  en un grupo de 33 individuos sanos que presentaron un valor medio de  $3,04 \pm 1,30$  ppb, con un rango de valores entre 1,45 y 6,31 ppb.
- Los valores medidos de  $J'aw_{NO}$  y de  $Daw_{NO}$  fueron de  $573 \pm 7145$  pl/s (113–1.755) y de  $4,49 \pm 3$  ppb/s, respectivamente.
- Los valores de  $CA_{NO}$  no presentaron asociación significativa con la edad, el sexo, el índice de masa corporal y los valores espirométricos ( $p > 0,05$ ).



**ESTUDIO 3**





ELSEVIER

respiratoryMEDICINE

# Diagnostic utility of inflammatory biomarkers in asthma: Exhaled nitric oxide and induced sputum eosinophil count

Ana M<sup>a</sup> Fortuna\*, Teresa Feixas, Mercedes González, Pere Casan

Department of Pulmonary Function, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni M<sup>a</sup> Claret, 167, Barcelona 08025, Spain

Received 31 January 2007; accepted 29 May 2007

Available online 21 August 2007

## KEYWORDS

Asthma;  
Inflammation;  
Diagnosis;  
Nitric oxide;  
Induced sputum

## Summary

**Background:** Even though an inflammatory process is known to be the underlying cause of asthma, diagnosis is based on clinical history, reversible airway obstruction and bronchial hyperresponsiveness according to international guidelines. The fraction of exhaled nitric oxide (FE<sub>NO</sub>) and induced sputum eosinophil count (Eos%) have been used as non-invasive inflammatory biomarkers.

**Objectives:** The aim of this study was to compare the sensitivity and specificity of FE<sub>NO</sub>, Eos% and spirometry and to assess whether their combined use in clinical practice would improve diagnostic yield.

**Methods:** In 50 patients with asthma symptoms we performed spirometry, a methacholine challenge test, FE<sub>NO</sub> measurement and assessment of Eos% in induced sputum. The standard diagnosis of asthma followed the guidelines of the Global Initiative for Asthma.

**Results:** Twenty-two of the 50 patients were diagnosed with asthma. The sensitivity and diagnostic accuracy were higher for FE<sub>NO</sub> measurement (77%; area under the receiver operating curve [AUC], 0.8) than for spirometry (22%; AUC, 0.63). The sensitivity and specificity of Eos% in induced sputum were 40% and 82%, respectively, and the diagnostic accuracy of Eos% was lower (AUC, 0.58). When both inflammatory biomarkers were used together specificity increased to 76%.

**Conclusions:** The diagnostic accuracy of FE<sub>NO</sub> measurement was superior to that of the standard diagnostic spirometry in patients with symptoms suggestive of asthma. The use of

**Abbreviations:** FE<sub>NO</sub>, fraction of exhaled nitric oxide; Eos%, eosinophil count expressed as a percentage; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity; ppb, parts per billion; PD<sub>20</sub>, the dose of methacholine producing a 20% fall in FEV<sub>1</sub>; ROC, receiver operating characteristic curve; AUC, area under the receiver operating characteristic curve

\*Corresponding author. Tel.: +34 93 5565972; fax: +34 93 5565601.

E-mail address: afortuna@santpau.es (A.M<sup>a</sup>. Fortuna).

FE<sub>NO</sub> measurement and induced sputum Eos% together to diagnose asthma in clinical practice is more accurate than spirometry or FE<sub>NO</sub> assessment alone and easier to perform.  
© 2007 Published by Elsevier Ltd.

## Introduction

Asthma is a chronic airway disease whose diagnosis is based on clinical history, reversible airway obstruction and bronchial hyperresponsiveness.<sup>1</sup> However, the real cause of these functional disorders is a chronic inflammatory process in which mastocytes and eosinophils play a major role.<sup>2</sup> Because conventional approaches to diagnosing asthma do not involve an assessment of airway inflammation, the fraction of exhaled nitric oxide (FE<sub>NO</sub>) and the induced sputum eosinophil count expressed as a percentage (Eos%) have been proposed as inflammatory biomarkers that are useful in this setting.<sup>3,4</sup> Several studies have demonstrated that each of these biomarkers is more accurate than standard approaches to the diagnosis of asthma,<sup>5,6</sup> but the accuracy of both used together has not been assessed. We therefore hypothesised that diagnostic yield in terms of specificity and sensitivity might improve if both tests were used together.

Our aim was to analyse the sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of FE<sub>NO</sub> measurement and Eos% in comparison with conventional diagnostic tests (spirometry, bronchodilator response and methacholine challenge) in the diagnosis of asthma. We also sought to evaluate whether using both inflammatory biomarkers together would provide greater diagnostic accuracy in patients with a clinical history suggestive of asthma.

## Material and methods

### Patients

Fifty-seven consecutive patients were recruited for prospective study. All were referred to our hospital-based respiratory medicine outpatient clinic for diagnosis with a clinical history suggestive of asthma (dry cough, wheezing, and shortness of breath) from October 2004 to November 2005. We excluded patients with conditions that could affect FE<sub>NO</sub> or Eos% measurement for reasons other than asthma: subjects with symptoms of respiratory tract infection in the previous 6 weeks or with systemic manifestations of atopy (rash, digestive symptoms, etc.) and patients who had received treatment with inhaled or oral corticosteroids in the last 4 weeks. All patients enrolled agreed to participate voluntarily and gave written informed consent. The institutional review board of our hospital approved the study.

### Study design

The tests in this prospective study were conducted on 2 consecutive days. The first day the patient filled in a clinical symptoms questionnaire<sup>7</sup> and underwent FE<sub>NO</sub> measurement, spirometry with bronchodilator response and collec-

tion of induced sputum. The next day a methacholine challenge test was performed. All the procedures were carried out at the same hour of each day and in an order that guaranteed that the results of one test did not interfere with the next. Trained members of our lung function laboratory staff executed the tests.

### Study procedures

The tests of reference for the diagnosis of asthma were the conventional lung function tests (spirometry and bronchodilator response) and methacholine challenge test following guidelines of the Global Initiative for Asthma (GINA).<sup>1</sup> Spirometry was performed following international guidelines<sup>8</sup> with a Datospir 120 (Sibelmed, Barcelona, Spain). A forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>) ≥ 80% of predicted and/or a ratio of FEV<sub>1</sub> to forced vital capacity (FVC) ≥ 75% were considered to lie within normal limits.

Spirometry results lying outside the reference limits were classified as mild obstruction (60% ≤ FEV<sub>1</sub> ≤ 74%), moderate (59% ≤ FEV<sub>1</sub> ≤ 40%), or severe (FEV<sub>1</sub> ≤ 39%). A positive bronchodilator response was defined as an increase in FEV<sub>1</sub> ≥ 15% and/or ≥ 200 mL from baseline after inhalation of 400 µg of salbutamol.<sup>8</sup>

The methacholine challenge was performed according to international guidelines as a dose–response test of increasing doses of methacholine chlorohydrate (0.1–32 mg/mL) every 5 min.<sup>9</sup> The test was stopped when the highest concentration (32 mg/mL) was tolerated, or if a fall of 20% in FEV<sub>1</sub> from baseline was induced after methacholine was inhaled. The results were expressed as the dose of methacholine provoking a 20% fall in FEV<sub>1</sub> (PD<sub>20</sub>). A methacholine challenge test was considered positive if the PD<sub>20</sub> was ≤ 16 mg/mL.<sup>9</sup> A subject who presented a clinical history suggestive of asthma and a positive methacholine challenge test was diagnosed with asthma following the GINA guidelines.<sup>1</sup>

### Inflammatory biomarkers

FE<sub>NO</sub> measurement was performed with a conventional chemoluminescence analyser (SIR N-6008, Madrid, Spain) according to international guidelines.<sup>10,11</sup> The standardised single breath technique was used; each patient inhaled to total lung capacity once and then exhaled at a constant flow rate of 50 mL/s for approximately 10 s. A resistance with a pressure above 5–20 cm H<sub>2</sub>O was provided to ensure velum closure and to exclude contamination from nasal NO. To interpret FE<sub>NO</sub> recordings, we took only the valid NO plateau of the exhalation curve (held for > 3 s and with a variation of < 10%). The mean value of FE<sub>NO</sub> from three technically valid measurements was recorded. The cutoff for a positive result was defined as a FE<sub>NO</sub> ≥ 20 parts per billion (ppb).<sup>12</sup>

Sputum induction was carried out following described procedures.<sup>13</sup> Briefly, each patient gave a sputum sample

induced with hypertonic saline. Sputum was separated from saliva to avoid inclusion of squamous cells, and the total nonsquamous cell count was performed. Cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. The filtrate was treated within 2 h with a solution of dithiothreitol and then centrifuged. The sediment was stained with Papanicolaou stain, toluidine blue and eosin hematoxylin. The differential cell count, including metachromatic cells, was expressed as the absolute number of cells in millions per gram of sputum and as the percentage of the total nonsquamous and bronchial epithelial cells. An adequate sputum sample was assumed if induction was tolerated for at least 4 min, the volume was >1 mL and squamous cell percentage was <20%.<sup>14</sup> The cutoff for a positive Eos% result was defined as  $\geq 3\%$ .<sup>14</sup>

### Statistical analysis

Descriptive statistics were expressed as mean  $\pm$  SD. The comparisons of anthropometric and other variables between groups were performed using the Mann–Whitney *U*-test. Diagnostic accuracy was assessed based on the area under the receiver operating characteristic curve (AUC). The Pearson correlation coefficient was used to assess the relationship between PD<sub>20</sub> and each of the two inflammatory biomarkers. Forward binary logistic regression was used to estimate the added usefulness of assessing both Eos% in induced sputum along with FE<sub>NO</sub>. Relevant odds ratios and the 95% confidence intervals (CI) were calculated. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant. An independent statistician analysed the raw data. The SPSS version 11.5 statistical package (Chicago, Illinois, USA) was used for all analyses.

### Results

Of 57 patients with a clinical history suggestive of asthma recruited, 7 were excluded because they were receiving oral corticosteroid treatment at the time of the study. Table 1 shows the clinical characteristics of the remaining 50 patients. The methacholine airway challenge test was positive in 22 patients and they were diagnosed with asthma. The diagnoses of the remaining 28 patients were eosinophilic bronchitis (5 patients, 17%), chronic rhinitis (14, 50%), chronic cough (6, 21%) and acute bronchitis (3, 10%).

No adverse events occurred during performance of the procedures. All patients were able to produce sputum and perform the FE<sub>NO</sub> procedure. Our induced sputum samples were minimally contaminated with saliva (mean squamous cell count of 6% and viability cellular of 64).

The FEV<sub>1</sub> and FEV<sub>1</sub>/FVC values were within reference limits for 45 patients (90%) and 5 patients presented airflow obstruction (4, moderate; 1, severe). There were no significant differences in age, sex, body mass index, FEV<sub>1</sub>, or FEV<sub>1</sub>/FVC between patients diagnosed with asthma and patients with other diagnoses.

The mean FE<sub>NO</sub> value was significantly higher in asthmatics at 40  $\pm$  31 ppb than in non-asthmatic patients (18  $\pm$  23 ppb) (*p* = 0.04). The mean Eos% in induced sputum tended to be higher in asthmatics (4.5  $\pm$  8.5%) than in non-

**Table 1** Characteristics of patients.

Characteristics	Non-asthmatic patients	Asthmatic patients
Patients (no.)	28	22
Age (year), mean (range)	38 (18–64)	37 (18–68)
Gender (no.)		
Male	10	11
Female	18	11
FEV <sub>1</sub> (%) (mean $\pm$ SD)	99 $\pm$ 10	94 $\pm$ 19**
FVC (%) (mean $\pm$ SD)	101 $\pm$ 10	104 $\pm$ 17**
FEV <sub>1</sub> /FVC (%) (mean $\pm$ SD)	78 $\pm$ 6.3	73 $\pm$ 12**
FE <sub>NO</sub> (ppb) (mean $\pm$ SD)	18 $\pm$ 23	40 $\pm$ 31*
Eos%, induced sputum (mean $\pm$ SD)	2.1 $\pm$ 3.3	4.5 $\pm$ 8.5**
Bronchodilator test no. (%)	Positive: 4 (14.3) Negative: 24 (85.7)	Positive: 9 (40.9%) Negative: 13 (59.1%)
Smokers patients (no.)	4 smokers; 3 ex-smokers	3 smokers; 4 ex-smokers

\*Statistically significant, *p* < 0.05.

\*\*Nonstatistically significant, *p* > 0.05.

asthmatic patients (2.1  $\pm$  3.3%) but the difference was not statistically significant (*p* = 0.07).

Table 2 shows the sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of the diagnostic procedures. FE<sub>NO</sub> measurement was the procedure that presented the highest sensitivity (77%). The figures show the receiver operating characteristic curves for the lung function variables (Fig. 1), FE<sub>NO</sub> and Eos% in induced sputum (Fig. 2) and the combined use of both inflammatory biomarkers (Fig. 3). The highest accuracy (sensitivity and specificity combined) was achieved by FE<sub>NO</sub> measurement, with a mean AUC of 0.80 (95% CI, 0.62–0.87; *p* < 0.001). The cutoff that best distinguished between asthmatics and non-asthmatics was a FE<sub>NO</sub> value of 23 ppb.

The AUC for Eos% in induced sputum was 0.56 (95% CI, 0.41–0.70; *p* < 0.001) at an Eos% cutoff of 4%. Spirometry presented an AUC of 0.64 (95% CI, 0.49–0.77; *p* < 0.008) for FEV<sub>1</sub> and 0.63 (95% CI, 0.48–0.76; *p* < 0.006) for FEV<sub>1</sub>/FVC.

A significant negative correlation between FE<sub>NO</sub> and PD<sub>20</sub> was observed (*r* = -0.4; *p* = 0.004). Forward logistic regression showed that the addition of sputum Eos% to FE<sub>NO</sub> measurement improved the diagnostic accuracy by increasing the specificity (specificity of FE<sub>NO</sub> plus induced sputum, 76%, *p* < 0.05 vs. 64% specificity for FE<sub>NO</sub> alone). The addition of the standard diagnostic procedures (lung function tests and bronchodilator test) to FE<sub>NO</sub> measurement did not increase accuracy.

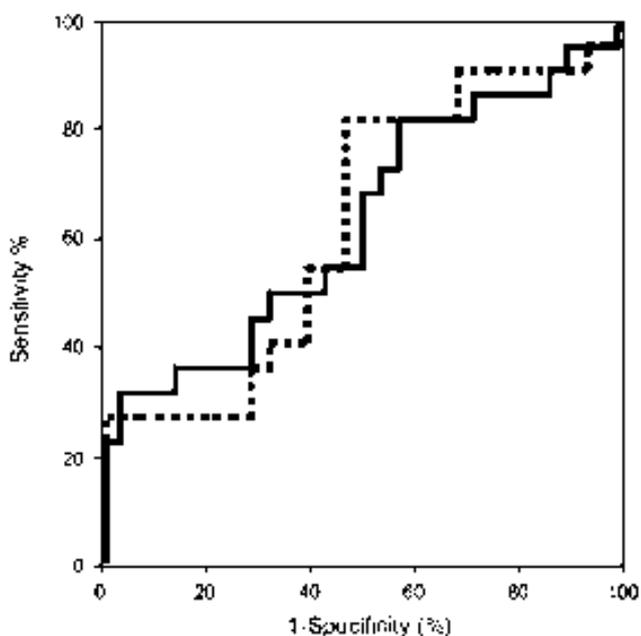
**Table 2** Sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of FE<sub>NO</sub>, Eos% in induced sputum and spirometry in the diagnosis of asthma.

	Patients asthmatics (n = 22)	Patients no asthmatics (n = 28)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
<b>FE<sub>NO</sub>*</b>						
Positive	17	10	77	64	62	78
Negative	5	18				
<b>Induced sputum (Eos%)<sup>†</sup></b>						
Positive	9	7	41	75	56	61
Negative	13	21				
<b>FEV<sub>1</sub></b>						
< 80%	5	0	22	100	100	56
≥ 80%	17	22				
<b>Bronchodilator test<sup>‡</sup></b>						
Positive	9	4	41	85	69	64
Negative	13	24				

\*FE<sub>NO</sub> positive: ≥20 ppb; negative: ≤19 ppb.

<sup>†</sup>Induced sputum (Eos%) positive: ≥3%; negative: ≤2.9%.

<sup>‡</sup>Bronchodilator test positive is the increase in FEV<sub>1</sub> ≥15% and/or ≥200 mL from baseline after inhalation of 400 µg of salbutamol.

