

Marcadores de la enfermedad asmática: de la función pulmonar al aire espirado

A. Moreno Galdó

Unidad de Neumología Pediátrica y Fibrosis Quística. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España.

El asma es primariamente una enfermedad inflamatoria de las vías aéreas, lo que ha estimulado la búsqueda de marcadores de la inflamación, obtenidos mediante técnicas no invasoras. Se han estudiado marcadores en diversos fluidos biológicos: sangre periférica y orina, esputo, aire espirado y condensado del aire espirado. De todos ellos, los que más interés presentan actualmente son los que se determinan en el esputo inducido (recuento de eosinófilos), en el aire espirado (óxido nítrico [NO] y monóxido de carbono [CO]) y en el condensado del aire espirado (isoprostanos). En el asma existe un aumento importante del NO exhalado, un aumento modesto del CO y un aumento moderado del 8-isoprostano. El NO exhalado es sensible a la inhibición por dosis bajas de glucocorticoides inhalados, mientras que el CO exhalado y el 8-isoprostano son mucho menos sensibles. Es posible que en los próximos años varios de estos parámetros tengan una aplicación en la práctica clínica diaria, ayudando al diagnóstico del asma y a la vigilancia del curso clínico de la enfermedad y su tratamiento.

Palabras clave:

Asma. Niños. Marcadores de la inflamación. Aire espirado. Condensado del aire espirado. Espudo inducido. Eosinófilos. Proteína catiónica del eosinófilo. Óxido nítrico. Monóxido de carbono. Peróxido de hidrógeno. Leucotrienos. Isoprostanos. Malonildialdehído. Nitritos. Citocinas.

INTRODUCCIÓN

El asma es primariamente una enfermedad inflamatoria de las vías aéreas, lo que ha estimulado la búsqueda de marcadores de la inflamación que puedan reflejar la alteración de las vías aéreas y contribuir a mejorar el tratamiento de la enfermedad¹. En la patogénesis del asma participan numerosas células que segregan una gran variedad de productos, y se han estudiado muchos de ellos como posibles marcadores de la inflamación. La importancia de cada uno como marcador dependerá del papel de la célula y/o del mediador en la cascada inflamatoria, su relación con

la situación clínica de los pacientes y la facilidad de su determinación².

En el asma, la biopsia bronquial realizada mediante fibrobroncoscopia constituye el "patrón estándar" para valorar la inflamación de la pared de las vías aéreas, pero, al ser un procedimiento agresivo, no es adecuada para su utilización en la práctica clínica habitual, especialmente en los niños, y no se puede repetir con facilidad³. Por ello, es deseable disponer de parámetros obtenidos mediante técnicas no invasoras cuya determinación guarde una buena correlación con los marcadores evaluados en la luz o en la pared bronquial⁴. Se han estudiado marcadores en diversos fluidos biológicos: sangre periférica y orina, esputo, aire espirado y condensado del aire espirado. Estos marcadores deberían cumplir de forma ideal las siguientes condiciones²:

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

A continuación se revisan los principales marcadores en los diversos fluidos biológicos, centrandolo la revisión en los de mayor relevancia clínica y/o fisiopatológica.

MARCADORES EN SANGRE PERIFÉRICA Y ORINA

Proteínas derivadas del eosinófilo

En el asma se detecta un aumento de eosinófilos en la sangre, en el esputo y en la mucosa respiratoria, y parece que éstos desempeñan un papel fundamental en la inflamación asmática⁵. Los eosinófilos son células secretoras y producen 4 sustancias principales: peroxidasa del eosinófilo (PEo), proteína catiónica eosinofílica (PCE), proteína X o neurotoxina derivada del eosinófilo (PEX) y proteína básica. Además segregan otros mediadores no preformados, tales como radicales libres de oxígeno, prostaglandinas, leucotrienos y factor activador plaquetario.

Dada la importante participación de estas células en el asma, la monitorización de su presencia y su actividad en los pacientes asmáticos ha generado un gran interés. Un enfoque ha sido la medida del número de eosinófilos en sangre y en esputo. Otro enfoque es la medida de algunos de los productos secretados durante su activación. Teóricamente este enfoque es más atractivo, ya que la mera enumeración de las células no proporciona información de su grado de activación y es razonable creer que es éste el que puede estar ligado al desarrollo del asma⁵.

Se ha sugerido que el estudio de las concentraciones séricas de PCE y otros marcadores de los eosinófilos tiene varias posibles utilidades en el asma infantil: predicción del desarrollo futuro de asma, predicción de evolución a asma en un niño con los primeros síntomas, evaluación del tipo de asma, indicación y monitorización del tratamiento antiinflamatorio y evaluación de la gravedad del asma⁶. Sin embargo, los estudios de estos marcadores tienen el inconveniente de que son determinaciones caras y que precisan de una manipulación muy estricta de las muestras, y sus resultados no han sido del todo concluyentes en el asma.

En varios trabajos se ha confirmado que el número de eosinófilos en sangre y la concentración de PCE y PEo séricas y de PEX en suero y orina son mayores en los pacientes asmáticos que en los pacientes sanos, aunque existe una amplia superposición de valores entre ambos grupos⁷⁻¹⁰ y ninguno de estos marcadores es capaz de confirmar o excluir por sí solo el asma con suficiente sensibilidad o especificidad. Además estos marcadores no son de valor adicional, respecto a los eosinófilos, en discriminar niños con o sin asma, y no hay diferencias en los pacientes con asma extrínseca e intrínseca⁸. En algunos trabajos los valores de estos marcadores varían en relación con la gravedad del asma⁸, pero en otros trabajos estos datos no se confirman¹⁰. Igualmente, en algunos trabajos estos marcadores disminuyen con el tratamiento antiinfla-

matorio, mientras que en otros sus valores no se modifican^{11,12}. En otras enfermedades alérgicas, tales como la dermatitis atópica y la rinoconjuntivitis alérgica, también aumenta la concentración de PCE y PEX, lo que limita su utilidad en el diagnóstico de asma⁹.

