

**UNIVERSIDAT DE VALÈNCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA**



**ESTUDIO DE LOS VALORES DE REFERENCIA DE ÓXIDO  
NÍTRICO ALVEOLAR Y BRONQUIAL EN AIRE ESPIRADO**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

Raquel López Reyes

**Directores:**

Dr. Miguel Perpiñá Tordera

Dr. Alfredo de Diego Damiá

Valencia, 2015



Don Miguel Perpiñá Tordera y Don Alfredo De Diego Damiá, Doctores en  
Medicina,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: Estudio de los valores de referencia de óxido nítrico alveolar y bronquial en aire espirado, ha sido realizado por Raquel López Reyes, bajo su dirección y se encuentra en condiciones de ser presentado como tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Valencia, 2015

Dr. Miguel Perpiñá Tordera

Dr. Alfredo De Diego Damiá



## AGRADECIMIENTOS

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

Al Dr. Miguel Perpiñá Tordera, Director de la Tesis, por iniciarme en el mundo de la investigación, así como por su constante orientación científica, apoyo y supervisión. Gracias Miguel.

Al Dr. Alfredo de Diego Damiá, co-director de la Tesis, por su estímulo y apoyo, así como por su dedicación y ayuda para la finalización del trabajo.

A la Dra. Dolores Nauffal Manzur, por su constante preocupación durante el recorrido de la tesis, sus consejos y apoyo incondicional, siempre animándome a seguir adelante. Gracias por ser mi amiga.

A la Dra. Rosario Menéndez Villanueva, por su confianza, estímulo y apoyo.

A los compañeros del servicio de Neumología por su labor en la remisión de pacientes para su estudio en el Laboratorio de Exploración Funcional.

A las enfermeras y auxiliares de la Unidad de Exploración funcional y del Servicio de Neumología, en especial a Vicente Macián Gisbert , Josefina Gomar Terrades, Fina Francés Vañó, Amelia Hernández Sogo, Raquel Cánovas Badí, Daniel Moreno Acosta y M. Ángeles Menéndez Salinas por su compañía en este viaje, su ayuda incondicional, profesionalidad y colaboración.

A los amigos, familiares y compañeros que participaron de forma altruista en el estudio, por entender mi dedicación, apoyarme y animarme durante la elaboración del mismo.

A la Fundación de Neumología de la Sociedad Valenciana de Neumología, por su ayuda económica para la realización de este proyecto.

A mi familia, en especial a mis padres, Marcos y Josefa, por su preocupación constante y apoyo incondicional, porque sin ellos no estaría aquí ni sería quien soy. Todo os lo debo a vosotros.

A Dani por su ayuda y por estar siempre ahí.

A mis padres





# ÍNDICE



|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>19</b>  |
| 1.1      | <b>ASMA E INFLAMACIÓN.....</b>  | <b>19</b>  |
| 1.1.1    | Introducción.....   | 19         |
| 1.1.2    | Heterogeneidad en el asma. Fenotipos inflamatorios .....  | 21         |
| 1.1.3    | La inflamación en el asma bronquial.....  | 25         |
| 1.2      | <b>VALORACIÓN DE LA INFLAMACIÓN BRONQUIAL MEDIANTE MÉTODOS NO INVASIVOS.....</b>                                      | <b>31</b>  |
| 1.2.1    | Introducción.....   | 31         |
| 1.2.2    | Biomarcadores no exhalados: proteínas séricas y metabolitos urinarios.....  | 34         |
| 1.2.3    | Espujo inducido. Recuento celular y metabolitos.....  | 36         |
| 1.2.4    | Biomarcadores en el condensado de aire exhalado .....   | 38         |
| 1.2.5    | Nariz electrónica. Determinación de compuestos orgánicos volátiles .....  | 40         |
| 1.2.6    | Óxido nítrico exhalado .....  | 42         |
| 1.3      | <b>ÓXIDO NÍTRICO Y ASMA .....</b>   | <b>44</b>  |
| 1.3.1    | Introducción.....   | 44         |
| 1.3.2    | Fisiología del óxido nítrico .....  | 44         |
| 1.3.3    | Características biológicas y moleculares del óxido nítrico.....   | 49         |
| 1.3.4    | Óxido nítrico e inflamación en el asma .....  | 52         |
| 1.3.5    | Utilidad clínica de la determinación de óxido nítrico exhalado.....   | 56         |
| 1.3.6    | Medición de óxido nítrico en aire espirado.....   | 64         |
| 1.3.7    | Limitaciones de la determinación de óxido nítrico exhalado .....  | 73         |
| 1.4      | <b>MODELOS DE PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL PULMÓN .....</b>  | <b>74</b>  |
| 1.5      | <b>UTILIDAD DEL MODELO BICOMPARTIMENTAL.....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICACIÓN.....</b>   | <b>89</b>  |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS DEL PROYECTO .....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>4</b> | <b>SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>  | <b>99</b>  |
| 4.1      | <b>SUJETOS.....</b>   | <b>99</b>  |
| 4.1.1    | Grupo de pacientes con asma.....  | 99         |
| 4.1.2    | Grupo sujetos sanos.....  | 100        |
| 4.1.3    | Aspectos éticos .....   | 100        |
| 4.2      | <b>MÉTODO .....</b>   | <b>100</b> |
| 4.2.1    | Diseño del estudio .....  | 100        |
| 4.2.1.1  | Evaluación inicial en el grupo de pacientes asmáticos.....  | 101        |
| 4.2.1.2  | Evaluación inicial en el grupo de sujetos sanos .....   | 102        |
| 4.2.1.3  | Protocolo de estudio clínico en pacientes.....  | 103        |
| 4.2.1.4  | Protocolo de estudio clínico en sujetos sanos. Determinación de valores normales 112                                  |            |
| 4.2.1.5  | Cronograma de trabajo .....   | 112        |
| 4.3      | <b>PROCESAMIENTO DE DATOS. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>  | <b>113</b> |
| 4.3.1    | Cálculo del tamaño de la muestra .....  | 113        |
| 4.3.2    | Análisis estadístico .....  | 113        |
| 4.3.2.1  | Descripción de variables .....  | 114        |
| 4.3.2.2  | Estudio de fiabilidad de las determinaciones de ONe, Calv,NO y J'awNO .....   | 114        |
| 4.3.2.3  | Análisis de concordancia para los valores de Calv,No y J'awNO obtenidos aplicando diferentes modelos matemáticos..... | 115        |
| 4.3.2.4  | Análisis univariado diferencial entre asma y sanos.....   | 116        |
| 4.3.2.5  | Estudio de correlación entre las variables. Análisis bivariado .....  | 116        |
| 4.3.2.6  | Análisis bayesiano .....  | 116        |
| 4.3.2.7  | Análisis multivariante.....   | 118        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>121</b> |
| 5.1      | <b>ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO</b>  | <b>121</b> |
| 5.1.1    | Características generales de los sujetos.....   | 121        |
| 5.1.2    | Características basales del grupo de pacientes con asma.....  | 123        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 5.1.2.1    | Características demográficas .....  | 123        |
| 5.1.2.2    | Características clínicas .....  | 123        |
| 5.1.2.3    | Pruebas de laboratorio .....  | 125        |
| 5.1.2.4    | Características funcionales.....  | 125        |
| 5.1.3      | Características basales del grupo control.....  | 126        |
| 5.1.4      | Comparación de las características basales entre el grupo con asma y el grupo control.....  | 126        |
| <b>5.2</b> | <b>DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN AIRE EXHALADO EN SUJETOS SANOS.....</b>  | <b>127</b> |
| 5.2.1      | Análisis descriptivo .....  | 127        |
| 5.2.2      | Ecuaciones de referencia para $ONE$ , $J'awNO$ y $Calv,NO$ .....  | 131        |
| 5.2.2.1    | Oxido nítrico en aire espirado.....   | 131        |
| 5.2.2.2    | Componente bronquial de óxido nítrico.....  | 132        |
| 5.2.2.3    | Concentración alveolar de $ON$ .....  | 133        |
| 5.2.3      | Resultados del estudio de fiabilidad de las determinaciones de óxido nítrico exhalado.....  | 133        |
| 5.2.4      | Análisis de concordancia de los valores de $J'awNO$ y $Calv,NO$ obtenidos aplicando diferentes modelos matemáticos en sujetos sanos .....                 | 137        |
| <b>5.3</b> | <b>DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN AIRE EXHALADO EN PACIENTES ASMÁTICOS.....</b>  | <b>139</b> |
| 5.3.1      | Análisis descriptivo .....  | 139        |
| 5.3.2      | Análisis de concordancia de los valores de $Calv,NO$ y $J'awNO$ obtenidos aplicando diferentes modelos matemáticos en pacientes asmáticos.....            | 143        |
| 5.3.3      | Análisis de concordancia entre los valores de óxido nítrico exhalado a 250 ml/s y los niveles predichos a partir de una ecuación de regresión lineal..... | 143        |
| <b>5.4</b> | <b>ANÁLISIS UNIVARIADO DIFERENCIAL ENTRE ASMÁTICOS Y SANOS, PARA LOS VALORES DE ÓXIDO NÍTRICO.....</b>  | <b>146</b> |
| <b>5.5</b> | <b>INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES VARIABLES SOBRE EL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO EN SUJETOS SANOS. ANÁLISIS UNI Y BIVARIADO.....</b>                             | <b>148</b> |
| <b>5.6</b> | <b>INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES VARIABLES SOBRE EL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO EN EL GRUPO DE ASMÁTICOS. ANÁLISIS UNI Y BIVARIADO.....</b>                     | <b>151</b> |
| 5.6.1      | Antecedentes personales.....  | 151        |
| 5.6.2      | Test cutáneos a neuroalergenos.....   | 152        |
| 5.6.3      | Niveles de $IgE$ .....  | 152        |
| 5.6.4      | Niveles de eosinófilos .....  | 152        |
| 5.6.5      | Tratamiento corticoideo.....  | 154        |
| 5.6.6      | Oxido nítrico y prueba broncodilatadora.....  | 157        |
| 5.6.7      | Hiperrespuesta bronquial y nivel de óxido nítrico exhalado .....  | 158        |
| 5.6.8      | Óxido nítrico exhalado, nivel de gravedad y grado de control de la enfermedad .....   | 161        |
| 5.6.9      | Oxido nítrico exhalado y calidad de vida.....   | 164        |
| <b>5.7</b> | <b>CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS VARIABLES: <math>ONE</math>, <math>Calv,NO</math> Y <math>J'awNO</math>. RESULTADOS DEL ANÁLISIS BAYESIANO.....</b>       | <b>165</b> |
| <b>5.8</b> | <b>TÉCNICAS MULTIVARIANTES .....</b>  | <b>177</b> |
| 5.8.1      | Análisis factorial .....  | 177        |
| <b>6</b>   | <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>181</b> |
| <b>6.1</b> | <b>VIABILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL OXIDO NÍTRICO EXHALADO Y SUS COMPONENTES ALVEOLAR Y BRONQUIAL .....</b>  | <b>181</b> |
| <b>6.2</b> | <b>VALORES NORMALES DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO, ALVEOLAR Y BRONQUIAL.....</b>  | <b>185</b> |
| <b>6.3</b> | <b>UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO .....</b>   | <b>190</b> |
| 6.3.1      | Limitaciones de la determinación de óxido nítrico exhalado .....  | 193        |
| <b>6.4</b> | <b>ANÁLISIS DE FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO .....</b>   | <b>194</b> |
| 6.4.1      | Factores fisiológicos, ambientales y patológicos .....  | 194        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 6.4.1.1    | Edad.....  | 195        |
| 6.4.1.2    | Género.....  | 195        |
| 6.4.1.3    | Peso.....  | 196        |
| 6.4.1.4    | Tabaquismo.....  | 196        |
| 6.4.1.5    | Atopia.....  | 197        |
| 6.4.1.6    | Tratamiento.....   | 197        |
| <b>6.5</b> | <b>RELACION DE LOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN CON LAS<br/>VARIABLES UTILIZADAS EN LA EVALUACIÓN DEL PACIENTE ASMÁTICO ...</b> | <b>198</b> |
| 6.5.1      | Óxido nítrico y función pulmonar.....  | 198        |
| 6.5.2      | Óxido nítrico e hiperrespuesta bronquial.....  | 199        |
| 6.5.3      | Correlación con medidas del control y calidad de vida en la enfermedad.....  | 200        |
| <b>6.6</b> | <b>PUNTOS DE CORTE EN EL DIAGNÓSTICO DE ASMA, ANÁLISIS<br/>BAYESIANO .....</b>   | <b>203</b> |
| <b>6.7</b> | <b>ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO UNA APROXIMACIÓN MULTIDIMENSIONAL<br/>206</b>  |            |
| <b>7</b>   | <b>CONCLUSIONES .....</b>  | <b>213</b> |
| <b>8</b>   | <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>  | <b>217</b> |
| <b>9</b>   | <b>ABREVIATURAS.....</b>   | <b>253</b> |
| <b>10</b>  | <b>ANEXOS.....</b>   | <b>257</b> |



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos celulares y moleculares de la inflamación en el asma bronquial.
- Figura 2.** Síntesis de óxido nítrico (ON).
- Figura 3.** Metabolismo del óxido nítrico (ON).
- Figura 4.** Sensor de quimioluminiscencia CLD 88sp.
- Figura 5.** Sensor electroquímico portátil NIOX MINO® Aerocrine.
- Figura 6.** Maniobra de exhalación de óxido nítrico espirado a 50 ml/s.
- Figura 7.** Gráfica de medición, de la fracción de óxido nítrico en aire espirado, con sensor de quimioluminiscencia CLD 88sp.
- Figura 8.** Curva de óxido nítrico en un sujeto asmático, obtenido a un flujo de 50 ml/s.
- Figura 9.** Curvas de óxido nítrico exhalado obtenidas en un mismo paciente a distintos flujos espiratorios.
- Figura 10.** Representación esquemática del modelo bicompartimental.
- Figura 11.** Técnicas analíticas descritas para estimar los parámetros independientes del flujo espiratorio.
- Figura 12.** Distribución de los valores de ONe a 50 ml/s en el grupo de sujetos sanos.
- Figura 13.** Distribución de los valores de la  $Calv,NO$ , según Condorelli, en el grupo de sujetos sanos.
- Figura 14.** Distribución de los valores de la  $J'awNO$ , según Condorelli, en el grupo de sujetos sanos.
- Figura 15.** Valores medios y DE para el ONe en cada uno de los días del estudio.
- Figura 16.** Valores medios y DE para el  $J'awNO$  en cada uno de los días del estudio.
- Figura 17.** Valores medios y DE para el  $Calv,NO$  en cada uno de los días del estudio.
- Figura 18.** Representación gráfica de la diferencia entre cada par de mediciones de ONe frente a su media según el método de Bland y Altman.
- Figura 19.** Correlación entre ONe y eosinofilia periférica.
- Figura 20.** Correlación entre  $J'awNO$  y eosinofilia periférica.
- Figura 21a.** Valores medios de  $Calv,NO$  en el grupo de pacientes con y sin tratamiento esteroideo.
- Figura 21b.** Valores medios de  $J'awNO$  en el grupo de pacientes con y sin tratamiento corticoideo.
- Figura 22a.** Comparación de los valores de ONe en los pacientes según recibieran o no tratamiento con corticoides inhalados y el grupo de sujetos sanos.
- Figura 22b.** Comparación de los valores de  $J'awNO$  en los pacientes según recibieran o no tratamiento con corticoides inhalados y el grupo de sujetos sanos.
- Figura 22c.** Comparación de los valores de  $Calv,NO$  en los pacientes según recibieran o no tratamiento con corticoides inhalados y el grupo de sujetos sanos.
- Figura 23a.** Valor medio de ONe y  $Calv,NO$  en los distintos grupos de gravedad de asma en el conjunto de pacientes asmáticos sin tratamiento esteroideo.

- Figura 23b.** Valor medio de J'awNO en los distintos grupos de gravedad de asma en el conjunto de pacientes asmáticos sin tratamiento esteroideo.
- Figura 24a.** Valor medio de ONe y Calv,NO en los distintos grupos de control de asma en el conjunto de pacientes asmáticos en tratamiento esteroideo.
- Figura 24b.** Valor medio de J'awNO en los distintos grupos de control de asma en el conjunto de pacientes asmáticos en tratamiento esteroideo.
- Figura 25.** Curvas ROC indicando el valor diagnóstico para asma del ONe, J'awNO y Calv,NO en la población total del estudio.
- Figura 26.** Curvas ROC indicando el valor diagnóstico para asma del ONe, J'awNO y Calv,NO en el grupo hombres, menores de 30 años.
- Figura 27.** Curvas ROC indicando el valor diagnóstico para asma del ONe, J'awNO y Calv,NO en el grupo mujeres, menores de 30 años.
- Figura 28.** Curvas de probabilidad posprueba de presentar asma según los valores predictivos de ONe.
- Figura 29.** Curvas de probabilidad posprueba de presentar asma según los valores predictivos de J'awNO.
- Figura 30.** Ganancia diagnóstica para el ONe.
- Figura 31.** Ganancia diagnóstica para el J'awNO.



# INTRODUCCIÓN

*“Sólo comprendemos aquellas preguntas que podemos responder”*

*Friedrich Nietzsche*



# **1 INTRODUCCIÓN**

## **1.1 ASMA E INFLAMACIÓN**

### **1.1.1 Introducción**

A pesar de los avances científicos llevados a cabo en los últimos años en el conocimiento del asma, esta enfermedad se considera aún hoy en día como un grupo heterogéneo o síndrome que aúna diferentes fenotipos, con manifestaciones clínicas similares y etiologías distintas. La definición más consensuada entorno a sus características establece que es “una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en cuya patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos y que cursa con hiperrespuesta bronquial y una obstrucción variable al flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente”<sup>1</sup>. La identificación de su componente inflamatorio, como mecanismo patológico común, se debe, en buena medida, al progreso que ha tenido lugar dentro de los métodos diagnósticos, y las técnicas de estudio disponibles como la broncoscopia<sup>2</sup>, el análisis del esputo inducido o más recientemente la búsqueda de biomarcadores<sup>3</sup> tanto en sangre como en muestras procedentes de la vía aérea. A pesar de ello, y sin menoscabo de su importancia como proceso patogénico, la relación entre inflamación y función pulmonar no está bien establecida como tampoco lo está la asociación entre la intensidad de la misma y la gravedad de la enfermedad<sup>4,5</sup>. Es por ello que actualmente se acepta que existan otros factores, genéticos y/o ambientales que influyan en su aparición y desarrollo, y justifiquen la existencia de distintas agrupaciones o fenotipos<sup>6,7</sup>.

El asma puede clasificarse en varios grupos o fenotipos según distintos criterios (Tabla 1). Su identificación supone una herramienta más en la categorización de la enfermedad<sup>8</sup>.

**Tabla 1.** Fenotipos del asma según diferentes criterios de clasificación.

| <b>Fenotipos del asma</b>   |
|---|
| <p><b>Fenotipos clínicos o fisiopatológicos.</b></p> <p>Asma grave.<br/>Asma con exacerbaciones grave.<br/>Asma refractaria al tratamiento.<br/>Asma de inicio precoz.<br/>Asma de inicio tardío.<br/>Asma con limitación fija al flujo aéreo.<br/>Asma y obesidad.</p> |
| <p><b>Fenotipos definidos por los desencadenantes.</b></p> <p>Asma alérgica.<br/>Asma inducida por antiinflamatorios no esteroideos (AINE).<br/>Asma inducida por menstruación.<br/>Asma inducida por ejercicio.</p>  |
| <p><b>Fenotipos inflamatorios.</b></p> <p>Eosinofílico.<br/>Neutrofílico.<br/>Paucigranulocítico.</p>   |

### **1.1.2 Heterogeneidad en el asma. Fenotipos inflamatorios**

El asma es una enfermedad compleja y como tal, heterogénea. En los últimos años, han sido numerosos los intentos de clasificarla en distintas categorías que agrupen a los enfermos que comparten características etiológicas, fisiopatológicas y clínicas, proporcionando grupos bien definidos con similar pronóstico y respuesta al tratamiento<sup>9</sup>. Para entender mejor los diferentes grupos de pacientes, diversos trabajos han intentado definir los posibles fenotipos (atributo o conjunto de atributos de una enfermedad resultantes de la interacción genes-entorno y capaces de establecer diferencias entre los individuos que comparten esa enfermedad)<sup>10</sup>. En la Tabla 1 se recogen los diferentes fenotipos de asma según distintos criterios de clasificación. Así, en la revisión clásica de Wenzel<sup>11</sup> se proponen tres categorías de fenotipos dependiendo de: a) criterios clínicos o fisiopatológicos, que dividen la enfermedad según la gravedad, la edad de inicio, la tendencia evolutiva de la obstrucción bronquial o las enfermedades asociadas; b) criterios relacionados con los factores o estímulos desencadenantes como el asma inducido por ácido acetilsalicílico (AAS) y el ocupacional, y por último; c) los criterios definidos por factores patobiológicos (inflamatorios). Aunque por lo general los fenotipos son clínicamente relevantes, en términos de presentación, factores desencadenantes y respuesta al tratamiento, no necesariamente se relacionan o explican los procesos patológicos subyacentes; es por esto que recientemente y con el fin de ordenar esta variabilidad, se ha propuesto el término endotipo (subtipos de una enfermedad definidos patológica y funcionalmente por mecanismos específicos). Mientras que las características fenotípicas representan observaciones de la dimensión clínica del asma, la

clasificación del asma en endotipos establece diferencias entre los distintos mecanismos capaces de producir la enfermedad. El enfoque por endotipos del asma propone la utilización combinada de 7 parámetros diferentes (epidemiología, clínica, biomarcadores, función pulmonar, genética, histopatología y respuesta al tratamiento)<sup>9</sup>, de manera que, para la identificación de un endotipo concreto, éste ha de cumplir expresamente al menos 5 de aquellos admitiendo que un fenotipo puede manifestarse en más de un endotipo y un endotipo contener más de un fenotipo<sup>9</sup>. Por tanto, una clasificación del asma, basada en endotipos, permitiría identificar un grupo homogéneo de pacientes en los que sea posible desarrollar biomarcadores definidos y estrategias terapéuticas específicas, de acuerdo con una fisiopatología determinada, lo que facilitaría la toma de decisiones en el seguimiento y en el manejo de los tratamientos actualmente disponibles.

Desde un punto de vista de su origen inflamatorio, el asma podría clasificarse en tres fenotipos<sup>12</sup>; 1) eosinofílica, 2) neutrofílica y 3) paucigranulocítica.

#### 1) Asma eosinofílica.

El asma eosinofílica es, seguramente, el fenotipo mejor estudiado. En sujetos que nunca han utilizado corticoesteroides, se define como la presencia de > 2% de eosinófilos en el esputo inducido, mientras que, en aquellos que han recibido tratamiento corticoideo, se utilizan umbrales de 2% al 4%. Se puede encontrar tanto en casos de asma leve-moderada como en el asma grave y se asocia a características clínicas y patológicas diferentes a la inflamación no eosinofílica. En el asma grave, los hallazgos patológicos en el lavado broncoalveolar (LBA) indican que entre la mitad y dos tercios de estos

pacientes tienen eosinofilia persistente a pesar de recibir tratamiento con dosis altas de esteroides inhalados y sistémicos. Esta persistencia de eosinófilos, puede representar un subtipo de asma grave, caracterizado por síntomas más intensos, descenso mantenido del volumen de espiración forzada en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>) y mayor número de exacerbaciones graves en comparación con las asmas graves sin eosinofilia persistente<sup>13</sup>. La eosinofilia es más prevalente en la enfermedad de inicio tardío que en la de comienzo precoz, incluso aunque se esté utilizando dosis similares de corticoides<sup>14</sup>. En el asma grave de comienzo precoz, el aumento en el número de eosinófilos se asocia con incremento del número de linfocitos T y mastocitos, mientras que en el asma eosinofílica de inicio tardío no hay evidencia clara de la participación de otras células, aparte de los eosinófilos. La enfermedad de comienzo tardío cursa con mayores cantidades de cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs), incluso en casos en que el proceso se encuentra controlado. En pacientes con asma grave e inflamación eosinofílica otras similitudes, con independencia de la edad de comienzo de la enfermedad serían: a) la presencia de concentraciones tisulares aumentadas de factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), en especial TGFβ<sub>2</sub> y de la enzima 15-lipooxigenasa y su producto, el ácido 15-hidroxi-eicosatetranoico<sup>15,16</sup>; b) el engrosamiento de la membrana basal subepitelial. Además, se ha demostrado que en células tisulares y procedentes del LBA el contenido de interleucina (IL) 4 o de IL-13 ARNm es menor en pacientes con asma grave en comparación con asmáticos leves, con independencia de la edad de comienzo de la enfermedad o del número de eosinófilos. La alergia es algo más frecuente en asmas graves de inicio precoz, aunque en este grupo es menos probable la persistencia de eosinofilia tisular

en comparación con asma graves de comienzo tardío. Por último, cabe destacar que el asma inducida por aspirina, que habitualmente se relaciona con enfermedad no alérgica, suele cursar con intensa eosinofilia tisular<sup>17</sup>.