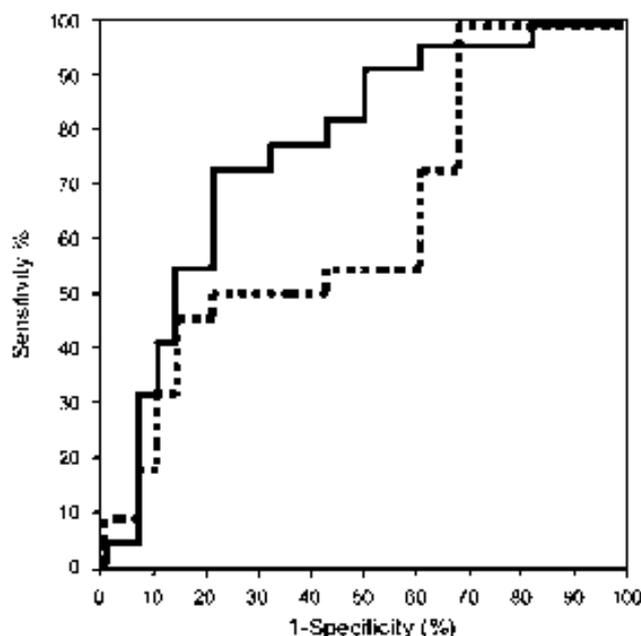


**Figure 1** Receiver operating characteristic curve (ROC) for forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>, solid line) and the ratio of FEV<sub>1</sub> to forced vital capacity ratio (FVC, dotted line).

The correlation between Eos% in induced sputum and PD<sub>20</sub> was not statistically significant ( $r = 0.2$ ;  $p = 0.4$ ), and adding Eos% measurement to the standard diagnostic procedures (lung function tests) produced no statistically significant increase in diagnostic accuracy.

**Discussion**

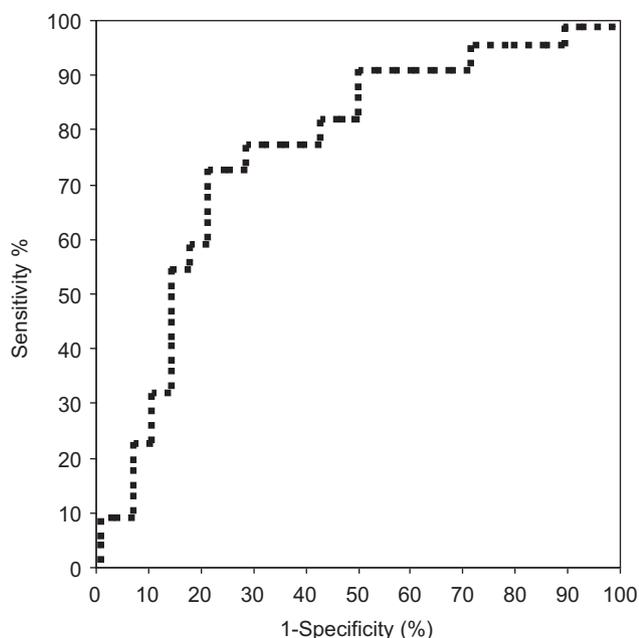
In this study, we have confirmed that measurement of FE<sub>NO</sub> as an inflammatory biomarker and in patients with high



**Figure 2** Receiver operating characteristic curve for the exhaled nitric oxide measurement (FE<sub>NO</sub>, solid line) and Eos% in induced sputum (dotted line). The FE<sub>NO</sub> measurement shows higher area under the receiver operating characteristic curve (AUC) than Eos% in induced sputum.

clinical suspicion of asthma it offers higher diagnostic sensitivity than the standard approach based on lung function and methacholine challenge testing, and we have further shown that using measurement of both FE<sub>NO</sub> and induced sputum Eos% together increased the accuracy of diagnosis.

Conventional procedures for diagnosing asthma according to international guidelines require the demonstration of



**Figure 3** Receiver operating characteristic curve for the exhaled nitric oxide measurement ( $FE_{NO}$ ) plus Eos% in induced sputum.

airway obstruction and/or bronchial hyperresponsiveness.<sup>1</sup> These procedures distinguish healthy individuals from patients according to the type and degree of airway obstruction, even though findings vary greatly because of individual airway variability and differing degrees of patient cooperation. Of 22 patients diagnosed with asthma based on a positive methacholine challenge test in our study, only 5 patients presented airflow obstruction by spirometry. The remaining 17 asthmatic patients presented normal  $FEV_1$  and  $FEV_1/FVC$  values and  $FE_{NO}$  values  $>20$  ppb, indicating a diagnosis of asthma by inflammatory biomarker but not by spirometry. These findings support a conclusion that this biomarker offers a useful tool for diagnosing asthma in patients who present spirometry values within the normal reference limits. The high significant correlation between  $FE_{NO}$  and  $PD_{20}$  also supports the use of  $FE_{NO}$  assessment to obtain a more accurate diagnosis of asthma, with less variability than with standard procedures. Moreover  $FE_{NO}$  is an easier technique to use in patients with mild asthma and it is safer in patients with severe airway obstruction ( $FEV_1 < 50\%$ ). The negative predictive value of  $FE_{NO}$  measurement is very acceptable and greater than that of spirometry or induced sputum Eos% assessment. Thus,  $FE_{NO}$  measurement can rule out an inflammatory respiratory process in 78% of the patients, giving it considerable diagnostic capability.

The cutoff for  $FE_{NO}$  measurement that shows the best combination of sensitivity and specificity in the diagnosis of asthma in our study was 23 ppb, consistent with the cutoff established in the literature.<sup>5,10,15</sup> The lower sensitivity of induced sputum Eos% in comparison with the sensitivity of  $FE_{NO}$  measurement is attributable to the periodic character of sputum eosinophil increases in some asthmatic patients.<sup>16</sup> The higher specificity of Eos% (77%) in comparison with  $FE_{NO}$  (64%) supports a diagnostic role for induced sputum Eos% measurement in eosinophilic diseases with asthmatic symp-

toms, such as eosinophilic bronchitis, occupational asthma and chronic cough. On the other hand, there are various airway inflammatory diseases—such as chronic obstructive pulmonary disease,<sup>17</sup> bronchiectasis,<sup>18</sup> or lung cancer<sup>19</sup>—where NO levels are elevated. Our findings also encourage the addition of induced sputum Eos% to  $FE_{NO}$  measurement to increase diagnostic yield in these cases. Thus, when we used both biomarkers together, the forward logistic regression model showed higher specificity in the diagnosis of patients with a clinical history suggestive of asthma. This improvement in specificity is not observed when spirometry and methacholine challenge test results are added to  $FE_{NO}$  assessment.

This study has confirmed the utility of  $FE_{NO}$  for diagnosing asthma in populations with clinical symptoms suggestive of the disease.  $FE_{NO}$  measurement led to a faster, more convenient and more accurate diagnosis of asthma than standard procedures. Additionally, we found that using both  $FE_{NO}$  and induced sputum Eos% together to diagnose asthma is more accurate than spirometry or  $FE_{NO}$  assessment alone and easier to perform than methacholine challenge test. These non-invasive techniques to measure inflammatory biomarkers offer simple, complementary and reproducible diagnostic tools for diagnosing asthma in clinical practice, suggesting an approach that may lead to a new definition of asthma in the future.

## Acknowledgments

M.E. Kerans provided assistance with English usage in a version of the manuscript.

None of the authors of this manuscript have a conflict of interest to declare in relation to this work.

## References

1. Global Initiative for Asthma. Global strategy for Asthma Management and Prevention NHLBI/WHO workshop report. No. 02-3659, 2002.
2. Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *Eur Respir J* 2003;**23**: 84–113.
3. Jatakanon A, Sim L, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998;**53**:91–5.
4. Strunk RC, Szefer SJ, Phillips B, et al. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *Am Acad Allergy Asthma Immunol* 2003;**112**:883–92.
5. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, et al. Comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;**169**:473–8.
6. Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest* 2003;**123**:751–6.
7. Juniper EF, O'Byrne PM, Guyatt GH, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J* 1999;**14**:902–7.
8. American Thoracic Society. Standardization of spirometry. *Am Rev Respir Dis* 1987;**136**:1285–98.
9. American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;**161**:309–29.

10. American Thoracic Society. Recommendations for standardised procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;**160**:2104–17.
11. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1997;**10**:1683–93.
12. Calaf N, De Lerma JB, Feixas T, Gonzalez M, Codina E, Casan P, et al. Exhaled nitric oxide: reference values in healthy adults. *Arch Bronconeumol* 2004;**40**(Suppl. 2):66.
13. Efthimiadis A, Pizzichini E, Pizzichini M, Hargreave FE. Sputum examination for indices of airway inflammation: laboratory procedures. Canadian Society. Lund, Sweden: Thoracic Society Canadienne de Thoracologie, Astra Draco AB; 1997.
14. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**161**:475–8.
15. Silkoff PE, Carlson M, Bourke T, Katial R, Ogren E, Szeffler SJ. The aecrine exhaled nitric oxide monitoring system NIOX is cleared by de US Food and Drug Administration for monitoring therapy is asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**114**(5):1241–56.
16. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990;**323**(15):1033–9.
17. Delen FM, Sippel JM, Osborne ML, Law S, Thukkani N, Holden WE. Increased exhaled nitric oxide in chronic bronchitis: comparison asthma and COPD. *Chest* 2000;**117**:695–701.
18. Kharitonov SA, Wells AU, O'Connor BJ, et al. Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;**151**:1889–93.
19. Liu CY, Wang CH, Chen TC, Lin HC, Yu CT, Kuo HP. Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthase in patients with primary lung cancer. *Br J Cancer* 1998;**78**:534–41.



ELSEVIER

respiratoryMEDICINE

## Diagnostic utility of inflammatory biomarkers in asthma: Exhaled nitric oxide and induced sputum eosinophil count

Ana M<sup>a</sup> Fortuna\*, Teresa Feixas, Mercedes González, Pere Casan

- Los 22 pacientes diagnosticados de asma presentaron valores de FE<sub>NO</sub> superiores a los pacientes no asmáticos ( $40 \pm 31$  ppb vs  $18 \pm 23$  ppb, respec.).
- La determinación de FE<sub>NO</sub> fue el procedimiento que presentó la más alta capacidad diagnóstica (sensibilidad 77% y especificidad 64% combinada) con un AUC de 0.80 (95% CI, 0.62–0.87;  $p < 0.001$ ).
- El punto de corte de FE<sub>NO</sub> que mejor distinguió a los pacientes asmáticos de los no asmáticos fue de 23 ppb.
- La determinación de FE<sub>NO</sub> presentó una correlación negativa y significativa con la PD<sub>20</sub> obtenida en la prueba de provocación bronquial con metacolina ( $r = -0.4$ ;  $p = 0.004$ ).
- La combinación de FE<sub>NO</sub> con el esputo inducido y no con la espirometría, aumentó la capacidad diagnóstica de FE<sub>NO</sub> aislado, mejorando la especificidad a un 76%.



## **ESTUDIO 4**





available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rmed](http://www.elsevier.com/locate/rmed)



# Airway and alveolar nitric oxide measurements in obstructive sleep apnea syndrome

A.M. Fortuna<sup>a,b,c,\*</sup>, R. Miralda<sup>a,b,c</sup>, N. Calaf<sup>b,c</sup>, M. González<sup>b,c</sup>, P. Casan<sup>b,c</sup>,  
M. Mayo<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Sleep Laboratory, Respiratory Medicine Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Mas Casanovas, 90, Barcelona 08025, Spain

<sup>b</sup> Pulmonary Function Laboratory, Respiratory Medicine Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Mas Casanovas, 90, Barcelona 08025, Spain

<sup>c</sup> Medicine Department of the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Received 7 September 2010; accepted 4 December 2010

Available online 12 January 2011

## KEYWORDS

Obstructive sleep apnea;  
Exhaled nitric oxide;  
Alveolar nitric oxide;  
Oxidative stress

## Summary

**Study objectives:** The process of intermittent hypoxia-reoxygenation produces airway inflammation and endothelial dysfunction that favors the development of cardiovascular disorders in obstructive sleep apnea syndrome (OSAS). Nitric oxide (NO) is an important mediator in airway inflammation and the regulation of endothelium-dependent vasodilation.

**Design:** This study compared airway NO ( $F_{ENO}$ ) and alveolar NO ( $C_{ANO}$ ) measurements in exhaled breath in 30 OSAS patients to those of 30 healthy (non-OSAS) individuals and determined the relationship between NO levels and OSAS severity. Additionally, NO measurements were analyzed after 3 months of CPAP treatment.

**Measurements and results:** The mean ( $\pm$ SD)  $F_{ENO}$  level in the OSAS group ( $27.2 \pm 18$  ppb) was higher than in the healthy non-OSAS group ( $p = 0.006$ ). The mean  $C_{ANO}$  level was  $1.65 \pm 0.90$  ppb, lower than in the non-OSAS group ( $p = 0.001$ ). A significant correlation was found between  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$  levels and the apnea–hypopnea index (AHI) in the OSAS group ( $r = 0.8$ ,  $p < 0.05$ ;  $r = -0.9$ ,  $p = 0.01$ , respectively).  $F_{ENO}$  levels decreased and  $C_{ANO}$  levels increased significantly after CPAP treatment.

**Conclusions:** Severe OSAS patients have higher  $F_{ENO}$  and lower  $C_{ANO}$  levels and these are restored to normal after CPAP treatment, reflecting the correction of local upper airway inflammation and endothelial dysfunction present in OSAS patients. Exhaled breath techniques can be useful to identify airway inflammation and endothelial dysfunction in severe OSAS patients.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Sleep Laboratory, Respiratory Medicine Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Mas Casanovas, 90, Barcelona 08025, Spain. Tel.: +34 93 5565972; fax: +34 93 5565601.

E-mail address: [afortuna@santpau.cat](mailto:afortuna@santpau.cat) (A.M. Fortuna).

## Introduction

In obstructive sleep apnea syndrome (OSAS), a highly prevalent disease affecting 4% and 2% of adult males and females, respectively,<sup>1</sup> recurrent upper airway obstructive episodes cause intermittent arterial oxygen desaturation, nocturnal arousals and disruption of sleep architecture.<sup>2</sup> OSAS is a cardiovascular risk factor<sup>3,4</sup> associated with increased morbidity and mortality,<sup>3,5</sup> one whose multifactorial pathogenesis involves metabolic and autonomic dysregulation, inflammatory processes and oxidative stress.<sup>4,6</sup> In OSAS patients intermittent hypoxia-reoxygenation episodes provide the mechanism by which inflammatory mediators are released, triggering the upper airway and systemic inflammation described in these patients.<sup>4,6</sup> The upper airway inflammation, aggravated by mechanical injury caused by repeated pharyngeal collapse, increases the airway obstruction. Moreover, the systemic inflammatory process also increases the release of oxygen-free radicals beyond the physiologic antioxidant capacity, generating oxidative stress.<sup>7–9</sup> This encourages endothelial dysfunction and provides a favorable environment for cardiovascular disorders such as systemic hypertension and stroke.<sup>10,11</sup>

Nitric oxide (NO) is implicated in the presence of airway inflammation in several respiratory diseases when it is synthesized in airway cells by the inducible NO synthase enzyme.<sup>12</sup> NO is also an oxygen-free radical and a powerful vasodilator released by endothelial NO synthase, involved in platelet aggregation and the regulation of vascular tone. Several studies have demonstrated a decrease in circulating NO in OSAS patients.<sup>13</sup> Techniques for the measurement of exhaled breath NO offer noninvasive, reliable and easy ways to assess upper airway and bronchial inflammation by means of the fraction of NO in the airway compartment ( $F_{ENO}$ ).<sup>14</sup> These exhaled breath techniques are also useful to measure the NO concentration in the alveolar compartment ( $C_{ANO}$ ), which indirectly marks pathogenic changes in the distal airways and alveolar-capillary membrane, thereby reflecting endothelial dysfunction.<sup>15</sup> The  $F_{ENO}$  levels reported for OSAS patients have been inconsistent in the literature, with elevated concentrations observed by some authors<sup>16,17</sup> but not by others.<sup>18</sup>  $C_{ANO}$  levels in OSAS patients have not usually been investigated, although one recent study measured this parameter before and after only two nights of continuous positive airway pressure (CPAP).<sup>18</sup>

CPAP is described as the treatment of choice for severe OSAS,<sup>19</sup> yet we still lack an objective criterion to determine whether to treat OSAS patients without symptoms or known cardiovascular factors. Nor do we know whether early CPAP treatment would prevent future cardiovascular diseases in these patients.<sup>20</sup>

The use of simple, noninvasive measurements would be useful to better understand OSAS pathophysiology and to identify important interindividual differences in disorder's consequences. Starting with the hypothesis that  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$  are candidate noninvasive measures for use in this setting, we aimed to determine  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$  levels in a group of OSAS patients before and after 3 months of treatment with CPAP to evaluate the relation between each measure of NO and OSAS severity and response to treatment.