Otro punto de interés de estos marcadores es su posible utilidad como predictores del desarrollo futuro de asma. En este sentido, los niños con episodios de sibilancias que a los 2 años de edad tienen valores de PCE $\geq 20 \mu\text{g/l}$ tienen una mayor probabilidad de continuar con episodios de sibilancias a los 5 años de edad (riesgo relativo = 2,9; intervalo de confianza del 95 %, 1,4-5,8)¹⁴. Asimismo, los lactantes con un episodio de bronquiolitis en el curso del cual tenían una PCE sérica $\geq 16 \mu\text{g/l}$ tuvieron más episodios de sibilancias y más ingresos hospitalarios por bronquitis que los que tenían valores $< 16 \mu\text{g/ml}$, que es un marcador específico, pero poco sensible¹⁴. De hecho, presentaron episodios posteriores de sibilancias el 86 % de los niños con valores de PCE $\geq 16 \mu\text{g/l}$, el 76 % de los que tuvieron valores $\geq 8 \mu\text{g/l}$ y el 40 % de los que tuvieron valores $< 8 \mu\text{g/l}$. En cambio, en otro estudio, las concentraciones de PCE en un primer episodio de bronquiolitis no fueron predictoras del desarrollo posterior de asma¹⁵.

ESPUTO INDUCIDO

El examen del esputo proporciona un método directo de estudiar de forma no invasora la inflamación de las vías aéreas. Ya en el siglo XIX se apreció la utilidad de la apariencia microscópica del esputo en el diagnóstico del asma, y se describió en estos pacientes las espirales de Curschmann y los cristales de Charcot-Leyden asociados a eosinofilia. La demostración de la presencia de inflamación de la mucosa de las vías aéreas en los pacientes asmáticos¹⁶ ha estimulado el interés por el estudio del esputo como un medio de valorar de forma no invasora la inflamación bronquial¹⁷.

En 1992 se publicó el primer estudio de inducción del esputo en niños con asma, gracias a la utilización de suero salino hipertónico nebulizado ultrasónicamente para facilitar la producción del esputo¹⁸. Se han desarrollado también mejoras técnicas en el procesamiento del esputo con el empleo de ditioneitol, un reactivo que rompe los puentes disulfuro entre las fibras de glucoproteínas que mantienen el esputo en su forma de gel, lo que facilita la dispersión celular y hace más fácil y reproducible el recuento celular.

La administración de suero salino hipertónico constituye un estímulo broncoconstrictor, por lo que se deben realizar mediciones repetidas de la función pulmonar y se tiene que hacer inhalar previamente

salbutamol para prevenir el broncoespasmo, a menos que se pretenda realizar de forma conjunta una prueba de broncoprovocación, midiendo en la misma prueba la hiperrespuesta bronquial y la inflamación de las vías aéreas^{19,20}. La tasa de éxitos en la inducción del esputo en niños oscila entre el 60 y el 100%, y si se realiza el test de broncoprovocación es menor que si se administra previamente salbutamol. El tratamiento previo con agonistas β_2 -adrenérgicos no altera el recuento celular¹⁹.

Se utilizan de forma sucesiva nebulizaciones de suero salino al 3, 4 y 5%¹⁷, o bien de suero salino al 3,5²¹ o 4,5%²² durante tiempos crecientes. Es preferible la utilización de nebulizadores ultrasónicos de bajo flujo (0,9 ml/min), ya que el uso de nebulizadores de alto flujo, aunque consigue un mayor porcentaje de éxitos en la inducción del esputo, puede provocar un mayor porcentaje de broncoconstricción. Utilizando la técnica de bajo flujo, el descenso medio del FEV₁ en pacientes adultos y niños con asma leve fue del 5,3%¹⁸. Aunque ocasionalmente es necesario el empleo de dosis adicionales de salbutamol por descensos del FEV₁ superiores al 20%, la técnica de inducir el esputo se ha realizado de forma segura en niños tanto con asma leve-moderada²³ como en niños que acuden a la unidad de urgencias con una crisis de asma aguda²⁴. En este último caso se ha realizado una modificación de la técnica utilizando suero salino fisiológico en lugar de suero salino hipertónico, con lo que se produjeron caídas del FEV₁ sólo entre el 0 y el 8%²⁴.

El mecanismo de inducción del esputo por la inhalación de suero salino hipertónico no está claro. Parece que el suero salino induciría un aumento del flujo de agua a las vías aéreas y liberaría o incrementaría el volumen de las secreciones, facilitando su expectoración¹⁸. Además, se estimularían los receptores de la tos y quizás se aumentaría el aclaramiento mucociliar²⁵.

El esputo es una mezcla variable de secreciones traqueobronquiales, saliva y suero salino hipertónico. Se han descrito 2 técnicas básicas para procesarlo: la primera consiste en seleccionar todas las porciones viscosas de la muestra expectorada¹⁸ y la segunda, en procesar toda la muestra, que contiene esputo más saliva²⁶. Con ambas técnicas se han obtenido resultados válidos y reproducibles, tanto de la composición de la fracción celular como de la fracción soluble del esputo inducido²⁷, aunque la mayoría de los estudios en niños han utilizado la primera técnica.

El estudio de más utilidad en el esputo es el recuento celular y, fundamentalmente, del porcentaje de eosinófilos. La célula dominante en el esputo de

niños normales es el macrófago, y el límite superior normal del porcentaje de eosinófilos es el 2,5%. La presencia de eosinófilos en el esputo se correlaciona con el porcentaje de éstos en el aspirado bronquial y en el lavado broncoalveolar²⁸. El esputo es una muestra de la luz bronquial y, a medida que el tiempo de inducción es mayor, constituye un reflejo progresivo desde las vías aéreas centrales hasta las periféricas. Por eso el porcentaje de eosinófilos en el esputo se correlaciona mejor con el lavado bronquial o el aspirado bronquial que con el número de eosinófilos en la biopsia bronquial. Se ha estudiado también un conjunto muy amplio de marcadores solubles en el sobrenadante del esputo de pacientes asmáticos: citocinas, mediadores derivados del eosinófilo, neutrófilo y mastocito, moléculas de adhesión, derivados del óxido nítrico, etc.²⁷.

El hecho de tratarse de una técnica relativamente no invasora y que se puede repetir de una manera secuencial ha permitido avanzar en los conocimientos sobre la reacción inflamatoria que ocurre en el asma, incluyendo lo que ocurre en los niños. Así, los niños con asma estable presentan un aumento de eosinófilos (mediana, 4,3%) y de células epiteliales (mediana, 14%) comparado con los niños normales (medianas, 0,3 y 1,5%), lo que demuestra que los niños con asma presentan una inflamación eosinofílica y daño epitelial²². Además, en este trabajo la inflamación se observaba incluso en los niños que recibiendo glucocorticoides inhalados (GCI), tenían una función pulmonar normal y un buen control sintomático de su enfermedad²².

En niños con crisis agudas de asma se observa un aumento importante del porcentaje de eosinófilos²⁴.