## 2) Asma neutrofílica.

Para el diagnóstico de asma no eosinofílico se ha sugerido un nivel menor de 1,9% de eosinófilos en el esputo en dos o más determinaciones, siempre que se excluyan otras alternativas (EPOC, bronquiectasias, fumadores de > 20 años/ paquete etc)<sup>18</sup>. Se estima que un 25% de pacientes con asma sintomática no tratada y hasta un 50% de pacientes con asma tratada con altas dosis de corticoides inhalados tienen un número normal de eosinófilos en el esputo. Histológicamente la inflamación no eosinofílica se caracteriza por la ausencia de eosinófilos en la submucosa, un número menor de linfocitos CD3+, macrófagos, y un grosor normal de la membrana basal subepitelial, en relación con la inflamación eosinofílica. Desde el punto de vista clínico, es más probable que sean mujeres, con comienzo de los síntomas en edades medias de la vida y sin atopia. Además, se ha descrito más frecuentemente en asmáticos fumadores, en pacientes con asma ocupacional, en el asma de atletas de élite o en pacientes obesos. Globalmente presentan menor número de exacerbaciones en relación al asma eosinofílica y pueden ser menos graves<sup>18</sup>. La relación del asma neutrofílica con un fenotipo concreto es menos clara. Se han descrito factores externos que pueden estar relacionados con la inflamación neutrofílica como el tabaquismo, exposiciones ocupacionales a irritantes e infecciones. Puede objetivarse más comúnmente en pacientes con asma grave. También se ha descrito una asociación de esta inflamación con aumentos en la IL-8, elastasa neutrofílica, y moléculas de alto peso molecular,



metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP-9). La activación de estas enzimas puede modificar la estructura de la vía aérea<sup>11</sup>. Este fenotipo se asocia con un descenso del FEV<sub>1</sub> y no se aprecia mayor hiperrespuesta bronquial, tras la provocación con metacolina<sup>19</sup>. Los esteroides son menos efectivos que en la inflamación eosinofílica.

### 3) Asma paucigranulocítica.

En el asma paucigranulocítica podemos encontrar un número normal de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos en esputo. Este grupo puede incluir a pacientes con asma bien controlada o intermitente o incluso pacientes sintomáticos a pesar del uso de esteroides a altas dosis, sugiriendo la contribución de otros tipos de células o patología<sup>18</sup>.

## 1.1.3 La inflamación en el asma bronquial

### La inflamación aguda en el asma bronquial

La hipótesis más aceptada hoy en día indica que el proceso inflamatorio en el asma comienza con la presentación y el procesamiento de los alérgenos inhalados por las células presentadoras de antígeno (CPA) tales como células dendríticas y macrófagos. Los antígenos presentados por estas células son reconocidos por los linfocitos T que proliferan y se diferencian en linfocitos Th<sub>2</sub>. Este tipo de linfocito, previamente sensibilizado y con memoria antigénica, es capaz de sintetizar mediadores químicos como las IL-4, IL-5, y IL-13<sup>20</sup>, que actúan sobre los linfocitos maduros del tipo “B”, para a su vez, sintetizar inmunoglobulinas “E” (IgE). Estas moléculas se unen a los propios antígenos y conjuntamente, a los receptores de alta afinidad de los mastocitos de las vías aéreas. Una vez depositados sobre la membrana, la célula libera sus gránulos enzimáticos y proteicos (histamina, serotonina, Kinasas, etc.), que actuarán

sobre los propios antígenos y sobre el endotelio vascular y el propio epitelio bronquial, produciendo reacciones de exudación y broncoconstricción defensivas. La participación de los mastocitos no termina en esta reacción defensiva que se desarrolla en la luz bronquial, sino que se observan respuestas tardías de infiltración mastocítica en las células musculares, que contribuirán al posterior remodelado de la vía aérea<sup>21</sup>. El metabolismo activo en la membrana de estas células produce una gran liberación de leucotrienos, sustancias proinflamatorias muy activas que se responsabilizan, conjuntamente con la histamina y serotonina, de la respuesta inflamatoria aguda en el asma. Además, los linfocitos Th<sub>2</sub> liberan otro potente mediador de información a distancia, la IL-5. Esta sustancia es el mayor inductor de la síntesis, maduración, migración y activación de los eosinófilos<sup>22</sup>, considerados como la célula efectora más potente y activa, responsable de la reacción inflamatoria tardía en el asma<sup>23</sup>. La migración e infiltración eosinofílica en las vías aéreas proporciona una liberación de potentes sustancias vasoactivas y enzimáticas que estas células sintetizan en su citoplasma y que producen daño local, contraen el músculo liso bronquial, y aumentan la permeabilidad vascular y la producción de moco. Entre las quimiocinas involucradas en los procesos de reclutamiento de eosinófilos destacan: RANTES, eotaxina y las proteínas quimiotácticas para monocitos (MCP-2, MCP-3 y MCP-4), todas las cuales se unen a un receptor común presente en los eosinófilos, el CC3. Los eosinófilos activados expresan integrinas de superficie entre las que destacan la  $\beta_2$ -integrina y la VLA-4, lo que permite su adhesión a los receptores endoteliales: E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1. En la expresión de estas moléculas de adhesión endoteliales juegan un papel primordial la IL-1 y el factor de necrosis

tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), así como la IL-4 e IL-13, todas producidas por los linfocitos Th<sub>2</sub> en el entorno inflamatorio.

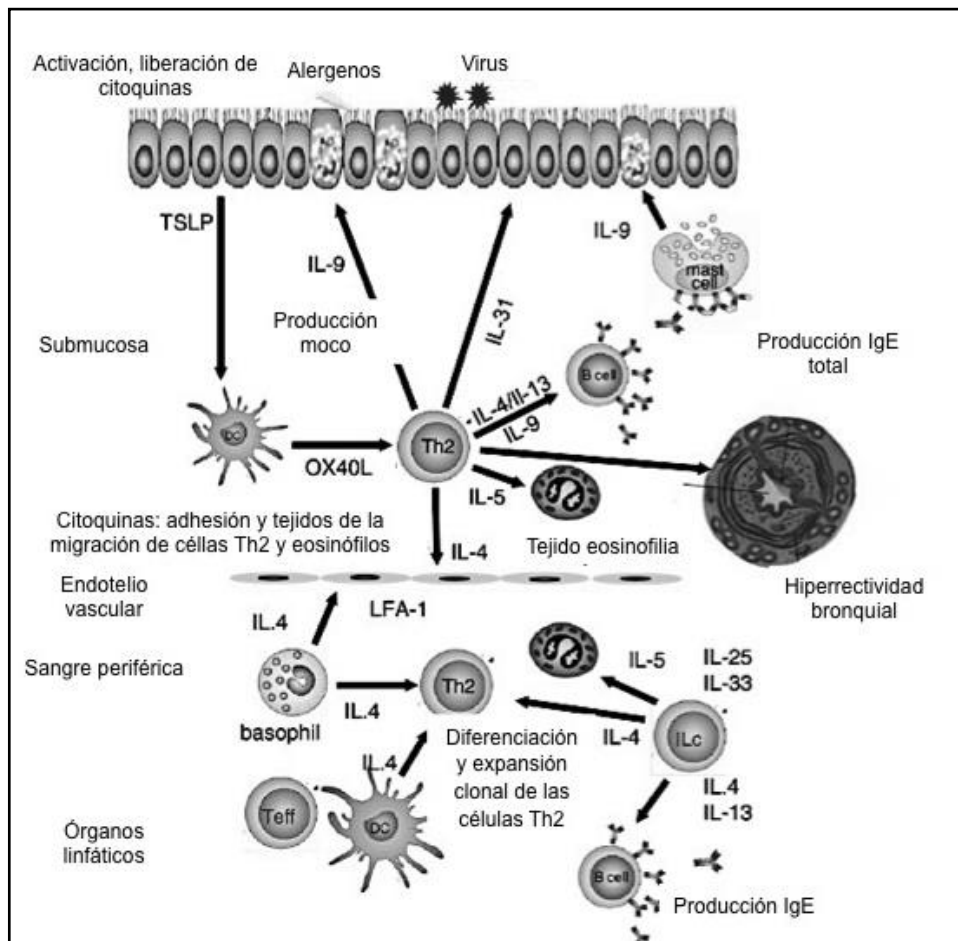
La inflamación en el asma crónica es mucho más compleja que una inflamación básicamente eosinofílica. En este proceso están implicadas numerosas estirpes celulares y diversos mecanismos interdependientes. Podemos encontrar dos sistemas bien diferenciados: las células epiteliales, y el infiltrado inflamatorio mixto subepitelial. Este último integrado por: eosinófilos, linfocitos, mastocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, y fibroblastos. En este proceso intervienen también otros factores como la inflamación neurogénica y los productos derivados de la oxidación como el óxido nítrico (ON). El ON es un transmisor intercelular, producido por las células epiteliales y por el endotelio. Desempeña un papel clave como vasodilatador, neurotransmisor y mediador proinflamatorio de las vías aéreas, amplificando la respuesta inflamatoria en el asma bronquial<sup>24</sup>.

#### La remodelación de las vías aéreas

El segundo componente característico de la inflamación en el asma es el denominado “remodelado bronquial”. Éste hace referencia a una serie de alteraciones estructurales patológicas que se desarrollan en la pared de las vías respiratorias. Estas alteraciones incluyen: hiperplasia de células caliciformes, aumento del número y tamaño de las glándulas mucosas, fibrosis subepitelial, incremento de la cantidad de músculo liso relativo al tamaño de la vía respiratoria, angiogénesis y, en conjunto, aumento del grosor de la pared bronquial y bronquiolar a expensas de todas sus capas. Los factores que dan inicio o perpetúan este remodelado no están claros. Tampoco lo está, si la remodelación de las vías respiratorias es una respuesta normal a una lesión, o

si por el contrario es una alteración en sí misma, o si los procesos responsables del desarrollo de la inflamación crónica son distintos de los responsables de la remodelación. Es por ello que los últimos años el estudio de su génesis ha sido tema de investigación intensa. En este sentido, la asociación inflamación y remodelado ha sido una de las más estudiadas. Por una parte, la observación de infiltración mastocítica del músculo liso bronquial de los asmáticos ha originado el concepto de miositis en el asma por acción inmediata de los mediadores liberados por los mastocitos sobre el músculo<sup>21</sup>. Por otra parte, las células T CD4+ efectoras que coordinan la respuesta inflamatoria, podrían intercambiar bidireccionalmente mensajes con las células musculares lisas u otras células mesenquimales, mediante el establecimiento de una sinapsis intercelular, a través de la cual, las células T comunicarían a las células estructurales, instrucciones inductoras de morfogénesis que favorecerían la remodelación, mientras que las células estructurales influirían sobre la función de las células T, estimulando la perpetuación de la inflamación crónica<sup>25,26</sup>. Otro enfoque diferente al estudio de los fenómenos de remodelación, analiza el papel que el epitelio bronquial puede desempeñar en dirigir la proliferación celular mesenquimal y el depósito de matriz extracelular en las estructuras conectivas subyacentes. La teoría de la unidad trófica epitelio-mesenquimal propone que la acción de diversos factores medioambientales impacta sobre el epitelio respiratorio y desencadena en combinación con factores genéticos de susceptibilidad, un proceso de lesión y respuesta reparadora anormal, que da lugar conjuntamente a la inflamación y remodelación de las vías respiratorias. Según esta teoría, la remodelación y la propia inflamación tendrían su origen en los mecanismos fisiológicos de

reparación programados en nuestras superficies de cubierta epitelial. Frente a una lesión epitelial, el epitelio, su sustrato mesenquimal, y la barrera del sistema inmunitario innato de la que el propio epitelio forma parte, activarían un programa de alerta de invasión microbiana como interpretación por defecto. Este programa desarrollaría una respuesta consistente en la liberación de citocinas, factores de crecimiento, agentes quimiotácticos y otros mediadores, lo que induciría el reclutamiento leucocitario y la inflamación, e iniciaría el proceso de reparación mediante la proliferación y diferenciación de células mesenquimales y depósito de matriz extracelular. La remodelación de las vías respiratorias se originaría en una desregulación de este programa de reparación, como consecuencia de la interacción entre factores genéticos de susceptibilidad en ciertos individuos y factores ambientales.



**Figura 1.** Mecanismos celulares y moleculares de la inflamación en el asma bronquial. Tomado de Papadopoulos et al. *Research needs in allergy: an EAACI position. Clinical and Translational Allergy* 2012; 2:21.

## **1.2 VALORACIÓN DE LA INFLAMACIÓN BRONQUIAL MEDIANTE MÉTODOS NO INVASIVOS**

### **1.2.1 Introducción**

Los biomarcadores son signos físicos o parámetros de laboratorio que pueden ser utilizados como indicadores de la presencia de procesos biológicos o fisiopatológicos, o bien, como marcadores de respuesta a una intervención terapéutica, sea farmacológica o no<sup>27</sup>. Para que la determinación de un cierto marcador en asma, pueda ser aplicable en la práctica diaria se ha sugerido que éste debería cumplir de forma ideal las siguientes condiciones<sup>3</sup>:

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

En los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio de la utilidad y relevancia clínica de los biomarcadores en el asma<sup>28-30</sup>. Entre las diferentes moléculas que se han relacionado con la enfermedad destacan: el recuento de células en esputo inducido, el óxido nítrico exhalado (ONE), el leucotrieno E4 en orina (uLTE4), los niveles de periostina, la proteína C reactiva (PCR), etc (Tabla 2).

A continuación presentamos un resumen de los que han tenido mayor impacto en la literatura.



**Tabla 2.** Biomarcadores en asma.

| <b>Biomarcador</b>   |
|--|
| <b>Sangre</b>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Eosinófilos.</li> <li>✓ IgE.</li> <li>✓ Periostina.</li> <li>✓ Superóxido dismutasa.</li> <li>✓ CD34+CD133.</li> </ul>  |
| <b>Derivados de la vía aérea</b>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Esputo inducido: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fase sólida o pellet: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Recuento diferencial de las células inflamatorias.</li> <li>▪ Proteína catiónica del eosinófilo.</li> <li>▪ Proteína eosinofílica.</li> <li>▪ Peroxidasa del eosinófilo.</li> </ul> </li> <li>○ Fase líquida o sobrenadante: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proteasas.</li> <li>▪ Eicosanoides: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cisteinil-leucotrienos.</li> <li>• 8-isoprostano.</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> <li>✓ Aire exhalado: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Peróxido de hidrogeno.</li> <li>○ Óxido nítrico exhalado y sus derivados.</li> <li>○ Metabolitos del ácido araquidónico. <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cilteinil-leucotrienos.</li> <li>▪ 8-isoprostano.</li> </ul> </li> <li>○ pH.</li> </ul> </li> <li>✓ Nariz electrónica: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Compuestos orgánicos volátiles.</li> </ul> </li> </ul> |
| <b>Orina</b>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Bromotirosina.</li> <li>✓ Leucotrieno 4.</li> <li>✓ F2 isoprostano.</li> </ul>  |

## **1.2.2 Biomarcadores no exhalados: proteínas séricas y metabolitos urinarios**

En el asma se puede observar una elevación de eosinófilos en sangre, esputo y mucosa respiratoria. Los eosinófilos segregan principalmente cuatro sustancias: proteína catiónica eosinofílica (PCE), proteína X o neurotoxina derivada del eosinófilo (PEX), proteína básica y peroxidasa del eosinófilo (PEo), cuya cuantificación aporta más información que el mero conteo de eosinófilos, ya que nos indica la actividad de éstos. 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 <sup>31-34</sup>.

Sin embargo, tienen una serie de limitaciones:

- a) Son determinaciones caras y precisan personal experimentado en su manejo y procesamiento.
- b) Los resultados hasta ahora no han sido concluyentes, ya que en muchos de estos trabajos nos encontramos con superposición amplia de valores entre sujetos sanos y asmáticos; tampoco nos permiten diferenciar entre asma intrínseca y extrínseca ni entre los diferentes niveles de gravedad. Se ha visto que la PCE es incapaz de predecir los cambios funcionales inducidos por el tratamiento o la respuesta al mismo y su uso en la monitorización de la enfermedad como guía para ajustar el tratamiento no aporta nada con respecto al seguimiento convencional. Además, se elevan en otros procesos alérgicos lo que limita su utilidad en el diagnóstico del asma <sup>32-36</sup>.

Actualmente se están investigando nuevos biomarcadores como la periostina. La periostina es una proteína glicosilada secretada por los fibroblastos pulmonares, cuya presencia ha sido confirmada en varios tejidos y patologías. Un estudio donde fueron incluidos pacientes asmáticos sintomáticos y a quienes se les realizó broncoscopia, toma de esputo y extracción de sangre, demostró que los niveles de periostina eran significativamente superiores en los pacientes que tenían mayor número de eosinófilos en esputo. Este estudio concluyó que la periostina es un marcador sistémico de la eosinofilia de la vía aérea en pacientes asmáticos<sup>37,38</sup>.

Otro marcador alterado en la circulación de los pacientes con asma es la quimiocina CCL-17, liberada por las células dendríticas y células epiteliales después del contacto con el alérgeno y envuelta en el reclutamiento de las células Th<sub>2</sub> en el pulmón. Los niveles de CCL-17 se encuentran incrementados en el esputo de pacientes asmáticos y también en el suero de niños con asma; por el contrario, están bajos en sujetos tratados con corticosteroides<sup>39,40</sup>.

La proteína YKL-7 también está incrementada en el suero de pacientes adultos con asma y se correlaciona con los niveles de esputo y con varios marcadores clínicos de severidad del asma<sup>41</sup>.

Finalmente, las células epiteliales en el asma liberan varias proteinasas y quimiocinas inflamatorias, como la IL-6 y la IL-8, necesarias para la activación de la cascada de la inflamación. Es posible que niveles de estas moléculas en la circulación puedan ser de ayuda para advertir una exacerbación o incluso indicar un subtipo de inflamación particular en un paciente.

En orina se ha estudiado el uLTE4, un metabolito estable de los Cys-LTs, considerado un biomarcador en el asma ya que es capaz de predecir la

respuesta clínica al tratamiento con antileucotrienos en determinadas poblaciones de pacientes asmáticos, no obstante el procesamiento de la muestra es complejo, siendo necesarios mayor número de estudios que avalen su utilidad<sup>42,43</sup>.

### **1.2.3 Esputo inducido. Recuento celular y metabolitos**

El examen del esputo inducido tiene por finalidad la obtención de células inflamatorias procedentes del tracto respiratorio inferior<sup>44</sup>. En condiciones normales las células predominantes son (en orden decreciente) macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células epiteliales bronquiales. Los eosinófilos representan menos del 3% de las células.

La inducción, colección, procesamiento y análisis del esputo se encuentran estandarizados según las recomendaciones de la European Respiratory Society (ERS)<sup>45</sup>. Para su inducción se suelen emplear soluciones salinas a distinta concentración (desde 0.9% a 7%) y tras su procesamiento y centrifugado se pueden obtener dos fases: una fase sólida o pellet, con las células entrelazadas entre el moco, y la fase líquida o sobrenadante, sin células. El estudio de más utilidad en el esputo inducido es el recuento celular y fundamentalmente el del conteo de eosinófilos. La presencia de eosinófilos en el esputo se correlaciona con la aparición de los mismos en el aspirado bronquial y en el LBA<sup>46</sup>. En 2002, Green y sus colaboradores demostraron que al añadir el recuento de eosinófilos en el seguimiento del asma, sobretodo con relación al ajuste de tratamiento, la frecuencia y gravedad de las exacerbaciones de estos pacientes disminuye de forma significativa<sup>47</sup>. Esta técnica se ha utilizado para identificar subpoblaciones de asmáticos como el asma eosinofílico vs neutrofílico -menos propenso a responder a corticoides-<sup>48</sup>.

Sin embargo, en pacientes con asma moderada grave, la ausencia de eosinofilia en esputo no siempre distingue entre pacientes que sufren asma no eosinofílico y asmáticos cuya eosinofilia ha sido controlada por esteroides. Un estudio reciente ha identificado a la PCE, a la proteína eosinofílica y a la PEO en macrófagos cultivados que han consumido eosinófilos apoptóticos. La PCE/PEO positivas, ambas en macrófagos, están incrementadas en el esputo de pacientes con asma moderada severa tratada con esteroides inhalados, en pacientes con bronquitis eosinofílica y en pacientes que sufren eosinofilia tras la retirada de los corticoides. Por lo tanto, la proteína del eosinófilo en el macrófago del esputo, es un marcador indirecto de la eosinofilia de la vía aérea que puede identificar asmáticos sometidos a tratamiento con esteroides<sup>49</sup>. En definitiva, el recuento de los eosinófilos y los neutrófilos en esputo son considerados marcadores reproducibles y validados para medir la inflamación de la vía aérea de estos pacientes y su número se relaciona con la severidad de la enfermedad<sup>50</sup>.

En el líquido sobrenadante se pueden determinar sustancias producidas por las mismas células (PCE, proteína mayor básica, interleucinas y quimiocinas, etc.) así como sus marcadores de activación, no obstante su validez y reproducibilidad no se ha establecido todavía. En el asma se han observado incrementos de la MMP-9 tanto en el esputo, como en el LBA y en las biopsias bronquiales<sup>51</sup>. Diferentes investigadores han observado un desequilibrio entre la MMP-9 y el tejido inhibidor de las metaloproteasas (TIMP), coincidiendo con un aumento de la gravedad del asma dependiente de dicha relación<sup>52</sup>. Los eicosanoides también están envueltos en la fisiopatología del asma, y así, en el esputo de pacientes que desarrollan esta enfermedad se

aprecian incrementos de los Cys-LTs, que se correlacionan con la severidad del asma, sin verse afectados por los corticosteroides<sup>53</sup>. El 8-isoprostano es el eicosanoide más estudiado y sus niveles se han analizado en el esputo de pacientes con asma y sujetos sanos, apreciándose un incremento de sus valores en los asmáticos más severos y en las exacerbaciones<sup>54</sup>.

En resumen, la técnica del esputo inducido se encuentra bien estandarizada<sup>45</sup>, demostrando que la cuantificación del porcentaje de eosinófilos es específica ya que permite diferenciar entre asmáticos y controles sanos o sujetos con otras enfermedades respiratorias, así como entre asma eosinofílico y neutrofílico<sup>48</sup>. Su utilización supone una mejora en el manejo de la enfermedad<sup>47</sup> y se relaciona con el control y la gravedad de la misma<sup>50,55</sup>. No obstante, se trata de un método costoso y complejo, que requiere tiempo, personal entrenado, y de una infraestructura específica, no siendo los resultados siempre reproducibles por lo que hasta ahora se ha utilizado fundamentalmente en investigación y menos en la práctica clínica.

#### **1.2.4 Biomarcadores en el condensado de aire exhalado**

El condensado de aire exhalado (CAE) representa un método no invasivo que permite medir una amplia variedad de moléculas volátiles y no volátiles del tracto respiratorio, que pueden ser marcadores de inflamación útiles para la monitorización y diagnóstico de enfermedades respiratorias. En los pacientes con asma, la inflamación crónica implica un incremento en la síntesis de productos de oxidación capaces de producir daños en estructuras proteicas y lipídicas celulares (membranas, receptores...), y lesionar el tejido pulmonar. Cuando este incremento en la producción de moléculas reactivas supera los mecanismos compensadores se produce el denominado estrés

oxidativo. Con las muestras obtenidas mediante el CAE podemos evaluar parámetros indirectos del estrés oxidativo, como son el pH y los productos de la peroxidación lipídica (prostaglandinas, leucotrienos e isoprostanos) así como valores de citoquinas/quimocinas. También se pueden evaluar parámetros directos como moléculas reactivas del oxígeno ( $H_2O_2$ ) y del nitrógeno ( $NO_2/NO_3$ ). Sin embargo, la mayoría de ellos muestran todavía baja reproducibilidad.