## Methods

### Subjects

Consecutive patients meeting the inclusion criteria were recruited for this prospective study. All had been referred to our sleep-disordered-breathing clinic because of clinical symptoms suggestive of OSAS. Patients whose test results confirmed this disease were included in an OSAS group. Healthy individuals in whom OSAS was ruled out were recruited for a non-OSAS group in which to determine physiologic levels of  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$ .

We excluded patients with a history of cognitive disorders, symptoms of respiratory tract infection in the 6 weeks prior to referral, and atopy or respiratory disease that might affect  $F_{ENO}$  levels (asthma, chronic obstructive pulmonary disease, sarcoidosis, lung cancer, bronchiectasis, cystic fibrosis) or kidney, liver and rheumatic diseases. Patients were also excluded if they had received treatment with inhaled or oral corticosteroids in the last four weeks or if spirometry results indicated loss of lung function.

The study was approved by the ethics committee of our hospital and all subjects (both patients and healthy individuals) gave their signed, informed consent.

### Study design

Individual characteristics were recorded and a clinical questionnaire was used to collect information on smoking, medication, cardiovascular disease (hypertension, ischaemic heart disease, and stroke), diabetes mellitus and dyslipidemia. Excessive daytime sleepiness was assessed using the Epworth Sleepiness Scale.<sup>21</sup> Complete physical examinations (including a chest x-ray for patients) and lung function tests (spirometry and a bronchodilator test), were also given. All individuals were studied by overnight respiratory polygraphy or polysomnography. Trained staff assigned to our lung function laboratory and sleep-disordered-breathing unit carried out the tests.

Patients were included in the OSAS group consecutively if the results of the sleep study indicated they had an apnea-hypopnea index (AHI)  $\geq 15$ . Healthy (non-OSAS) group individuals were found to have an AHI  $< 5$ . Within 5 days of each sleep study, each subject underwent  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$  measurement procedures, all of which were carried out at the same hour of the day (of 09:00 to 11:00 a.m.), before spirometry, so as not to interfere with that test.

OSAS patients who met the criteria for CPAP treatment<sup>2</sup> also underwent a titration night study by attended polysomnography or with a simplified automatic CPAP device (AutoSet Clinical System, Resmed, North Ryde, Australia).<sup>22</sup> After 3 months of CPAP treatment the patient came to a follow-up visit that included an interview and collection of anthropometric data as well as the procedures needed for determining  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$ . CPAP treatment adherence was assessed objectively by reading the counter that showed the operating hours since treatment was started.

## OSAS diagnostic studies

### Polysomnography

The OSAS diagnosis was established by overnight polysomnography (Siesta, Compumedics, Melbourne, Australia) in those patients who had excessive daytime sleepiness and/or associated comorbidity.<sup>2</sup> Sleep stages were documented by two electroencephalography and two electrooculography channels, submental and anterior tibial electromyography channels. Arterial oxygen saturation was assessed by pulse oximetry (SpO<sub>2</sub>) and airflow by nasal flow pressure sensor and oronasal thermistor; thoracic and abdominal excursion bands, electrocardiographic leads, and snoring and body position sensors were also in place. Recordings were made for a minimum of 6 h, with a minimum sleep time of 3 h. Apnea was defined as the absence of airflow for  $\geq 10$  s and hypopnea as a 30%–90% reduction of airflow compared with baseline lasting  $\geq 10$  s in combination with a reduction of  $\geq 3\%$  in SpO<sub>2</sub> and/or followed by an arousal.<sup>23,24</sup> We recorded the mean AHI, as the average total number of apneic and hypopneic events per sleep hour, the number of arousals, the arousal index (number of arousals per hour), the mean SpO<sub>2</sub> and the cumulative time with SpO<sub>2</sub> < 90% expressed as a percentage of total sleep time registered (CT90%). No sleep studies had to be repeated.<sup>23</sup>

### Respiratory polygraphy

The remaining subjects, who had not reported excessive sleepiness or comorbidity, underwent respiratory polygraphy (Sibelhome 300, Sibel, Barcelona, Spain). SpO<sub>2</sub> was assessed by pulse oximetry and airflow by nasal flow pressure sensor and oronasal thermistor. Thoracic and abdominal excursion bands and snoring and body position sensors were also in position. The same AHI criteria used in polysomnography were also used in polygraphy, with the exception that arousals were not detected by the polygraphy device.<sup>25</sup>

### Lung function

Spirometry and bronchodilator tests (Datospir 120, Sibel) were performed before and after inhalation of salbutamol following international guidelines.<sup>26</sup> A forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>)  $\geq 80\%$  of predicted and/or a ratio of FEV<sub>1</sub> to forced vital capacity (FVC)  $\geq 75\%$  were considered to lie within normal limits in this clinical setting. Patients who presented spirometric values below these cutoffs were excluded. Spirometry was repeated after exhaled NO measurement 3 months after the beginning of CPAP treatment in the OSAS patient group.

### NO measurements

#### F<sub>ENO</sub> measurement: the single-breath technique

F<sub>ENO</sub> was measured with a conventional chemoluminescence analyser (NIOX, Aerocrine AB, Stockholm, Sweden) using the on-line standardized single-breath technique according to international guidelines.<sup>27</sup> The subject inhaled to total lung capacity from the device once and then exhaled at a constant flow rate (V<sub>E</sub>) of 50 mL/s for

approximately 10 s. Resistance at a pressure above 5–20 cm H<sub>2</sub>O was provided to ensure velum closure and exclude contamination from nasal NO. To interpret F<sub>ENO</sub> recordings we considered valid only the NO plateau of the exhalation curve (held for  $>3$  s and with a variation  $<10\%$ ). The mean value of F<sub>ENO</sub> from 3 technically valid measurements was recorded.

#### C<sub>ANO</sub> measurement: the multiple flow rate exhalation technique

The patient exhaled at several different V<sub>E</sub> (10, 30, 100 and 200 mL/s) using the standard on-line technique, according to a previously validated method.<sup>28</sup> The NO levels for each exhaled flow rate (V<sub>NO</sub>) in picoliters per second were stored and analyzed on the computer using NO analysis software. To calculate the flow-independent parameters required, we introduced the values for 100 and 200 mL/s into the equations of Tsoukias and Silkoff.<sup>28</sup> By this means, we were able to derive the positive slope of the relationship between V<sub>NO</sub> and V<sub>E</sub>, which represents C<sub>ANO</sub>, and the intercept, which is the maximum total airway NO flow (J'<sub>AW,NO</sub>). Airway diffusion (D<sub>AW,NO</sub>) of NO was calculated using the Silkoff equation (D<sub>AW,NO</sub> = J'<sub>AW,NO</sub> × C<sub>ANO</sub>).<sup>29</sup>

### Statistical analyses

To express the results of quantitative variables we used means  $\pm$  SD. Results for categorical variables are reported as absolute frequencies and percentages. The *t* test was used to compare the means of independent paired variables. The Pearson correlation coefficient was used to assess the correlation between F<sub>ENO</sub> and C<sub>ANO</sub> measurements with sleep study variables which reflect severity of disease (AHI, SpO<sub>2</sub>, CT90%), as the dataset for the sample presented a normal distribution (according to the Kolmogorov–Smirnov test). Additionally, age, sex, weight and body mass index (BMI) were entered into a multiple logistic regression model to evaluate whether the relationship between F<sub>ENO</sub> and C<sub>ANO</sub> level and the AHI was maintained after correction for covariation. A *p*-value  $<0.05$  was considered statistically significant. An independent statistician analyzed the raw data, using the SPSS statistical package (version 14) (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## Results

### Patient characteristics and sleep study results

The functional, clinical and anthropometric characteristics of both groups are described in Table 1. The mean AHI was  $46.7 \pm 18.0$  for OSAS patients and  $2.4 \pm 1.7$  for non-OSAS subjects (*p* = 0.001). The mean nighttime SpO<sub>2</sub> was  $93 \pm 2\%$  for OSAS patients and  $96 \pm 1.1$  for non-OSAS subjects (*p* = 0.001).

Of 39 patients with a sleep study confirming the diagnosis of OSAS, 9 were excluded from the study because they did not perform the multiple flow rate exhalation technique successfully. Thirty patients whose sleep study did not confirm the diagnosis made up the healthy (non-OSAS)

**Table 1** Group characteristics of OSAS and healthy (non-OSAS) patients.

	OSAS group <i>n</i> = 30	Healthy Non-OSAS group <i>n</i> = 30	<i>p</i> -value
Age, yrs	54 ± 10	40.7 ± 10	0.001
Sex, male/female	22/8	14/16	0.001
BMI kg/m <sup>-2</sup>	31.16 ± 3.34	24.8 ± 2.8	0.001
FEV <sub>1</sub> % pred	101 ± 11	107 ± 13	0.13
FVC % pred	97 ± 11	104 ± 10	0.14
FEV <sub>1</sub> /FVC %	79 ± 4	80 ± 6	0.75
Smoking, <i>n</i>			0.001
Smoker	6	2	
Non-smokers	9	1	
Ex-smoker	15	27	
Hypertension, <i>n</i> (%)	13 (43)	3 (10)	0.007
Diabetes mellitus, <i>n</i> (%)	4 (13)	0 (0)	0.005
Dyslipidemia, <i>n</i>	5 (16)	1 (3)	0.008
Ischemic heart disease, <i>n</i>	1 (3)	0 (0)	0.001
Stroke, <i>n</i>	0 (0)	0 (0)	0.1
Epworth scale	13 ± 4.3	9.8 ± 3.2	0.04

Data are presented as mean ± SD, unless otherwise noted.

group. Forty-two underwent polysomnography and 18, polygraphy.

### NO measurements at diagnosis

The mean F<sub>ENO</sub> levels were significantly higher in the OSAS group than in the healthy (non-OSAS) group (Table 2). A significant correlation was found between F<sub>ENO</sub> and AHI ( $r = 0.8$ ;  $p < 0.05$ ). Mean nighttime SpO<sub>2</sub> ( $r = -0.4$ ;  $p = 0.01$ ), and CT90% ( $r = 0.3$ ;  $p = 0.05$ ) in the OSAS patients were also directly correlated with F<sub>ENO</sub>. The OSAS smokers had lower F<sub>ENO</sub> levels than non-smokers (12 ± 6 ppb vs 35 ± 4 ppb, respectively;  $p = 0.01$ ).

C<sub>ANO</sub> levels were significantly lower in the OSAS group than in the healthy (non-OSAS) group (Table 2). The OSAS smokers had lower C<sub>ANO</sub> levels than non-smokers but the difference was not statistically significant (1.2 ± 0.6 ppb vs 1.6 ± 0.6 ppb, respectively;  $p = 0.2$ ). There was a significant negative correlation between the mean C<sub>ANO</sub> level and AHI, ( $r = -0.9$ ,  $p = 0.01$ ) (Fig. 1). C<sub>ANO</sub> levels and mean nighttime SpO<sub>2</sub> ( $r = 0.5$ ,  $p = 0.02$ ) (Fig. 2) and CT90% ( $r = -0.5$ ,  $p = 0.03$ ) were also significantly correlated. We also observed a significant negative correlation between F<sub>ENO</sub> and C<sub>ANO</sub> levels in the OSAS group ( $r = -0.7$ ,  $p = 0.01$ ) while in the healthy (non-OSAS) group the correlation was significant but weak ( $r = 0.4$ ,  $p = 0.025$ ). C<sub>ANO</sub> levels did

not correlate with sex, age, BMI, or respiratory function status ( $p > 0.05$ ).

The multiple logistic regression model confirmed that two variables, the presence of a diagnosis of OSAS ( $r = 0.508$ ,  $p = 0.006$ ) and severity (AHI,  $r = 0.9$ ,  $p = 0.001$ ) remained significantly associated with C<sub>ANO</sub> level independently of age, sex, weight and BMI. Both these variables also remained significantly associated with F<sub>ENO</sub> in the model (OSAS diagnosis:  $r = 0.8$ ,  $p = 0.005$ ; AHI:  $r = 0.6$ ,  $p = 0.001$ ).

### F<sub>ENO</sub> and C<sub>ANO</sub> measurements after CPAP treatment

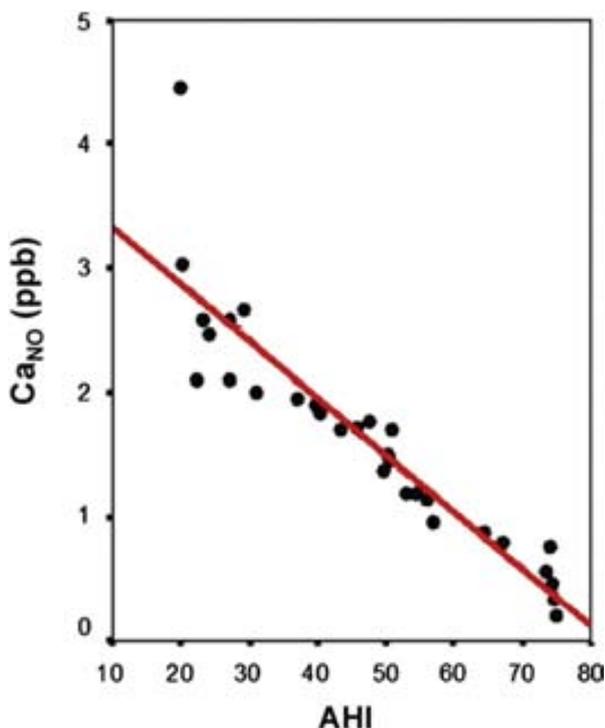
CPAP treatment was initiated in 24 of the 30 OSAS patients. At the 3-month follow-up visit, CPAP was being used for a mean of 6 ± 1 h per night. At which time F<sub>ENO</sub> levels had decreased significantly (Fig. 3). Because two outliers were present, we compared F<sub>ENO</sub> levels before and after CPAP with a nonparametric Wilcoxon test (even though the Kolmogorov–Smirnov test showed that the data were normally distributed). The decrease in F<sub>ENO</sub> after treatment remained statistically significant ( $p = 0.018$ ) in that comparison.

C<sub>ANO</sub> levels, however, had increased significantly by 2.9 ± 1 ppb (Fig. 4). There was a weak but significant correlation between the change in C<sub>ANO</sub> level and the AHI at diagnosis ( $r = 0.4$ ;  $p = 0.04$ ), (Table 2).

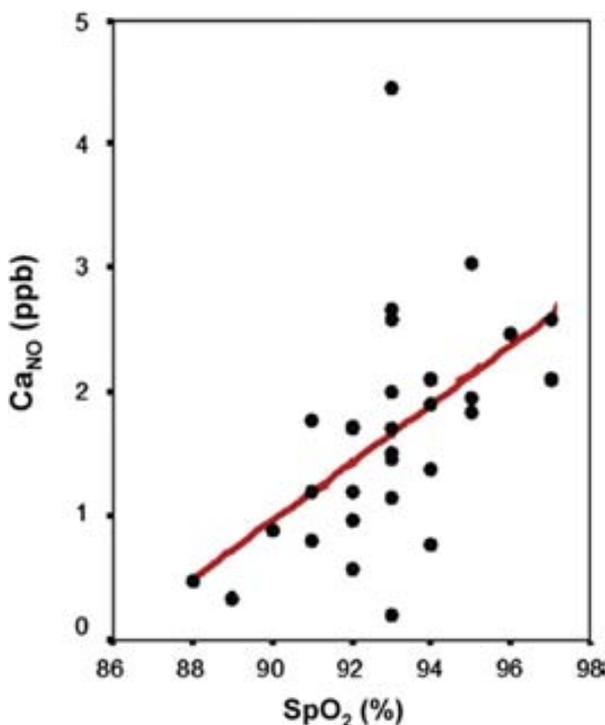
**Table 2** Nitric oxide measurements in OSAS patients, before and after CPAP treatment, and in the non-OSAS group.