El grado de eosinofilia en el esputo se correlaciona con la gravedad del asma crónica en los niños, de forma que los niños con asma persistente presentan un porcentaje más elevado de eosinófilos que los niños con asma episódica frecuente, y éstos a su vez más elevado que los niños con asma episódica infrecuente²⁹. De esta forma, parece que el patrón clínico del asma se relaciona con el grado de inflamación de la vía aérea, lo que apoya el empleo de la valoración clínica de la frecuencia de episodios de sibilantes en los últimos 12 meses para determinar los requerimientos de tratamiento antiinflamatorio.

En pacientes adultos con asma corticoddependiente, al reducir la dosis de glucocorticoides orales (GCO) se produce un aumento de los eosinófilos en esputo que precede en 4 semanas al aumento de los eosinófilos en sangre y en 6 semanas a la exacerbación con el empeoramiento de los síntomas y el FEV₁. La exacerbación clínica se acompaña también de aumento de PCE en el esputo³⁰.

El tratamiento con GCI disminuye el porcentaje de eosinófilos en el esputo. Un aspecto interesante de la respuesta del porcentaje de eosinófilos al tratamiento con GCI es la existencia de una curva dosis-respuesta en todos los intervalos de dosis desde 100 a 1.600 $\mu\text{g}/\text{día}$, mientras que con el óxido nítrico se observa una meseta a partir de 400 $\mu\text{g}/\text{día}$ ³¹.

El estudio de la celularidad predominante en los pacientes asmáticos parece indicar la existencia de 2 patrones diferentes de inflamación: uno, en el que predominan los eosinófilos, y otro, en el que predominan los neutrófilos. Este hecho, que se describió inicialmente en las crisis agudas de asma, parece observarse también en los pacientes con asma persistente tratados con corticoides³². Se ha sugerido que estos datos podrían tener importancia terapéutica, ya que la eosinofilia en el esputo podría indicar una respuesta favorable a los corticoides.

Otra utilidad de los marcadores en el esputo inducido es su ayuda en el diagnóstico de asma, para lo que tienen una fiabilidad mayor que los marcadores séricos: los pacientes con asma en comparación con el grupo control tienen un mayor porcentaje de eosinófilos en esputo, eosinófilos en sangre, y niveles mayores de PCE en esputo. El área bajo la curva ROC muestra que los eosinófilos en esputo (0,9) son significativamente mejores marcadores que los eosinófilos en sangre (0,72) y que la PCE sérica (0,67)³³.

El estudio del esputo inducido ofrece unas perspectivas prometedoras en el manejo del asma. El procedimiento para la obtención de un esputo puede ser relativamente rápido, y con frecuencia precisa menos de 10-15 min. Sin embargo, se necesitan al menos 60-90 min adicionales para procesarlo y realizar el recuento diferencial celular. Además, el número de pacientes que se puede estudiar en paralelo es limitado, ya que el esputo necesita procesarse antes de 2 h de su extracción. Por lo tanto, se trata de un método costoso y que requiere tiempo, razón por la que hasta ahora se ha utilizado fundamentalmente en investigación, y menos en la práctica clínica.

MARCADORES EN EL AIRE ESPIRADO

Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es el marcador más estudiado en el aire espirado. El NO es un gas que está presente en el aire exhalado y que puede medirse mediante quimioluminiscencia. Esta técnica se basa en la reacción del NO con el ozono, que genera NO_2 , el cual, al estabilizarse, emite una radiación lumínica proporcional a la concentración de NO en el aire espirado. En los últimos años se ha estandarizado la me-

didada del NO, tanto en adultos como en niños³⁴⁻³⁶, lo que hace que la técnica sea más fiable.

El NO se forma de manera continua en las vías aéreas. Durante la espiración se mezcla el NO producido por los alvéolos con el NO generado en las vías aéreas de conducción. Por este motivo, las concentraciones de NO en el aire exhalado son dependientes del flujo. Hay que tener en cuenta que en las vías aéreas superiores se produce una gran cantidad de NO, y se observa la máxima concentración en la mucosa de los senos paranasales, unas 3.000 ppb (partes por billón), en contraste con las determinaciones en las vías aéreas distales mediante broncoscopia, que corresponden a alrededor de 5 ppb. Por tanto, para medir el NO procedente de las vías aéreas inferiores en el aire exhalado, es necesario evitar la contaminación del aire procedente de las vías aéreas superiores. Para ello se realiza una exhalación lenta contra una resistencia fija, con lo que se consigue el cierre del paladar blando.

Hay 2 métodos de medir el NO. En el método *on-line* el gas exhalado se recoge a un flujo fijo a través de una conexión lateral del circuito espiratorio. En el método *off-line* el aire exhalado se recoge en una bolsa inerte para el NO y se analiza con posterioridad.

El NO tiene numerosos efectos en las vías aéreas y se produce en cantidades elevadas en el asma. El NO se forma a partir del aminoácido L-arginina a través de la enzima NO sintetasa. Existen 3 formas de esta enzima, 2 constitucionales (la NO sintetasa neuronal [nNOS] y la NO sintetasa endotelial [eNOS]) y una forma inducible (iNOS), que no se expresa en condiciones normales y se induce por las citocinas inflamatorias y por las endotoxinas. Las formas constitucionales están relacionadas con la regulación fisiológica de la función de la vía aérea (vasodilatación, broncodilatación leve, regulación del aclaramiento mucociliar), mientras que la forma inducible participa en las enfermedades inflamatorias de las vías aéreas y en la defensa contra las infecciones. La forma inducible se inhibe por la acción de los corticoides, pero no las formas constitucionales.

La medición del NO en el aire exhalado³⁷ ha abierto la posibilidad de su utilización como un marcador no invasor de la inflamación asmática, y cumple varios de los requisitos para ser un marcador ideal: es fácil de medir, puede considerarse una muestra directa de las vías aéreas inferiores, es posible realizar medidas repetidas, está aumentado en el asma bronquial y disminuye con el tratamiento antiinflamatorio.

La concentración de NO exhalado en niños sanos es independiente de la edad y del sexo³⁸. En nuestro

grupo, tras determinar la concentración normal de NO exhalado en un grupo de 37 niños sanos, hemos obtenido un valor medio de 3,1 ppb, con un rango de 1 a 6 ppb³⁹.

Varios estudios han mostrado una elevación de los valores de NO en pacientes adultos y en niños con asma. El aumento de NO tiene su origen predominantemente en las vías aéreas inferiores y se debe sobre todo a la activación de la iNOS. Mediante estudios inmunohistoquímicos se ha comprobado un aumento de la iNOS en las vías aéreas de los pacientes asmáticos localizado preferentemente en las células epiteliales⁴⁰, pero también en células inflamatorias como los macrófagos y los eosinófilos. También puede haber una pequeña contribución de la NOS neuronal, ya que los polimorfismos del gen *NOS1* se correlacionan con el nivel de NO exhalado⁴¹.