Los biomarcadores más estudiados en el CAE son los siguientes: el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ON y sus derivados, los metabolitos del ácido araquidónico (eicosanoides) y el pH<sup>56</sup>. En diferentes estudios de pacientes con asma grave, se han observado incrementos del  $H_2O_2$  en el CAE, correlacionándose con la gravedad de la enfermedad y la función pulmonar<sup>57</sup>. En pacientes con asma alérgico no controlado, sin tratamiento previo con esteroides, se ha demostrado una correlación inversa entre el FEV<sub>1</sub>, la concentración de metacolina capaz de provocar un descenso del 20% en el FEV<sub>1</sub> (PC<sub>20</sub>) y el  $H_2O_2$  en el CAE. También se ha objetivado en pacientes con similares características, que la terapia antiinflamatoria con corticoides inhalados reduce el  $H_2O_2$  en el CAE a la vez que aumenta el FEV<sub>1</sub><sup>58</sup>.

Otros marcadores serían los Cys-LTs, sus niveles aumentan en el CAE de pacientes asmáticos. Al igual que ocurre con el esputo, sus valores se correlacionan con la severidad de la enfermedad<sup>59</sup> y se reducen con la terapia antiinflamatoria<sup>60</sup>. El 8-isoprostano es el prostanoide más estudiado en el CAE, ya que es estable, y se detecta tanto en pacientes asmáticos, como en sujetos sanos. En el asma los niveles de 8-isoprostano se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, pero sus niveles no se inhiben completamente con

el tratamiento corticoide, aún así, puede ser un indicador potencial para medir la inflamación de las vías aéreas a pesar del tratamiento antiinflamatorio<sup>61</sup>. Datos recientes sugieren una relación entre la concentración del 8-isoprostano en el CAE y la inflamación de la vía aérea pequeña<sup>62</sup>.

El pH es considerado el marcador mejor medido en el CAE, ya que está ampliamente validado y es un biomarcador reproducible, simple de medir y barato. En un estudio realizado por Hunt y sus colaboradores<sup>63</sup> demostraron que el pH del CAE fue significativamente más bajo en pacientes con una crisis asmática que en pacientes con asma controlado, y que el pH del CAE se normalizó al tratar la exacerbación<sup>63</sup>. Sin embargo, no es un marcador específico de asma, ya que también se puede observar un pH disminuido en pacientes con fibrosis quística, EPOC, fumadores o en presencia de infecciones.

Hasta la fecha no hay una estandarización completa de la recogida de las muestras del CAE y de su posterior análisis, por lo que esto dificulta su aplicabilidad en la práctica clínica habitual.

### **1.2.5 Nariz electrónica. Determinación de compuestos orgánicos volátiles**

La nariz electrónica es una tecnología emergente no invasiva que detecta los compuestos orgánicos volátiles (COV) en la fase gaseosa del aire exhalado<sup>64</sup>. La tecnología de la nariz electrónica se basa en una micromatriz de nanosensores encargados de reconocer diferentes fracciones de mezclas de sustancias con capacidad odoríferas, imitando de una manera simplificada el principio del sistema olfativo de los mamíferos. A diferencia de otros sistemas, no permite la identificación de componentes individuales, sino de mezclas de



componentes que se traducen en patrones de reconocimiento denominados *smell prints* o lo que podría traducirse como huellas olfativas<sup>65</sup>. Los estudios transversales con la nariz electrónica han demostrado poder discriminar entre enfermedades respiratorias. Los pacientes con asma se pueden diferenciar de los controles sanos y de los pacientes con EPOC con un nivel de precisión de un 80-100%<sup>66</sup>. Los datos preliminares, usando sets de validación externa de pacientes con asma y EPOC están empezando a ser útiles y muestran datos satisfactorios. Esto sugiere que la nariz electrónica puede tener un papel en el diagnóstico diferencial de las enfermedades respiratorias. En el caso del asma, además de ser útil para el diagnóstico, podría facilitar la identificación de diferentes patrones de COV que discriminen de forma rápida y sencilla los distintos fenotipos inflamatorios celulares que existen en ésta, permitiendo un manejo terapéutico más óptimo. No obstante, se necesitan más estudios que permitan determinar los patrones de COV más específicos de cada enfermedad.

La nariz electrónica presenta algunas ventajas respecto a otras técnicas como la cromatografía de gases o la espectrometría de masas, ya que se trata de un sistema técnicamente más sencillo, de un tamaño menor y que permite la obtención de resultados en tiempo real. Sin embargo, también presenta sus limitaciones, algunas de carácter metodológico, como la contaminación ambiental de ciertos componentes orgánicos volátiles en la habitación en la que se realiza la recogida de muestras, la interferencia de algunos alimentos y bebidas, respiración a volumen corriente o minuto, y otros dependientes del dispositivo. Además dado el escaso estado de desarrollo de esta tecnología en el campo médico, quedan por definir claramente los patrones de componentes

orgánicos volátiles asociados a cada patología, siendo necesarios consensos y/o recomendaciones metodológicas<sup>67</sup>.

### **1.2.6 Óxido nítrico exhalado**

La medición de gases en aire exhalado es una forma no invasiva de evaluar la inflamación. En este sentido, el ON es el gas mejor caracterizado<sup>68</sup>. Desde que Gustafsson et al<sup>69</sup> mostrara su presencia en aire espirado en animales, diversos estudios han señalado que la fracción espirada del ON está aumentada en asmáticos frente a controles<sup>70-74</sup>, disminuida en pacientes tratados con esteroides inhalados<sup>75-77</sup> y que se asocia estrechamente con la inflamación eosinofílica<sup>78,79</sup>. Además, han sido numerosos los trabajos que han demostrado su utilidad en el diagnóstico, seguimiento, valoración del tratamiento y caracterización fenotípica de la enfermedad. Las directrices de la ERS y de la American Thoracic Society (ATS) coinciden en que los dos factores principales que influyen en la metodología de su medición son: la posibilidad de contaminación por aire ambiental o nasal y la variabilidad originada por los distintos sistemas y flujos del aire exhalado utilizados<sup>80,81</sup>. Es por ello que se han publicado un número muy elevado de trabajos, así como recomendaciones por parte de la ERS y ATS, para consensuar y estandarizar el procedimiento para su determinación<sup>80,82-84</sup>.

La Tabla 3 muestra las ventajas e inconvenientes de los distintos biomarcadores.

**Tabla 3.** Ventajas y desventajas de las técnicas no invasivas que miden los biomarcadores de inflamación en el asma.

|                    | <b>Espuito inducido</b>  | <b>Condensado aire exhalado</b>  | <b>Nariz electrónica</b>   | <b>ONe</b>  |
|--------------------|--|--|--|---|
| <b>Ventajas</b>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Medición de múltiples biomarcadores.</li> <li>• Recuento celular diferencial en citospin reproducible.</li> <li>• Herramienta válida para el diagnóstico o evaluación de la terapia antiinflamatoria.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• No invasivo.</li> <li>• Medición de múltiples biomarcadores.</li> <li>• Permite medidas seriadas.</li> <li>• Potente herramienta para el diagnóstico y evaluación de terapia antiinflamatoria.</li> </ul>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• No invasivo.</li> <li>• Portátil.</li> <li>• Casi en tiempo real.</li> <li>• Alta dimensión de la señal del biomarcador.</li> <li>• Permite medidas seriadas.</li> <li>• Potente herramienta para el diagnóstico y evaluación de terapia antiinflamatoria.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• No invasivo.</li> <li>• Reproducible.</li> <li>• Medición barata.</li> <li>• Resultados directos.</li> <li>• Permite medidas seriadas.</li> <li>• Herramienta para el diagnóstico y evaluación de la terapia antiinflamatoria en el asma.</li> </ul> |
| <b>Desventajas</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Marcadores solubles sujetos a dilución.</li> <li>• No es posible repetir en un periodo corto de tiempo.</li> <li>• Se precisa experiencia y pericia por un especialista.</li> <li>• Se necesita medicación de rescate al realizar la técnica.</li> <li>• Contraindicada en asma persistente severo, trastornos cardiovasculares activos.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Los ensayos de detección no son totalmente reproducibles.</li> <li>• Caro y alto consumo de tiempo en el procedimiento.</li> <li>• Marcadores solubles sujetos a dilución.</li> <li>• Se precisa de laboratorio especializado.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• La validación externa no se ha completado todavía.</li> <li>• La tecnología de los sensores está aun en desarrollo.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipo caro.</li> <li>• Diversos factores de confusión.</li> <li>• Se precisa de un muestreo longitudinal dentro de un mismo paciente para tener más información que la que aporta una sola determinación.</li> </ul>                                |

## **1.3 ÓXIDO NÍTRICO Y ASMA**

### **1.3.1 Introducción**

El descubrimiento del ON como molécula fisiológica en el organismo se remonta al siglo XIX como resultado de estudios de fisiología orientados a conocer la regulación de la presión sanguínea. En este contexto se identificó un “factor relajante del endotelio” producido por las células y que participa en el mantenimiento del tono muscular de los vasos. Años después se demostró que este factor es el ON y se identificó el modo en que las células lo sintetizan a partir del aminoácido L-arginina. A partir de este momento, el interés por el ON creció de modo exponencial con múltiples publicaciones sobre sus funciones fisiológicas y utilidades terapéuticas así como el reconocimiento científico a sus descubridores. En 1991 se midió por primera vez en aire exhalado tanto en animales como en sujetos sanos<sup>69</sup>. En 1992 fue denominado “molécula del año” por la prestigiosa revista Science tras demostrarse su existencia en la circulación sistémica y pulmonar comprobándose que era el “factor relajante del endotelio”<sup>85</sup> y en 1998 se concedió el Premio Nobel de Medicina a tres de los cuatro investigadores que descubrieron su papel en las enfermedades cardiovasculares.

### **1.3.2 Fisiología del óxido nítrico**

El ON es un gas incoloro, lipofílico, de vida media muy 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, sin necesidad de receptores de ON extracelulares o transportadores de membrana<sup>86,87</sup>.

Es una molécula formada por dos átomos, oxígeno (O) y nitrógeno (N) que se aparean para formar ON 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 ( $O_2^-$ ) y metales de transición. Al perder su electrón no apareado y formar catión nitrosilo ( $ON^+$ ) 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>88</sup>. Entre estas funciones destacan: agregación plaquetaria, regulación del flujo sanguíneo, neurotransmisión no-adrenérgica no-colinérgica, y mecanismos de defensa citotóxicos y citostáticos contra tumores y gérmenes. Está presente en casi todos los órganos y es producido en el aparato respiratorio, donde juega un papel importante en su biología, estando implicado en la fisiopatología de varias enfermedades pulmonares. A nivel del aparato respiratorio el ON regula el tono del músculo liso y los vasos sanguíneos de la vía aérea y es un inhibidor de componentes de la cascada inflamatoria, incluyendo la activación leucocitaria, su movilidad y adhesión.

La síntesis de ON se produce en una reacción de oxidación-reducción a partir del aminoácido L-arginina mediante la acción del enzima ON-sintasa (ONS) -Figura 2-. Para esta reacción, la enzima ONS requiere, además del sustrato de L-arginina, la presencia de calmodulina, grupo Hemo y de 4 cofactores: mononucleótido de flavina (MNF), dinucleótido de flavin adenina (FAD), tetrahidrobiopterina ( $H_4B$ ) y dinucleotido fosfato de nicotinamida adenina (NADPH)<sup>89</sup>.

La L-arginina es transportada al interior de la célula endotelial por un transportador específico y mediante la ONS se sintetiza L-citrulina y una

molécula de ON, en una reacción que se produce en dos procesos de mono oxigenación. La producción de ON puede ser atenuada por inhibidores de la ONS derivados de la L-arginina<sup>90</sup>.

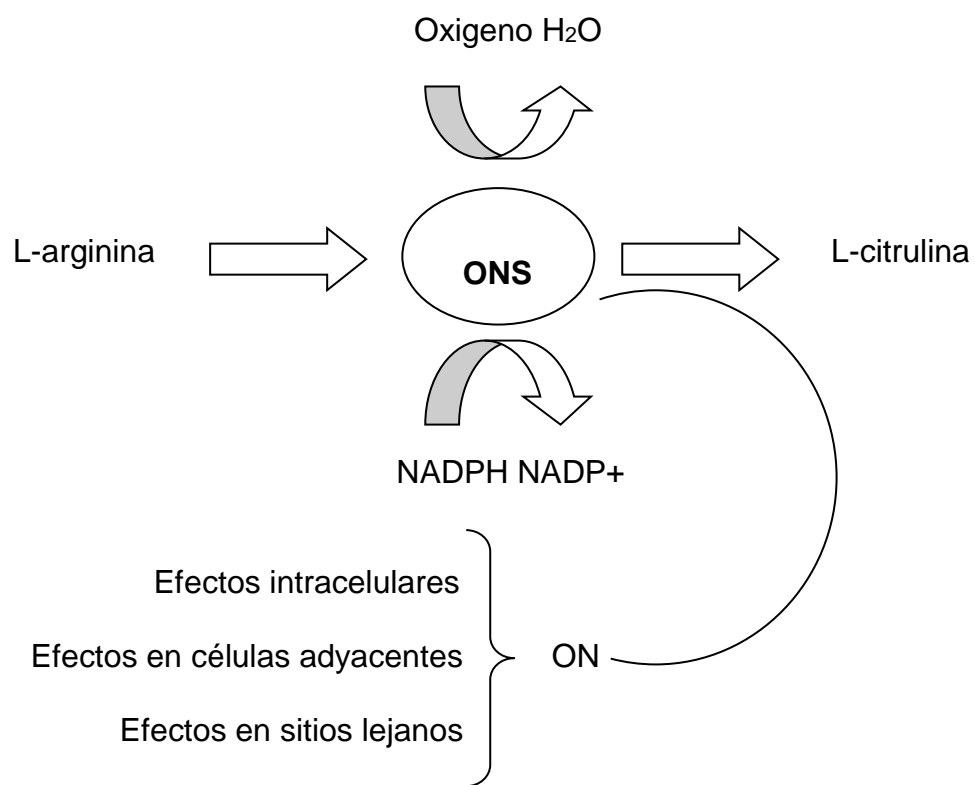
La estructura molecular de la ONS se compone de dos cadenas idénticas de aminoácidos, dímeros, formados por un dominio carboxi-terminal que es homólogo al citocromo P450 y que contiene la zona de reconocimiento NADPH, FAD y FMN y un dominio amino-terminal de posición planar, esencial para la actividad de la ONS y que contiene el grupo Hemo, la H<sub>4</sub>B y la zona de reconocimiento de la L-arginina.

Se han identificado tres isoformas de la ONS, dos constitutivas (ONSc) y una forma inducible (ONSi)<sup>88,91,92</sup>. Las isoformas constitutivas son la ONS neuronal (ONSn), que se expresa predominantemente en las neuronas, y la ONS endotelial (ONSe), que se expresa fundamentalmente en el endotelio. Ambas son citosólicas y dependientes de calcio (Ca), producen pequeñas cantidades (fisiológicas) de ON en respuesta a agonistas que aumentan el calcio intracelular (Ca<sup>2+</sup>). Ante un aumento de Ca<sup>2+</sup> se unen a un tercer dominio afín a la calmodulina (CAM), proteína de bajo peso molecular que actúa como quelante del Ca<sup>2+</sup> y activador molecular enzimático<sup>93</sup>.

La ONSi o tipo 2 es calcio independiente y no se encuentra en todas las células de forma fisiológica. Su activación permite la síntesis de hasta mil veces más de ON 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). Su expresión en estas células puede ser inducida

como respuesta a estímulos inmunológicos, por citocinas inflamatorias o por productos bacterianos, considerándose un marcador de inflamación y de citotoxicidad. La ONSi es bloqueada por los corticoides, que no afectan a las isoformas constitutivas<sup>94</sup>.

Alternativamente a la vía de la ONS, la L-arginina puede ser metabolizada por la arginasa (arginasa I y II) la cual cataliza la síntesis de poliaminas y L-prolina, mediante la conversión de L-arginina en L-ornitina. Finalmente, la dimetilarginina asimétrica (ADMA), un potente inhibidor de la formación de ON por la vía de la arginina y ONS, reduce la disponibilidad intracelular de L-arginina. ADMA inhibe competitivamente la ONS mediante el desplazamiento de la arginina de ella, de modo que ADMA elevada resulta en un desacoplamiento de la ONS, la reducción de la síntesis de ON y aumento de la producción de  $O_2^-$  y peroxinitrito ( $ONOO^-$ )<sup>24,92</sup>.



**Figura 2.** Síntesis de óxido nítrico (ON).



### 1.3.3 Características biológicas y moleculares del óxido nítrico

Hay algunos aspectos bioquímicos, moleculares, celulares, anatómicos y genéticos del ON que son relevantes en la interpretación de las mediciones:

a) Origen celular del ON.

Las células epiteliales de las vías aéreas, pueden expresar todas las isoformas de la ONS y por tanto contribuyen al ON de las vías respiratorias inferiores. Además, en las enfermedades inflamatorias como el asma, el incremento de ONe puede reflejar la inducción de la ONSi por las citocinas proinflamatorias, y ésta puede expresarse también en otros tipos de células (macrófagos, eosinófilos y otras células inflamatorias)<sup>95</sup>.

b) Localización anatómica de la síntesis de ON.

Las vías aéreas superiores (cavidad nasal y senos) producen gran cantidad de ON observándose la máxima concentración en los senos paranasales (3.000 ppb), muy superior al espirado por la boca. El tracto inferior también contribuye en forma sustancial al ONe. En pacientes asmáticos se ha observado mediante la realización de bronoscopias flexibles un aumento del ON en la tráquea y en los bronquios principales similar al registrado en la boca, lo que indica que los niveles elevados en el asma proceden de las vías aéreas inferiores.

c) Papel biológico del ON exhalado.

Las concentraciones de ON en el aire espirado son demasiado bajas para ser de relevancia fisiológica, dada la exposición continua a la hemoglobina sanguínea capilar que se une al ON y lo inactiva. Sin embargo, la activación de la ONS no produce únicamente ON sino también una variedad de óxidos de nitrógeno tales como nitratos, nitritos, y

peroxinitritos que dependiendo de las concentraciones y la situación óxido-reductora ambiental pueden ser citoprotectores o citotóxicos. También se forman S-nitrosotioles (SNOs), que se almacenan y pueden realizar algunas de las actividades biológicas del ON tales como broncodilatación, motilidad ciliar, efectos antimicrobianos y efectos de hidratación de las vías aéreas.

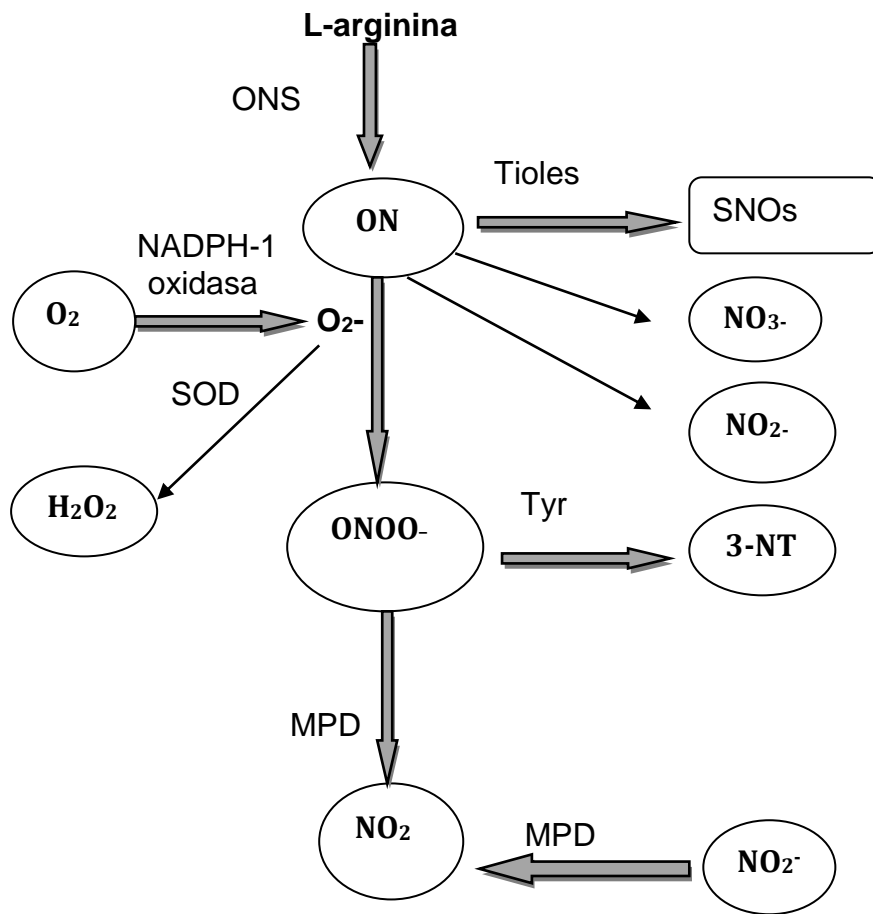
d) En los pulmones el ON endógeno tiene las siguientes funciones:

- Broncodilatador leve.
- Vasodilatador potente.
- Neurotransmisor del sistema no adrenérgico no colinérgico (NANC), regulando la broncoconstricción colinérgica.
- Antimicrobiano (acción citostática y bactericida).
- Modulador de la diferenciación celular: Concentraciones altas de ON favorecen la inhibición de la diferenciación de las células CD4+ T helper en Th<sub>1</sub> (productoras de IL-2 e interferón- $\gamma$ ) y el aumento de Th<sub>2</sub> (secretoras de IL-4 e IL-5 que favorecen la producción de IgE, adhesión y acúmulo de eosinófilos). Así pues, el incremento local de ON favorece la existencia de un patrón celular y de mediadores de inflamación similar al encontrado en asmáticos, tanto atópicos como no atópicos.
- Amplificador de la inflamación de la vía aérea: el ON favorece el aumento del edema, la exudación plasmática y el despegamiento epitelial bronquial.

e) Genética de la vía de síntesis del ON en el asma.

Hay evidencias de que la ONSn está involucrado en la genética del asma. El gen de la ONSn está localizado en el cromosoma 12. Variantes

dentro de este gen parece que están asociadas a una mayor frecuencia de asma y a unos niveles más elevados de ONe. Estos datos sugieren que la variabilidad del ONe puede ser explicada parcialmente por una predisposición genética<sup>81</sup>.



**Figura 3.** Metabolismo del óxido nítrico (ON).

### 1.3.4 Óxido nítrico e inflamación en el asma

La aplicación que la medición del ONe pueda tener en la práctica clínica se basa en su capacidad para reflejar la inflamación bronquial subyacente, y de forma más concreta, la inflamación eosinofílica.

La relación entre los niveles de ONe y la inflamación subyacente es compleja. En los pacientes asmáticos, con o sin atopia, existe una sobrerregulación de la ONSi en el epitelio bronquial que se correlaciona con los niveles de ONe, disminuyendo los valores de ONSi en pacientes tratados con corticoides<sup>96-99</sup>. El aumento de la expresión de la ONSi 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- $\kappa$ B), mediado por citocinas inflamatorias producidas por los linfocitos Th2. Estas citocinas son las responsables, mediante factores de transcripción, de estimular la expresión de la ONSi epitelial en la respuesta inflamatoria del asma<sup>100</sup>. También, se han descrito la presencia de polimorfismos del gen de la ONSi asociados a una mayor gravedad de la enfermedad, mayor eosinofilia sanguínea y elevación de los niveles de ON circulante y de ONe<sup>101,102</sup>. Otros factores que influyen en la formación de ON dependen de su sustrato, la L-arginina<sup>103,104</sup>.

El uso del ONe se ha generalizado después de que algunos estudios hubieran mostrado una correlación significativa entre sus niveles y el recuento de eosinófilos en diferentes localizaciones (Tabla 4).