	OSAS group <i>n</i> = 30	Healthy Non-OSAS group <i>n</i> = 30	<i>p</i> -value	CPAP, OSAS group <i>n</i> = 24		<i>p</i> -value
				Pre-CPAP	Post-CPAP	
F <sub>ENO</sub> ppb, mean ± SD	27.2 ± 18	16.7 ± 8	0.006	31.5 ± 18	20 ± 10	0.018
D <sub>AW,NO</sub> , ml/s, mean (95% CI)	24.8 (2.4–169)	4.8 (0.5–10.4)	0.005	27.3 (2.4–169)	8.9 (0.1–82)	0.01
J <sub>AW,NO</sub> , pl/s, mean (95% CI)	1147 (53.6–5800)	566 (113–1755)	0.004	1255 (54–5802)	1112 (14–7500)	0.49
C <sub>ANO</sub> , ppb, mean ± SD	1.65 ± 0.90	2.86 ± 1.39	0.001	1.8 ± 0.8	4.2 ± 1.6	0.01

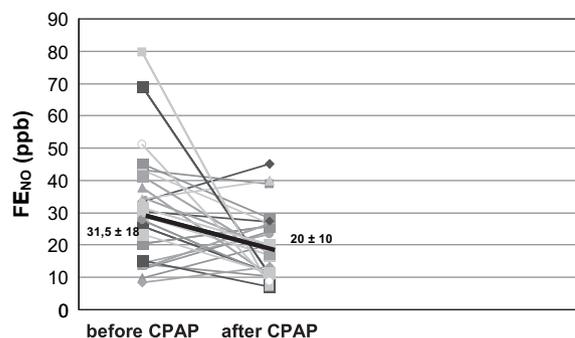
Data are presented as mean ± SD or followed by the 95% confidence interval (CI), as indicated. OSAS: obstructive sleep apnoea syndrome; CPAP: continuous positive airway pressure; F<sub>ENO</sub>: fraction of exhaled breath nitric oxide; D<sub>AW,NO</sub>: nitric oxide airway diffusing capacity; J<sub>AW,NO</sub>: maximum total airway nitric oxide flow; C<sub>ANO</sub>: alveolar nitric oxide concentration.



**Figure 1** Correlation between alveolar nitric oxide ( $C_{aNO}$ ) level and the apnea–hypopnea index (AHI) in patients with obstructive sleep apnea syndrome ( $r = -0.9$ ;  $p = 0.01$ ).



**Figure 2** Correlation between alveolar nitric oxide ( $C_{aNO}$ ) levels and mean nighttime arterial oxygen saturation ( $SpO_2\%$ ) ( $r = 0.5$ ;  $p = 0.02$ ) in patients with obstructive sleep apnea syndrome.

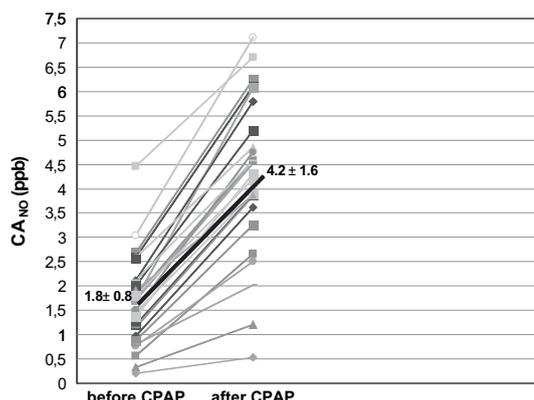


**Figure 3** Lines graph showing individual levels of exhaled nitric oxide ( $F_{ENO}$ ) before and after continuous positive airway pressure (CPAP) treatment of 24 patients with obstructive sleep apnea syndrome. Mean value is included.

**Discussion**

Our study confirmed that OSAS patients have  $F_{ENO}$  levels that are higher than those of healthy (non-OSAS) individuals, consistent with the presence of an upper airway inflammatory process. We also confirmed that  $F_{ENO}$  level was correlated with OSAS severity. In addition,  $C_{aNO}$  levels were lower in OSAS patients and this measure was also correlated with OSAS severity, suggesting that these patients have abnormal NO bioavailability that would lead to endothelial dysfunction. CPAP treatment improved and restored the  $F_{ENO}$  and  $C_{aNO}$  levels after 3 months of treatment in the 24 treated patients.

Higher levels of  $F_{ENO}$  in OSAS patients reflect the presence of bronchial and upper airway inflammation. Elevated levels of polymorphonuclear cells and inflammatory mediators in the nasal mucosa of OSAS patients were described by Hatipoglu and Rubinstein.<sup>30</sup> They also observed the presence of subepithelial edema, a reduction in connective tissue, and inflammatory cell infiltration of pharyngeal tissue obtained by uvulopalatopharyngoplasty or tonsillectomy. The transfer of the pharyngeal pressure gradient toward the lower airway and the effect of proinflammatory cytokines also favor the development of bronchial



**Figure 4** Lines graph showing individual values levels of alveolar nitric oxide ( $C_{aNO}$ ) before and after continuous positive airway pressure (CPAP) treatment of 24 patients with obstructive sleep apnea syndrome. Mean value is included.

inflammation, as shown by recent studies based on samples obtained by noninvasive techniques (induced sputum or exhaled breath condensate, for example).<sup>17</sup> Salerno et al<sup>31</sup> and Devaousassaux et al<sup>32</sup> observed neutrophil predominance and macrophage deficits in the induced sputum of OSAS patients compared with healthy individuals. The higher levels of  $F_{ENO}$  and  $J'_{AWNO}$  we observed in OSAS patients in this study are consistent with the work of other groups studying inflammatory markers in exhaled breath.<sup>17,31,33</sup> The correlation we observed between  $F_{ENO}$  levels and OSAS severity as demonstrated by the AHI and nighttime desaturation also reflects greater upper airway inflammation in patients with more severe OSAS. This level of inflammation would contribute to worsening OSAS by narrowing the upper airway, as was demonstrated by Culla et al<sup>34</sup> recently. Those authors showed that severe OSAS patients present an increased oral NO, suggesting that oral inflammation in OSA patients could be a consequence of intermittent hypoxia.

Our smoking patients had lower  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$  levels than ex-smokers and non-smokers. Cigarettes contain a large number of free radicals and pro-oxidant substances which cause lower NO bioactivity and favor an oxidative stress state. In addition, smokers have a tetrahydrobiopterin deficit; this cofactor is necessary for the process by which endothelial NO is generated.<sup>35</sup>

In our study OSAS patients also had lower  $C_{ANO}$  levels than individuals in the non-OSAS group, suggesting the presence of endothelial dysfunction in the former. Endothelial NO is the main factor implicated in endothelium-dependent vasodilation and its synthesis depends on the balance between oxygen-free radical production and degradation and NO production.<sup>7</sup> In OSAS the increased release of oxygen-free radicals induced by hypoxia-reoxygenation exceeds physiological antioxidation, favoring a reduction in cofactors required for NO synthesis and greater synthesis of the superoxide radical and peroxynitrite.<sup>7,8</sup> Hypoxia also alters the production of endothelial NO synthase, favoring lower levels of circulating NO in these patients,<sup>13</sup> with a deleterious effect on the vascular bed. A more direct, noninvasive way to measure the availability of endothelial NO and therefore of assessing possible endothelial dysfunction would be the measurement of  $C_{ANO}$ . This marker depends on the concentration in the alveolus and its diffusion through the alveolar-capillary membrane, so that if NO synthesis is decreased, less will be diffused and exhaled.<sup>15</sup> The low  $C_{ANO}$  levels in our OSAS group are consistent with the only study that analyses  $C_{ANO}$  in such patients.<sup>18</sup> Foresi et al showed that  $C_{ANO}$  values were significantly lower in OSAS patients with systemic hypertension compared to those of non-hypertensive OSAS patients, and the authors conclude that their findings may be linked to a possible endothelial dysfunction in OSAS patients.<sup>18</sup> We additionally found that  $C_{ANO}$  levels correlated with OSAS severity, with lower  $SpO_2$  and increased CT90%. In addition,  $C_{ANO}$  and  $F_{ENO}$  levels were correlated with each other, so that those with more upper airway and bronchial inflammation had more endothelial dysfunction, and these patients were also precisely the ones who had more severe OSAS.

Physiologic  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$  levels were restored after 3 months of CPAP treatment. Moreover, the group of patients with more severe disease presented more marked change

when their normal  $C_{ANO}$  levels were reestablished. Whether or not to treat patients with CPAP only on the basis of AHI is debated, particularly in patients with severe nonsleepy OSAS.<sup>20</sup> In such cases biomarkers such as  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$  obtained by noninvasive measurements could eventually to provide valuable molecular signatures in OSAS.<sup>36</sup>

A limitation of this study is that there are statistically significant differences in anthropometric parameters, such as BMI, between the OSAS group and the healthy individuals whose NO data were used for comparison. We know that obesity itself favors inflammation and oxidative stress that predisposes the individual to metabolic syndrome and OSAS.<sup>36</sup> However, the results for  $F_{ENO}$  and obesity are inconsistent in the literature. Depalo et al<sup>16</sup> demonstrated higher  $F_{ENO}$  levels and increased neutrophils in the induced sputum of obese OSAS patients in comparison with obese non-OSAS individuals. However Petrosyan et al<sup>17</sup> saw no significant differences in  $F_{ENO}$  between these two types of patient. In our study we found no correlation between BMI and either  $F_{ENO}$  level or  $C_{ANO}$  level either in OSAS patients or non-OSAS individuals, consistent with the findings of Foresi et al.<sup>18</sup> These results are also consistent with recent literature showing that OSA is a major determinant of endothelial dysfunction independently of obesity.<sup>37</sup> Furthermore, logistic regression showed that the presence of OSAS and severity as shown by AHI are the only factors that remained correlated with  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$  levels in the multiple regression model to rule out covariation with age, sex or BMI. Finally, the most important finding of our study, the change in  $F_{ENO}$  and  $C_{ANO}$  levels after 3 months of CPAP treatment, was found by analyzing within-subject differences before and after CPAP treatment, a strength of our study.

In conclusion, severe OSAS patients have higher  $F_{ENO}$  and lower  $C_{ANO}$  levels compared to healthy patients, and physiologic levels are restored after 3 months of CPAP treatment. Exhaled breath techniques to measure airway and endothelial NO provide an easy, noninvasive way to detect or monitor local upper airway inflammation and endothelial dysfunction in severe OSAS patients. Use of these measures would contribute to, aiding more accurate prediction of response to treatment.

## Abbreviations

AHI	apnea-hypopnea index
BMI	body mass index
$C_{ANO}$	alveolar nitric oxide
CPAP	continuous positive airway pressure
CT90%	the cumulative time with $SpO_2 < 90\%$
$D_{AWNO}$	airway diffusion
$F_{ENO}$	airway nitric oxide
FEV <sub>1</sub>	forced expiratory volume in 1 s
FVC	forced vital capacity
$J'_{AWNO}$	maximum total airway NO flow
NO	nitric oxide
OSAS	obstructive sleep apnea syndrome
ppb	parts per billion
$SpO_2$	arterial oxygen saturation
$V_E$	exhaled constant flow rate
$V_{NO}$	exhaled NO flow rate

## Disclosure statement

This was not an industry supported study. Dra. Ana M Fortuna and the other authors have indicated no financial conflicts of interest.

## References

- Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1217–39.
- Epstein LJ, Cristo D, Strollo PJ, et al. Adult obstructive sleep apnea task force of the American academy of sleep medicine. Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *J Clin Sleep Med* 2009;15(3):263–76.
- Nieto FJ, Young TB, Lind BK, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study: sleep heart health study. *JAMA* 2000;283:1829–36.
- McNicholas WT, Bonsignore MR and the management committee of EU COST ACTION B26. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J* 2007;29:156–78.
- Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, et al. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnea—hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 2005;365:1046–53.
- Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005;112:2660–7.
- Barceló A, Barbé F, de la Peña M, et al. Antioxidant status in patients with sleep apnea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J* 2006;27:756–60.
- Barceló A, Miralles C, Barbé F, et al. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnea. *Eur Respir J* 2000;16:644–7.
- Gozal D, Kheirandish-Gozal L. Cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea: oxidative stress, inflammation, and much more. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(4):369–75.
- Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome - an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 2003;7:35–51.
- Phillips CL, Grunstein RR. Obstructive sleep apnoea: time for a radical change? *Eur Respir J* 2006;27:671–3.
- Moilanen E, Whittle BRJ, Moncada S. Nitric oxide as a factor in inflammation. In: Gallin JI, Snyderman S, Fearon DT, et al., editors. *Inflammation: basic Principles and clinical Correlates*. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1999. p. 787–801.
- Ip MSM, Lam B, Chan L-Y, et al. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2166–71.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 2000;16:781–92.
- Lavi S, Yang EH, Prasad A, et al. The interaction between coronary endothelial dysfunction, local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in humans. *Hypertension* 2008;51:127–33.
- Depalo A, Carpagnano GE, Spanvello A, et al. Exhaled NO and iNOS expression in sputum cells of healthy, obese and OSA subjects. *J Intern Med* 2008;263:70–8.
- Petrosyan M, Perraki E, Simoes D, et al. Exhaled breath markers in patients with obstructive sleep apnoea. *Sleep Breath* 2008;12:207–15.
- Foresi A, Leone C, Olivieri D, Cremona G. Alveolar-derived exhaled nitric oxide is reduced in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 2007;132:860–7.
- White J, Cates C, Wright J. Continuous positive airways pressure for obstructive sleep apnea. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;2. CD001106.
- Barbé F, Mayoralas LR, Duran J, et al. Treatment with continuous positive airway pressure is not effective in patients with sleep apnea but no daytime sleepiness. a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2001;134(11):1015–23.
- Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 1991;14:540–5.
- Masa JF, Jimenez A, Duran J, et al. Grupo Español de Sueño. Alternative methods of titrating continuous positive airway pressure: a large multicenter study. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(11):1218–24.
- Rechtschaffen A, Kales A. *A manual of standardized terminology techniques and scoring systems for sleep stages of human subjects*. Washington: DC US-Government Printing Office; 1968.
- EEG arousals: scoring rules and examples: a preliminary report from the sleep disorders atlas task force of the American sleep disorders association. *Sleep* 1992;15:173–84.
- Collop NA, Anderson WM, Boehlecke B, et al. Clinical guidelines for the use of unattended portable monitors in the diagnosis of obstructive sleep apnea in adult patients. Portable monitoring task force of the American Academy of sleep medicine. *Clin Sleep Med* 2007;3(7):737–47.
- Standardization of spirometry. Statement of the American thoracic Society. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1285–98.
- American Thoracic Society. 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. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912–30.
- Fortuna AM, Balleza M, Calaf N, González M, Feixas T, Casan P. Determinación de la concentración de óxido nítrico alveolar en aire espirado: procedimiento y valores de referencia en personas sanas. *Arch Bronconeumol* 2009;45:145–9.
- George SC, Hogman M, Permutt S, Silkoff PE. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. *J Appl Physiol* 2004;96:831–9.
- Hatipoglu U, Rubinstein I. Inflammation and obstructive sleep apnea syndrome pathogenesis: a working hypothesis. *Respiration* 2003;70:665–71.
- Salerno FG, Carpagnano E, Guido P, et al. Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. *Respir Med* 2004;98:25–8.
- Devouassoux G, Lévy P, Rossini E, et al. Sleep apnoea is associated with bronchial inflammation and continuous positive airway pressure-induced airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:597–603.
- Olopade CO, Christon JA, Zakkari M, et al. Exhaled pentane and nitric oxide levels in patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 1997;111:1500–4.
- Culla B, Guida G, Brussino L, et al. Increased oral nitric oxide in obstructive sleep apnea. *Respir Med* 2010;104(2):316–20.
- Wever RM, Van Dam T, Van Rijn HJ, et al. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:340–4.
- Salord N, Mayos M, Miralda R, et al. Respiratory sleep disturbances in patients undergoing gastric bypass surgery and their relation to metabolic syndrome. *Obes Surg* 2009;19(1):74–9.
- Jelic S, Leaderer DJ, Adams T, et al. Vascular inflammation in obesity and sleep apnea. *Circulation* 2010;121(8):1014–21.





## Airway and alveolar nitric oxide measurements in obstructive sleep apnea syndrome

A.M. Fortuna<sup>a,b,c,\*</sup>, R. Miralda<sup>a,b,c</sup>, N. Calaf<sup>b,c</sup>, M. González<sup>b,c</sup>, P. Casan<sup>b,c</sup>, M. Mayos<sup>a,b,c</sup>

### • RESULTADOS

- Los valores de  $FE_{NO}$  fueron superiores en el grupo de pacientes con SAHS respecto al grupo control sin SAHS ( $27.2 \pm 18$  ppb vs  $16.7 \pm 8$  ppb;  $p=0,006$ ).

- En el grupo de pacientes con SAHS se observó asociación entre los valores de  $FE_{NO}$  y la severidad del SAHS, de forma que a mayor IAH los valores de  $FE_{NO}$  fueron superiores ( $r = 0.8$ ;  $p < 0.05$ ). Así mismo se estableció asociación significativa entre  $FE_{NO}$  y otros parámetros de gravedad como la Sat  $O_2$  media nocturna (%) y el  $CT_{90}$  (%); ( $r = -0.4$ ;  $p < 0.01$ ;  $r = 0.3$ ;  $p < 0.05$ ).