La exposición a estímulos proinflamatorios produce un aumento del NO exhalado. Tras una prueba de provocación bronquial específica con alérgenos, en la fase precoz broncoconstrictora no se modifica el NO, pero sí aumenta de forma progresiva durante la fase tardía, lo que puede ser un reflejo de la expresión de iNOS en respuesta a las citocinas inflamatorias⁴². Los niveles de NO aumentan también con la exposición natural a alérgenos inhalados durante la estación polínica o a alérgenos de interior^{43,44}.

En niños con asma se ha comprobado que los valores de NO exhalado se correlacionan significativamente con la hiperrespuesta bronquial a la metacolina, respuesta a broncodilatadores, síntomas clínicos y concentraciones séricas de IgE y proteína catiónica del eosinófilo⁴⁵. También los valores de NO exhalado muestran una buena correlación en niños con asma con el porcentaje de eosinófilos y los valores de proteína catiónica del eosinófilo en el lavado broncoalveolar⁴⁶.

La medición del NO exhalado puede tener las siguientes utilidades: ayuda en el diagnóstico del asma, monitorización de la enfermedad y del tratamiento, y valoración de los lactantes y preescolares con siblantes.

Ayuda en el diagnóstico del asma

Recientemente se han publicado datos que muestran que la determinación de NO exhalado puede ser de ayuda en el diagnóstico del asma:

– En pacientes adultos, un punto de corte de NO exhalado de 16 ppb mostró una especificidad elevada para el diagnóstico del asma (90%) pero una baja sensibilidad (69%), y con un punto de corte de 13 ppb se obtuvo una especificidad del 85% y una sensibilidad del 80%⁴⁷.

– En un grupo de niños preescolares (edad, 3,8-7,5 años), con un punto de corte de 9,7 ppb la sensibilidad del NO exhalado para el diagnóstico del asma fue de 86% y la especificidad, del 92% para discriminar niños con asma de controles sanos⁴⁸.

Monitorización de la enfermedad

Los valores de NO exhalado son de utilidad para controlar el efecto del tratamiento antiinflamatorio y la aparición de exacerbaciones. En pacientes en los que se disminuye la dosis de GCI, los valores de NO pueden aumentar antes de que ocurran cambios en otros parámetros, tales como la función pulmonar o el número de eosinófilos en el esputo, y por lo tanto pueden servir como un aviso precoz de una pérdida de control del asma⁴⁹.

Monitorización del tratamiento

Los valores de NO exhalado no se afectan por la administración de agonistas β_2 -adrenérgicos de acción corta ni prolongada, lo que concuerda con la idea de que estos agentes no tienen influencia sobre la inflamación crónica del asma³. El tratamiento con nedocromilo tampoco disminuye los valores de NO exhalado⁴⁵.

El montelukast disminuye en un 15-30% los valores de NO exhalado en niños con asma⁵⁰.

Los valores de NO son muy sensibles al tratamiento con glucocorticoides. Pueden disminuir de forma significativa incluso 6 h después del tratamiento con un corticoide nebulizado, y 2-3 días después del uso de GCI, obteniéndose un efecto máximo después de 2-4 semanas de tratamiento⁴⁹. En nuestra experiencia, en un grupo de niños con asma leve intermitente sin tratamiento antiinflamatorio de base, asintomáticos y con la función pulmonar normal, encontramos en un porcentaje importante de ellos una concentración de NO exhalado elevada, lo que parecería indicar la existencia de inflamación asmática en su vía aérea. La administración de budesonida inhalada consiguió normalizar los valores en 2 semanas. También en un grupo de niños con asma moderada persistente en tratamiento con budesonida inhalada, en fase estable, asintomáticos y con una función pulmonar normal, el 60% de ellos tenían una concentración de NO exhalado superior a la normal. Tras doblar la dosis de budesonida se normalizaron igualmente los valores en 2 semanas⁵¹. Otros autores han encontrado igualmente un aumento de los valores de NO exhalado en los pacientes asmáticos sin tratamiento corticoide, pero valores similares a los del grupo control en los que tomaban glucocorticoides⁵².

Al interrumpir el tratamiento con GCI, incluso en pacientes que los han tomado hasta 4 años, se pro-

duce un aumento de los valores de NO exhalado⁴⁵. Esto parece indicar que los GCI no producen un efecto inhibitorio sostenido sobre la producción de NO. También sugiere que la monitorización de los valores de NO exhalado en los pacientes que toman GCI puede servir como parámetro de valoración del cumplimiento del tratamiento.

En la crisis aguda de asma se produce un aumento del NO exhalado, que disminuye con el tratamiento con GCO, hasta su normalización o, en casos de niños con asma más grave, hasta los valores propios del asma leve-moderada⁵³⁻⁵⁵.

La monitorización del NO puede ser útil en pacientes que toman tratamiento combinado con agonistas β_2 y GCI, para asegurar que la inflamación está controlada, ya que puede ser difícil valorarla por la evolución de los síntomas, al estar usando un agonista β_2 de acción prolongada³.

No obstante, se ha visto que mientras que con el empleo de GCI en dosis bajas se puede conseguir un control de los síntomas del asma y una disminución de los valores de NO exhalado, la disminución de los eosinófilos en esputo, con un control similar de los síntomas, puede necesitar dosis mayores de GCI, lo que sugiere que los valores de NO pueden ser demasiado sensibles al tratamiento con corticoides para determinar que la inflamación está totalmente controlada⁴⁹.

Algunos pacientes adultos, con asma moderada o grave persistente de difícil control, en tratamiento con dosis altas de GCI o con corticoides orales, continúan presentando valores altos de NO, aunque menores que los asmáticos que no reciben glucocorticoides⁵⁶. La identificación de pacientes en los que los valores de NO exhalado permanecen elevados, a pesar del tratamiento con dosis altas de GCI, puede representar una resistencia o insensibilidad a los glucocorticoides y sugiere la persistencia de inflamación pulmonar⁵⁶. En un grupo de niños con asma de difícil control con síntomas persistentes a pesar de la utilización de dosis elevadas de GCI, se realizó tratamiento con GCO durante 2 semanas, y se observó también la existencia de 2 grupos diferentes de pacientes: uno con valores elevados de NO, en la mayoría incluso tras el tratamiento con prednisona, y otro con valores normales de NO, antes y después del tratamiento con prednisona oral. En ambos subgrupos hubo niños en los que persistían los síntomas. Estos resultados parecen indicar que puede haber diferentes patrones de niños con asma de difícil control y pueden orientar la utilización de tratamientos alternativos a los glucocorticoides.