En este sentido, la biopsia bronquial ha permitido mostrar la utilidad del ONe para predecir la persistencia de eosinofilia en asma severa refractaria al tratamiento. Según un trabajo de Silkoff<sup>105</sup>, valores de ONe superiores a 73 ppb

presentan una sensibilidad (S) y especificidad (E) de 1 para identificar eosinofilia persistente en la mucosa bronquial<sup>105</sup>. Existen también múltiples trabajos que correlacionan la eosinofilia del LBA y la determinación del ONe, y lo hacen con valores superiores a los obtenidos con el esputo inducido, sobretodo después del tratamiento corticoideo<sup>106,107</sup>. Incluso se ha objetivado la no correlación entre la eosinofilia del LBA y la presencia de infiltración mucosa, indicando que el LBA y la biopsia bronquial reflejan la inflamación de diferentes compartimentos<sup>108</sup>.

Los estudios que han evaluado el ONe como marcador de inflamación en el asma, en comparación con el esputo inducido, también han mostrado buena correlación entre las dos determinaciones, sobretodo en pacientes con asma estable y sin tratamiento corticoideo<sup>78</sup>. Se ha comprobado como los pacientes que tuvieron una exacerbación leve ante la reducción del tratamiento corticoide presentaron un aumento de eosinófilos en el esputo inducido y del ONe que se correlacionaba con el cambio en el FEV<sub>1</sub> y el aumento del tratamiento de rescate broncodilatador<sup>50</sup>.

El estudio más ambicioso, que incluyó a 566 asmáticos de gravedad variable, concluyó que en pacientes no fumadores, una concentración de ONe > 36 ppb (medida por quimioluminiscencia a un flujo de 50 ml/s) tiene una S del 78% y una E del 72% para identificar un recuento de eosinófilos > 3% en esputo (no se identificaron factores confusores clínicamente relevantes)<sup>109</sup>. Por otra parte, Shaw et al demostraron que niveles de ONe < 26 ppb tenían un valor predictivo negativo (VPN) del 85% para identificar un recuento de eosinófilos en esputo < 3%, remarcando la utilidad del ON para descartar inflamación eosinofílica<sup>110</sup>.

Al mismo tiempo se ha demostrado en diferentes estudios en adultos y niños, una correlación positiva entre la eosinofilia en sangre periférica y los valores elevados de ONe tanto en pacientes con asma como en individuos con atopia<sup>111,112</sup>. Por otra parte, los análisis de cluster han identificado diferentes fenotipos de asma con niveles elevados de ONe, incluyendo el asma atópico de inicio temprano y de predominio de inflamación eosinofílica; con niveles bajos de ONe como el asma no eosinofílica en pacientes obesos o asma de inicio tardío<sup>113</sup>.

La relación entre ONe y eosinofilia persiste independientemente de cuál sea el diagnóstico clínico (EPOC, bronquitis eosinofílica, rinitis alérgica)<sup>107,114,115</sup>. Sin embargo, existe controversia acerca de si esta correlación se mantiene en pacientes con asma dependiente de corticoides. Nair et al<sup>116</sup>, observaron que el tratamiento con mepolizumab normalizaba el recuento de eosinófilos en asmáticos graves tratados con prednisona, pero no los niveles de ONe<sup>116</sup>, mientras otras publicaciones contradicen estos datos<sup>117</sup>.

El estudio EXTRA evaluó en pacientes con asma grave extrínseco el papel de tres biomarcadores implicados en la respuesta inflamatoria Th2 (ONe, eosinofilia sanguínea y periostina sérica), e identificaron cómo después de 48 semanas de tratamiento con omalizumab, los pacientes con niveles bajos en los biomarcadores presentaron menor número de exacerbaciones con respecto a aquellos con niveles elevados<sup>118</sup>.

**Tabla 4.** Correlación entre la fracción de óxido nítrico en aire espirado y eosinofilia.

|                                     | <b>Muestra</b>           | <b>Correlación</b> | <b>Significación</b> |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------|----------------------|
| <b>Warke et al<sup>119</sup></b>    | Lavado<br>broncoalveolar | 0,78               | P< 0,001             |
| <b>Lex et al<sup>108</sup></b>      | Lavado<br>broncoalveolar | 0,54               | P=0,001              |
| <b>Payne et al<sup>17</sup></b>     | Biopsia bronquial        | 0,54               | P=0,03               |
| <b>Lim et al<sup>106</sup></b>      | Biopsia bronquial        | 0,14               | P=NS                 |
| <b>Mattes et al<sup>120</sup></b>   | Espujo inducido          | 0,35               | P=0,09               |
| <b>Jatakanon et al<sup>78</sup></b> | Espujo inducido          | 0,48               | P=0,003              |
| <b>Jones et al<sup>121</sup></b>    | Espujo inducido          | 0,62               | P< 0,001             |
| <b>Berry et al<sup>109</sup></b>    | Espujo inducido          | 0,59               | P<0,001              |
| <b>Schelich et al<sup>122</sup></b> | Espujo inducido          | 0,54               | P<0,001              |
| <b>Strunk et al<sup>123</sup></b>   | Sangre                   | 0,51               | P<0,001              |

### **1.3.5 Utilidad clínica de la determinación de óxido nítrico exhalado**

La ATS, establece una serie de recomendaciones sobre las aplicaciones clínicas de la medición del ONe, catalogadas según el grado de recomendación y el nivel de evidencia existente<sup>84</sup>. Estas recomendaciones se detallan en la Tabla 5.



**Tabla 5.** Recomendaciones de la American Thoracic Society para el uso clínico de la medición de la fracción de óxido nítrico exhalado en aire espirado.

| <b>Aplicación</b>   | <b>Grado de recomendación</b> | <b>Nivel de evidencia</b> |
|---|-------------------------------|---------------------------|
| Diagnóstico de inflamación eosinofílica.  | Fuerte                        | Moderado                  |
| Estimación de la probabilidad de respuesta a esteroides en pacientes con síntomas respiratorios crónicos.   | Fuerte                        | Bajo                      |
| Soporte objetivo del diagnóstico de asma.   | Débil                         | Moderado                  |
| Valores bajos de ONe predicen ausencia de eosinofilia y respuesta a corticoides.  | Fuerte                        | Moderado                  |
| Valores altos de ONe predicen eosinofilia y respuesta a corticoides.  | Fuerte                        | Bajo                      |
| Se recomienda monitorizar el ONe en asmáticos.  | Fuerte                        | Bajo                      |
| Se considera un aumento significativo del ONe el 20% en pacientes con valores altos y el 10% en pacientes con valores bajos.  | Débil                         | Bajo                      |
| Se considera un descenso significativo del ONe el 20% en pacientes con valores altos y el 10% en pacientes con valores bajos y se interpreta como respuesta al tratamiento. | Débil                         | Bajo                      |

a) Diagnóstico de asma.

Hasta la fecha, se han publicado diversos trabajos que analizan la utilidad de la medición del ONE como test diagnóstico de asma, pero las poblaciones que incluyen estos estudios son heterogéneas (adultos seleccionados por síntomas sugestivos de la enfermedad, adultos con tos crónica, adultos no seleccionados con síntomas respiratorios, etc.), el número de participantes en los estudios es variable y los dispositivos empleados son diferentes. En estas condiciones, hasta el momento los resultados en cuanto a S, E y área bajo la curva son dispares y poco valorables (Tabla 6).

**Tabla 6.** Utilidad diagnóstica de la fracción de óxido nítrico en aire espirado.

|                                       | <b>Población</b>              | <b>Punto de corte</b> | <b>Sensibilidad</b> | <b>Especificidad</b> | <b>Área ROC</b> |
|---------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
| <i>Deykin et al</i> <sup>124</sup>    | Asmáticos y población general | 31 ppb                | 72,2%               | 70,6%                | 0,84            |
| <i>Dupon et al</i> <sup>125</sup>     | Sospecha de asma              | 16 ppb                | 85%                 | 80%                  | 0,83            |
| <i>Fortuna et al</i> <sup>126</sup>   | Sospecha de asma              | 20 ppb                | 77%                 | 64%                  | 0,80            |
| <i>Berkman et al</i> <sup>127</sup>   | Sospecha de asma              | 7 ppb                 | 82%                 | 89%                  | 0,89            |
| <i>Smith et al</i> <sup>128</sup>     | Sospecha de asma              | 20 ppb                | 88%                 | 70%                  | 0,86            |
| <i>Kowal et al</i> <sup>129</sup>     | Tos crónica                   | 40 ppb                | 88,3%               | 82,6%                | 0,89            |
| <i>Saito et al</i> <sup>130</sup>     | Sospecha de asma              | 38 ppb                | 81,8%               | 85,7%                | 0,85            |
| <i>Leon et al</i> <sup>131</sup>      | Síntomas inespecíficos        | 41 ppb                |                     |                      | 0,77            |
| <i>Pedrosa et al</i> <sup>132</sup>   | Sospecha de asma              | 40 ppb                | 74%                 | 72%                  | 0,76            |
| <i>Cordeiro et al</i> <sup>133</sup>  | Pacientes atópicos            | 27 ppb                | 78%                 | 92%                  |                 |
| <i>Matsunaga et al</i> <sup>134</sup> | Asmáticos y población general | 22 ppb                | 91%                 | 84%                  |                 |
| <i>Schneider</i> <sup>135</sup>       | Sospecha de asma              | 31ppb                 | 49%                 | 75%                  | 0,65            |

A pesar de todo ello, la Sociedad Española de Neumología y Cirugía torácica (SEPAR), en su documento de consenso sobre asma<sup>136</sup>, decidió en su penúltima edición, incorporar el ONe al algoritmo diagnóstico de asma y en su reciente actualización ha situado el punto de corte en 50 ppb<sup>1</sup>. A su vez, la guía de la ATS especifica que se puede presumir una inflamación eosinofílica (y, por tanto, una respuesta a los esteroides) con valores de ONe > 50 ppb en adultos y > 35 ppb en niños. El valor predictivo de estos puntos de corte es superior al de las medidas convencionales como la variabilidad del flujo pico o la espirometría<sup>128</sup>, y similar a la del test de provocación bronquial<sup>127</sup>. Así pues un paciente sintomático con valores claramente elevados no plantearía dudas sobre el diagnóstico de asma, pero valores normales no descartarían la enfermedad, especialmente en fumadores o en sujetos ya tratados. En general se acepta que en pacientes con síntomas sugestivos de asma el ON es un parámetro más en el proceso diagnóstico, pero carece de robustez como marcador diagnóstico aislado.

b) Ayuda en la caracterización de la enfermedad.

Existen datos que apoyan el papel del ONe en la identificación de los diferentes fenotipos inflamatorios de asma (con predominio eosinofílico o neutrofilico)<sup>12</sup>. Hay varios estudios en pacientes con asma que examinan la relación entre ONe e inflamación bronquial medida directamente por esputo inducido, lavado broncoalveolar, y biopsia endobronquial, y sugieren que el aumento de la ONe reflejaría la inflamación eosinofílica de la vía aérea<sup>23,47,105,109,119,120</sup>.

La identificación de fenotipos clínicos en el asma tiene un particular interés en los casos de control difícil. En estos pacientes existe doble riesgo de infra o sobre tratamiento, por lo que resultaría muy útil disponer de una prueba sencilla que permitiese predecir en qué casos aumentar la medicación con el fin de reducir la sintomatología. En una muestra de 242 pacientes; 48 de ellos con asma grave y 194 con asma no grave, procedentes del estudio SARP (Severe Asthma Research Program), los niveles de ONe no permitieron identificar los casos más graves, pero dentro de éstos sus niveles eran significativamente mayores (aproximadamente el doble) en los casos con un recuento de eosinófilos  $> 2\%$ <sup>137</sup>. Si el ONe se relaciona con la inflamación eosinofílica en el asma de control difícil y niveles elevados son más proclives a responder a corticoides sistémicos, podríamos deducir que el principal papel del óxido nítrico en el asma podría radicar en su potencial capacidad de identificar la respuesta a los esteroides y la cumplimentación terapéutica.

c) Monitorización del tratamiento.

a. *Utilidad de la medición de ONe como guía para ajustar el tratamiento.*

Teniendo en cuenta las limitaciones que se derivan de apoyar el concepto de control en parámetros básicamente subjetivos (como el Asthma control test -ACT- y el Asthma control questionnaire -ACQ-), o bien, poco sensibles a pesar de su objetividad ( $FEV_1$ ), se ha propuesto la medición del ONe como herramienta útil para adoptar decisiones terapéuticas en la práctica clínica habitual. Diversos ensayos clínicos han evaluado

el papel del ON en la monitorización del tratamiento corticoideo sin mostrar beneficios relevantes<sup>110,138-140</sup>. Una revisión de la Cochrane del 2009<sup>141</sup> que comparó la eficacia de las intervenciones basadas en el óxido nítrico espirado con la de los síntomas clínicos del asma (con o sin espirometría) tampoco obtuvo los resultados esperables; el estudio concluyó que, en el momento actual, ajustar la dosis de corticoides inhalados de acuerdo con los niveles de ONe - en comparación con los síntomas de asma - sólo logra beneficios modestos y supone un aumento de la dosis de medicación en niños <sup>141</sup>. No obstante, esta revisión está limitada a seis estudios con un total de 1010 participantes que completaron los ensayos y aunque los trabajos comparten algunos aspectos comunes, tienen también diferencias significativas que limitan su valor; en particular, la definición de la exacerbación del asma, la diferencia del punto de corte para el ONe, la estrategia de control y los pasos para adaptar los fármacos. Una revisión posterior concluye que la falta de resultados obedece a problemas metodológicos y del diseño del estudio<sup>142</sup>. En ésta Gibson et al destacan: 1) la relación dosis-respuesta de los tratamientos utilizados en relación a los resultados obtenidos, 2) el efecto de la adherencia y no adherencia al tratamiento, 3) algoritmos de decisión propuestos, 4) los puntos de corte de ONe propuestos. En definitiva, la eficacia de la medición del ONe para la toma de decisiones terapéuticas está lejos de ser comprobada y se requieren

estudios mejor diseñados para obtener resultados concluyentes. Lo que sí parece ser más útil es considerar las variaciones en los niveles de ONe a lo largo del tiempo. El coeficiente de variación individual en sujetos sanos se sitúa en torno al 10%<sup>143,144</sup>, porcentaje que aumenta hasta un 20% en asmáticos<sup>143-145</sup>. De acuerdo con esto, el comité de expertos de la ATS decidió elegir este último punto de corte para considerar un cambio en el ONe como significativo a lo largo del tiempo o después de una intervención terapéutica <sup>84</sup>.

b. *Utilidad de la medición del ONe como marcador de cumplimiento del tratamiento.*

Los corticoides reducen la síntesis de ON inhibiendo la ONS, por lo que niveles elevados de ONe en pacientes asmáticos pueden ser debidos a insuficiente tratamiento antiinflamatorio, escasa adherencia o pobre técnica de inhalación<sup>146-148</sup>. Por el contrario, los niveles de ONe no se afectan por la administración de  $\beta$ -agonistas de acción corta ni prolongada, lo que concuerda con la idea de que estos agentes no tienen influencia sobre la inflamación crónica del asma. El tratamiento con montelukast disminuye en un 15-30% los niveles de ONe en niños con asma mientras que el tratamiento con corticoides puede hacer disminuir de forma significativa los niveles de ON 6 horas después de su uso en el caso de un corticoide nebulizado, y 2-3 días después del tratamiento con corticoides inhalados, obteniéndose un efecto máximo después de 2-4 semanas de la cumplimentación. Al

interrumpir el tratamiento con corticoides inhalados, incluso en pacientes que los han tomado hasta 4 años, se produce un aumento de los niveles de ON exhalado, demostrando la falta de un efecto inhibitorio sostenido sobre la producción de ON. La monitorización de los niveles de ONe en los pacientes que toman corticoides inhalados puede servir como parámetro de valoración del cumplimiento del tratamiento. Sobre esto existe poca evidencia científica, pero un estudio preliminar, realizado en 20 niños con asma, encontró que cuando el cumplimiento era <50%, los valores de ONe estaban elevados en el 80% de los casos<sup>149</sup>.

### **1.3.6 Medición de óxido nítrico en aire espirado**

La determinación de ON en aire espirado es una técnica no invasiva que permite cuantificar la concentración de ON que se encuentra en la vía aérea mediante el cálculo de la fracción espirada de ON. Fue la primera técnica que se desarrolló tras objetivar la presencia de grandes concentraciones de ON en la vía aérea y en especial en pacientes asmáticos.

#### **a) Metodología.**

Los niveles de ON en aire exhalado pueden medirse con exactitud mediante analizadores de quimioluminiscencia. Esta técnica se basa en la reacción del ON con el ozono que genera dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) en estado activo, el cual al estabilizarse emite una radiación lumínica proporcional a la concentración de ON en el aire espirado en partes por billón (ppb). Se trata de una técnica sencilla, no invasiva, y que proporciona un resultado rápido y sensible pudiendo detectar concentraciones de ON inferiores a 1 ppb.



El sensor de quimioluminiscencia es el equipo más ampliamente utilizado en la práctica clínica, siendo su uso exclusivamente hospitalario. Existen diferentes modelos en el mercado (SIR N-6008, LR 2000 analyser®, NIOX® Aerocrine), con diferencias en detalles complementarios (Figura 4). En la actualidad existen nuevos dispositivos como el que se expone en la Figura 5, se trata de un equipo portátil, de pequeñas dimensiones, que permite la medición de O<sub>2</sub> ambulatorio y en el domicilio del paciente sin requerir calibración. Se diferencia del equipo de quimioluminiscencia en que la medición se realiza a través de un sensor electroquímico que permite una medición más rápida y precisa.



**Figura 4.** Sensor de quimioluminiscencia CLD 88sp.

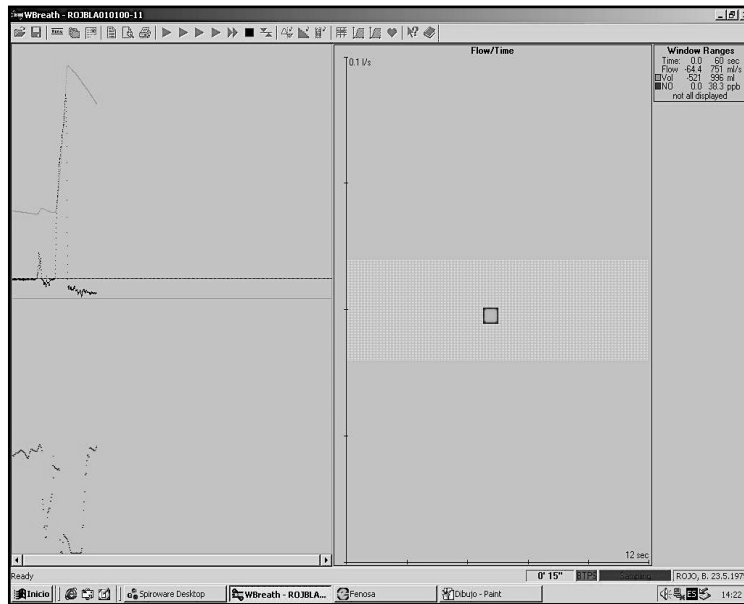


**Figura 5.** Sensor electroquímico portátil NIOX MINO® Aerocrine.

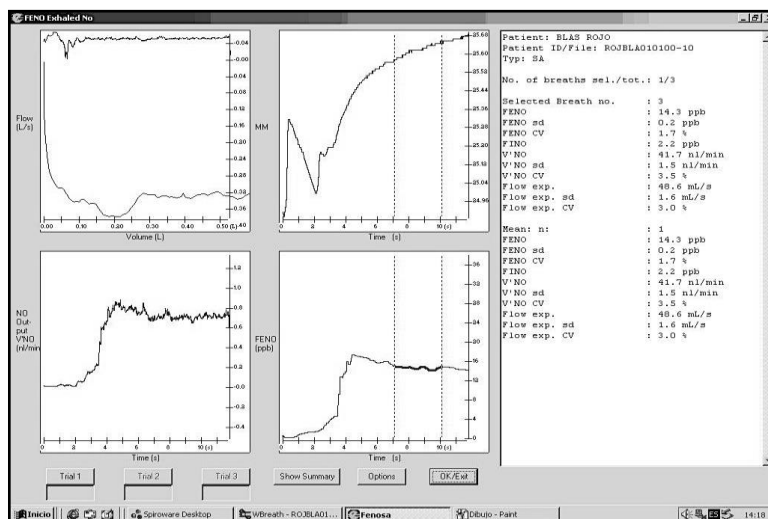
b) Método de determinación.

Existen dos métodos principales para medir el ON: el método *on line* (la muestra se analiza directamente en el dispositivo, en tiempo real) y la técnica *off line* (el aire exhalado se almacena en balones apropiados y la cuantificación del gas se hace con posterioridad). El procedimiento es el siguiente: El individuo debe estar sentado, de esta forma se permite un volumen de espacio muerto inferior a 10 ml 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 ON ambiental. A continuación se debe realizar una espiración al interior del equipo, no forzada, de entre 6 a 10 segundos de duración manteniendo un flujo constante de 50 ml/s. Esto se regula mediante una resistencia y con el control gráfico del flujo en la pantalla del dispositivo o del ordenador, tal y como se muestra en la Figura 6. Los niveles de ONe son inversamente proporcionales al flujo espiratorio. Por esta dependencia del flujo, las normativas internacionales recomiendan medir el ONe a un flujo de 50 ml/s en el cual la concentración de ON procede fundamentalmente de la difusión de ON en la vía aérea (Ver figura 7 y 8). Además la espiración se debe realizar inmediatamente después de llegar a capacidad pulmonar total para evitar mantener la respiración, algo que favorecería la acumulación de ON en la orofaringe. Se requieren 2 determinaciones con una variabilidad < 10% 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%.



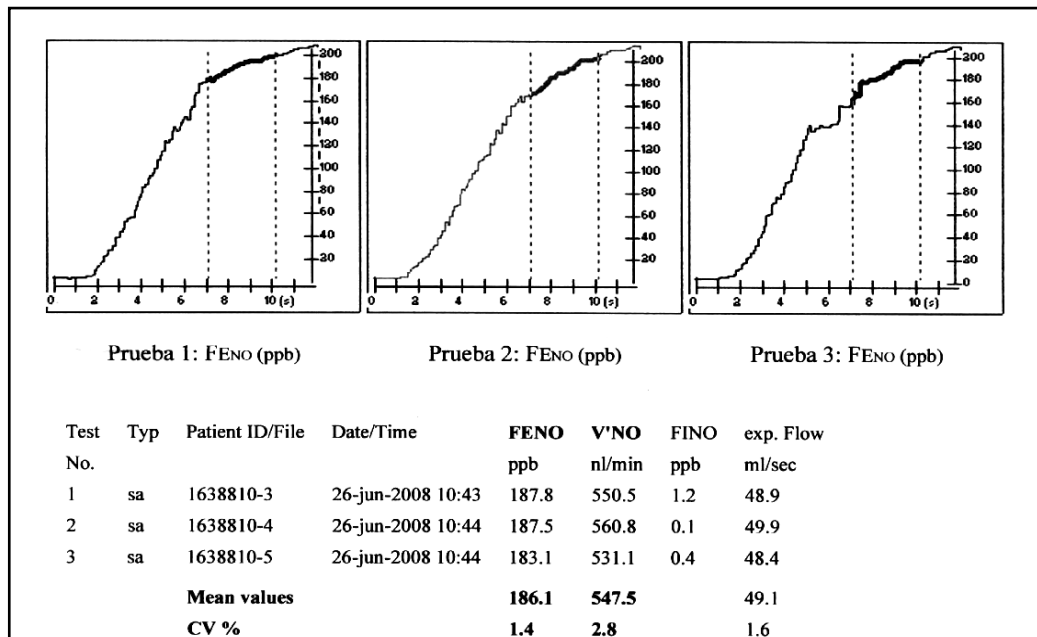
**Figura 6.** Maniobra de exhalación de óxido nítrico exhalado 50 ml/s.



**Figura 7.** Gráfica de medición de fracción de óxido nítrico en aire espirado con sensor de quimioluminiscencia CLD 88sp.

El analizador posee una resistencia bucal de entre 5 y 20 cmH<sub>2</sub>O que permite el cierre del velo del paladar. De esta forma se evita la comunicación con el ON que se encuentra en las fosas nasales. Además el equipo cuenta con un filtro que impide la contaminación con el ON ambiental.

Las dos técnicas están internacionalmente estandarizadas, sin embargo, la técnica on-line es la utilizada habitualmente en la práctica clínica y en los estudios de investigación siendo considerada como el *gold standard* para la medición del ONe<sup>80,82</sup>.