- Los valores de  $CA_{NO}$  fueron significativamente inferiores en el grupo de SAHS respecto al grupo de sanos ( $1.65 \pm 0.90$  ppb vs  $2.86 \pm 1.39$  ppb;  $p = 0.001$ ).

- En el grupo de pacientes con SAHS los valores de  $CA_{NO}$  presentaron asociación negativa y significativa con la gravedad del SAHS (IAH:  $r = -0.9$ ,  $p = 0.01$ ). Así mismo se estableció asociación significativa entre  $CA_{NO}$  y otros parámetros de gravedad como la Sat  $O_2$  media nocturna (%) y el  $CT_{90}$  (%); ( $r = 0.5$ ,  $p = 0.02$ ,  $r = -0.5$ ,  $p = 0.03$ , respec.).

- En los dos grupos de pacientes se observó una asociación negativa y significativa entre los valores de  $FE_{NO}$  y  $CA_{NO}$  (SAHS:  $r = -0.7$ ,  $p = 0.01$ ; sanos:  $r = 0.4$ ,  $p = 0.025$ ).
- No se observó asociación entre los valores de  $FE_{NO}$  y  $CA_{NO}$  con el sexo, la edad, el IMC y los datos espirométricos en ninguno de los dos grupos ( $p > 0,05$ ).
- En el grupo de SAHS, la correlación logística múltiple mostró que el diagnóstico de SAHS ( $r = 0.508$ ,  $p = 0.006$ ) y el IAH ( $r = 0.9$ ,  $p = 0.001$ ) se asociaba a los niveles de  $CA_{NO}$  independientemente de la edad, el sexo y el IMC. Así mismo ocurría para los niveles de  $FE_{NO}$  (diagnósticos de SAHS:  $r = 0.8$ ,  $p = 0.005$ ; IAH:  $r = 0.6$ ,  $p = 0.001$ ).
- Se inició tratamiento con CPAP en 24 de los 30 pacientes con SAHS con un cumplimiento medio de 6 h/noche a los 3 meses. El tratamiento con CPAP restableció los valores de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$  a valores similares a los del grupo control ( $FE_{NO}$ :  $31.5 \pm 18$  a  $20 \pm 10$  ppb;  $CA_{NO}$ :  $1.8 \pm 0.8$  a  $4.2 \pm 1.6$  ppb).
- El cambio de  $CA_{NO}$  medio después del tratamiento con CPAP fue de  $2.9 \pm 1$  ppb;  $p < 0,05$ ). Hubo una correlación débil pero significativa entre el cambio de  $CA_{NO}$  después del tratamiento y el IAH en el momento del diagnóstico de SAHS ( $r = 0.4$ ;  $p = 0.04$ ).
- Los pacientes con SAHS fumadores presentaron valores de  $FE_{NO}$  inferiores a aquellos que no eran fumadores ( $12 \pm 6$  ppb vs  $35 \pm 4$  ppb;  $p = 0.01$ ); los valores de  $CA_{NO}$  fueron también inferiores pero sin significación estadística ( $1.2 \pm 0.6$  ppb vs  $1.6 \pm 0.6$  ppb, respectivamente;  $p = 0.2$ ).





## **DISCUSIÓN**



La tesis doctoral presentada se distribuye en dos partes bien diferenciadas relacionadas con la determinación de NO en aire espirado. En la primera parte se incluyen dos artículos que analizan aspectos metodológicos. Así, se describe la técnica de determinación de NO en aire espirado a flujo constante ( $FE_{NO}$ ) mediante el equipo portátil NIOX MINO<sup>®</sup> y descripción de la técnica de espiración a múltiples flujos para la determinación de  $CA_{NO}$  con la obtención de valores de referencia de ambas técnicas en población sana. En la segunda se evalúa la capacidad diagnóstica de la determinación de  $FE_{NO}$  en pacientes con asma y la utilidad de  $FE_{NO}$  y  $CA_{NO}$  como marcador de inflamación local y disfunción endotelial en pacientes con SAHS.

En el primer trabajo, *Determinación de óxido nítrico en aire espirado ( $FE_{NO}$ ) mediante un equipo portátil (NIOX-MINO<sup>®</sup> Aerocrine) en población sana*, se presentaron valores de referencia obtenidos en nuestro centro mediante el novedoso equipo portátil de determinación de  $FE_{NO}$  NIOX-MINO<sup>®</sup>, su correlación con los valores obtenidos mediante el sensor de quimioluminiscencia habitual y valor de corte de  $FE_{NO}$  en un grupo de 28 pacientes sanos. Además se realizó una aportación útil sobre el método y el procedimiento habitual para el uso del equipo NIOX-MINO<sup>®</sup>.

Nuestro estudio sobre valores de referencia de  $FE_{NO}$  con el equipo NIOX-MINO<sup>®</sup> fue el primero publicado en España. Observamos valores de  $FE_{NO}$  superiores con el equipo portátil NIOX-MINO<sup>®</sup> a los obtenidos con el equipo de quimioluminiscencia en todos los pacientes y en cada una de las determinaciones al igual que otras series publicadas, donde la mayoría de los resultados objetivan valores superiores con el dispositivo portátil<sup>57,60</sup>. Tan sólo un estudio con posterioridad objetivó valores inferiores con el equipo portátil,<sup>59</sup> resultados influidos por las dificultades técnicas. Esta diferencia en el valor de  $FE_{NO}$  podría facilitar el error de catalogar enfermedad cuando en realidad el individuo sería sano. Sin embargo observamos una correlación fuerte, directa y significativa entre ambos equipos ( $r = 0,92$ ;  $p = 0,001$ ), que permite establecer un factor de corrección lineal con el que poder equiparar los valores obtenidos con ambos equipos:  $(NIOX-MINO<sup>®</sup>) = 10 + 1,5 FE_{NO} (N-6008<sup>®</sup>)$ . La utilización de esta ecuación nos permite confirmar la significación de patológico o no, al valor de

FE<sub>NO</sub> obtenido por el equipo NIOX-MINO<sup>®</sup>. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por autores como Pizzimenti et al.<sup>60</sup> y Kim et al.<sup>63</sup> En la práctica clínica para la interpretación de los resultados lo útil y recomendable es el uso de valores de referencia del equipo portátil y establecer el juicio clínico en base a la elaboración de valores intrasujeto.<sup>285,286</sup>

En el estudio se calculó también el valor de corte de FE<sub>NO</sub> con significación patológica. Se obtuvo un valor de corte de 34 ppb para el equipo portátil NIOX-MINO<sup>®</sup>, valor similar a los obtenidos por la escasa literatura internacional publicada en aquel momento sobre este equipo.<sup>57,60</sup> Previamente se había propuesto para el equipo habitual de quimioluminiscencia un valor de corte de 20 ppb,<sup>64,90</sup> muy similar al obtenido en nuestro estudio (17 ppb). Las diferencias en el valor de corte entre ambos equipos, prácticamente el doble con el equipo NIOX-MINO<sup>®</sup>, al igual que lo comentado para los valores de referencia, requieren establecer valores intraindividuo con el equipo utilizado sobre los que realizar las modificaciones pertinentes en el control y tratamiento de los pacientes.

No se observó una influencia de la edad, el sexo o la espirometría en los valores de FE<sub>NO</sub> con el equipo portátil NIOX-MINO<sup>®</sup> en consonancia con los estudios publicados.<sup>60-63</sup> Respecto al equipo de quimioluminiscencia tampoco se observó influencia de estos factores a diferencia de algunos resultados previos.<sup>64-66</sup> Las diferencias en la superficie de la vía aérea o de la capacidad de difusión entre hombres y mujeres y en los individuos de mayor edad son postuladas como posibles causas de estas diferencias. En nuestro estudio podría haber influido en la ausencia de diferencias, el tamaño de la muestra.

Desde el punto de vista metodológico el estudio confirma las ventajas presentes en el equipo NIOX-MINO<sup>®</sup> respecto al habitual: se minimiza la posibilidad de contaminación ambiental, no requiere calibración y se necesita una determinación única. Su portabilidad y rapidez de ofrecer el resultado (1,30 segundos) permite la utilización del mismo en la consulta neumológica extrahospitalaria e incluso en el domicilio del paciente.

El establecimiento de valores de referencia como los de este estudio, con una muy buena correlación con el equipo habitual y de un valor de corte a partir del cual establecer patología así como las propias ventajas metodológicas del equipo portátil, han permitido la incorporación de este equipo en las recomendaciones para el manejo clínico del paciente con asma<sup>53</sup> y en otras enfermedades respiratorias.

En el segundo trabajo, *Determinación de la concentración de óxido nítrico alveolar en aire espirado: procedimiento y valores de referencia en personas sanas*, se desarrolla el *modelo matemático bicompartimental* que permite la medición de  $CA_{NO}$  mediante la técnica de espiración de múltiples flujos, el desarrollo de esta técnica y el establecimiento de valores de referencia en un grupo de 33 individuos sanos.

Con el fin de determinar la concentración alveolar de NO y entender así mejor la fisiología pulmonar del NO, varios autores en la década de los 80 describieron el pulmón como un modelo diferenciado en dos compartimentos, *modelo bicompartimental*, uno bronquial y otro alveolar, que ayudaba a entender los cambios dinámicos del NO en el aire espirado. El compartimento de la vía aérea está determinado por el flujo de NO bronquial ( $J'_{awNO}$ ) y por la capacidad de difusión de NO en la vía aérea ( $D_{awNO}$ ) de tal forma que la producción de NO en la vía aérea es proporcional a la diferencia de concentración existente en la luz y la concentración de la pared bronquial. Además, la  $D_{awNO}$  depende de la concentración de NO en la pared del bronquio. Mientras, el compartimento alveolar está definido por la  $CA_{NO}$ , parámetro que sufre modificaciones de forma dinámica con la respiración y refleja el equilibrio entre el NO producido localmente y el que se difunde a la vía aérea.<sup>96</sup> Estos autores desarrollaron varias ecuaciones matemáticas que permitían estimar los parámetros necesarios para la utilización práctica del modelo bicompartimental. Sin embargo la complejidad del análisis hizo que no se utilizaran en la práctica clínica.

Ante la escasa literatura reciente, decidimos con nuestro estudio desarrollar matemáticamente el *modelo bicompartimental*. Para ello analizamos diferentes ecuaciones propuestas en la literatura, para finalmente escoger los modelos matemáticos de Tsoukias y George, y de Silkoff que nos permitían medir los 3 parámetros relevantes: ( $Daw_{NO} = J'aw_{NO} \times CA_{NO}$ ).<sup>94,96</sup>

La técnica que permite la utilización práctica del *modelo bicompartimental* y determinar los parámetros  $CA_{NO}$ ,  $J'aw_{NO}$  y  $Daw_{NO}$ , en el momento del estudio, es la técnica de espiración a múltiples flujos. En el estudio que se presenta en esta tesis se utilizó la medición a 4 flujos (10, 30, 100 y 500 ml/s) que permitía el uso de las ecuaciones de Tsoukias y George y de Silkoff.<sup>94,96</sup> Metodológicamente la técnica de espiración es la misma que la técnica de flujo constante que permite la determinación de  $FE_{NO}$ , pero realizada 4 veces, una por cada flujo definido.

Se establecieron valores de referencia de  $CA_{NO}$  entre 1,45 – 6,31 ppb con un valor medio de  $3,04 \pm 1,30$  ppb en un grupo de 33 sujetos sanos. A pesar de existir poca experiencia en este ámbito en el momento del estudio, los valores de  $CA_{NO}$  obtenidos estaban en consonancia con los obtenidos por la literatura en población sana<sup>72,107</sup> y en estudios de casos-controles de pacientes con patología respiratoria inflamatoria que incluían sujetos sanos.<sup>287,288</sup> Los valores de referencia y valores medios, obtenidos de  $J'aw_{NO}$  y de  $Daw_{NO}$  estaban así mismo dentro del margen de referencia de otros estudios.

El desarrollo de la técnica que permite de forma práctica el uso del modelo bicompartimental para obtener valores de referencia de  $CA_{NO}$ ,  $J'aw_{NO}$  y  $Daw_{NO}$  en población sana, en nuestro laboratorio equiparables a los de la literatura, permite su aplicación en la valoración del estado inflamatorio distal y del ámbito endotelial en enfermedades respiratorias. En la literatura, se han demostrado valores aumentados de  $CA_{NO}$  en pacientes con asma y alveolitis respiratoria respecto a controles sanos como reflejo de una mayor inflamación alveolar.<sup>287</sup> Así mismo se ha observado una asociación entre la gravedad del asma y la  $CA_{NO}$  de tal forma que son los pacientes con asma grave los que presentarían una  $CA_{NO}$  superior a los pacientes con asma leve, en los cuales los niveles de  $FE_{NO}$  sí estarían elevados. Estos resultados sugieren que los pacientes con asma grave presentan

una mayor inflamación alveolar y de pequeña vía aérea y no tanto bronquial, a diferencia que el asma no grave<sup>289</sup> pudiendo ser la determinación de  $CA_{NO}$  útil en la identificación para el control de este tipo de pacientes entre otros (EPOC, neumopatía intersticial, etc.). Así mismo dado que la determinación de  $CA_{NO}$  es el resultado de la suma del transporte de NO desde la luz alveolar y la concentración del transporte transversal de toda la vía aérea, reflejaría también el estado de la membrana alveolocapilar y del endotelio.<sup>96</sup>

El tercer trabajo, *Diagnostic utility of inflammatory biomarkers in asthma: exhaled nitric oxide and induced sputum eosinophil count*, evalúa la capacidad diagnóstica de  $FE_{NO}$  en comparación con el esputo inducido y con los métodos habituales de diagnóstico de asma (espirometría, prueba broncodilatadora y prueba de provocación con metacolina) en un grupo de 57 pacientes con clínica sugestiva de asma. Así mismo se evaluó si la combinación de  $FE_{NO}$  con el resto de pruebas aumentaba dicha capacidad diagnóstica.

La determinación de  $FE_{NO}$  fue la prueba que presentó mayor capacidad diagnóstica (sensibilidad 77% y especificidad 64% combinadas) comparada con el  $FEV_1\%$ , con la respuesta broncodilatadora positiva de la espirometría y con el esputo inducido. El área bajo la curva (AUC) fue de 0,8 (95% CI, 0.62 –0.87;  $p < 0.001$ ). Además se observó una alta correlación entre los valores de  $FE_{NO}$  y la prueba de provocación con metacolina. Estos datos confirman que la determinación de  $FE_{NO}$  es un método útil y fiable para el diagnóstico de asma, con menos variabilidad que los métodos habituales y con gran precisión diagnóstica.

La determinación de  $FE_{NO}$  presentó un muy aceptable valor predictivo negativo y superior al de la espirometría y al esputo inducido, por lo que permite descartar pacientes con enfermedad respiratoria inflamatoria en un alto porcentaje de casos (78%).

El esputo inducido presentó sin embargo mayor especificidad (77%) que la determinación de  $FE_{NO}$ , hecho explicable por el papel diagnóstico que tiene el esputo inducido en pacientes con síntomas sugestivos de asma y patología

inflamatoria eosinofílica como son la bronquitis eosinofílica, el asma ocupacional o la tos crónica.

En cuanto a los valores medios de  $FE_{NO}$  se observaron valores superiores en el grupo de asmáticos respecto al grupo de pacientes sin asma ( $40 \pm 31$  ppb vs  $18 \pm 23$  ppb,  $p = 0.04$ ), así como se mostró una tendencia en el porcentaje de eosinófilos en el esputo inducido a ser superior en el grupo de pacientes asmáticos. Estos resultados confirman la presencia de una mayor inflamación detectable por biomarcadores en pacientes con diagnóstico de asma respecto a aquellos sin asma. Así mismo, el valor de corte de  $FE_{NO}$  con el que se consiguió una mayor capacidad diagnóstica de asma fue de 23 ppb en consonancia con la literatura presente hasta aquel momento.<sup>51,150</sup>

En la comparación con la prueba de provocación bronquial con metacolina, utilizada como *Gold standard* para el diagnóstico de asma, sólo en 5 de los 22 pacientes con metacolina positiva (23%) la determinación de  $FE_{NO}$  fue negativa ( $\leq 19$  ppb). Además se observó una correlación negativa entre la  $PD_{20}$  y la determinación de  $FE_{NO}$  sugiriendo que los pacientes con mayor componente de hiperreactividad bronquial presentaban mayor inflamación. En contraste con estos resultados, se observó cómo sólo el 22% de los pacientes diagnosticados de asma presentaban obstrucción al flujo aéreo y el 59% prueba broncodilatadora negativa. Además todos los pacientes asmáticos que presentaban un  $FEV_1\%$  y  $FEV_1/FVC$  (%) dentro del margen de referencia mostraron valores de  $FE_{NO} > 20$  ppb. Estos resultados sugieren el uso de  $FE_{NO}$  como un nuevo método para el diagnóstico de asma en pacientes con clínica sugestiva, sin tratamiento corticoideo y valores espirométricos dentro del margen de referencia.