No está claro si los valores de NO son útiles para indicar un cambio de tratamiento en los pacientes con

asma. Datos recientes indican que un valor de NO superior a 13 ppb puede tener una sensibilidad de 0,67 y una especificidad de 0,65 para predecir un aumento en la escala de tratamiento⁵⁷.

Una de las limitaciones del empleo del NO exhalado como control de los pacientes asmáticos es la falta de una curva dosis-respuesta adecuada con el empleo de GCI, de forma que algunos autores han observado un *plateau* en la respuesta del NO con 400 μg de budesonida³¹. Según estos autores, en pacientes tratados con dosis moderadas o altas de GCI existirían pocas diferencias en los valores de NO, en contraste con diferencias más importantes desde el punto de vista clínico en cuanto a la gravedad del asma. Parece pues que el NO exhalado no refleja todos los cambios inflamatorios que se producen en los pacientes asmáticos. Otras limitaciones del NO exhalado en la monitorización de los pacientes asmáticos son⁵⁸: los valores de NO en los pacientes con asma no alérgico no están aumentados, la producción de NO puede aumentar transitoriamente en respuesta a infecciones víricas, por lo que no se debe determinar el NO inmediatamente tras una infección vírica, y finalmente existe una superposición de valores entre los controles normales y los pacientes asmáticos, y los asmáticos pueden tener valores desde normales a muy elevados.

Lactantes y preescolares con sibilantes

Recientemente se ha descrito también la medición del NO exhalado en niños de entre 3 y 24 meses de edad, durante la realización de estudios de función pulmonar con la técnica de la espiración forzada con presión positiva. Los lactantes con episodios de sibilancias y los que tenían una historia familiar de atopia presentaron valores más elevados que los lactantes normales⁵⁹. Se han puesto a punto también métodos para la determinación del NO exhalado recogiendo el aire de la respiración a volumen corriente de niños pequeños^{35,36}. Utilizando esta metodología, Baraldi et al⁵⁵ encontraron en niños con bronquitis de repetición un aumento del NO exhalado en las fases de agudización, y Avital et al⁶⁰, un aumento del NO en niños entre 2 y 7 años con asma bronquial en fase estable.

La importancia de estos estudios es la posibilidad de que pueda haber diferencias entre los lactantes con sibilancias debidas a infecciones virales en los que el NO exhalado no estaría elevado, y aquellos con sibilantes recurrentes en los que estaría elevado y disminuiría con el tratamiento con glucocorticoides⁶¹.

El NO constituye uno de los marcadores de más interés actualmente para el manejo de los pacientes asmáticos, tanto por su interés clínico como por la faci-

lidad e inmediatez de su medición. Como inconvenientes cabe destacar el elevado precio de los aparatos de medición y su poca facilidad de transporte.

Monóxido de carbono

El monóxido de carbono (CO) es un gas que produce el organismo y se puede detectar también en el aire exhalado. Hay 3 fuentes principales del CO en el aire exhalado: degradación enzimática del hem, liberación no relacionada con el hem (peroxidación lipídica, xenobióticos, bacterias) y CO exógeno.

Alrededor del 85% del CO endógeno procede de la degradación del hem por la hem oxigenasa. Existen 2 formas de hem oxigenasa: una forma constitucional (HO-2) y una forma inducible (HO-1) de distribución ubicua que se activa por citocinas proinflamatorias, NO, peróxido de hidrógeno, endotoxinas y oxidantes. La hem oxigenasa forma parte de los mecanismos protectores contra el estrés oxidativo.

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

En el aire exhalado de los pacientes asmáticos se encuentran valores elevados de CO, que reflejarían el grado de inducción de la HO-1, con valores normales en pacientes tratados con GCI^{62,63}. También se han encontrado valores elevados de CO en pacientes con asma grave, incluidos pacientes tratados con corticoides orales⁶⁴. Sin embargo, la diferencia entre los valores de CO exhalado entre los pacientes asmáticos y los sanos es menor que para el NO, y existe una mayor superposición de valores⁶⁵.

Tras realizar una prueba de provocación específica con alérgenos, el CO aumenta tanto en la fase precoz, posiblemente por la activación de la HO-1 por prostaglandinas liberadas por los mastocitos, como en la tardía por la activación por citocinas⁶⁶. El CO no aumenta con la broncoconstricción inducida por la histamina, lo que indica que la broncoconstricción *per se* no influye en los valores de CO y, por tanto, la elevación que se observa durante la provocación alérgica estaría más relacionada con la inflamación y el estrés oxidativo que con los cambios en el calibre de las vías aéreas.

En un estudio realizado en niños, los valores de CO fueron más elevados en los niños con asma persistente que en los niños sanos y los niños con asma episódica ocasional. Los valores en estos 2 últimos grupos no fueron significativamente diferentes⁶⁵. El NO exhalado se comportó de forma diferente, ya que estuvo elevado respecto a los controles sanos tanto en

el grupo de niños con asma persistente como en el grupo con asma episódica ocasional, y no fue diferente entre los 2 grupos de pacientes asmáticos, lo que sugiere que la medida del NO puede no distinguir entre niños asmáticos con distinto nivel de gravedad. La medida del CO podría ofrecer, por tanto, datos complementarios a los obtenidos con el NO.

En este estudio también se apreció un inconveniente de la determinación de CO exhalado, al aumentar los valores de forma importante en las infecciones respiratorias de vías altas, aunque los valores se normalizan en el período de recuperación⁶⁵.

Parece, por tanto, que la medida del CO puede ser otra forma de controlar la inflamación mediada por citocinas y oxidantes y de valorar los tratamientos antiinflamatorios.

CONDENSADO DEL AIRE ESPIRADO

Otro enfoque para analizar los mediadores de la inflamación en el asma es la medición de mediadores no volátiles en el condensado del aire espirado. El gas subglótico está saturado con agua. El condensado del vapor de agua del aire espirado se consigue enfriándolo. Se trata de un procedimiento nada invasor y que no está influido por el calibre de las vías aéreas. El procedimiento es muy bien tolerado, incluso por pacientes con obstrucción grave de la vía aérea y por niños. Para recoger el condensado se hace respirar al paciente a través de una válvula que separa el aire inspirado del espirado. El aire espirado se hace circular por un condensador que se enfría a 0 °C con hielo o a -20 °C mediante un circuito refrigerado, lo que hace que se condense y pueda ser recogido. En general, se tarda unos 10-15 min en obtener 1-3 ml de condensado³. Es importante evitar la contaminación con saliva y controlarla mediante la determinación de la concentración de amilasa en el condensado.