**Figura 8.** Curva de óxido nítrico en un sujeto asmático, obtenido a un flujo de 50 ml/s.

c) Factores que pueden influir en la determinación de óxido nítrico exhalado.

Existen diferentes factores, fármacos y enfermedades que cursan con alteración en la determinación de ONe y que deben tenerse en cuenta en el momento de interpretar el resultado junto con la historia clínica del paciente.

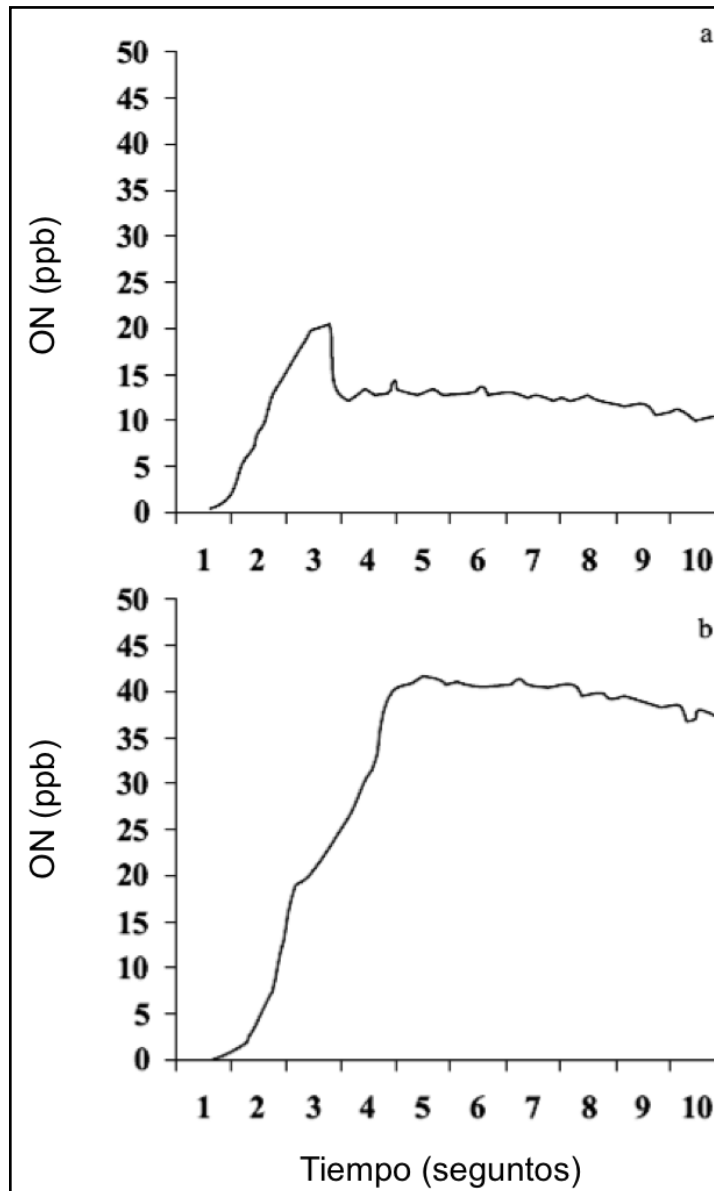
(Tablas 7 y 8)

*a. Factores del paciente:*

- Edad.
- Sexo.
- Maniobras respiratorias (velocidad de flujo en la exhalación, ver Figura 9).
- Calibre de la vía aérea.
- Ingesta de algunos alimentos o bebidas.
- Ritmo circadiano (por lo que se recomienda realizar todas las pruebas en el mismo horario).
- El ejercicio físico, puede disminuir la ONe por incremento del flujo.
- Infecciones de vías respiratorias altas y bajas, pueden llevar a niveles de ONe elevados.
- Tóxicos: las personas expuestas al tabaco, también de forma pasiva, presentan una menor concentración de ONe.
- Ingesta de medicamentos: los corticoides tal y como se ha visto ampliamente en la literatura disminuyen el ONe.

*b. Factores generales:*

- Procedencia del ON: La formación de ON como hemos visto es muy superior en las vías respiratorias altas que en las bajas. Por tanto la contaminación nasal es muy importante, pero mediante técnicas adecuadas es posible evitarla.
- ON en el aire ambiental: puede influir sobre todo en la recogida a volumen corriente donde la contribución del espacio muerto es mayor. Sin embargo, el empleo de técnicas de exhalación contra resistencia y la rápida captación del ON ambiental por la Hb del lecho capilar pulmonar evitan que el ON ambiental afecte la lectura del ONe.
- Flujo espiratorio elevado, puede dar un descenso de la ONe. Como hemos comentado, actualmente se aconseja un flujo estándar de 50 ml/s.
- Apnea: origina acumulación de ON procedente de la cavidad nasal, es causa de los picos iniciales en la determinación *on line*.



**Figura 9.** Curvas de óxido nítrico exhalado obtenidas en un mismo paciente: a) mediante un sistema convencional que utiliza un flujo elevado (250 ml/s), y b) mediante un método de detección que utiliza flujos bajos (45 ml/s). Puede observarse que, con flujos altos, se detecta un pico inicial de ON que se sigue de plateau, mientras que el pico inicial desaparece cuando la determinación se realiza a flujos bajos y sin pausa al final de la inspiración. Además, las concentraciones de óxido nítrico exhalado son más altas cuando se obtienen a flujos bajos.

**Tabla 7.** Factores que modifican la concentración de ONe.

| <b>Aumento ONe</b>     | <b>Disminución ONe</b>          |
|------------------------|---------------------------------|
| Dieta rica en nitratos | Espirometría                    |
| Fármacos ( IECA)       | Ejercicio físico                |
| Infección viral        | Hábito tabáquico                |
| Rinitis alérgica       | Ingesta de bebidas estimulantes |
| ON ambiental           |                                 |

**Tabla 8.** Enfermedades respiratorias que presentan alteraciones de la concentración de ONe.

| <b>Aumento ONe</b>      | <b>Disminución ONe</b> |
|-------------------------|------------------------|
| Asma                    | Discinesia ciliar      |
| Rinitis alérgica        | Fibrosis quística      |
| Neumopatía intersticial | Hipertensión pulmonar  |
| Cáncer de pulmón        | EPOC                   |
| Bronquiectasias         |                        |
| Tuberculosis pulmonar   |                        |
| EPOC                    |                        |

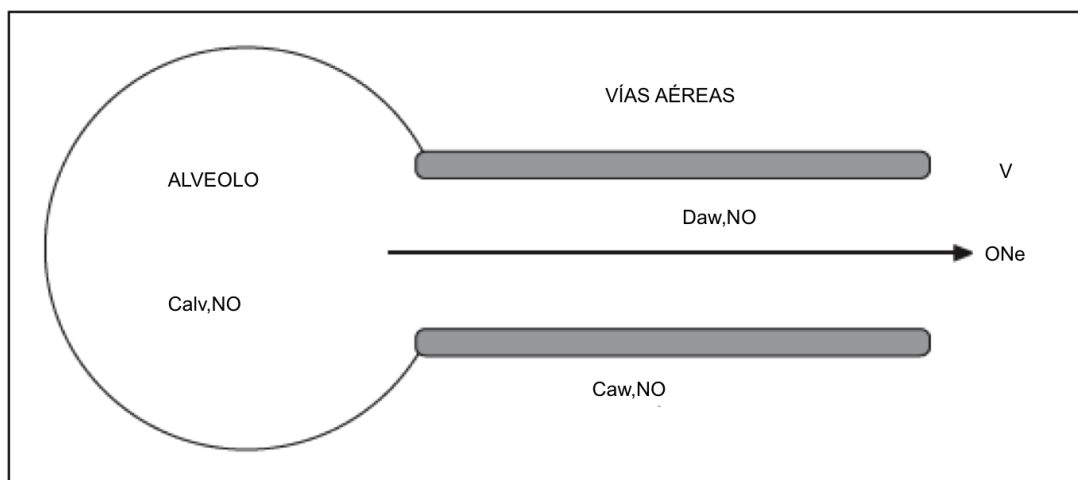


### 1.3.7 Limitaciones de la determinación de óxido nítrico exhalado

Una de las limitaciones del empleo del ON exhalado como biomarcador en el asma y específicamente en el manejo del tratamiento, es la falta de existencia de una curva dosis-respuesta adecuada con el empleo de corticoides inhalados, de forma que algunos autores han observado un *plateau* en la respuesta del ON con 400 µg de budesonida<sup>150</sup>. Según estos autores en pacientes tratados con dosis moderadas o altas de corticoides inhalados existirían pocas diferencias en los valores de ON en contraste con diferencias más importantes desde el punto de vista clínico en cuanto a la gravedad del asma. Por tanto, el ON exhalado podría no reflejar todos los cambios inflamatorios que se producen en los pacientes asmáticos. Otras limitaciones del ON exhalado con respecto a la monitorización de los pacientes asmáticos son las siguientes: a) los niveles de ON en los pacientes con asma no alérgico no están aumentados, b) la producción de ON puede aumentar transitoriamente en respuesta a infecciones víricas, por lo que no se debe determinar el ON inmediatamente tras una infección vírica, y finalmente c) existe una superposición de valores entre los controles normales y los pacientes asmáticos, pudiendo los asmáticos tener valores desde normales a muy elevados. Otros factores que pueden modificar el valor del ONe son: el tabaquismo que puede disminuirlo o la rinitis alérgica, que lo eleva tanto en época polínica como en no polínica.

## 1.4 MODELOS DE PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL PULMÓN

El ON se produce a lo largo del tracto respiratorio desde la nariz hasta los alveolos. Diversos autores han descrito un modelo matemático, denominado bicompartimental que se basa en la existencia de dos compartimentos bien diferenciados, el bronquial y el alveolar, y que permite diferenciar la contribución de las vías aéreas distales a la producción de ON<sup>151-153</sup> (Figura 10).



**Figura 10.** Representación esquemática del modelo bicompartimental para el análisis del óxido nítrico exhalado.

El ONe se origina fundamentalmente en las vías aéreas de conducción, aunque una pequeña cantidad procede directamente de los alveolos. Durante la espiración, el aire del alveolo es transportado a través de las vías aéreas y enriquecido por el ON que difunde desde la pared de las mismas<sup>154</sup>. De acuerdo con la ley de Fick, la liberación de ON hacia la luz bronquial es proporcional a la diferencia de concentraciones entre la pared bronquial y la luz. Por tanto, en cada punto de la luz bronquial existen dos factores que determinan la concentración de ON en el aire en tránsito. El primero es el flujo de aire desde la parte distal de la luz bronquial hasta el punto en cuestión. El segundo factor es la capacidad de difusión del ON desde la pared bronquial hacia la luz. De acuerdo con esto, la concentración al final del tubo bronquial, es decir, el nivel de ONe, es el resultado acumulativo del transporte longitudinal más la difusión lateral de ON a lo largo del árbol bronquial completo<sup>151</sup>.

El valor inicial para este proceso viene determinado por la concentración de ON en el aire alveolar ( $C_{alv,NO}$ ). A su vez la difusión de ON hacia la luz bronquial viene determinada por la concentración de ON en la pared bronquial ( $C_{aw,NO}$ ). Esta concentración es el resultado de un equilibrio entre su producción y su eliminación, que incluye la pérdida por difusión hacia la luz bronquial. Además, se debe tener en cuenta el flujo espiratorio, factor que tiene una influencia decisiva sobre la concentración de ON en el aire exhalado (al final del tubo). La extrapolación de medidas de la concentración de ON exhaladas a flujos espiratorios muy bajos, permite aproximar la situación de flujo cero y estimar la concentración de ON en la pared de las vías aéreas. En contraste, un flujo espiratorio extremadamente alto no permitiría que durante su tránsito a través de las vías aéreas, el aire exhalado tuviese tiempo para

enriquecerse con ON de la pared bronquial. La extrapolación a flujos espiratorio muy elevados permite equiparar la concentración de ON exhalado a la concentración alveolar de ON.

Si la liberación del ON desde la pared de las vías aéreas hacia su luz bronquial se produjese a un flujo constante, la cantidad de ON liberado dependería sólo del tiempo disponible para el paso a través de las vías aéreas y sería inversamente proporcional al flujo espiratorio. Sin embargo, se ha comprobado que la producción de ON por las paredes de las vías aéreas no es constante<sup>152</sup>. De hecho, las curvas de concentración de ON exhalado vs flujo espiratorio corresponden a una hipérbola, por lo que se asume que la liberación de ON por la pared de las vías aéreas disminuye a flujos bajos y aumentan a flujos altos<sup>151</sup>. Como la liberación de ON desde la pared de las vías aéreas a su luz se realiza por un proceso de difusión pasiva, la constante que describe el flujo de ON se denomina  $D_{aw,NO}$ , también llamada capacidad de difusión de ON en las vías aéreas<sup>151</sup>.

Partiendo de unas mismas  $C_{alv,NO}$  y  $C_{aw,NO}$ , la existencia de diferentes  $D_{aw,NO}$  determinará un comportamiento distinto de las curvas  $C_{e,NO}$  vs flujo espiratorio ( $V'$ ). La  $D_{aw,NO}$  depende de diversos factores, como la intensidad de la conversión química y el proceso de transporte. Puede disminuir por un aumento del grosor de las capas de fluido de las vías aéreas que impida la difusión y puede aumentar por el incremento de la superficie disponible para la liberación de ON. En pacientes con asma parece existir un incremento de la superficie de difusión, por lo que la  $D_{aw,NO}$  estaría aumentada.

Teniendo en cuenta las consideraciones previas, el modelo bicompartimental se concreta en la siguiente ecuación <sup>153,155,156</sup>:

$$ONe = Caw,NO \cdot (1 - e^{-Daw,NO/V'}) + Calv,NO \cdot e^{-Daw,NO/V'} \quad (1)$$

Donde ONe representa la concentración exhalada de ON, Caw,NO la concentración de ON efectiva en la pared de las vías aéreas, Calv,NO la concentración media de ON en los alveolos, Daw,NO la capacidad de difusión total de ON en las vías aéreas y V' el flujo espiratorio. ONe, Caw,NO y Calv,NO pueden ser expresadas en ppb, V' en L.s<sup>-1</sup> y Daw,NO en pl.s<sup>-1</sup> . ppb<sup>156</sup>.

A flujos espiratorios (V') muy bajos, la relación Daw,NO/V' resulta mayor, por lo que la potencia e<sup>-Daw,NO/V'</sup> tiende a cero. Por tanto, a flujos espiratorios muy reducidos, el ONe prácticamente sólo dependerá de la Caw,NO. Por el contrario, a flujos espiratorios muy altos, e<sup>-Daw,NO/V'</sup> tiende a uno, por lo que la ONe dependerá prácticamente sólo de la Calv,NO.

La ecuación (1) se puede simplificar como:

$$ONe = Caw,NO + (Calv,NO - Caw,NO) \cdot e^{-Daw,NO/V'} \quad (2)$$

A flujos espiratorios (V') elevados, el cociente Daw,NO/V' es muy pequeño, por lo que la expresión e<sup>-Daw,NO/V'</sup> se pueda aproximar a 1-Daw,NO/V'.

Con ello, la ecuación (2) puede ser expresada del siguiente modo:

$$ONe = Calv,NO + (Caw,NO - Calv,NO) \cdot Daw,NO/V' \quad (3)$$

Como habitualmente, la Calv,NO supone menos del 2% de la Caw,NO, se puede suprimir del segundo término de la ecuación anterior:

$$\text{ONe} = \text{Calv,NO} + \text{Caw,NO} \cdot \text{Daw,NO}/V' \quad (4)$$

Por último, si se multiplica la ecuación (4) por el flujo espiratorio ( $V'$ ), se obtiene:

$$\text{ONe} \cdot V' = \text{Calv,NO} \cdot V' + \text{Caw,NO} \cdot \text{Daw,NO} \quad (5)$$

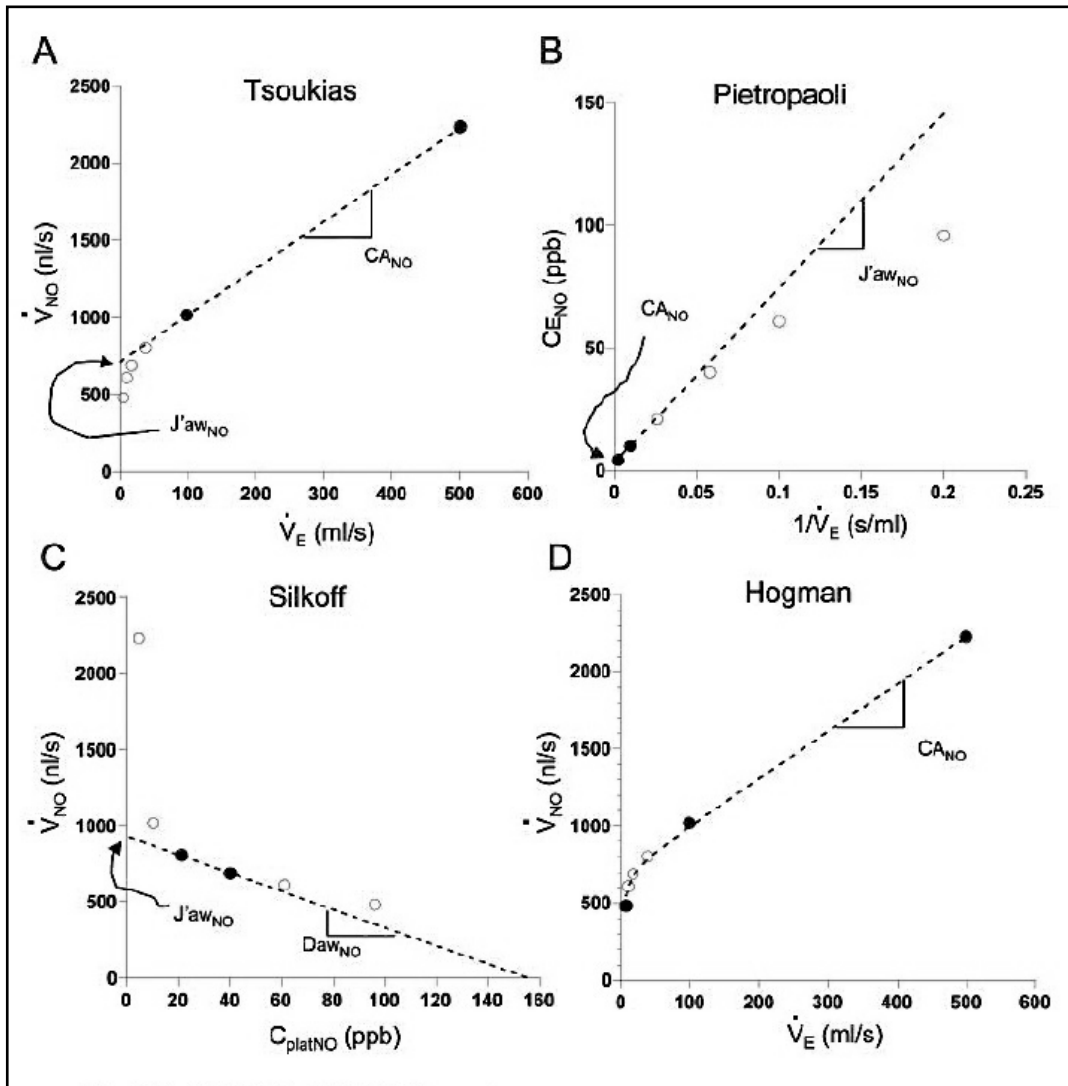
El producto  $\text{ONe} \cdot V'$  representa la tasa de eliminación de ON desde las vías aéreas ( $V'NO$ ), mientras que el producto  $\text{Caw,NO} \cdot \text{Daw,NO}$  corresponde al máximo flujo de ON en el compartimento bronquial ( $J'awNO$ , en  $\text{nl}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Por último, es posible reducir esta expresión a una relación lineal:

$$V'NO = \text{Calv,NO} \cdot V' + J'awNO \quad (6)$$

Realizando determinaciones de la  $V'NO$  a dos flujos espiratorios diferentes, los métodos lineales de Tsoukias<sup>155</sup> y de Pietropaoli<sup>157</sup> proporcionan valores de  $\text{Calv,NO}$  (pendiente de la recta) y  $J'awNO$  (ordenada en el origen).

Frente a estos métodos lineales, que sólo proporcionan algunos de los parámetros que caracterizan los modelos bicompartimentales, se han desarrollado técnicas no lineales como la de Silkoff<sup>156</sup> que nos permite obtener tres términos de la ecuación (3):  $\text{Calv,NO}$ ,  $\text{Caw,NO}$  y  $\text{Daw,NO}$ .

Por último, sobre este mismo modelo otros autores han elaborado aproximaciones matemáticas basadas en modelos mixtos más complejos, como el de Hogman<sup>158</sup> o George<sup>159</sup> que permiten obtener el cálculo de la mayor parte de componentes (Ver Tabla 9).



**Figura 11.** Esquemas que representan 4 diferentes técnicas analíticas que se han descrito en la literatura para estimar los parámetros independientes de flujo, utilizando un mínimo de 2 flujos espiratorios constantes y un máximo de 3. A: Técnica de Tsoukias; B: Técnica de Pietropaoli; C: Técnica de Silkoff; D: Técnica de Hofman.

**Tabla 9.** Técnicas de espiración constante a múltiples flujos\*.

| Técnica                                | Parámetros independientes del flujo |        |         |        | Espiración a múltiples flujos                 |
|--|-------------------------------------|--------|---------|--------|---|
|  | J'awNO                              | Daw,NO | Calv,NO | Caw,NO |   |
| <b>Tsoukias<sup>155</sup></b>          | X                                   |        | X       |        | 2 espiraciones a un flujo entre 100-500 ml/s  |
| <b>Pietropaoli<sup>157</sup></b>       | X                                   |        | X       |        | 2 espiraciones a un flujo entre 100-500 ml/s  |
| <b>Silkoff, 2-flujos<sup>152</sup></b> | X                                   | X      |         | X      | 2 espiraciones a un flujo entre 15-50 ml/s    |
| <b>Silkoff, 9-flujos<sup>152</sup></b> | X                                   | X      | X       | X      | 9 espiraciones a un flujo entre 4.2-1550 ml/s |
| <b>Hogman<sup>160</sup></b>            | X                                   | X      | X       | X      | 3 espiraciones a un flujo entre 5-500 ml/s    |
| <b>Tsoukias SB<sup>161</sup></b>       | X                                   | X      | X       | X      | 1 espiración a un flujo entre 6 ± 1% cambio   |

\*Modificado de *Modeling pulmonary nitric oxide exchange. George et al<sup>159</sup>*.

J'awNO (pl/s): flujo máximo total de ON en el compartimiento de la vía aérea; Daw,NO: capacidad de difusión del compartimiento de la vía aérea; Calv,NO (ppb): concentración media de óxido nítrico (ON) en el tejido alveolar; Caw,NO: concentración media de ON en la pared bronquial.



Pese al considerable desarrollo de estos modelos, todavía no se han generado valores de referencia para los diferentes parámetros de intercambio de ON. Como aproximación se considera que los valores de  $Calv,NO$  oscilan entre 1 - 5,6 ppb, los de  $J'awNO$  entre 420 - 1280  $pl.s^{-1}$ , la  $Daw,NO$  entre 3,1 - 9,2  $pl.s^{-1}.ppb^{-1}$ , y la  $Caw,NO$  entre 75 - 225 ppb <sup>159</sup>.

Desde un punto de vista práctico, el valor de  $ONE$  medido a 50 ml/s se considera un aceptable equivalente del  $J'awNO$ .

Los modelos bicompartimentales proporcionan una explicación sencilla a la dinámica de intercambio de ON. Sin embargo, su simplificación conlleva algunas limitaciones: a) No incluyen la región correspondiente a los bronquiolos respiratorios y terminales, b) Asumen una producción homogénea de ON a lo largo de las vías aéreas, c) Requieren maniobras con flujos espiratorios muy altos o muy bajos, que no siempre resultan fácilmente reproducibles. Sin embargo, la limitación más importante, proviene de la demostrada difusión axial del ON y de la propia geometría de las vías aéreas. En este sentido, se ha comprobado que los dos compartimentos propuestos no resultan completamente estancos y que una porción de la  $Calv,NO$  puede corresponder a ON producido en el compartimento bronquial que mediante difusión axial retrógrada llega a los alveolos.