Una vez demostrada la capacidad diagnóstica del  $FE_{NO}$  en la sospecha clínica de asma se evaluó si la combinación de diferentes métodos diagnósticos, incluyendo la determinación de  $FE_{NO}$ , podría aumentar la capacidad diagnóstica. Así se observó como al incorporar a la determinación de  $FE_{NO}$ , la del esputo inducido la especificidad diagnóstica fue mayor (76%) que la obtenida por  $FE_{NO}$  como método diagnóstico único. La combinación de  $FE_{NO}$  con la prueba de provocación con metacolina o la prueba broncodilatadora no aumentaba la

capacidad diagnóstica del  $FE_{NO}$ . De esta forma la combinación de dos técnicas que evalúan el estado inflamatorio bronquial permite el diagnóstico de asma con una mayor capacidad que las medidas que evalúan la broncoconstricción o la hiperrespuesta bronquial.

Los resultados de este trabajo están en consonancia con el estudio de Smith et al.<sup>150</sup>, pionero en el uso de  $FE_{NO}$  como método diagnóstico de asma y único estudio en el momento de realización de la tesis, así como con la literatura que posteriormente ha valorado la utilidad de  $FE_{NO}$  tanto en el diagnóstico de asma, como en el control del tratamiento y de las agudizaciones.<sup>156-161</sup>

Los resultados obtenidos confirman que la determinación de  $FE_{NO}$  es una técnica con una mayor capacidad diagnóstica de asma que el esputo inducido y que el resto de los procedimientos habituales (espirometría y prueba broncodilatadora), y que su combinación con el esputo inducido establece un diagnóstico fiable y preciso de inflamación bronquial en pacientes con alta sospecha clínica de asma. Así mismo estos resultados han contribuido a la incorporación en el algoritmo diagnóstico de la Guía Española del Asma (GEMA) la utilidad de un valor de corte de  $FE_{NO} \geq 30$  ppb a partir del cual establecer el diagnóstico de asma.<sup>109</sup>

El cuarto trabajo, *Airway and alveolar nitric oxide measurements in obstructive sleep apnea syndrome*, determinó valores de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$  en un grupo de pacientes con SAHS en comparación con un grupo de individuos sanos (grupo control). Así mismo evaluó el efecto del tratamiento con CPAP durante 3 meses sobre los valores de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$ .

Se observaron valores de  $FE_{NO}$  superiores en el grupo de pacientes con SAHS respecto al grupo control, resultados consistentes con la literatura,<sup>218,256,257</sup> y que sugieren la presencia de un proceso inflamatorio local en este tipo de pacientes. Además los valores de  $FE_{NO}$  se correlacionan con el IAH y con otros parámetros de gravedad como son  $SO_2$  media nocturna (%) y el  $CT_{90}$  (%), lo que también sugiere que a mayor gravedad del SAHS mayor grado de inflamación. En el paciente con SAHS la inflamación de la VAS y de la vía bronquial se producen

como consecuencia de la hipoxia intermitente crónica, el aumento de la colapsabilidad de la VAS y el estrés mecánico local secundarios a la oclusión repetida de la VAS.<sup>198</sup>

Respecto a la determinación de  $CA_{NO}$ , se observaron valores de  $CA_{NO}$  inferiores en los pacientes con SAHS respecto al grupo control, resultados consistentes con el único estudio de la literatura publicado en el momento.<sup>258</sup> Se observó además una correlación con la determinación de  $FE_{NO}$  y con los parámetros de gravedad del SAHS como el IAH, la Sat  $O_2$  media (%) y el  $CT_{90}$  (%). Estos resultados confirman que los pacientes con mayor inflamación de la VAS y mayor gravedad del SAHS presentan mayor alteración de la difusión alveolar de NO, por lo que podría relacionarse con una mayor disfunción endotelial, ya que el NO es uno de los factores principales implicados en la vasodilatación dependiente de endotelio y su síntesis depende de un equilibrio entre la producción de RLO y la degradación-producción de NO. En los pacientes con SAHS se ha demostrado un aumento de RLO y un estado de estrés oxidativo como consecuencia de los episodios de hipoxia-reoxigenación crónica que favorece una menor síntesis de NO por diferentes mecanismos y en un último término disfunción endotelial que predispone a la comorbilidad cardiovascular.<sup>206</sup> La determinación de  $CA_{NO}$ , podría constituir un marcador no invasivo de disfunción endotelial en los pacientes con SAHS.

Los pacientes fumadores presentaron valores de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$  inferiores al grupo de exfumadores y de no fumadores. Está demostrado que las sustancias que contiene el tabaco presentan radicales libres y sustancias pro-oxidantes que disminuyen la biodisponibilidad de NO e inhiben la producción del cofactor necesario (tetrahidropterina) para que la eNOS sintetice NO.<sup>237</sup> Por otro lado, la N-nitrosamina existente en el cigarrillo tiene un gran poder inhibitor de la producción de NO por los macrófagos alveolares.<sup>241</sup> Así la determinación de NO en aire espirado en el grupo de pacientes fumadores se tiene que tener en cuenta con precaución.

De los 30 pacientes con SAHS se inició tratamiento con CPAP en 24 de ellos y se realizó una nueva determinación de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$  a los 3 meses. Se

observó cómo las determinaciones de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$  mejoraron después de los 3 meses de tratamiento con CPAP, restableciéndose los valores a los márgenes de referencia, ( $FE_{NO}$ :  $31.5 \pm 18$  a  $20 \pm 10$  ppb;  $CA_{NO}$ :  $1.8 \pm 0.8$  a  $4.2 \pm 1.6$  ppb).<sup>288</sup>

El cambio de  $CA_{NO}$  medio después del tratamiento con CPAP fue de  $2.9 \pm 1$  ppb y se observó una correlación débil pero significativa entre el cambio de  $CA_{NO}$  después del tratamiento con CPAP y el IAH en el momento del diagnóstico de SAHS. Estos hallazgos sugieren que los pacientes con un mayor aumento de los niveles de  $CA_{NO}$  fueron aquellos que presentaban un SAHS más grave y que respondieron mejor al tratamiento con CPAP.

La presencia de correlación entre los valores de  $CA_{NO}$  y la determinación de derivados de NO en sangre circulante (nitritos; nitratos), hubiese apoyado la hipótesis de la disfunción endotelial y mejoría de la misma tras el tratamiento con CPAP, siendo una limitación de nuestro trabajo.

Los pacientes del grupo de control presentaron un IMC inferior al grupo de pacientes con SAHS. Es conocido que la obesidad por si misma favorece inflamación y estrés oxidativo que predispone síndrome metabólico y SAHS.<sup>279</sup> Sin embargo hay resultados contradictorios en la literatura acerca de la asociación entre  $FE_{NO}$  y obesidad. En nuestro estudio no hubo asociación entre las determinaciones de  $FE_{NO}$  y  $CA_{NO}$  y el IMC de los pacientes ni de los individuos sanos, resultados consistentes con la literatura.<sup>257,258</sup> Además la asociación entre la determinación de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$  y la gravedad del SAHS (IAH) se mantuvo independiente a variables como la edad, el sexo, el peso o el IMC en el análisis de regresión múltiple.

Por otro lado, el hallazgo más importante de nuestro estudio, el restablecimiento de los valores de  $FE_{NO}$  y  $CA_{NO}$  después de 3 meses de tratamiento con CPAP, mediante el análisis de las diferencias intrasujetos antes y después del tratamiento con CPAP, le confiere fuerza a los resultados.

Estos resultados hacen de la determinación no invasiva de  $FE_{NO}$  y  $CA_{NO}$  posibles marcadores de gravedad del SAHS e indicadores precoces de disfunción

endotelial, pudiendo ser parámetros útiles en la toma de decisiones terapéuticas de pacientes con SAHS, conjuntamente con el IAH y la clínica.

Los resultados sugieren que los pacientes con SAHS grave presentan una mayor inflamación de la VAS y mayor disfunción endotelial reflejado por valores de  $FE_{NO}$  superiores y de  $CA_{NO}$  inferiores, respectivamente, respecto a los individuos sanos. A su vez, el tratamiento con CPAP durante 3 meses restablece los valores de  $FE_{NO}$  y de  $CA_{NO}$  a niveles fisiológicos. La decisión terapéutica en el SAHS siempre debe tomarse en base a los parámetros de gravedad, la clínica del paciente, así como la presencia de comorbilidad cardiovascular. La utilidad de estos biomarcadores mediante técnicas no invasivas, puede ser una herramienta más que contribuya a la toma de decisiones terapéuticas y a la predicción de respuesta al tratamiento con CPAP en pacientes con SAHS.





## **CONCLUSIONES**



1. El equipo portátil NIOX-MINO<sup>®</sup> permite la determinación de FE<sub>NO</sub> de forma sencilla, rápida y fiable. Sus valores de referencia son superiores a los que presenta el equipo de quimioluminiscencia y se equiparan mediante un factor de corrección lineal. Las ventajas del equipo portátil permiten su uso en el manejo y control de pacientes con asma en un ambiente extrahospitalario.
2. La técnica de determinación de NO en aire espirado a diferentes flujos permite poner en práctica el *modelo bicompartimental* del NO para la cuantificación de la concentración alveolar de NO (CA<sub>NO</sub>), biomarcador del estado inflamatorio de la vía aérea distal y del estado endotelial pulmonar.
3. La determinación de FE<sub>NO</sub> presenta excelente correlación con la prueba de provocación bronquial con metacolina en el diagnóstico de asma. Además aporta una mayor capacidad diagnóstica que métodos convencionales como la espirometría, la prueba broncodilatadora y el esputo inducido.
4. La combinación de pruebas que miden el estado inflamatorio de la vía aérea superior, FE<sub>NO</sub> y esputo inducido, superan la capacidad diagnóstica de ambas técnicas valoradas de forma individual.
5. Los pacientes con SAHS presentan valores de FE<sub>NO</sub> superiores que los individuos sanos, reflejo del proceso inflamatorio local que presentan.
6. La determinación de CA<sub>NO</sub> en pacientes con SAHS presenta valores inferiores que en los individuos sanos, como reflejo de la menor biodisponibilidad de NO.
7. Los valores de FE<sub>NO</sub> y de CA<sub>NO</sub> en pacientes con SAHS se relacionan con la gravedad de la entidad lo que probablemente refleja un mayor componente de inflamación local y de disfunción endotelial en los sujetos más graves.
8. El tratamiento con CPAP durante 3 meses restablece los valores de FE<sub>NO</sub> y de CA<sub>NO</sub> hasta la normalidad.



## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Arnold WP, Katsuki S, and Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74:3203-3207.
2. Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
3. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Pharmacological and Biochemical Properties of Endothelium-Derived Relaxant Factor Evidence That Endothelium-Derived Relaxant Factor Is Closely Related To Nitric Oxide Radical. *American Heart Association Monograph* 1986; II:287.
4. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res.* 1987; 61(6):866-79.
5. Furchgott RF, Carvalho MH, Khan MT, et al. Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels* 1987; 24:145-149.
6. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.
7. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664-666.
8. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends in Biochemical Sciences* 1992; 17:399-402.
9. Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science* 1992; 258:1861.
10. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry* 1994; 63:175-195.
11. Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, et al. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *European Journal of Pharmacology* 1988; 154:213-216.
12. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:12231-12234.
13. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical Journal* 1994; 298 (Pt 2):249-258.

14. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacological Reviews* 1997; 49:137-142.
15. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annual Review of Physiology* 1995; 57:707-736.
16. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, et al. Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *The Biochemical Journal* 1990; 269:207-210.
17. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiological Reviews* 2004; 84:731-765.
18. Shaul PW, North AJ, Wu LC, et al. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *The Journal of Clinical Investigation* 1994; 94:2231-2236.
19. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267:6370-6374.
20. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1991; 43:109-142.
21. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Pphysiology. Renal Pphysiology* 2001; 280:F193-206.
22. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258:1898-1902.
23. Joshi MS, Ponthier JL, Lancaster JR, Jr. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Rradiccal Biology & Medicine* 1999; 27:1357-1366.
24. Muruganandam A, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994; 1200:1-6.
25. Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2000; 26:463-478.
26. Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation* 2001; 103:1752-1758.

27. Bo L, Dawson TM, Wesselingh S, et al. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Annals of Neurology* 1994; 36:778-786.
28. Boullerne AI, Petry KG, Meynard M, et al. Indirect evidence for nitric oxide involvement in multiple sclerosis by characterization of circulating antibodies directed against conjugated S-nitrosocysteine. *Journal of Neuroimmunology* 1995; 60:117-124.
29. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunology Today* 1992; 13:157-160.
30. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88:4651-4655.
31. Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 1993; 48:1034-1043.
32. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, et al. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 184:409-420.
33. Gaston B, Sears S, Woods J, et al. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *Lancet* 1998; 351:1317-1319.
34. Ricciardolo FL, Geppetti P, Mistretta A, et al. Randomised double-blind placebo-controlled study of the effect of inhibition of nitric oxide synthesis in bradykinin-induced asthma. *Lancet* 1996; 348:374-377.
35. Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, et al. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiologica Scandinavica* 1990; 140:449-457.
36. Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunology Today* 1995; 16:128-130.
37. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology* 2000; 164:6166-6173.
38. Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *European Journal of Immunology* 1994; 24:980-984.

39. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, et al. TNF-alpha and IL-1 beta upregulate nitric oxide-dependent ciliary motility in bovine airway epithelium. *The American Journal of Physiology* 1995; 268:L911-917.
40. Loukides S, Kharitonov S, Wodehouse T, et al. Effect of arginine on mucociliary function in primary ciliary dyskinesia. *Lancet* 1998; 352:371-372.
41. Folkerts G, Kloek J, Muijsers RB, et al. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. *European Journal of Pharmacology* 2001; 429:251-262.
42. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molecular Aspects of Medicine* 1998; 19:221-357.
43. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, et al. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991; 181:852-857.
44. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *The European Respiratory Journal* 1993; 6:1368-1370.
45. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343:133-135.
46. Lundberg JO, Weitzberg E, Nordvall SL, et al. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *The European Respiratory Journal* 1994; 7:1501-1504.
47. Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, et al. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nature Medicine* 1995; 1:370-373.
48. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1993; 9:371-377.
49. Silkoff P. History, technical and regulatory aspects of exhaled nitric oxide. *Journal of Breath Research* 2008; 2:037001.
50. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. The European Respiratory Society Task Force. *The European Respiratory Journal* 1997; 10:1683-1693.

51. 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. *American Journal of Respiratory and Critical care medicine* 1999; 160:2104-2117.
52. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005; 171:912-930.
53. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2011; 184:602-615.
54. Salome CM, Roberts AM, Brown NJ, et al. Exhaled nitric oxide measurements in a population sample of young adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999; 159:911-916.
55. Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, et al. Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *The European Respiratory Journal* 2003; 21:433-438.
56. Hemmingsson T, Linnarsson D, Gambert R. Novel hand-held device for exhaled nitric oxide-analysis in research and clinical applications. *Journal of Clinical Monitoring and Computing* 2004; 18:379-387.
57. Alving K, Janson C, Nordvall L. Performance of a new hand-held device for exhaled nitric oxide measurement in adults and children. *Respiratory Research* 2006; 7:67.
58. Khalili B, Boggs PB, Bahna SL. Reliability of a new hand-held device for the measurement of exhaled nitric oxide. *Allergy* 2007; 62:1171-1174.
59. McGill C, Malik G, Turner SW. Validation of a hand-held exhaled nitric oxide analyzer for use in children. *Pediatric Pulmonology* 2006; 41:1053-1057.
60. Pizzimenti S, Bugiani M, Piccioni P, et al. Exhaled nitric oxide measurements: correction equation to compare hand-held device to stationary analyzer. *Respiratory Medicine* 2008; 102:1272-1275.