En el condensado se encuentran moléculas y sustancias derivadas de la cavidad oral, de la orofaringe, del árbol traqueobronquial y de los alvéolos. La contribución proporcional de cada uno de estos orígenes no se conoce todavía. Se asume que a partir del líquido superficial de las vías aéreas se origina un aerosol con el flujo turbulento de aire, de forma que el contenido del condensado refleja la composición del líquido superficial de las vías aéreas³. Dado que hay una buena correlación entre los valores de CO₂ y O₂ en el líquido condensado y en el aire espirado⁶⁷, es posible que las partículas de aerosol espiradas en la respiración reflejen la composición del líquido de recubrimiento extracelular broncoalveolar.

Mediante este procedimiento en pacientes asmáticos se han encontrado concentraciones elevadas de

peróxido de hidrógeno, prostanoideos (isoprostanos y leucotrienos), productos de la peroxidación lipídica y nitritos y nitratos.

Peróxido de hidrógeno

Las células inflamatorias activadas en el asma, especialmente los eosinófilos, liberan varias especies reactivas de oxígeno, entre las que se encuentran el anión superóxido (O_2^-), y especies derivadas del nitrógeno, como el NO. Ambos se combinan entre sí para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) que es altamente reactivo y puede lesionar el epitelio de las vías aéreas. El O_2 se metaboliza rápidamente para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que difunde a través del revestimiento líquido de la vía aérea y puede evaporarse en el aire exhalado. La medida del H_2O_2 en el líquido condensado del aire espirado puede ser usada de esta forma como un marcador no invasor de estrés oxidativo en el asma bronquial^{68,69}.

En el trabajo de Horvath et al⁷⁰, el 70% de pacientes asmáticos no tratados con esteroides presentaban un aumento del H_2O_2 , mientras que prácticamente todos ellos presentaban un aumento de NO exhalado. De acuerdo con estos datos, la medida del NO es una técnica más sensible en el diagnóstico del asma que el H_2O_2 , y no todos los pacientes tienen estrés oxidativo. En el mismo estudio, los pacientes asmáticos tratados con esteroides que se encontraban estables presentaban un valor normal tanto del NO como del H_2O_2 . En cambio, los pacientes asmáticos tratados con corticoides que se encontraban inestables presentaban un valor normal de NO, pero un aumento del H_2O_2 que reflejaba una persistencia de estrés oxidativo e inflamación no detectable con el NO. Esto sugiere que el H_2O_2 podría ser útil en la monitorización del control de la inflamación asmática en conjunción con el NO.

Prostanoideos

Los prostanoideos son potentes mediadores de la inflamación, entre los que se encuentran las prostaglandinas, los leucotrienos y los isoprostanos. Mediante el estudio del condensado del aire espirado se están obteniendo datos más precisos de su posible papel en el asma:

- Las prostaglandinas PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ no están aumentadas de forma significativa en el asma³.

- Los cisteinil-leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 y LTE_4) se producen fundamentalmente por los mastocitos y los eosinófilos, y dan lugar a broncoconstricción, aumento de la permeabilidad vascular e hipersecreción mucosa. El leucotrieno B_4 (LTB_4) es un potente recluta-

dor de los neutrófilos. Se ha encontrado que los valores tanto de cisteinil leucotrienos como de LTB_4 están aumentados en niños con asma leve persistente y moderada y grave persistente, con valores más elevados en las categorías más graves. Todos estos niños recibían tratamiento con GCI, pero no con antagonistas de los leucotrienos. Los valores en los pacientes con asma leve intermitente no fueron diferentes de los encontrados en el grupo de control. En estos mismos pacientes los valores de NO exhalado aumentaron respecto al grupo de control, en todos los grupos de niños con asma⁷¹.

En pacientes adultos con asma moderada en los que empeora su sintomatología al retirar los GCI, se observa un incremento adicional de los valores de cisteinil leucotrienos en el condensado del aire espirado⁷².

- Los isoprostanos son un tipo de prostanoideos formados por la peroxidación lipídica del ácido araquidónico. Circulan en el plasma, se eliminan en la orina y se pueden detectar en el condensado del aire espirado. En el asma, los valores de 8-isoprostano se elevan al doble en los pacientes con asma leve, y al triple en los pacientes con asma grave, independientemente del tratamiento con corticoides⁷³. La falta relativa de efecto de los corticoides sobre el 8-isoprostano sugiere que los GCI pueden no ser muy efectivos para disminuir el estrés oxidativo.

Productos de la peroxidación lipídica

Se ha comprobado que en niños con una crisis aguda de asma los valores de malonildialdehído, un producto de la peroxidación lipídica, se elevan, y los valores de glutatión reducido (GSH) disminuyen, y ambos se normalizan con el tratamiento con corticoides sistémicos⁷⁴. Estos datos contribuyen también a apoyar el papel del estrés oxidativo en la fisiopatología del asma. La producción de malonildialdehído puede representar un aumento de la rotura de membranas y de la formación de ácido araquidónico para sintetizar leucotrienos y otros mediadores inflamatorios.

Productos relacionados con el óxido nítrico

El NO reacciona con el superóxido para formar peroxinitritos, los cuales pueden unirse a moléculas que contienen tioles tales como la cisteína y el glutatión para formar S-nitrosotioles o pueden oxidarse a nitratos y nitritos. Los peroxinitritos también reaccionan con varias moléculas y originan modificaciones covalentes. El resultado de una de estas modificaciones es la 3-nitrotirosina, un producto estable de la descomposición de los peroxinitritos, que se utiliza como un

marcador para identificar el efecto de los oxidantes derivados del NO en diversas enfermedades³.

En el condensado del aire espirado se han encontrado valores elevados de nitritos en pacientes asmáticos, sobre todo en las exacerbaciones agudas⁷⁵, aumento de la 3-nitrotirosina que disminuye con el tratamiento con corticoides y que aumenta con la retirada de éstos, coincidiendo con la aparición de sintomatología, lo que sugiere que puede ser un predictor del deterioro en el asma y que puede desempeñar un papel en el remodelamiento de las vías aéreas⁷². Los valores de S-nitrosotioles disminuyen con el tratamiento con GCI en dosis de 400 µg/día, pero no con dosis bajas de 100 µg/día, en contraste con los de nitritos y nitratos, lo que sugiere que estos últimos son más sensibles al tratamiento antiinflamatorio³.