Reconocidas estas limitaciones, en los últimos años se han desarrollado nuevas aproximaciones matemáticas y modelos de aplicación como el modelo axial y el modelo bicompartimental-axial.

El modelo axial analiza la difusión retrograda de ON que se produce desde la vía aérea hacia la región alveolar, contraria a la dirección de espiración, y que comporta una pérdida significativa de ON en el aire espirado.

El resultado es una subestimación del flujo máximo de ON de la vía aérea y de la concentración de ON en la pared de la vía aérea pudiendo dar falsamente valores elevados de Calv,NO e infraestimar valores de J'awNO.

El modelo bicompartimental-axial, desarrollado por Condorelli et al, incorpora la difusión axial y se adapta a una geometría en trompeta de las vías aéreas<sup>162</sup>. La incorporación de este análisis sobre el modelo bicompartimental incluye ecuaciones y algoritmos modificados más complejos. Así para tener en cuenta la difusión axial los autores añaden un factor de corrección: en la determinación de Calv,NO se le resta J'awNO/740 y en la determinación de J'awNO éste se multiplica por 1.7.

En comparación con el modelo bicompartimental simple, obtiene valores de J'awNO superiores y valores de Calv,NO inferiores y cercanos a 0.

También se han propuesto modelos de espiración a flujos variables, al finalizar una apnea o durante la respiración a volumen corriente<sup>163</sup>. Incluso, se ha diseñado un modelo tricompartmental respirando a volumen corriente, que evita las maniobras espiratorias prolongadas a flujos muy altos, que pueden resultar incómodas para niños o enfermos con un deterioro funcional importante<sup>164</sup>.

Recientemente, y en un intento de simplificar los cálculos, Paredi et al proponen un nuevo método para determinar las concentraciones de Calv,NO y J'awNO, basado en la determinación de las áreas bajo la curva del ONe a 50 ml/s y a 200 ml/s<sup>165</sup>.

Sin embargo, los datos sobre la validación de estos últimos procedimientos en asmáticos son muy limitados y todavía se dispone de muy escasa información que permita interpretar su potencial valor clínico.

## 1.5 UTILIDAD DEL MODELO BICOMPARTIMENTAL

Existe un creciente conocimiento del valor y significado de los diferentes parámetros que caracterizan los dos compartimentos pulmonares de producción de ON. La potencial aplicación de esta diferenciación anatómica, reside en estimar cuál es el lugar en el que asienta la inflamación eosinofílica en cada paciente concreto, lo que podría constituir un instrumento más en la diferenciación de grupos de enfermos.

Diferentes trabajos han objetivado que  $J'awNO$  se encuentra elevado en los enfermos con asma<sup>156,166</sup>. En estos estudios se ha señalado su relación con diversos indicadores clínicos, funcionales e inflamatorios de la enfermedad y su sensibilidad al tratamiento con corticoides inhalados<sup>156,167-169</sup>. Así en niños con asma leve, el  $J'awNO$  resulta mayor en los que tienen síntomas que en los asintomáticos, y a su vez, en éstos que en los controles sanos<sup>168</sup>. En estos niños, el  $J'awNO$  guarda relación no solo con la intensidad de los síntomas sino también con la limitación al flujo espiratorio medida a través de los flujos mesoespiratorios<sup>168</sup>. En adultos con asma tratados con corticosteroides inhalados, el  $J'awNO$  se ha relacionado con la función pulmonar basal (expresada como porcentaje del  $FEV_1$  predicho o por el cociente  $FEV_1$ /capacidad vital forzada –FVC-), así como con el grado de hiperrespuesta de las vías aéreas ( $PC_{20}$  a la metacolina)<sup>156</sup>, o el grado de reversibilidad bronquial. Esta última relación se evaluó en 179 niños con asma leve (69 sin tratamiento previo con corticoides) y 21 controles no atópicos ni asmáticos de la misma edad. La respuesta broncodilatadora alcanzó una moderada correlación con el  $J'awNO$ , pero sólo en los niños que no habían recibido corticoides inhalados<sup>169</sup>.

Dichos estudios también confirman el efecto de los corticoides sobre el J'awNO. En 25 adultos con asma, que nunca habían sido tratados con corticoides inhalados, dos semanas de tratamiento con beclometasona lograron reducir el J'awNO<sup>156</sup>. Asimismo, cuatro semanas de tratamiento con fluticasona, también redujeron el J'awNO en 40 adultos con asma moderada-grave, mientras que no afectaron a la concentración alveolar de ON<sup>166</sup>. A su vez, se ha comprobado que la disminución del J'awNO inducida por el tratamiento corticoideo se asocia a una reducción de la intensidad de los síntomas y a una mejoría de la función pulmonar y una disminución de marcadores séricos de inflamación eosinófila<sup>166</sup>.

En definitiva, el J'awNO en las vías aéreas refleja la tasa de producción tisular de ON, se asocia con los síntomas de asma y los datos de función pulmonar, y muestra la sensibilidad a la intervención con corticoides.

Por otra parte, se considera que la Calv,NO no suele estar elevada o experimenta un leve incremento en los pacientes con asma, tanto por la menor cuantía de la producción alveolar como por el aumento de la capacidad de difusión alveolo-capilar, que facilita su rápido paso al lecho vascular, donde se une a la hemoglobina<sup>167,170</sup>. Sin embargo, existen indicios de que algunos sujetos con asma podrían tener niveles elevados de Calv,NO. En asmáticos adultos no fumadores, clínicamente estables y en tratamiento con corticosteroides inhalados se han registrado valores elevados de Calv,NO, no relacionados con el FEV<sub>1</sub>, y que disminuyen tras un ciclo de corticosteroides sistémicos<sup>171</sup>. Este hallazgo podría reflejar la persistencia o falta de supresión con las dosis habituales de corticosteroides inhalados de la reacción inflamatoria a nivel alveolar o de los bronquiolos respiratorios. También existe

evidencia de que la Calv,NO guarda relación con el grado de inflamación de la pequeña vía aérea. Se ha demostrado la existencia de una correlación entre la Calv,NO y los eosinófilos recuperados mediante lavado broncoalveolar en enfermos con asma grave, así como con parámetros funcionales de afectación de la vía aérea distal, como el lavado de nitrógeno<sup>62,172</sup>. Es por ello que algunos autores sugieren la utilidad del Calv,NO como marcador clínico en pacientes seleccionados. En este sentido, en una publicación de Lehtimaki et al<sup>173</sup> en la que se incluyó un grupo de 40 asmáticos de recién diagnóstico y sin tratamiento corticoide, los autores compararon aquellos que tenían síntomas nocturnos con los que se encontraban asintomáticos y descubrieron que los niveles de J'awNO se hallaban similarmente elevados en los dos grupos de asmáticos en relación con los controles sanos. Por el contrario, comprobaron que la concentración alveolar de ON era superior en los asmáticos con síntomas nocturnos que en los asmáticos sin clínica nocturna o en los controles. Dado que el compartimento alveolar se corresponde a los alvéolos y a las pequeñas vías aéreas (bronquiolos respiratorios y terminales), los autores sugieren que en el asma nocturna existe una inflamación periférica más activa. Este hallazgo fue reforzado por la existencia de mayores niveles de mieloperoxidasa (MPD) e IL-6 en los pacientes con síntomas nocturnos, lo que incluso sugiere un cierto componente de inflamación neutrofílica. En consecuencia, parece que la medición de Calv,NO podría ser útil para identificar un mayor grado de inflamación periférica en este caso en pacientes con síntomas nocturnos.

En cuanto a la respuesta al tratamiento, niveles elevados de Calv,NO parecen mostrar una respuesta inflamatoria, no suficientemente controlada con los corticoides inhalados, que se relaciona con la percepción sintomática de los

pacientes y que podría mostrar afectación concomitante del parénquima pulmonar. Sin embargo los trabajos que evalúan la respuesta de Calv, NO al tratamiento corticoideo inhalado muestran resultados hasta el momento discordantes.

# JUSTIFICACIÓN

*“Las cosas no ocurren porque sí, todo tiene un motivo”*

*James Dashner*





## 2 JUSTIFICACIÓN

La inflamación en el asma constituye un elemento central de su patogenia y está presente en todas las formas clínicas de la enfermedad, independientemente de su gravedad<sup>174,175</sup>. Así, casi la totalidad de las estructuras existentes en la pared bronquial participan en este fenómeno, incluyendo el epitelio, el músculo liso, las glándulas secretoras de la submucosa, las células secretoras del epitelio, los vasos sanguíneos y las terminaciones nerviosas. El proceso inflamatorio causa infiltración celular, aumento de la permeabilidad vascular, edema y contracción del músculo liso que en algunos pacientes, conduce a lo largo de los años a una progresiva remodelación de las vías aéreas, cuyos componentes principales son depósito de colágeno, hipertrofia e hiperplasia del músculo liso y engrosamiento de la membrana basal. La inflamación interviene directa o indirectamente en la aparición de los procesos fisiopatológicos de la enfermedad, que incluyen la obstrucción al flujo aéreo y la hiperrespuesta bronquial<sup>176-178</sup>. Sus características pueden servir para diferenciar fenotipos de asma como el asma alérgica<sup>179</sup>, no alérgica<sup>180</sup>, ocupacional<sup>181</sup> o el exacerbado por aspirina<sup>182</sup>. Sin embargo, a pesar de que esta relación de la enfermedad con el proceso inflamatorio es ampliamente aceptada, el diagnóstico y monitorización del asma se sigue apoyando mayoritariamente en la valoración funcional respiratoria y en los datos subjetivos de control de la enfermedad. La medición de los cambios y la progresión de la inflamación, no se utiliza habitualmente por dificultades técnicas, falta de valores de normalidad en los parámetros a determinar, etc. No obstante el valor de su detección radica en su capacidad para monitorizar la

enfermedad, evaluar la respuesta al tratamiento, identificar diferentes grupos de enfermos y considerar la actitud terapéutica a adoptar. Es por ello que en los últimos años, ha aumentado el interés por medir la inflamación bronquial y estudiar su relación con el grado de actividad de la enfermedad, la hiperrespuesta bronquial, el remodelado de la vía aérea, etc. De ahí que, se haya impulsado la búsqueda de biomarcadores que nos permitan: a) analizar de manera no invasiva la calidad y magnitud de la inflamación subyacente; y b) ser útiles en diagnóstico, clasificación y seguimiento de la enfermedad, en el marco de una valoración multidimensional de la misma. La biopsia bronquial, el LBA y el cepillado bronquial son herramientas válidas para medir la inflamación existente en la vía aérea pero son invasivas. En la actualidad, existen otras técnicas no invasivas, como el análisis esputo inducido, el estudio del aire exhalado o la nariz electrónica, que pueden aportar información importante y precisa sobre el proceso inflamatorio de la vía aérea y que se están desarrollando como futuros biomarcadores de inflamación<sup>183</sup>. De entre todos ellos, el ONe es el más estudiado hasta la fecha. Se ha postulado como marcador inflamatorio dada su correlación con la eosinofilia que existe en la vía aérea<sup>17,106,109,119</sup>, su sencillez, reproducibilidad y carácter no invasivo, requiriendo menos experiencia que el recuento celular en el esputo y siendo menos costoso que otros métodos analizados. Sin embargo, y a pesar de su amplia utilización todavía existen dudas sobre valores de normalidad ya que los puntos de corte formulados para su aplicación en la práctica clínica no siempre son concordantes, bien porque derivan de estudios heterogéneos en cuanto a la población examinada, o porque utilizan diferentes técnicas de medición o analizadores, todo lo cual dificulta su interpretación e implementación.

Por otra parte, el desarrollo de los modelos bicompartimentales ha permitido analizar los cambios dinámicos del ON en la vía aérea<sup>153,157,159</sup>. El cálculo del J'awNO y la Calv,NO, supone un paso más en el estudio del asma y la categorización de la enfermedad, sin embargo la información disponible sobre su uso en el asma es todavía muy escasa<sup>184</sup>.

Teniendo en cuenta las discordancias en la utilidad del ON como biomarcador en el asma, y la falta de evidencia en torno al papel de sus componentes alveolar y bronquial en el manejo de la enfermedad, el presente trabajo se ha diseñado con la intención de definir valores de normalidad para Calv,NO y J'awNO en población sana. Evaluar su relación con parámetros demográficas, clínicos, funcionales, grado de control o calidad de vida en el asma, son algunos de los objetivos propuestos.



# OBJETIVOS

*“El motivo no existe siempre para ser alcanzado, sino para servir de punto de mira”*

*Joseph Joubert*



### 3 OBJETIVOS DEL PROYECTO

- a) Determinar valores de referencia en nuestro laboratorio para  $ONE$ ,  $Calv,NO$  y  $J'awNO$ , en individuos sanos, mediante la técnica de espiración constante a múltiples flujos, aplicando el modelo matemático de Condorelli.
- b) Estudiar la reproducibilidad de la técnica de medición de  $Calv,NO$  y  $J'awNO$ , empleada en nuestro laboratorio.
- c) Analizar las diferencias en el cálculo de  $Calv,NO$  y  $J'awNO$ , según los modelos bicompartimentales de Tsoukias y Pietropaolli y el modelo de difusión axial de Condorelli.
- d) Analizar la rentabilidad diagnóstica de la determinación de  $ONE$ ,  $Calv,NO$  y  $J'awNO$  en el asma.
- e) Evaluar la relación del  $ON$  con el resto de variables utilizadas en el estudio y seguimiento del asma; antropométricas, clínicas, funcionales y de control y calidad de vida en la enfermedad.





# SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

*“La disciplina es la parte más importante del éxito”*

*Truman Capote*



## **4 SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 SUJETOS**

#### **4.1.1 Grupo de pacientes con asma**

Para realizar el presente trabajo, se seleccionaron de forma prospectiva y durante un periodo de dos años, pacientes afectos de asma, procedentes de las Consultas Externas del Servicio de Neumología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

##### **a) Criterios de inclusión.**

Los criterios que debían cumplir para ser incluidos en el estudio fueron los siguientes: a) estar ya diagnosticados de asma, según los criterios propuestos por la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA)<sup>185</sup>; con o sin tratamiento esteroideo; b) edad superior a los 14 años e inferior a los 75; c) ausencia de otra patología asociada al asma y concomitante capaz de modificar los valores de ONe (bronquiectasias, enfermedades inflamatorias pulmonares, fibrosis quística, sinusitis etc) y; d) situación de estabilidad clínica del asma.

##### **b) Criterios de exclusión.**

Los criterios de exclusión fueron: a) síntomas o signos de infección respiratoria en las 8 semanas previas; b) incapacidad para realizar correctamente la maniobra de determinación del ONe y; c) no cumplimentación de cualquiera de los criterios de inclusión.

### **4.1.2 Grupo sujetos sanos**

#### a) Criterios de inclusión.

Se reclutó un grupo formado por sujetos voluntarios, aparentemente sanos, fumadores y no fumadores, sin enfermedades de base, con edades comprendidas entre los 14 y 75 años, con valores espirométricos dentro del margen de referencia, sin historia previa de patología pulmonar, tratamiento corticoideo, o infección de vías altas en los seis meses previos a las pruebas. Todos ellos completaron el cuestionario desarrollado por la International Union Against Lung and Tuberculosis Diseases (IUALTD) en 1984 y revisado en 1987<sup>186</sup>, utilizado para el cribado de enfermedades respiratorias, dada su sensibilidad para identificar patología respiratoria y su manejo sencillo y rápido. Los individuos que contestaron afirmativamente a alguna de las preguntas referentes a la presencia de síntomas bronquiales fueron excluidos del estudio.

### **4.1.3 Aspectos éticos**

La inclusión de los sujetos en el estudio se realizó previa información y consentimiento y, el estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe.

## **4.2 MÉTODO**

### **4.2.1 Diseño del estudio**

Se trata de un estudio transversal, observacional, comparativo de 2 cohortes de individuos: sanos o asmáticos.

El protocolo se desarrolló de forma secuencial y cada sujeto fue estudiado en dos sesiones consecutivas separadas por un intervalo máximo de

1 día. Estas sesiones fueron precedidas por una visita de cribado (visita 0) en la que se examinaba la adecuación del paciente a la finalidad del estudio (criterios de inclusión y exclusión). En caso afirmativo, el paciente era informado de los objetivos genéricos de la investigación solicitándole su consentimiento expreso para participar en la misma. Tras ser seleccionados, los pacientes eran citados en un plazo no superior a 3 días para la primera evaluación (visita 1) en la que se procedía a realizar la entrevista clínica, exploración física y extracción analítica; además en el grupo de pacientes asmáticos se suministraban los cuestionarios de control del asma (ACT<sup>187</sup> y el ACQ<sup>188</sup>) así como el cuestionario de calidad de vida AQLQ de Sydney modificado (AQLQ-Sm)<sup>189</sup>. Por otra parte, el grupo de sujetos sanos cumplimentaba el cuestionario de síntomas respiratorios de la IUALTD<sup>190</sup>. En un segundo día con el sujeto en ayunas, se realizaba una determinación de ONe siguiendo las recomendaciones señaladas por las normativas de consenso ATS/ERS de 2005<sup>80</sup>, efectuándose con posterioridad una espirometría forzada seguida del test broncodilatador, según la normativa SEPAR<sup>191</sup>.

Los voluntarios sanos se obtuvieron de los trabajadores del hospital, compañeros y familiares, a los que se les informó de la finalidad y protocolo del estudio y consintieron en participar.

En un subgrupo de sujetos sanos, se procedió a la repetición de la determinación del ONe en tres días consecutivos, con tal de evaluar la reproducibilidad de la técnica.

#### **4.2.1.1 Evaluación inicial en el grupo de pacientes asmáticos**

En la primera visita, una vez confirmados los criterios de selección, se

valoraron las siguientes características de los pacientes, mediante la anamnesis y exploración clínica:

- a) Variables demográficas y antropométricas: edad, sexo, peso y talla.
- b) Antecedentes personales:
  - Hábito tabáquico actual o previo, índice acumulado de tabaquismo.
  - Exposición laboral.
  - Antecedentes de patología rinosinusal y/o alergias.
  - Otras enfermedades.
  - Fármacos.
- c) Características evolutivas, desencadenantes, gravedad del asma: edad de inicio, periodicidad de los síntomas, antecedentes de asma familiar, tratamiento habitual, utilización de recursos sanitarios en el último año, antecedentes de asma de riesgo vital y sintomatología en el último mes.
- d) Grado de control del asma: la evaluación del grado de control del asma se realizó mediante los cuestionarios ya validados y adaptados para su uso en España: ACT<sup>187</sup>, y el ACQ<sup>188</sup>.
- e) Calidad de vida y asma: con el fin de evaluar la calidad de vida, se suministró el cuestionario de calidad de vida AQLQ-Sm<sup>189</sup>.

#### **4.2.1.2 Evaluación inicial en el grupo de sujetos sanos**

En los sujetos del grupo control se recogieron en la anamnesis las mismas variables que en el grupo de pacientes relativas a edad, género, índice de masa corporal (IMC), antecedentes personales (hábitos tóxicos, antecedentes de patología respiratoria o rinosinusal, medicación habitual, antecedentes de procesos inflamatorios en vías aéreas en los 6 meses previos). A todos los individuos del grupo control incluidos en el estudio se les

aplicó el cuestionario europeo de la IUALTD con el fin de valorar datos acerca de la presencia de síntomas respiratorios<sup>190</sup>. Los sujetos que contestaron afirmativamente a alguna de las preguntas referentes a la presencia de síntomas bronquiales fueron excluidos del estudio.

#### **4.2.1.3 Protocolo de estudio clínico en pacientes**

En los sujetos con diagnóstico de asma se realizaron las siguientes determinaciones:

##### **4.2.1.3.1 Determinación analítica**

Se obtuvo una muestra de sangre periférica para determinación de la IgE sérica total expresada en UI/ml. Además se realizó un hemograma para obtener el número de leucocitos/ml y el recuento de neutrófilos y eosinófilos expresados en porcentaje sobre el total de células.

##### **4.2.1.3.2 Determinación de ONe**

La determinación del ONe se realizó siguiendo las recomendaciones de la ATS<sup>80</sup>, mediante la técnica de espiración constante a un flujo de 50 ml/s. Para ello, se utilizó el analizador de quimioluminiscencia; DENOX 88 (*Analyzer CLD 88 series Eco Medics AG*), que calcula las concentraciones de ONe en ppb. Se utilizó el método *on line*, que facilita el cálculo de ONe a tiempo real mientras se realiza la maniobra de espiración. El procedimiento es el siguiente: el individuo debe estar sentado, de esta forma se consigue un volumen de espacio muerto inferior a 10 ml, con lo que se garantiza la rápida recogida de muestra de origen respiratorio. La maniobra consiste en 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 se

debe tener en cuenta la concentración de ON ambiental. Desde la capacidad pulmonar total se realiza una espiración al interior del equipo, no forzada, de duración entre 6 y 10 segundos, a un flujo constante de 50 ml/s, flujo en el cual la concentración de ON procede fundamentalmente de la difusión de ON en la vía aérea. Los niveles de ON espirado son flujo-dependiente, por eso, el flujo de espiración debe ser estable y asegurado por el equipo pues a mayores flujos de espiración la concentración de ONe disminuiría. La espiración debe realizarse inmediatamente después de llegar a la capacidad pulmonar total, sin apnea, algo que favorecería la acumulación de ON en la orofaringe. Durante la espiración un marcador visual ofrecido por el software del equipo ayuda al paciente a mantener la espiración al flujo requerido. Se requieren para el cálculo del ONe, al menos dos determinaciones con una variabilidad < 10% entre ellas, así como 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%. No es conveniente realizar más de 6 maniobras. El equipo facilita una gráfica que representa el resultado de ONe total (ppb) respecto al tiempo (s).

El analizador posee una resistencia bucal entre 5-20 cmH<sub>2</sub>O que asegura el cierre del velo del paladar y evita la contaminación con el ON procedentes de las fosas nasales, motivo por el cual no se requiere pinza nasal. Además el equipo cuenta con un filtro que impide la contaminación con el ON ambiental.

Previo a la determinación de ON se tuvieron en cuenta las siguientes recomendaciones:

- a) Evitar la toma de tratamiento broncodilatador inhalado y corticoide



inhalado y/o sistémico previamente a la medición. En los pacientes que estaban en tratamiento, no se interrumpía y se recogían los datos del fármaco, dosis y hora de la última toma.

- b) Realizar la medición al menos 2 horas después de la última ingesta.
- c) Evitar la ingesta de alimentos ricos en nitratos (verduras como lechuga y espinacas) así como la ingesta de bebidas estimulantes (café, té, alcohol) en las horas previas a la medición.
- d) Realizar la medición del ONe previamente a la realización de otras pruebas respiratorias como espirometría.
- e) Evitar la realización de ejercicio físico previa a la determinación.

La maniobra incluyó:

- a) Preparación del paciente.
  - a. Se observaron las condiciones físicas del paciente para la realización de la prueba.
  - b. Se comprobó que las recomendaciones requeridas se cumplían.
  - c. Se acomodó al sujeto y se le explicó el procedimiento.
- b) Preparación del equipo.
  - a. El equipo debía estar calibrado y preparado para su utilización.
  - b. Se recogía en hoja de datos los niveles de ON ambiental.
  - c. Se colocaba la boquilla o el filtro en el tubo de la espiración.

#### **4.2.1.3.3 Cálculo de los componentes alveolar y bronquial del óxido nítrico**

La técnica es similar a la que se utiliza para la determinación del ONe, la diferencia se encuentra en la necesidad de realizar la espiración a diferentes flujos y no solo a 50 ml/s, el utilizado para la determinación del ONe. Empleamos 4 flujos adicionales: 100, 150, 200, y 250 ml/s -técnica de espiración constante a múltiples flujos-, de los cuales elegimos dos para el cálculo de  $J'_{awNO}$  y  $Calv,NO$ , según las ecuaciones de Tsoukias y Pietropaoli, previamente descritas. Para tener en cuenta la morfología en trompeta y la difusión axial los valores de  $Calv,NO$  se corrigieron de acuerdo con el método propuesto por Condorelli et al:  $Calv,NO \text{ corregido} = Calv,NO - (J'_{awNO} / 740)$ . La corrección para los valores de  $J'_{awNO}$  se realizó multiplicando los valores iniciales por 1,7<sup>162</sup>.