61. Antus B, Horvath I, Barta I. Assessment of exhaled nitric oxide by a new hand-held device. *Respiratory Medicine* 2010; 104:1377-1380.
62. Maniscalco M, Lundberg JO. Hand-held nitric oxide sensor NIOX-MINO<sup>®</sup> for the monitoring of respiratory disorders. *Expert Review of Respiratory Medicine* 2010; 4:715-721.
63. Kim SH, Moon JY, Kwak HJ, et al. Comparison of two exhaled nitric oxide analyzers: the NIOX-MINO<sup>®</sup> hand-held electrochemical analyzer and the NOA280i stationary chemiluminescence analyzer. *Respirology* 2012; 17:830-834.
64. Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, et al. Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest* 2006; 130:1319-1325.
65. Dressel H, de la Motte D, Reichert J, et al. Exhaled nitric oxide: independent effects of atopy, smoking, respiratory tract infection, gender and height. *Respiratory Medicine* 2008; 102:962-969.
66. Travers J, Marsh S, Aldington S, et al. Reference ranges for exhaled nitric oxide derived from a random community survey of adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 176:238-242.
67. Jilma B, Kastner J, Mensik C, et al. Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. *Life Sciences* 1996; 58:469-476.
68. Taylor DR, Mandhane P, Greene JM, et al. Factors affecting exhaled nitric oxide measurements: the effect of sex. *Respiratory Research* 2007; 8:82.
69. Harris EA, Hunter ME, Seelye ER, et al. Prediction of the physiological dead-space in resting normal subjects. *Clinical Science and Molecular Medicine* 1973; 45:375-386.
70. Mandhane PJ, Hanna SE, Inman MD, et al. Changes in exhaled nitric oxide related to estrogen and progesterone during the menstrual cycle. *Chest* 2009; 136:1301-1307.
71. Haight RR, Gordon RL, Brooks SM. The effects of age on exhaled breath nitric oxide levels. *Lung* 2006; 184:113-119.
72. Gelb AF, George SC, Camacho F, et al. Increased nitric oxide concentrations in the small airway of older normal subjects. *Chest* 2011; 139:368-375.

73. Masters IB, Ware RS, Zimmerman PV, et al. Airway sizes and proportions in children quantified by a video-bronchoscopic technique. *BMC pulmonary medicine* 2006. 8; 6:5.
74. Depalo A, Carpagnano GE, Spanevello A, et al. Exhaled NO and iNOS expression in sputum cells of healthy, obese and OSA subjects. *Journal of Internal Medicine* 2008; 263:70-78.
75. Maniscalco M, de Laurentiis G, Zedda A, et al. Exhaled nitric oxide in severe obesity: effect of weight loss. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2007; 156:370-373.
76. Komakula S, Khatri S, Mermis J, et al. Body mass index is associated with reduced exhaled nitric oxide and higher exhaled 8-isoprostanes in asthmatics. *Respiratory Research* 2007; 8:32.
77. Barros R, Moreira A, Fonseca J, et al. Obesity and airway inflammation in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006; 117:1501-1502.
78. Sundry JS, Hauswirth DW, Mervin-Blake S, et al. Smoking is associated with an age-related decline in exhaled nitric oxide. *The European Respiratory Journal* 2007; 30:1074-1081.
79. Malinowski A, Janson C, Holmkvist T, et al. Effect of smoking on exhaled nitric oxide and flow-independent nitric oxide exchange parameters. *The European Respiratory Journal* 2006; 28:339-345.
80. McSharry CP, McKay IC, Chaudhuri R, et al. Short and long-term effects of cigarette smoking independently influence exhaled nitric oxide concentration in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 116:88-93.
81. Hoyt JC, Robbins RA, Habib M, et al. Cigarette smoke decreases inducible nitric oxide synthase in lung epithelial cells. *Experimental Lung Research* 2003; 29:17-28.
82. Su Y, Han W, Giraldo C, et al. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1998; 19:819-825.
83. Olin AC, Aldenbratt A, Ekman A, et al. Increased nitric oxide in exhaled air after intake of a nitrate-rich meal. *Respiratory Medicine* 2001; 95:153-158.

84. Tee AK, Hui KP. Effect of spirometric maneuver, nasal clip, and submaximal inspiratory effort on measurement of exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Chest* 2005; 127:131-134.
85. Karrasch S, Ernst K, Behr J, et al. Exhaled nitric oxide and influencing factors in a random population sample. *Respiratory Medicine* 2011; 105:713-718.
86. Crapo RO, Morris AH, Gardner RM. Reference spirometric values using techniques and equipment that meet ATS recommendations. *The American Review of Respiratory Disease* 1981; 123:659-664.
87. Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, et al. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. *Thorax* 2006; 61:817-827.
88. Smith AD, Cowan JO, Taylor DR. Exhaled nitric oxide levels in asthma: Personal best versus reference values. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 124:714-718 e714.
89. Olin AC, Bake B, Toren K. Fraction of exhaled nitric oxide at 50 mL/s: reference values for adult lifelong never-smokers. *Chest* 2007; 131:1852-1856.
90. Olivieri M, Talamini G, Corradi M, et al. Reference values for exhaled nitric oxide (reveno) study. *Respiratory Research* 2006; 7:94.
91. See KC, Christiani DC. Normal values and thresholds for the clinical interpretation of exhaled nitric oxide levels in the US general population: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2010. *Chest* 2013; 143:107-116.
92. Buchvald F, Baraldi E, Carraro S, et al. Measurements of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 115:1130-1136.
93. Shaw DE, Berry MA, Thomas M, et al. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 176:231-237.
94. Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, et al. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1997; 155:260-267.

95. Kisson N, Duckworth LJ, Blake KV, et al. FE(NO): relationship to exhalation rates and online versus bag collection in healthy adolescents. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 162:539-545.
96. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *Journal of Applied Physiology* 1998; 85:653-666.
97. Tsoukias NM, Shin HW, Wilson AF, et al. A single-breath technique with variable flow rate to characterize nitric oxide exchange dynamics in the lungs. *Journal of Applied Physiology* 2001; 91: 477-87.
98. Tsoukias NM, Tannous Z, Wilson AF, et al. Single-exhalation profiles of NO and CO<sub>2</sub> in humans: effect of dynamically changing flow rate. *Journal of Applied Physiology* 1998; 85:642-652.
99. Silkoff PE, Sylvester JT, Zamel N, et al. Airway nitric oxide diffusion in asthma: Role in pulmonary function and bronchial responsiveness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 161:1218-1228.
100. Pietropaoli AP, Perillo IB, Torres A, et al. Simultaneous measurement of nitric oxide production by conducting and alveolar airways of humans. *Journal of Applied Physiology* 1999; 87:1532-1542.
101. Hogman M, Drca N, Ehrstedt C, et al. Exhaled nitric oxide partitioned into alveolar, lower airways and nasal contributions. *Respiratory medicine* 2000; 94:985-991.
102. George SC, Hogman M, Permutt S, et al. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. *Journal of Applied Physiology* 2004; 96:831-839.
103. Shin HW, George SC. Impact of axial diffusion on nitric oxide exchange in the lungs. *Journal of Applied Physiology* 2002; 93:2070-2080.
104. Shin HW, Condorelli P, Rose-Gottron CM, et al. Probing the impact of axial diffusion on nitric oxide exchange dynamics with heliox. *Journal of Applied Physiology* 2004; 97:874-882.
105. Shin HW, Condorelli P, George SC. Examining axial diffusion of nitric oxide in the lungs using heliox and breath hold. *Journal of Applied Physiology* 2006; 100:623-630.
106. Condorelli P, Shin HW, Aledia AS, et al. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant

- flow exhalations and an axial diffusion model. *Journal of Applied Physiology* 2007; 102:417-425.
107. Hogman M, Lafih J, Merilainen P, et al. Extended NO analysis in a healthy subgroup of a random sample from a Swedish population. *Clinical Physiology and Functional Imaging* 2009; 29:18-23.
108. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annual Review of Immunology* 2004; 22:789-815.
109. Plaza V, Bolivar I, Giner J, et al. Knowledge of and attitudes and adherence to the Spanish Guidelines for Asthma Management (GEMA) among Spanish health care professionals: the GEMA test Project. *Archivos de Bronconeumologia* 2008; 44:245-251.
110. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *The New England Journal of Medicine* 2001; 344:350-362.
111. Redington AE, Meng QH, Springall DR, et al. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment. *Thorax* 2001; 56:351-357.
112. Lane C, Knight D, Burgess S, et al. Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath. *Thorax* 2004; 59:757-760.
113. Guo FH, Comhair SA, Zheng S, et al. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *Journal of Immunology* 2000; 164:5970-5980.
114. Guo FH, Uetani K, Haque SJ, et al. Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. *The Journal of Clinical Investigation* 1997; 100:829-838.
115. Batra J, Pratap Singh T, Mabalirajan U, et al. Association of inducible nitric oxide synthase with asthma severity, total serum immunoglobulin E and blood eosinophil levels. *Thorax* 2007; 62:16-22.

116. Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A, et al. Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with NOS1 genotype. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 162:2043-2047.
117. Kharitonov SA, Lubec G, Lubec B, et al. L-arginine increases exhaled nitric oxide in normal human subjects. *Clinical Science* 1995; 88:135-139.
118. Lara A, Khatri SB, Wang Z, et al. Alterations of the arginine metabolome in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2008; 178:673-681.
119. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, et al. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998; 53:91-95.
120. Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 161:64-72.
121. Berry MA, Shaw DE, Green RH, et al. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2005; 35:1175-1179.
122. Berlyne GS, Parameswaran K, Kamada D, et al. A comparison of exhaled nitric oxide and induced sputum as markers of airway inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000; 106:638-644.
123. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, et al. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *The European Respiratory Journal* 1999; 13:1386-1390.
124. Mattes J, Storm van's Gravesande K, Reining U, et al. NO in exhaled air is correlated with markers of eosinophilic airway inflammation in corticosteroid-dependent childhood asthma. *The European Respiratory Journal* 1999; 13:1391-1395.
125. Malmberg LP, Turpeinen H, Ryttila P, et al. Determinants of increased exhaled nitric oxide in patients with suspected asthma. *Allergy* 2005; 60:464-468.

126. Barreto M, Villa MP, Monti F, et al. Additive effect of eosinophilia and atopy on exhaled nitric oxide levels in children with or without a history of respiratory symptoms. *Pediatric Allergy and Immunology* 2005; 16:52-58.
127. Pedroletti C, Lundahl J, Alving K, et al. Exhaled nitric oxide in asthmatic children and adolescents after nasal allergen challenge. *Pediatric Allergy and Immunology* 2005; 16:59-64.
128. Silkoff PE, Lent AM, Busacker AA, et al. Exhaled nitric oxide identifies the persistent eosinophilic phenotype in severe refractory asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 116:1249-1255.
129. Lim S, Jatakanon A, Meah S, et al. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma. *Thorax* 2000; 55:184-188.
130. Brightling CE, Symon FA, Birring SS, et al. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. *Thorax* 2003; 58:528-532.
131. Warke TJ, Fitch PS, Brown V, et al. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002; 57:383-387.
132. Lex C, Ferreira F, Zacharasiewicz A, et al. Airway eosinophilia in children with severe asthma: predictive values of noninvasive tests. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006; 174:1286-1291.
133. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, et al. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002; 57:643-648.
134. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, et al. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002; 57:875-879.
135. Ramesh G, Jindal SK, Ganguly NK, et al. Increased nitric oxide production by neutrophils in bronchial asthma. *The European Respiratory Journal* 2001; 17:868-871.
136. Malinovschi A, Janson C, Hogman M, et al. Both allergic and nonallergic asthma are associated with increased FE(NO) levels, but only in never-smokers. *Allergy* 2009; 64:55-61.

137. Boulet LP, Lemiere C, Archambault F, et al. Smoking and asthma: clinical and radiologic features, lung function, and airway inflammation. *Chest* 2006; 129:661-668.
138. Stirling RG, Kharitonov SA, Campbell D, et al. Increase in exhaled nitric oxide levels in patients with difficult asthma and correlation with symptoms and disease severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. *Asthma and Allergy Group. Thorax* 1998; 53:1030-1034.
139. Langley SJ, Goldthorpe S, Custovic A, et al. Relationship among pulmonary function, bronchial reactivity, and exhaled nitric oxide in a large group of asthmatic patients. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*: 2003; 91(4):398-404.
140. Horvath I, Barnes PJ. Exhaled monoxides in asymptomatic atopic subjects. *Clinical and Experimental Allergy*: 1999; 29:1276-1280.
141. Prasad A, Langford B, Stradling JR, et al. Exhaled nitric oxide as a screening tool for asthma in school children. *Respiratory Medicine* 2006; 100:167-173.
142. Franklin PJ, Stick SM, Le Souef PN, et al. Measuring exhaled nitric oxide levels in adults: the importance of atopy and airway responsiveness. *Chest* 2004; 126:1540-1545.
143. Scott M, Raza A, Karmaus W, et al. Influence of atopy and asthma on exhaled nitric oxide in an unselected birth cohort study. *Thorax* 2010; 65:258-262.
144. Romero KM, Robinson CL, Baumann LM, et al. Role of exhaled nitric oxide as a predictor of atopy. *Respiratory Research* 2013; 14:48.
145. Goldstein MF, Veza BA, Dunsky EH, et al. Comparisons of peak diurnal expiratory flow variation, postbronchodilator FEV(1) responses, and methacholine inhalation challenges in the evaluation of suspected asthma. *Chest* 2001; 119:1001-1010.
146. Hunter CJ, Brightling CE, Woltmann G, et al. A comparison of the validity of different diagnostic tests in adults with asthma. *Chest* 2002; 121:1051-1057.
147. 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.

148. Henriksen AH, Lingsas-Holmen T, Sue-Chu M, et al. Combined use of exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness in characterizing asthma in a large population survey. *European Respiratory Journal* 2000; 15:849-855.
149. Deykin A, Massaro AF, Drazen JM, et al. Exhaled nitric oxide as a diagnostic test for asthma: online versus offline techniques and effect of flow rate. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 165:1597-1601.
150. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, et al. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004; 169:473-478.
151. Heffler E, Guida G, Marsico P, et al. Exhaled nitric oxide as a diagnostic test for asthma in rhinitic patients with asthmatic symptoms. *Respiratory Medicine* 2006; 100:1981-1987.
152. Taylor DR, Pavord ID. Biomarkers in the assessment and management of airways diseases. *Postgraduate Medical Journal* 2008; 84:628-634; quiz 633.
153. Belda J, Parameswaran K, Lemiere C, et al. Predictors of loss of asthma control induced by corticosteroid withdrawal. *Canadian respiratory journal* 2006; 13:129-133.
154. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352:2163-2173.
155. Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, et al. Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma: a randomized controlled trial. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005; 172:831-836.
156. Fritsch M, Uxa S, Horak F, Jr., et al. Exhaled nitric oxide in the management of childhood asthma: a prospective 6-months study. *Pediatric Pulmonology* 2006; 41:855-862.
157. Gelb AF, Flynn Taylor C, Shinar CM, et al. Role of spirometry and exhaled nitric oxide to predict exacerbations in treated asthmatics. *Chest* 2006; 129:1492-1499.

158. Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, et al. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2001; 164:738-743.
159. Szeffler SJ, Mitchell H, Sorkness CA, et al. Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372:1065-1072.
160. Wilson AM, Duong M, Pratt B, et al. Anti-inflammatory effects of once daily low dose inhaled ciclesonide in mild to moderate asthmatic patients. *Allergy* 2006; 61:537-542.
161. Jones SL, Herbison P, Cowan JO, et al. Exhaled NO and assessment of anti-inflammatory effects of inhaled steroid: dose-response relationship. *European Respiratory Journal* 2002; 20:601-608.
162. Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, et al. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1995; 152:892-896.
163. Slats AM, Sont JK, van Klink RH, et al. Improvement in bronchodilation following deep inspiration after a course of high-dose oral prednisone in asthma. *Chest* 2006; 130:58-65.
164. Tsai YG, Lee MY, Yang KD, et al. A single dose of nebulized budesonide decreases exhaled nitric oxide in children with acute asthma. *Journal of Pediatrics* 2001; 139:433-437.
165. Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996; 153:454-457.
166. Szeffler SJ, Martin RJ, King TS, et al. Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002; 109:410-418.
167. Zeiger RS, Szeffler SJ, Phillips BR, et al. Response profiles to fluticasone and montelukast in mild-to-moderate persistent childhood asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006; 117:45-52.