Citocinas

El análisis del condensado del aire espirado proporciona un medio de profundizar en el conocimiento de la fisiopatología del asma en los niños. En este sentido se ha comprobado que los niños con asma presentan un aumento de la concentración de interleucina 4 (IL-4) y una disminución del interferón-gamma (IFN-γ) en el condensado del aire espirado. Los valores de IFN-γ habían disminuido tanto en los niños tratados como en los no tratados con corticoides, mientras que los de IL-4 habían aumentado en los no tratados con GCI y eran normales en los tratados con 600 µg o más de GCI⁷⁶.

Temperatura del aire espirado

La medición de la temperatura del aire espirado muestra una buena correlación con los valores de NO exhalado en niños con asma bronquial no tratados con glucocorticoides, por lo que podría ser también un marcador de la inflamación asmática⁷⁷.

En resumen, en la actualidad se dispone de un amplio abanico de marcadores no invasores para el control y seguimiento de los pacientes asmáticos y que han demostrado su utilidad en trabajos de investigación; los más útiles son los eosinófilos en esputo y el NO exhalado. Además, se están definiendo las diferencias en su comportamiento, que hacen que su utilidad pueda ser complementaria. Así, en el asma existe un aumento importante del NO, un aumento modesto del CO y un aumento moderado del 8-isoprostano. El NO exhalado es sensible a la inhibición por dosis bajas de GCI, mientras que el CO exhalado y el 8-isoprostano son mucho menos sensibles. En los próximos años habrá que definir la utilidad y la aplicación de estos parámetros en la práctica clínica diaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Holgate ST. Biomarkers of asthma. *Lancet* 1998;351:1300-1.
- Bousquet J, Corrigan CJ, Venge P. Peripheral blood markers: evaluation of inflammation in asthma. *Eur Respir J* 1998;11:42S-8S.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002;7:1-32.
- Cobos Barroso N. Óxido nítrico exhalado: aplicaciones en pediatría. *Arch Bronconeumol* 1998;34:371-3.
- Venge P. Eosinophils. En: Barnes P, Rodger IW, Thomson NC, editors. *Asthma: basic mechanisms and clinical management*. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1998; p. 141-58.
- Villa JR, García G, Boya MJ, Rueda S, Marín M, Nogales A. Proteína catiónica del eosinófilo en el asma infantil. Correlación con la clínica y la función pulmonar. *An Esp Pediatr* 1996;45:479-82.
- Hoekstra MO, Hovenga H, Gerritsen J, Kauffman HF. Eosinophils and eosinophil-derived proteins in children with moderate asthma. *Eur Respir J* 1996;9:2231-5.
- Parra A, Sanz ML, Vila L, Prieto I, Diéguez I, Oehling AK. Eosinophil soluble protein levels, eosinophil peroxidase and eosinophil cationic protein in asthmatic patients. *Invest Allerg Clin Immunol* 1999;9:27-34.
- Remes S, Korppi M, Remes K, Savolainen K, Mononen I, Pekkanen J. Serum eosinophil cationic protein (ECP) and eosinophil protein X (EPX) in childhood asthma: the influence of atopy. *Pediatr Pulmonol* 1998;25:167-74.
- Vanto T, Koskinen P. Serum eosinophil cationic protein in the evaluation of asthma severity in children. *Allergy* 1998;53:415-9.
- Hoekstra MO, Grol MH, Hovenga H, Bouman K, Stijnen T, Koeter GH, et al. Eosinophil and mast cell parameters in children with stable moderate asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 1998;9:143-9.
- Sorva R, Metso T, Turpeinen M, Juntunen-Backman K, Bjorksten F, Haahtela T. Eosinophil cationic protein in induced sputum as a marker of inflammation in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:45-50.
- Villa JR, García G, Rueda S, Nogales A. Serum eosinophilic cationic protein may predict clinical course of wheezing in young children. *Arch Dis Child* 1998;78:448-52.
- Reijonen TM, Korppi M, Kuikka L, Savolainen K, Kleemola M, Mononen I, et al. Serum eosinophil cationic protein as a predictor of wheezing after bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 1997;23:397-403.
- Oymar K, Bjercknes R. Is serum eosinophil cationic protein in bronchiolitis a predictor of asthma? *Pediatr Allergy Immunol* 1998;9:204-7.
- Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW, Twentyman OP, Howarth PH, et al. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:434-57.
- Pavord ID, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997;52:498-501.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25-9.
- Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exha-