#### **4.2.1.3.4 Espirometría forzada y test broncodilatador**

A todos los pacientes se les realizó una espirometría forzada siguiendo las recomendaciones establecidas en la normativa de la SEPAR<sup>191</sup>. Para ello se utilizó un espirómetro COLLINS modelo GS Modular System (Palex), cuyo principio de detección de flujo está basado en un neumotacógrafo tipo Fleisch. La prueba suponía siempre la realización de, al menos, tres maniobras técnicamente satisfactorias, con una variabilidad entre las mismas menor del 5% o 100 ml y un máximo de 8 maniobras. El inicio de la espiración forzada se obtuvo por extrapolación retrógrada de la curva volumen-tiempo.

Los parámetros seleccionados para cada sujeto fueron el  $FEV_1$ , la FVC, el cociente  $FEV_1/FVC$  y los porcentajes respecto a los valores teóricos de cada paciente. Como parámetros de referencia se utilizaron los teóricos de población adulta de Roca<sup>192</sup>.

Los posibles cambios en la obstrucción bronquial de nuestros pacientes, se valoraron con el estudio de su reversibilidad y en aquellos casos cuya prueba broncodilatadora fue negativa con el cálculo de la respuesta broncoconstrictora.

La prueba broncodilatadora se realizó el mismo día de la espirometría forzada mediante la administración de 600 µg de salbutamol, inhalado con cartucho presurizado a través de una cámara espaciadora tipo Volumatic®. La respuesta se evaluó mediante otra espirometría realizada a los 20 minutos, siguiendo las recomendaciones SEPAR<sup>191</sup>.

#### **4.2.1.3.5 Prueba de provocación bronquial con metacolina**

Para la realización de esta prueba se siguieron las indicaciones recogidas en la normativa SEPAR<sup>193</sup>. Se utilizó metacolina como agente broncoconstrictor, empleando el método de respiración a volumen corriente durante 2 min<sup>194</sup>. Tras la práctica de una espirometría basal, el paciente inhalaba el diluyente (solución salina al 0,9%) durante 2 min y a continuación se administraba la metacolina, a dosis dobladas, hasta conseguir un descenso del FEV<sub>1</sub> igual o superior al 20% respecto al basal, o bien hasta alcanzar una dosis de metacolina de 16 mg/ml.

La metacolina fue preparada en viales estériles por el Servicio de Farmacia del hospital a diluciones consecutivamente dobladas desde 2 ng/ml hasta 16 ng/ml. Las diferentes soluciones en concentraciones descendentes desde 2 mg/ml hasta 0,0125 mg/ml, fueron elaboradas en el Laboratorio de Exploración funcional de Neumología, disueltas en cloruro sódico al 9%. En todo momento se respetaron las condiciones de conservación y la estabilidad del producto (no exposición a la luz y mantenimiento en nevera a 4°C). Se

utilizó como placebo suero fisiológico estéril.

Los criterios para elegir la dosis inicial de metacolina fueron los siguientes (Tabla 10)<sup>194</sup>: *a*) en pacientes con valores basales de FEV<sub>1</sub> y FEV<sub>1</sub>/FVC superiores al 70 y el 80%, respectivamente, y caída del FEV<sub>1</sub> menor del 10% con el diluyente, se comenzaba con 2 mg/mL en caso de que no tomaran ninguna medicación, con 1 mg/ml si tomaban ocasionalmente broncodilatadores, con 0,25 mg/ml si utilizaban éstos a diario y con 0,125 mg/ml si estaban en tratamiento con corticoides inhalados (CI) u orales; *b*) en pacientes con FEV<sub>1</sub> inferior al 70% y/o FEV<sub>1</sub>/FVC menor del 80% y caída del FEV<sub>1</sub> por debajo del 10% tras el diluyente, se iniciaba la prueba con 0,03 o con 0,125 mg/ml según estuvieran recibiendo o no CI u orales, y *c*) en los pacientes que tras el diluyente presentaban un descenso del FEV<sub>1</sub> superior al 10%, la primera dosis de histamina era de 0,03 mg/ml. En todos los casos, si el descenso del FEV<sub>1</sub> detectado tras una dosis de metacolina era inferior al 5%, se procedía a suprimir la dosis inmediatamente posterior, salvo cuando la concentración de metacolina utilizada era de 2 mg/ml; en esta situación se optó por no suprimir la dosis posterior para mayor seguridad del paciente, ya que, al cuadruplicar la cantidad de fármaco, la diferencia de concentraciones entre ambas dosis era, a nuestro entender, demasiado elevada. Terminada la prueba, los pacientes recibieron 600 µg de salbutamol mediante cartucho presurizado con cámara espaciadora.

Se suspendieron antes de la prueba las medicaciones β-agonistas, bromuro de ipratropio, cromonas, teofilina, antagonistas de los leucotrienos y los antihistamínicos según las recomendaciones de la SEPAR<sup>193</sup>.

La respuesta broncoconstrictora se expresó a través del cálculo de la PC<sub>20</sub>.

La PC<sub>20</sub> se obtuvo por interpolación lineal entre los dos últimos puntos de la curva dosis-respuesta, y calculada con la siguiente fórmula:

$$PC_{20}: \text{Anti log} \left( \log C_1 + \frac{(\log C_2 - \log C_1) (20 - R_1)}{R_2 - R_1} \right)$$

C<sub>1</sub>: Concentración de metacolina anterior a la caída del 20%.

C<sub>2</sub>: Concentración de metacolina posterior a la caída del 20%.

R<sub>1</sub>: % de caída del FEV<sub>1</sub> después de C<sub>1</sub>.

R<sub>2</sub>: % de caída después de C<sub>2</sub>.

También se obtuvo la deltaFVC que representa el porcentaje de descenso de la FVC cuando el FEV<sub>1</sub> cae un 20% respecto a basal. Refleja el grado de atrapamiento aéreo debido a la broncoconstricción producida durante el TPB y algunos estudios la señalan como mejor indicador para la gravedad del asma que la PC<sub>20</sub><sup>195</sup>.

**Tabla 10.** Criterios utilizados para elegir la concentración inicial de metacolina en la prueba de provocación bronquial con el protocolo abreviado, de acuerdo con las recomendaciones de la ERS.

| <b>Espirometría basal</b>   | <b>Dosis inicial de metacolina (mg/ml)</b> |
|---|--|
| <b>FEV<sub>1</sub>&gt; 70%, FEV<sub>1</sub>/FVC&gt; 80%, sin respuesta al diluyente</b> |  |
| <b>Sin medicación</b>   | 2  |
| <b>BD no diariamente</b>  | 1  |
| <b>BD diariamente</b>   | 0,25                                       |
| <b>Corticoides inhalados</b>  | 0,125                                      |
| <b>FEV<sub>1</sub>&gt; 70%, FEV<sub>1</sub>/FVC&gt; 80%, sin respuesta al diluyente</b> |  |
| <b>Corticoides inhalados</b>  | 0,03                                       |
| <b>Resto de pacientes</b>   | 0,125                                      |
| <b>Caída del FEV<sub>1</sub>&gt; 10%</b>  | 0,03                                       |

BD: broncodilatadores, FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo, FVC: capacidad vital forzada.

#### **4.2.1.3.6 Valoración del grado de control y calidad de vida en la enfermedad**

Todos los pacientes cumplimentaron los cuestionarios ACT y ACQ.

El cuestionario ACT, consta de 5 preguntas relacionadas con la frecuencia de los síntomas asmáticos y el uso de medicación de rescate que el paciente ha necesitado en las 4 semanas previas. Las puntuaciones pueden oscilar desde 5 (peor control) a 25 (control total). Este cuestionario ha sido validado al castellano<sup>187,196</sup>. Se ha estudiado la relación de este cuestionario con los grados de control según la Global initiative for asthma (GINA) u otros criterios fijados en cada estudio, para establecer los puntos de corte del mismo. Así, se han indicado valores de  $ACT \geq 20$  para el asma controlada<sup>196,197</sup>, mientras que para el asma no controlada se han sugerido valores de ACT que oscilan desde  $\leq 15$ ,  $\leq 17$ <sup>197</sup>,  $\leq 19$ <sup>187,198,199</sup> o  $\leq 20$ . Estos puntos de corte son dependientes, en gran medida de los criterios aplicados para definir el control de la enfermedad, siendo aún escasos los estudios que han aplicado como criterio los niveles de control recogidos en la GINA.

El ACQ es un cuestionario diseñado para la evaluación del grado de control del asma, tanto en la práctica clínica como en estudios clínicos. Consta de 7 ítems puntuados de 0 a 6, que hacen referencia a 5 síntomas distintos del asma durante la última semana (despertarse por la noche, gravedad de los síntomas al despertarse, limitación en las actividades, falta de aire y sibilancias), al tratamiento con agonistas  $\beta_2$  de acción corta y a la función pulmonar medida mediante el FEV<sub>1</sub>. La puntuación total se calcula como la media de los 7 ítems, y puede situarse entre 0 (buen control) y 6 (control extremadamente pobre)<sup>188</sup>.

El AQLQ-Sm es un cuestionario autorrellenable que consta de 22 preguntas. Éstas hacen referencia al estado del paciente en las últimas 4 semanas y se agrupan en cuatro dimensiones que recogen: sensación de ahogo, estado de ánimo, restricción social y preocupación. Las opciones de respuesta para cada ítem se sitúan en una escala equidistante de 7 puntos, donde 1 = máxima limitación y 7 = ausencia de limitación. El cuestionario proporciona una puntuación global, que es la media para todos los ítems, y una puntuación para cada dimensión, que es la media de los ítems correspondientes. De este modo, el rango posible de puntuaciones oscila entre 0 y 7, siendo las puntuaciones más bajas las que indican una peor calidad de vida.

#### **4.2.1.4 Protocolo de estudio clínico en sujetos sanos. Determinación de valores normales**

En sujetos del grupo sanos se realizó una espirometría forzada y se determinó el ONe con la técnica de espiración constante a múltiples flujos, para establecer los patrones de normalidad y poderlos comparar con los del grupo de estudio.

#### **4.2.1.5 Cronograma de trabajo**

El tiempo estimado para la ejecución del presente trabajo se estimó en 3 años repartidos de la siguiente forma: a) durante los primeros 24 meses se realizó la selección adecuada de los pacientes, las diferentes visitas y aplicación de las diversas pruebas a realizar en cada una de ellas; b) en los 2 meses siguientes se llevó a cabo la construcción final de la base de datos; c) análisis de los datos (2 meses); y d) redacción final de los resultados (10



meses).

## **4.3 PROCESAMIENTO DE DATOS. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **4.3.1 Cálculo del tamaño de la muestra**

El valor de Calv,NO del grupo control se estima que debe estar alrededor de 2,4 ppb. Consideramos clínicamente significativa una diferencia en dichos valores entre el grupo control y el grupo de pacientes con asma de 1,4 ppb. A partir de los datos de la literatura asumimos una desviación estándar de 1,4. Teniendo en cuenta un riesgo  $\alpha$  de 0,05, riesgo  $\beta$  de 0,05 y una prueba bilateral, estimamos 90 pacientes en cada grupo, contando con un 10% de pérdidas.

### **4.3.2 Análisis estadístico**

El análisis realizado en el presente estudio, comprende 3 partes bien diferenciadas. El primer aspecto, corresponde al estudio descriptivo de las variables principales del trabajo (ONe, Calv,NO y J'awNO), tratando de establecer su distribución, fiabilidad y validez en sujetos sanos, con el fin de definir los valores de referencia en nuestro laboratorio.

En segundo lugar se estimó la capacidad de cada una de ellas para diferenciar por separado, entre sujetos asmáticos y sanos. Para este objetivo, se utilizó el análisis bayesiano a fin de conocer la probabilidad y capacidad diagnóstica de dichas variables.

Finalmente, mediante la aplicación de modelos probabilísticos logísticos se estudió la influencia de diferentes variables cuantitativas y cualitativas en la estimación de asma.

Como herramienta estadística para el cálculo de los datos se utilizó el

programa IBM SPSS Statistics versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU).

#### **4.3.2.1 Descripción de variables**

Inicialmente se procedió a comprobar la normalidad de distribuciones de cada una de las variables principales continuas. Para ello empleamos el test de Kolmogorov-Smirnov ( $p > 0,05$ ). Los valores de medida central y dispersión se exponen en el texto y en las tablas como valores medios  $\pm$  desviación estándar y las variables categóricas mediante frecuencias absolutas y porcentajes. Aquellas variables que no seguían una distribución normal, se expresan como mediana y rango intercuartílico ( IQR).

Los valores de referencia se elaboraron mediante modelos de regresión lineal múltiple. Se utilizó el método de introducción de variables de *stepwise* para identificar los factores pronósticos independientes de los valores de ONe, Calv,NO y J'awNO introduciendo inicialmente en la ecuación como posibles variables explicativas la edad, el sexo, el peso, la talla y el IMC. En cualquier caso se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ .

#### **4.3.2.2 Estudio de fiabilidad de las determinaciones de ONe, Calv,NO y J'awNO**

La medición del ONe constituye una buena alternativa para valorar el grado de inflamación eosinofílica presente en la vía aérea. De acuerdo con el modelo bicompartimental, resulta factible cuantificar el ON originado en el espacio alveolar y el procedente del propio árbol bronquial . Sin embargo, está todavía por definir con exactitud si los valores de Calv,NO y J'awNO son reproducibles a lo largo del tiempo. Por este motivo y como paso previo al

análisis de los datos objeto de esta tesis, fue necesario realizar un estudio de fiabilidad del ONE y de sus componentes alveolar y bronquial. Para su estudio se eligió en un subgrupo de sujetos sanos y no fumadores, en los que se llevó a cabo una determinación de ONE, durante 4 días consecutivos, entre las 11 y 12 de la mañana y habiendo transcurrido siempre más de 3 horas desde la toma de un desayuno ligero.

La reproducibilidad de las determinaciones fue estimada midiendo los correspondientes coeficientes de correlación intraclass (CCI). El CCI es el índice estadístico más apropiado para cuantificar la fiabilidad de las mediciones asociadas a variables cuantitativas. De acuerdo con la clasificación de Fermanian, se consideró como aceptable un  $CCI > 0,75^{200}$ .

#### **4.3.2.3 Análisis de concordancia para los valores de Calv,NO y J'awNO obtenidos aplicando diferentes modelos matemáticos**

Tal y como hemos comentado previamente, los valores de Calv,NO y J'awNO pueden ser calculados por diferentes modelos matemáticos, entre ellos, los más utilizados en la práctica clínica son el de Tsoukias y el de Pietropaolli. Con el fin de establecer el grado de concordancia entre ambos, se utilizó el CCI y el análisis de las diferencias individuales de Altman y Bland. Para aplicar este último modelo, se construye una gráfica donde el eje de ordenadas (y) representa la diferencia entre las mediciones (A-B) y el eje de abscisas (x) representa la media de ambas mediciones  $((A+B)/2)$ . De esta manera, el gráfico permite investigar cualquier posible relación entre el error de la medida y el valor real, evaluar la magnitud del desacuerdo entre mediciones o identificar valores *outliers*.

#### **4.3.2.4 Análisis univariado diferencial entre asma y sanos**

Para realizar las comparaciones entre variables cuantitativas en sujetos sanos y asmáticos, si seguían una distribución normal, aplicamos el test de la t de Student para datos no apareados o el análisis de varianza ANOVA. En caso contrario se empleó el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. El nivel de significación mínima se estableció en 0,05.

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

#### **4.3.2.5 Estudio de correlación entre las variables. Análisis bivariado**

Todas las variables, se incluyeron en un análisis bivariado de correlación que se ejecutó de forma independiente para los pacientes con asma y sujetos sanos. Se tuvieron en consideración los coeficientes de correlación de Pearson -r- cuando el nivel de significación estadística era  $< 0,05$ . De este modo, intentamos detectar la colinealidad de las variables representadas en cada dominio entre sí, y con las demás. Asimismo, nos permitió apreciar las diferencias en el comportamiento de estas relaciones con el resto de variables, tanto en el grupo de asma y como en el de sanos.

Cuando las variables no seguían una distribución normal aplicamos el test de Spearman.

#### **4.3.2.6 Análisis bayesiano**

Con el propósito de determinar la concentración de ONe, Calv,NO y J'awNO, capaces de predecir el diagnóstico de asma, para cada valor obtenido de ONe, Calv,NO y J'awNO se calcularon, la S y E, el valor predictivo positivo (VPP) y el VPN. A partir de esos datos se construyeron las curvas de eficacia

diagnóstica a fin de hallar el mejor punto de corte para ONe, Calv,NO y J'awNO (valor con mejor S y E) y se determinaron las áreas bajo la curva, con su IC del 95%, buscando estimar los índices de exactitud diagnóstica global; aceptando que áreas bajo la curva cercanas a 1 indican que la discriminación de la prueba es excelente.

Tomando como elemento de partida los puntos de corte obtenidos para ONe, y J'awNO determinamos finalmente las probabilidades posprueba de asma tras obtener valores de ONe, y J'awNO superiores (VPP) o inferiores (1-VPN), y las probabilidades posprueba de no asma tras un VPN para cada probabilidad preprueba (PPP) posible, de acuerdo con el teorema de Bayes:

$$VPP = \frac{PPP \times \text{sensibilidad}}{PPP \times \text{sensibilidad} + [(1-PPP) \times (1-\text{especificidad})]}.$$
$$VPN = \frac{(1-PPP) \times \text{especificidad}}{(1-PPP) \times \text{especificidad} + [PPP \times (1-\text{sensibilidad})]}.$$

La PPP es la estimación que hace el clínico, expresada en términos de probabilidad, antes de que se conozcan los resultados de la prueba que va a realizarse. En nuestro caso sería la probabilidad de presentar asma que, a juicio del clínico, según su experiencia u otros datos ya conocidos, tiene el paciente antes de las mediciones de óxido nítrico. Aplicando las fórmulas antes citadas, es factible calcular el VPP y el VPN de cada una de las posibles PPP (desde 0,1 hasta 1) con la sensibilidad y especificidad halladas para el punto de corte de ONe, y J'awNO estimados como mejor.

Con el fin de analizar la diferencia entre la probabilidad preprueba de la enfermedad y la probabilidad posprueba obtenida por el resultado de la prueba, se estudió la ganancia diagnóstica (G).

La ganancia diagnóstica aportada por la respuesta positiva de la prueba se calculó para ONe y JáwNO con la siguiente ecuación:

$$G (+): VPP- P$$

La ganancia diagnóstica aportada por la respuesta negativa de la prueba se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$G (-) : P- (1-VPN)$$

El conjunto de la ganancia diagnóstica alcanzada por la aplicación de la prueba, o contenido diagnóstico ( $\gamma$ ) de la prueba es igual a la suma de estas dos ganancias diagnósticas:

$$\Gamma = G (+) + G(-)$$

#### **4.3.2.7 Análisis multivariante**

Se utilizó el análisis factorial para reducir o reagrupar el conjunto inicial de variables utilizadas habitualmente en el diagnóstico y seguimiento del asma, en otros más pequeños y homogéneos de variables relacionadas. El análisis factorial, es una técnica de reducción de dimensionalidad de los datos, cuyo propósito último consiste en buscar el número mínimo de dimensiones capaces de explicar el máximo de información contenida en los datos<sup>201</sup>. Como método de extracción de factores se empleó el método de componentes principales y para determinar el número de factores que se extraían se estableció como punto de corte los valores específicos  $\geq 1,00$ . Se realizó rotación de factores con el método varimax para fortalecer el agrupamiento de las variables alrededor del factor asociado. Los registros anotados en la matriz de factores rotados representan los pesos de las variables en relación con cada factor y reciben el nombre de cargas de factor. Al tratarse de una rotación ortogonal, su intervalo oscila entre -1,00 y +1,00.

# RESULTADOS

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un  
esfuerzo total es una victoria completa”*

*Mathama Gandhi*





## **5 RESULTADOS**

### **5.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO**

#### **5.1.1 Características generales de los sujetos**

Entre Junio de 2010 y Mayo de 2013 se incluyeron en el estudio 237 adultos afectos de asma y 154 controles sanos (134 hombres y 257 mujeres; edad media 38 años, rango 14-75 años).

La características demográficas, antropométricas, clínicas y funcionales de la población de estudio se muestran en la siguiente tabla. Como se observa, los dos grupos fueron comparables en cuanto a edad, sexo e IMC.

**Tabla 11.** Características demográficas, antropométricas, clínicas y funcionales de la población de estudio\*. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (DE).

|                                  | <b>Grupo asma<br/>(n: 237)</b> | <b>Grupo control<br/>(n: 154)</b> |
|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Edad (años)                      | 39,8 $\pm$ 14,6                | 37,1 $\pm$ 13,8                   |
| Sexo (V/M)                       | 83/154                         | 51/103                            |
| Talla (m)                        | 1,64 $\pm$ 0,1                 | 1,65 $\pm$ 0,1                    |
| Peso (Kg)                        | 71,2 $\pm$ 14,2                | 66,9 $\pm$ 13,8                   |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> )         | 26,3 $\pm$ 4,8                 | 24,3 $\pm$ 4,5                    |
| Fumador (S/N)                    | 52/185                         | 31/123                            |
| Rinitis (S/N)                    | 94/143                         | 0/154                             |
| Atopia (S/N)                     | 118/119                        | 0/154                             |
| FEV <sub>1</sub> (% v. ref)      | 97,2 $\pm$ 17,2                | 108,8 $\pm$ 12,9                  |
| FVC (% v. ref)                   | 108,5 $\pm$ 16,7               | 109,1 $\pm$ 13,7                  |
| FEV <sub>1</sub> /FVC (% v. ref) | 76,2 $\pm$ 9,6                 | 85,7 $\pm$ 6,6                    |
| MEF <sub>25/75</sub> (% v. ref)  | 66,9 $\pm$ 26,7                | 96,1 $\pm$ 23,4                   |

## **5.1.2 Características basales del grupo de pacientes con asma**

### **5.1.2.1 Características demográficas**

El rango de edad de los 237 pacientes con asma, osciló entre 14 y 75 años con una edad media de  $39,8 \pm 14,6$ . Ochenta y tres fueron varones (35%) y 154 mujeres (65%).

### **5.1.2.2 Características clínicas**

El grado de tabaquismo se estableció en función de su situación en el momento del estudio. Constatamos que 111 sujetos (46,8 %), tenían historia de tabaquismo, siendo 52 (21,9%) fumadores activos. El resto no presentaban antecedentes de tabaco. El valor medio del nº de paquetes/año fumados por los asmáticos fumadores fue de  $12,7 \pm 14,9$  (mediana 9; IQR: 3-16,2) .

La media de años desde el diagnóstico de asma fue de  $4,84 \pm 8,2$  (mediana 1,5; IQR: 0,4-6). Nuestra serie estaba formada por pacientes ambulatorios y la mayoría de ellos nunca habían precisado de ingreso en el hospital por agudización de su sintomatología respiratoria, ni de cuidados intensivos. La media de ingresos en nuestros pacientes fue de  $0,17 \pm 0,5$  (rango de 0-3) Los síntomas que más frecuentemente relataban los enfermos fueron tos (49,1%) y disnea (40%).

51 pacientes (23,7%) asociaban comorbilidades, siendo la más frecuente la hipertensión arterial (Tabla 12). En cuanto a los antecedentes clínicos de atopia; un 40,9% de los pacientes refería historia de rinitis mientras que un 51,3% presentaban antecedentes de prick-test a neuroalergenos positivo.

Respecto al tratamiento para el asma, 111 pacientes (46,8%) no estaban recibiendo esteroides inhalados ni sistémicos en el momento del estudio.

El grado de control y gravedad de la enfermedad se estableció siguiendo las recomendaciones de GINA<sup>163</sup>. Entre los pacientes asmáticos sin tratamiento esteroideo (n=111); un 58,6% (65) presentaban un asma intermitente, un 33,3% (37) un asma persistente leve y un 8,1% (9) persistente moderado. Entre los pacientes asmáticos con tratamiento esteroideo (n=126); un 15,9% (20) presentaban un asma intermitente, un 61,1% (77) un asma persistente leve, un 19,8% (25) persistente moderado y un 3,2% (4) persistente grave. Según los grados de control de GINA, en el grupo de tratamiento, un 57,1% (72) mostraba un asma bien controlada, un 38,1% (48) estaba parcialmente controlado y el 4,8% (6) manifestaba un mal control. También se recogieron datos de control según los cuestionarios ACT y ACQ. El ACT registró valores medios de  $20,21 \pm 4,3$  y el ACQ de  $0,94 \pm 0,8$ .