168. Gibson PG. Using fractional exhaled nitric oxide to guide asthma therapy: design and methodological issues for Asthma Treatment Algorithm Studies. *Clinical and Experimental Allergy* 2009; 39:478-490.
169. Redline S, Young T. Epidemiology and natural history of obstructive sleep apnea. *Ear, Nose, & Throat Journal* 1993; 72:20-21, 24-26.
170. Shepherd KL, Jensen CM, Maddison KJ, et al. Relationship between upper airway and inspiratory pump muscle force in obstructive sleep apnea. *Chest* 2006; 130:1757-1764.
171. Hillman DR, Murphy AS, Pezzullo L. The economic cost of sleep disorders. *Sleep* 2006; 29:299-305.
172. Duran J, Esnaola S, Rubio R, et al. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2001; 163:685-689.
173. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005; 112:2660-2667.
174. Lavie P, Herer P, Hoffstein V. Obstructive sleep apnoea syndrome as a risk factor for hypertension: population study. *British Medical Journal* 2000; 320:479-482.
175. Peppard PE, Young T, Palta M, et al. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *The New England Journal of Medicine* 2000; 342:1378-1384.
176. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study*. *Journal of the American Medical Association* 2000; 283:1829-1836.
177. Bonsignore MR, Borel AL, Machan E, et al. Sleep apnoea and metabolic dysfunction. *European Respiratory Review* 2013; 22:353-364.
178. Newman AB, Nieto FJ, Guidry U, et al. Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the Sleep Heart Health Study. *American Journal of Epidemiology* 2001; 154:50-59.

179. Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, et al. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *The New England Journal of Medicine* 2005; 353:2034-2041.
180. Redline S, Yenokyan G, Gottlieb DJ, Shahar E, O'Connor GT, Resnick HE, et al. Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke. Sleep Heart Health Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010 Jul 15;182(2):269-77.
181. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, et al Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep-apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 2005;365:1046-53.
182. McNicholas WT, Bonsignore MR. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *European Respiratory Journal* 2007; 29:156-178.
183. Young T, Finn L, Peppard P, Szklo-Coxe M, Austin D, Nieto J, et al. Sleep-disordered-breathing and mortality; Eighteen-year follow-up of Wisconsin Sleep Cohort. *Sleep*. 2008;31:1071–8.
184. Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, et al. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS medicine* 2009; Aug (6)8: e1000132.
185. Berry RB, Gleeson K. Respiratory arousal from sleep: mechanisms and significance. *Sleep* 1997; 20:654-675.
186. Younes M. Role of arousals in the pathogenesis of obstructive sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004; 169:623-633.
187. Punjabi NM, Bandeen-Roche K, Marx JJ, et al. The association between daytime sleepiness and sleep-disordered breathing in NREM and REM sleep. *Sleep* 2002; 25:307-314.
188. Engleman HM, Douglas NJ. Sleep. 4: Sleepiness, cognitive function, and quality of life in obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *Thorax* 2004; 59:618-622.
189. Terán-Santos J, Jiménez-Gómez A, Cordero-Guevara J, and the Cooperative Group Burgos–Santander. The association between sleep

- apnea and the risk of traffic accidents. *The New England Journal of Medicine* 1999;340:847–851.
190. Philip P, Sagaspe P, Lagarde E, et al. Sleep disorders and accidental risk in a large group of regular registered highway drivers. *Sleep Med* 2010; 11:973-979.
191. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep* 1999; 22:667-689.
192. Lloberes P, Durán-Cantolla J, Martínez-García MÁ, et al. Diagnosis and treatment of sleep apnea-hypopnea syndrome. *Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. Archivos de Bronconeumología* 2011;47:143-56.
193. Kushida CA, Littner MR. Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures: an update for 2005. *Sleep* 2005 ;28(4):499-521.
194. Sullivan CE, Issa FG, Berthon-jones M. et al Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet*. 1981 18;1(8225):862-5.
195. Epstein LJ, Kristo D, Strollo PJ Jr, et al. Adult Obstructive Sleep Apnea Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 2009;5:263–276.
196. Barbé F, Durán-Cantollá J, Sánchez de la Torre M. et al. Effect of continuous positive airway pressure on the incidence of hypertension and cardiovascular events in nonsleepy patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association* 2012 May 23;307(20):2161-8.
197. Sharma SK, Agrawal S, Damodaran D et al. CPAP for the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2011;365:2277-2286.
198. Ryan CM, Bradley TD. Pathogenesis of obstructive sleep apnea. *Journal of Applied Physiology* 2005; 99:2440-2450.

199. Riha RL, Brander P, Vennelle M, et al. A cephalometric comparison of patients with the sleep apnea/hypopnea syndrome and their siblings. *Sleep* 2005; 28:315-320.
200. Sforza E, Bacon W, Weiss T, et al. Upper airway collapsibility and cephalometric variables in patients with obstructive sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 161: 347–352.
201. Simpson L, Mukherjee S, Cooper MN, et al. Sex differences in the association of regional fat distribution with the severity of obstructive sleep apnea. *Sleep* 2010; 33: 467–474.
202. Carrera M, Barbé F, Sauleda J, et al. Patients with obstructive sleep apnea exhibit genioglossus dysfunction that is normalized after treatment with continuous positive airway pressure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999; 159: 1960–1966.
203. Bianchi AL, Denavit-Saubie M, and Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiological Reviews* 75: 1–45, 1995.
204. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in endocrinology and metabolism: Trends of Endocrinology and Metabolism* 2000; 11:327-332.
205. Nieto FJ, Peppard PE, Young TB. Sleep disordered breathing and metabolic syndrome. *Wisconsin Medical Journal* 2009; 108: 263–265.
206. Caples SM, Garcia-Touchard A, Somers VK. Sleep-disordered breathing and cardiovascular risk. *Sleep* 2007; 30:291-303.
207. Farre R, Rotger M, Montserrat JM, et al. Collapsible upper airway segment to study the obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome in rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2003; 136:199-209.
208. Boyd JH, Petrof BJ, Hamid Q, et al. Upper airway muscle inflammation and denervation changes in obstructive sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004; 170:541-546.
209. Paulsen FP, Steven P, Tsokos M, et al. Upper airway epithelial structural changes in obstructive sleep-disordered breathing. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 166:501-509.

210. Puig F, Rico F, Almendros I, et al. Vibration enhances interleukin-8 release in a cell model of snoring-induced airway inflammation. *Sleep* 2005; 28:1312-1316.
211. Almendros I, Carreras A, Ramirez J, et al. Upper airway collapse and reopening induce inflammation in a sleep apnoea model. *European Respiratory Journal* 2008; 32:399-404.
212. Schwab RJ, Gupta KB, Gefer WB, et al. Upper airway and soft tissue anatomy in normal subjects and patients with sleep-disordered breathing. Significance of the lateral pharyngeal walls. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1995; 152:1673-1689.
213. Woodson BT, Garancis JC, Toohill RJ. Histopathologic changes in snoring and obstructive sleep apnea syndrome. *The Laryngoscope* 1991; 101:1318-1322.
214. Sekosan M, Zakkar M, Wenig BL, et al. Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea. *The Laryngoscope* 1996; 106:1018-1020.
215. Rubinstein I. Nasal inflammation in patients with obstructive sleep apnea. *The Laryngoscope* 1995; 105:175-177.
216. Hauber HP, Ruller S, Muller E, et al. Pharyngeal lavage lymphocytosis in patients with obstructive sleep apnea: a preliminary observation. *PloS one* 2011; 6:e16277.
217. Depalo A, Carpagnano GE, Spanevello A, et al. Exhaled NO and iNOS expression in sputum cells of healthy, obese and OSA subjects. *Journal of Internal Medicine* 2008; 263:70-78.
218. Salerno FG, Carpagnano E, Guido P, et al. Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. *Respiratory Medicine* 2004; 98:25-2865.
219. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005; 112: 2660–2667.
220. Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cellular Research* 2010; 20:24-33.

221. Pierce GL, Lesniewski LA, Lawson BR, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation* 2009; 119:1284-1292.
222. Htoo AK, Greenberg H, Tongia S, et al. Activation of nuclear factor  $\kappa$ B in obstructive sleep apnea: a pathway leading to systemic inflammation. *Sleep & Breathing* 2006; 10:43-50.
223. Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 165: 934–939.
224. Lavie L, Polotsky V. Cardiovascular aspects in obstructive sleep apnea syndrome - molecular issues, hypoxia and cytokine profiles. *Respiration* 2009; 78: 361–370.
225. Von der Thusen JH, Kuiper J, van Berkel TJ, et al. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacological Reviews* 2003; 55: 133–166.
226. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, et al. Elevation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101: 2149–2153.
227. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102: 2165–2168.
228. Nagaoka T, Kuo L, Ren Y, et al. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of retinal arterioles via enhanced superoxide production. *Investigative Ophthalmology Visual Science* 2008; 49: 2053–2060.
229. Ridker PM, Rifai N, Rose L. et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *The New England Journal of Medicine* 2002;347:1557-65.
230. Guilleminault C, Kirisoglu C, Ohayon MM. C-reactive protein and sleep-disordered breathing. *Sleep* 2004; 27: 1507–11.

231. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 2003.
232. Barceló A, Barbé F, Llompart E, et al. Effects of obesity on C-reactive protein level and metabolic disturbances in male patients with obstructive sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004 Jul 15;117(2):118-21.
233. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome—an oxidative stress disorder. *Sleep Medicine Review* 2003; 7: 35–51.
234. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology* 1996; 271: C1424–C1437.
235. Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, et al. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 162: 566–570.
236. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, et al. 2008. Inflammation, oxidative stress and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 2008; 117: 2270–2278.
237. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *Journal of Clinical Investigation* 2003;111:1201–1209.
238. Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *Journal of Physiology Pharmacology* 2002;53:515-524.
239. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, et al. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:22546–54.
240. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9220 –9225.

241. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Investigation* 1997;99:41-46.
242. Jelic S, Le Jemtel TH. Inflammation, oxidative stress, and the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Trends of Cardiovascular Medicine* 2008; 18:253-60.
243. Carlson J, Hedner J, Patterson A. Increased plasma concentration of ADMA, a naturally occurring nitric oxide synthesis inhibitor in OSA patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1997;155:A869.
244. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 2004; 27: 123–128.
245. Barcelo A, Miralles C, Barbe F, et al. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *European Respiratory Journal* 2000; 16: 644–647.
246. Hoffmann MS, Singh P, Wolk R, et al. Microarray studies of genomic oxidative stress and cell cycle responses in obstructive sleep apnea. *Antioxidants & Redox Signaling* 2007; 9: 661–66.
247. Christou K, Moulas AN, Pastaka C, et al. Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Medicine* 2003; 4: 225–228.50.
248. Barcelo A, Barbe F, de la Pena M, et al. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *European Respiratory Journal* 2006; 27: 756–760.
249. El Solh AA, Saliba R, Bosinski T, et al. Allopurinol improves endothelial function in sleep apnoea: a randomised controlled study. *European Respiratory Journal* 2006; 27: 997–1002.
250. Grebe M, Eisele HJ, Weissmann N, et al. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006; 173: 897–901.
251. Faure P, Tamiel R, Baguet JP, et al. Impairment of serum albumin antioxidant properties in obstructive sleep apnoea syndrome. *European Respiratory Journal* 2008; 31: 1046–1053.

252. Narkiewicz K, van de Borne PJ, Pesek CA, et al. Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. *Circulation* 1999; 99: 1183–1189.
253. Guardiola JJ, Matheson PJ, Clavijo LC, et al. Hypercoagulability in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Medicine* 2001; 2: 517–523.
254. Känel von R, Loredó JS, Ancoli-Israel S, et al. Association between sleep apnea severity and blood coagulability: Treatment effects of nasal continuous positive airway pressure. *Sleep Breath* 2006; 10: 139–46.
255. Phillips CL, McEwen BJ, Morel-Kopp M-C, et al. Effects of continuous positive airway pressure on coagulability in obstructive sleep apnoea: a randomised, placebo-controlled crossover study. *Thorax* 2012; 67: 639–44.
256. Olopade CO, Christon JA, Zakkar M, et al. Exhaled pentane and nitric oxide levels in patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 1997; 111:1500-1504.
257. Petrosyan M, Perraki E, Simoes D, et al. Exhaled breath markers in patients with obstructive sleep apnoea. *Sleep & Breathing* 2008; 12:207-215.
258. Foresi A, Leone C, Olivieri D, et al. Alveolar-derived exhaled nitric oxide is reduced in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 2007; 132:860-867.
259. Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of alpha(1)-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B(4) and interleukin 8. *Thorax* 2002; 57:709-714.
260. Devouassoux G, Levy P, Rossini E, et al. Sleep apnea is associated with bronchial inflammation and continuous positive airway pressure-induced airway hyperresponsiveness. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007; 119:597-603.
261. Carpagnano GE, Spanevello A, Sabato R, et al. Exhaled pH, exhaled nitric oxide, and induced sputum cellularity in obese patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Translational Research* 2008; 151:45-50.

262. Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, et al.. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:46230–40.
263. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, et al.. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 106:57–62.
264. Murata T, Yamawaki H, Hori M, et al. Hypoxia impairs endothelium dependent relaxation in organ cultured pulmonary artery. *European Journal of Pharmacology* 2001; 421:45–53.
265. Tahawi Z, Orolinova N, Joshua IG, et al. Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *Journal of Applied Physiology* 2001; 90:2007–13.
266. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al: Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *Journal of the American College of Cardiology* 2002, 39:257–265.
267. Ip MS, Tse HF, Lam B, et al. Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004; 169:348–53.
268. Chung S, Yoon IY, Shin YK, et al. Endothelial dysfunction and inflammatory reactions of elderly and middle aged men with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath* 2009, 13:11–17.
269. Nieto FJ, Herrington DM, Redline S, et al. Sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004; 169:354–360.
270. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, et al. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 2008; 117:2270–2278.
271. Schulz R, Schmidt D, Blum A, Lopes-Ribeiro X, Lücke C, Mayer K, et al. Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax* 2000; 55:1046-51.

272. Ozkan, sleep breath 2007 Kato M, Roberts-Thomson P, Phillips BG, et al. Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 2000; 102:2607–10.
273. Ip MSM, Lam B, Chan L-Y, et al. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000;162:2166-71.
274. Noda A, Nakata S, Koike Y, et al. Continuous positive airway pressure improves daytime baroreflex sensitivity and nitric oxide production in patients with moderate to severe obstructive sleep apnea syndrome. *Hypertens Research* 2007; 30:669–76.
275. Drager LF, Bortolotto LA, Figueiredo AC, et al. Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 176: 706–712.
276. Kato M, Roberts-Thomson P, Phillips BG, et al. Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 2000; 102: 2607–2610.
277. Christou K, Kostikas K, Pastaka C, et al. Nasal continuous positive airway pressure treatment reduces systemic oxidative stress in patients with severe obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Medicine* 2009, 10:87–94.
278. Hernandez C, Abreu J, Abreu P, et al. Effects of nasal positive airway pressure treatment on oxidative stress in patients with sleep apnea-hypopnea syndrome. *Archivos de Bronconeumología* 2006, 42:125–126.
279. Lee SD, Ju G, Choi JA, et al. The association of oxidative stress with central obesity in obstructive sleep apnea. *Sleep Breathing* 2011, 16:511–517.
280. Lancaster, J. R. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*1994; 91: 8137–8141.

281. Hyde RW, Geigel EJ, Olszowka AJ, et al. Determination of production of nitric oxide by lower airways of humans--theory. *Journal of Applied Physiology* 1997;82(4):1290-6.
282. Borland CDR, Higenbottam WT. A simultaneous single breath measurement of pulmonary diffusing capacity with nitric oxide and carbon monoxide. *European Respiratory Journal* 1989; 2: 56–63.
283. Guenard H, Varene N, Vaida P. Determination of lung capillary blood volume and membrane diffusing capacity in man by the measurements of NO and CO transfer. *Respiratory Physiology* 1987; 70: 113–120.
284. Meyer, M Piiper J. Nitric oxide (NO), a new test gas for study of alveolar-capillary diffusion. *European Respiratory Journal* 1989; J. 2: 494–496.
285. Silkoff Philip E, Carlson M, Bourke T et al. Aerocrine exhaled nitric oxide monitoring system NIOX is cleared by de US Food and Drug Administration for monitoring therapy is asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004;114:1241-56.
286. Kharitonov S. NIOX-MINO®; a new handheld exhaled NO device. *European Respiratory Society 15th Annual Congress; 2005. European Respiratory Society; 2005.*
287. Lehtimäki L1, Kankaanranta H, Saarelainen S, et al. Extended exhaled NO measurement differentiates between alveolar and bronchial inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2001;163(7):1557-61.
288. ShinHW, Rose-GottronCM, Pérez F, et al. Flow-independent nitric oxide exchange parameters in healthy adults. *Journal of Applied Physiology* 2001;91:2173–81.
289. Brindicci C, Ito K, Barnes PJ, et al. Differential flow analysis of exhaled nitric oxide in patients with asthma of differing severity. *Chest.* 2007;131(5):1353-62.

## APÉNDICE

- Otras aportaciones científicas relevantes:

- Manual de Procedimientos SEPAR N° 11. Pruebas para el estudio de inflamación de las vías aéreas. Capítulo 3. Medición de Óxido Nítrico en aire espirado. Barcelona, 2007.