- led nitric oxide, and breath condensate. *Eur Respir J* 2000;16:1008-15.
20. Magnussen H, Holz O. Monitoring airway inflammation in asthma by induced sputum. *Eur Respir J* 1999;13:5-7.
 21. Jakatanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacoline responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998;53:91-5.
 22. Cai Y, Carty K, Henry RL, Gibson PG. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J* 1998;11:848-53.
 23. Sorv R, Metso T, Turpeinen M, Juntunen-Backman K, Bjorksten F, Haahtela T. Eosinophil cationic protein in induced sputum as a marker of inflammation in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:45-50.
 24. Twaddell SH, Gibson PG, Carty KL, Woolley KL, Henry RL. Assessment of airway inflammation in children with acute asthma using induced sputum. *Eur Respir J* 1996;9:2104-8.
 25. Daviskas E, Anderson SD, Gonda I, Eberl S, Meikle S, Seale JP, et al. Inhalation of hypertonic saline aerosol enhances mucociliary clearance in asthmatic and healthy subjects. *Eur Respir J* 1996;9:725-32.
 26. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey KA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1126-31.
 27. Kips JC, Peleman RA, Pauwels RA. Methods of examining induced sputum: do differences matter? *Eur Respir J* 1998;11:529-33.
 28. Gootendorst DC, Sont JK, Willems LN, Kluin-Nelemans JC, Van Krieken JH, Veselic-Charvat M, et al. Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy* 1997;27:769-79.
 29. Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* 2003;58:116-21.
 30. Pizzichini MMM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Pavord I, Dolovich J, et al. Prednisone-dependent asthma: inflammatory indices in induced sputum. *Eur Respir J* 1999;13:15-21.
 31. Jakatanon A, Kharitonov S, Lim S, Barnes PJ. Effect of differing doses of inhaled budesonide on markers of airway inflammation in patients with mild asthma. *Thorax* 1999;54:108-14.
 32. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001;119:1329-36.
 33. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Dolovich J, Hargreave FE. Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:539-44.
 34. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. "ERS task force report": exhaled and nasal nitric oxide: recommendations. *Eur Respir J* 1997;10:1683-93.
 35. American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children - 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:2104-17.
 36. Baraldi E, de Jongste JC, Gaston B, Alving K, Barnes PJ, Bisgaard H, et al. Measurement of exhaled nitric oxide in children, 2001. *Eur Respir J* 2002;20:223-37.
 37. Gustaffsson LE, Leone AM, Persson M, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea-pigs and humans. *Byochem Biophys Res Commun* 1991;181:852-7.
 38. Baraldi E, Azzolin NM, Cracco A, Zacchello F. Reference values of exhaled nitric oxide for healthy children 6-15 years old. *Pediatric Pulmonol* 1999;27:54-8.
 39. Reverté C, Gartner S, Cobos N, Moreno A, Liñán S, González M. Óxido nítrico exhalado en niños normales y asmáticos. *An Esp Pediatr* 1998;48(Supl 110):45.
 40. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth PH, Redington A, et al. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993;342:1510-3.
 41. Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A, Silverman EK, Yandava CN, Israel E, et al. Exhaled nitric oxide in patients with asthma. Association with NOS1 genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2043-7.
 42. Paredi P, Leckie MJ, Horvath I, Allegra L, Kharitonov SA, Barnes PJ. Changes in exhaled carbon monoxide and nitric oxide levels following allergen challenge in patients with asthma. *Eur Respir J* 1999;13:48-52.
 43. Baraldi E, Carra S, Dario C, Azzolin N, Ongarro R, Marcer G, et al. Effect of natural grass pollen exposure on exhaled nitric oxide in asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:262-6.
 44. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, Vicentini L, Mazzi P, Susuki Y, et al. Exhaled nitric oxide in asthmatic children exposed to relevant allergens: effect of flunisolide. *Eur Respir J* 2000;15:730-4.
 45. Covar RA, Szeffler SJ, Martin RJ, Sundstrom DA, Silkoff PE, Murphy J, et al. Relations between exhaled nitric oxide and measures of disease activity. *J Pediatr* 2003;142:469-75.
 46. Warke TJ, Fitch PS, Brown V, Taylor R, Lyons JDM, Ennis M, et al. Exhaled nitric oxide correlate with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002;57:383-7.
 47. 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.
 48. Malmberg LP, Pelkonen AS, Haahtela T, Turpeinen M. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. *Thorax* 2003;58:494-9.
 49. Kharitonov SA, Barnes PJ. Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 2000;16:781-92.
 50. Bisgaard H, Loland L, Oj JA. NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene antagonist receptor montelukast. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1227-31.
 51. Gartner S, Reverté C, Cobos N, Moreno A, Liñán S, Pena M. Efecto de la budesonida sobre el óxido nítrico exhalado y la proteína catiónica sérica. *An Esp Pediatr* 1998;48(Supl 110):44.
 52. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne E, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343:133-5.
 53. Baraldi E, Azzolin M, Zanconato S, Dario C, Zacchello F. Corticosteroids decrease exhaled nitric oxide in children with acute asthma. *J Pediatr* 1997;131:381-5.

54. Lanz MJ, Leung DYM, McCormick DR, Harbeck R, Szeffler SJ, White CW. Comparison of exhaled nitric oxide, serum eosinophilic cationic protein, and soluble interleukin-2 receptor in exacerbations of pediatric asthma. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:305-11.
55. Baraldi E, Dario C, Ongaro R, Scollo M, Azzolin NM, Panza N, et al. Exhaled nitric oxide concentration during treatment of wheezing exacerbation in infants and young children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1284-8.
56. Stirling RG, Kharitonov SA, Campbell D, Robinson DS, Durham SR, Chung KF, 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. *Thorax* 1998;53:1030-4.
57. Griese M, Koch M, Latzin P, Beck J. Asthma severity, recommended changes of inhaled therapy and exhaled nitric oxide in children: a prospective, blinded trial. *Eur J Med Res* 2000;5:334-40.
58. Lierl MB. Exhaled nitric oxide: a useful aide in pediatric asthma management? *J Pediatr* 2003;142:461-2.
59. Wildhaber JH, Hall GL, Stick SM. Measurement of exhaled nitric oxide with the single-breath technique and positive expiratory pressure in infants. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:74-8.
60. Avital A, Uwytyed K, Berkman N, Godfrey S, Bar-Yishay E, Springer C. Exhaled nitric oxide and asthma in young children. *Pediatr Pulmonol* 2001;164:86-91.
61. Godfrey S. Ups and downs of nitric oxide in chesty children. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:438-9.
62. Zayasu K, Sekizawa K, Okinaga S, Yamaha M, Sasaki H. Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Crit Care Med* 1997;156:1140-3.
63. Horvarth I, Donnelly LE, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Elevated levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of chronic inflammation. *Thorax* 1998;53:668-72.
64. Stirling RG, Lim S, Kharitonov SA, Chung FK, Barnes PJ. Exhaled breath carbon monoxide is minimally elevated in severe but not mild atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:A922.
65. Uasuf CG, Jakatanon A, James A, Kharitonov SA, Wilson NM, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide in childhood asthma. *J Pediatr* 1999;135:569-74.
66. Paredi P, Leckie MJ, Horvath I, Allegra L, Kharitonov SA, Barnes PJ. Changes in exhaled carbon monoxide and nitric oxide levels following allergen challenge in patients with asthma. *Eur Respir J* 1999;13:48-52.
67. Von Pohle WR, Anholm JD, McMillan J. Carbon dioxide and oxygen partial pressure in expiratory water condensate are equivalent to mixed expired carbon dioxide and oxygen. *Chest* 1992;101:1601-4.
68. Dohlman AW, Black HR, Royall JA. Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:955-60.
69. Jösbis Q, Rastgeep HC, Hermans WM, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur Respir J* 1997;10:519-21.
70. Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Chung KF, et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1042-6.
71. Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B, Bush A, Wilson NM, Barnes PJ. Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1345-9.
72. Hanazawa T, Kharitonov SA, Oldfield W, Kay AB, Barnes PJ. Nitrotyrosine and cysteinyl leukotrienes in breath condensates are increased after withdrawal of steroid treatment in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:A919.
73. Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostano, a marker for oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:216-20.
74. Corradi M, Folesani G, Andreoli R, Manini P, Bodini A, Piacentini G, et al. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am J Crit Care Med* 2003;167:395-9.
75. Hunt J, Byrns RE, Ignarro LJ, Gaston B. Condensed expired nitrite as a home marker for acute asthma. *Lancet* 1995;346:1235-6.
76. Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ. Increased interleukin-4 and decreased interferon- γ in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1290-3.
77. Piacentini GL, Bodini A, Zerman L, Costella S, Zanolla L, Peroni DG, et al. Relationship between exhaled air temperature and exhaled nitric oxide in childhood asthma. *Eur Respir J* 2002;20:108-11.