**Tabla 12.** Comorbilidades más frecuentes en pacientes asmáticos.

|                              | n  | %    |
|------------------------------|----|------|
| <b>Hipertensión arterial</b> | 21 | 41,2 |
| <b>Dislipemia</b>            | 10 | 19,6 |
| <b>Depresión</b>             | 7  | 13,7 |
| <b>Hipotiroidismo</b>        | 6  | 11,7 |
| <b>Diabetes</b>              | 6  | 11,7 |
| <b>Artrosis</b>              | 5  | 9,8  |

### **5.1.2.3 Pruebas de laboratorio**

La determinación de IgE total, se obtuvo en 152 asmáticos. Su valor medio fue de  $208,4 \pm 379,7$  UI/ml con un rango de 2 a 3734 UI/ml. Su mediana fue 92,1 UI/ml (IQR: 32,3-250,5). El estudio en sangre periférica de los neutrófilos y de los eosinófilos, se expresó como porcentaje sobre el número total de leucocitos. El porcentaje medio de eosinófilos en sangre fue de  $4,6 \pm 3,5$  % con un rango de 0,1 a 27%, mediana de 3,7% (IQR: 2,5-5,7) mientras que el de neutrófilos fue de  $53,9 \pm 11,5$  % con un rango de 28,1-90,8%, mediana 51 % (IQR: 47-60).

### **5.1.2.4 Características funcionales**

59 pacientes presentaban una alteración ventilatoria obstructiva en la espirometría, el grado de obstrucción basal se cuantificó con el FEV<sub>1</sub>. El 81,4% presentaba una obstrucción leve, el 11,9% moderada y el 6,8% moderadamente grave.

La reversibilidad de la obstrucción se valoró con la respuesta obtenida al administrar el salbutamol inhalado. El test broncodilatador (TBD) fue positivo en 80 pacientes (33,7%). La media del porcentaje de cambio para el FEV<sub>1</sub>, en el total de pacientes, fue  $8,4 \pm 9,4$  %, para la FVC fue de  $2,6 \pm 6,4$  %, y para los flujos mesoespiratorios  $26,82 \pm 27,47$ %. Entre los pacientes con TBD positivo, la media del porcentaje de cambio para el FEV<sub>1</sub> fue de  $19,7 \pm 9,7$ %, para la FVC  $8,8 \pm 7,8$ % y para los flujos mesoespiratorios  $50,3 \pm 31,3$ %.

Se realizaron 157 test de provocación bronquial con metacolina. Los motivos por los que algunos pacientes no llegaron a someterse al test fueron: a) presentar una espirometría forzada con un TBD positivo, b) no aceptar el

consentimiento escrito para la prueba, y c) haber suspendido la prueba antes de llegar al final por no entender el procedimiento.

Los valores de PC<sub>20</sub> obtenidos fueron: mediana 1,1 mg/ml (IQR: 0,2-3,7). La deltaFVC tuvo valores medios de  $11,2 \pm 5,6\%$ .

### **5.1.3 Características basales del grupo control**

El número total de sujetos incluidos en este grupo fue de 154.

La edad media fue de  $37,1 \pm 13,8$  años, con un rango de 14 a 73 años. Hubo 51 varones (33,1%) y 103 mujeres (63,9%). De ellos, 91, que suponen un 59,1% de la muestra, nunca habían sido fumadores, 21 (13,6%) eran fumadores activos, con un índice medio de año/paquete de 13,2, 10 (6,5%) eran fumadores ocasionales y 32 (20,8%) ex fumadores de más de 1 año.

Ningún sujeto tenía antecedentes de rinitis o atopia.

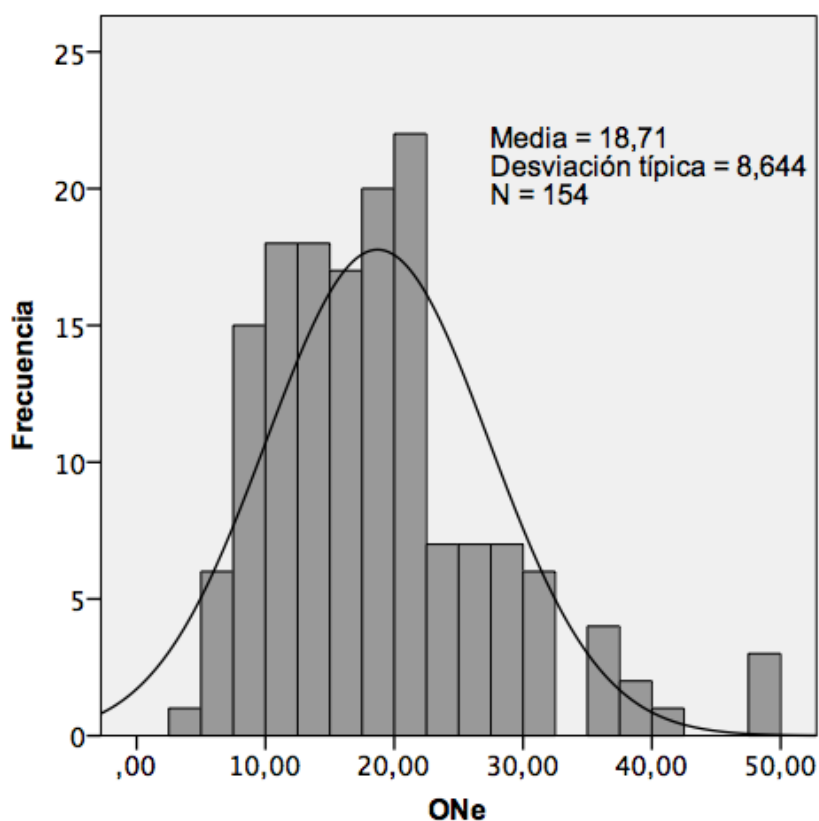
### **5.1.4 Comparación de las características basales entre el grupo con asma y el grupo control**

El grupo control fue comparable estadísticamente en todas las variables al grupo de pacientes con asma, salvo en las que le exigían para ser control: sin historia previa de patología pulmonar, sin tratamiento corticoideo, sin antecedentes de infección de vías altas en las 8 semanas previas.

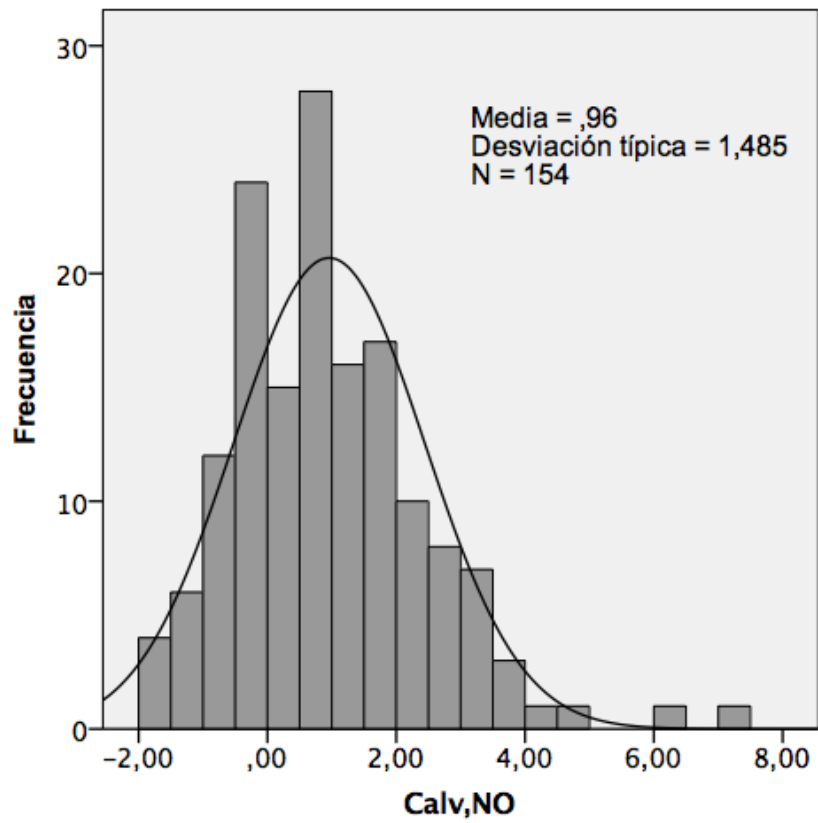
## 5.2 DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN AIRE EXHALADO EN SUJETOS SANOS

### 5.2.1 Análisis descriptivo

Los valores de ONe, Calv,NO y J'awNO en el grupo de sujetos sanos, se muestran en los siguientes gráficos. Como puede observarse en población sana, las distribución de los valores muestra un rango de normalidad (Kolmogorov-Smirnov). Los valores de Calv,NO y J'awNO se expresan según las estimaciones de Condorelli.

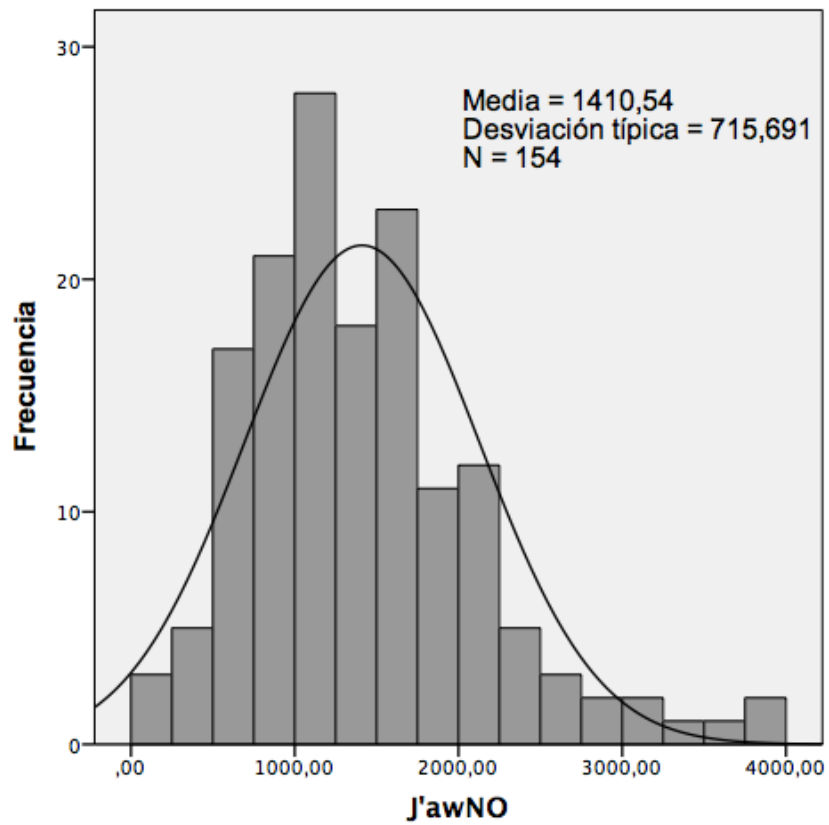


**Figura 12:** Distribución de los valores de ONe a 50 ml/s en el grupo de sujetos sanos.



**Figura 13:** Distribución de los valores de la Calv,NO, según Condorelli, en el grupo de sujetos sanos.





**Figura 14:** Distribución de los valores de J'awNO, según Condorelli, en el grupo de sujetos sanos.

La tabla 13, muestra los distintos valores de ONe en sujetos sanos, según el flujo utilizado y, los de Calv,NO o J'awNO, según las ecuaciones de Tsoukias, Pietropaolli y las correcciones de Condorelli.

**Tabla 13.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar para ON en el grupo de sujetos sanos, a distintos flujos de medición, y para Calv,NO y J'awNO, según diferentes modelos matemáticos.

|                            | <b>Sanos<br/>(n: 154)</b> |
|----------------------------|---------------------------|
| ONe (50 ml/s) ppb          | 18,7 $\pm$ 8,6            |
| ONe (100 ml/s) ppb         | 10,5 $\pm$ 4,9            |
| ONe (150 ml/s) ppb         | 7,5 $\pm$ 3,3             |
| ONe (200 ml/s) ppb         | 6,2 $\pm$ 2,7             |
| ONe (250 ml/s) ppb         | 5,1 $\pm$ 2,2             |
| Calv,NO (Tsoukias) ppb     | 2,1 $\pm$ 1,5             |
| J'awNO (Tsoukias) pl/s     | 831,8 $\pm$ 417,8         |
| Calv,NO (Pietropaolli) ppb | 2,2 $\pm$ 1,6             |
| J'awNO (Pietropaolli) pl/s | 816,3 $\pm$ 409,1         |
| Calv,NO (Condorelli) ppb   | 0,9 $\pm$ 1,4             |
| J'awNO (Condorelli) pl/s   | 1410,5 $\pm$ 715,7        |

## **5.2.2 Ecuaciones de referencia para ONe, J'awNO y Calv,NO**

La determinación de ONe es una técnica cada vez más empleada en los laboratorios de función pulmonar, sin embargo el cálculo de sus componentes alveolar y bronquial todavía está relegado al campo de la investigación, siendo necesaria más información sobre el método más adecuado para su determinación o cuáles son sus valores de referencia, con el fin de aplicar su examen a la práctica clínica habitual. En el siguiente apartado analizamos los valores de referencia para el ONe, Calv,NO y J'awnO en población adulta y sana.

### **5.2.2.1 Oxido nítrico en aire espirado**

Las ecuaciones de referencia para población sana en nuestro laboratorio (excluyendo a los sujetos fumadores) se obtuvieron mediante un análisis de regresión lineal múltiple en el que introdujimos como variables independientes: edad, sexo, peso y talla, por ser aquellas que más se han utilizado en la literatura. El resultado final (método de backward), mostró una ecuación significativa, en la que solo estaban presentes la edad y el peso, si bien solo explicaban el 14% de la variabilidad del ONe, siendo el error típico de la estimación de 7,9. No encontramos diferencias en cuanto al sexo. La tabla 14 muestra los coeficientes de regresión para la ecuación.

**Tabla 14.** Coeficientes de regresión parcial para la ecuación mínimo-cuadrática de ONe.

|           | Coeficientes no estandarizados |              | Coeficientes tipificados | t   | P     |
|-----------|--------------------------------|--------------|--------------------------|-----|-------|
|           | B                              | Error típico | Beta                     |     |       |
| Constante | 2,5                            | 3,5          |                          | 0,7 | 0,5   |
| Edad      | 0,1                            | 0,05         | 0,2                      | 2   | 0,04  |
| Peso      | 0,2                            | 0,05         | 0,3                      | 3,6 | 0,000 |

Por tanto, la ecuación de referencia para el ONe sería:

$$\text{ONe} = 2,5 + 0,1 \times \text{edad} + 0,2 \times \text{peso}$$

El intervalo de referencia se estableció como el intervalo de confianza al 95%, para el ONe en sujetos sanos, no fumadores: 2,6 – 36 ppb.

### 5.2.2.2 Componente bronquial de óxido nítrico

El modelo para el J'awNO también incluyó inicialmente peso, talla, sexo y edad. Por el mismo método de análisis, obtuvimos una ecuación significativa en la que solo estaba presente la variable peso, que explicaría el 12% de la variabilidad del J'awNO, siendo el error típico de la estimación de 666,3. No encontramos diferencias en cuanto a la edad, o el sexo.

**Tabla 15.** Coeficientes de regresión parcial para la ecuación mínimo-cuadrática de J'awNO.

|           | Coeficientes no estandarizados |              | Coeficientes tipificados | t   | P     |
|-----------|--------------------------------|--------------|--------------------------|-----|-------|
|           | B                              | Error típico | Beta                     |     |       |
| Constante | 217,5                          | 289,6        |                          | 0,7 | 0,4   |
| Peso      | 18,7                           | 4,2          | 0,4                      | 4,4 | 0,000 |

Por tanto, la ecuación de referencia para el J'awNO sería:

$$J'awNO = 217,5 + 18,7 \times \text{peso}$$

El Intervalo de referencia se estableció como el intervalo de confianza al 95% para el J'awNO, en sujetos sanos, no fumadores: 86,4-2879 pl/s.

### 5.2.2.3 Concentración alveolar de ON

Los valores de Calv,NO no se vieron influidos por ninguna de las variables utilizadas en los modelos previos. Ninguna ecuación fue significativa para explicar la variabilidad del Calv,NO.

El Intervalo de referencia para el Calv,NO en sujetos sanos, no fumadores, se estableció como el intervalo de confianza al 95%: (-2,1) - 3,7 ppb.

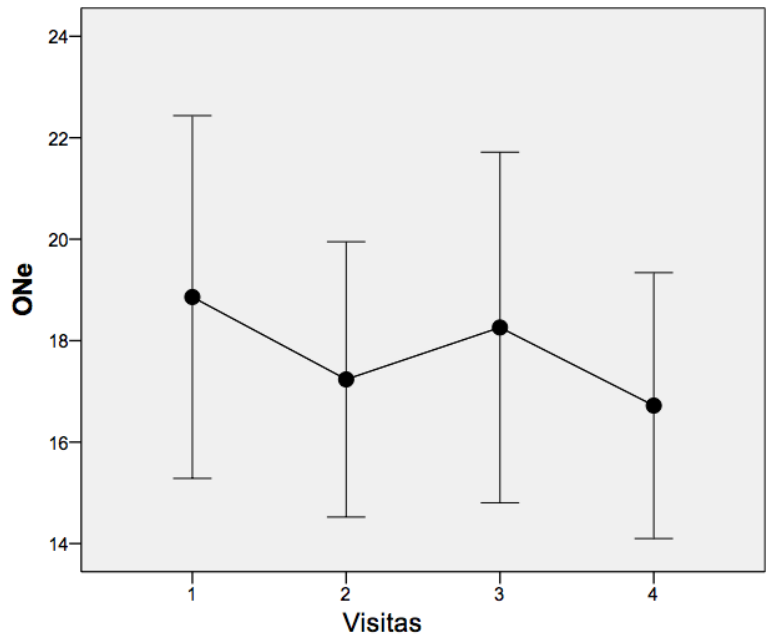
### 5.2.3 Resultados del estudio de fiabilidad de las determinaciones de óxido nítrico exhalado

Para valorar la reproducibilidad de las determinaciones de ONe, J'awNO y Calv,NO, estudiamos un subgrupo de 30 sujetos sanos, no fumadores, en los

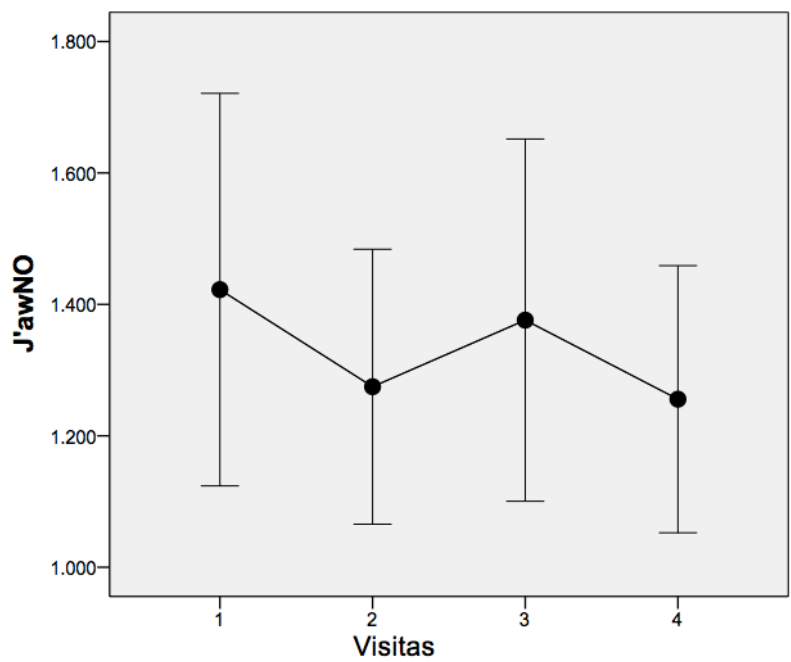
que se realizó una determinación de ONe durante 4 días consecutivos, tal y como se especificó en el capítulo de material y métodos. La reproducibilidad de las mediciones de ONe, J'awNO y Calv,NO, obtenidas aplicando los diferentes modelos matemáticos para su cálculo, se estimó determinando los correspondientes CCI.

Las figuras 15, 16 y 17 muestran los valores medios y desviación estándar para ONe y, J'awNO y Calv,NO ( según Condorelli) en cada uno de los días de estudio.

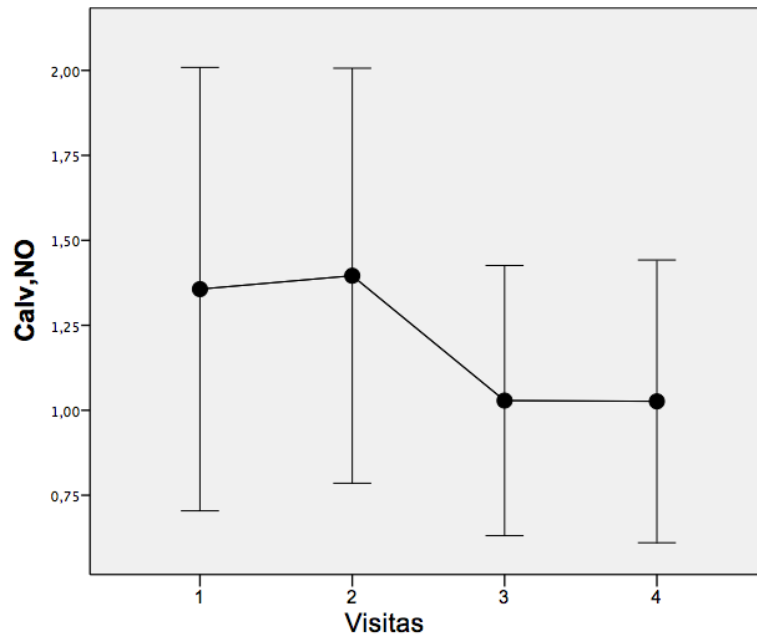
Los resultados confirman la fiabilidad de las determinaciones con un CCI > 0,9 para ONe y J'awNO y de 0,7 para Calv,NO.



**Figura 15.** Valores medios y DE para ONE en cada uno de los días del estudio.



**Figura 16.** Valores medios y DE para J'awNO en cada uno de los días del estudio.



**Figura 17.** Valores medios y DE para Calv,NO en cada uno de los días del estudio.

La siguiente tabla muestra los valores de los diferentes CCI.

**Table 16.** Valores de los diferentes CCI e intervalos de confianza (IC) al 95% obtenidos para los valores de ONe, J'awNO y Calv,NO.

|                | CCI  | IC 95%    | p     |
|----------------|------|-----------|-------|
| <b>ONe</b>     | 0,94 | 0,90-0,97 | 0,000 |
| <b>J'awNO</b>  | 0,91 | 0,85-0,96 | 0,000 |
| <b>Calv,NO</b> | 0,75 | 0,54-0,89 | 0,000 |



### 5.2.4 Análisis de concordancia de los valores de J'awNO y Calv,NO obtenidos aplicando diferentes modelos matemáticos en sujetos sanos

Tal y como hemos comentado previamente, existen diferentes modelos matemáticos para el cálculo de los componentes alveolar y bronquial del ONe. Entre ellos, los modelos bicompartimentales de Tsoukias y Pietropaoli han adquirido notable protagonismo al ser utilizados en la práctica clínica habitual con el fin de diferenciar la magnitud de la inflamación existente en ambos compartimentos del tracto respiratorio. El siguiente análisis se realizó con el propósito de evaluar hasta que punto los valores de J'awNO y Calv,NO obtenidos por estos dos métodos resultan comparables.

La correlación entre los valores de Calv,NO y J'awNO según Tsoukias y Pietropaoli fue altamente significativa;  $r = 0,99$ ,  $p = 0,000$  para J'awNO; y  $r = 0,96$ ,  $p = 0,000$  para Calv,NO. La tabla 17 muestra la media de los valores de oxido nítrico alveolar y bronquial, para el grupo de sanos, según las distintas ecuaciones matemáticas utilizadas y su correspondiente CCI.

**Tabla 17.** Valores ( media  $\pm$  DE) de Calv,NO ( ppb) y J'awNO ( pl/s) obtenidos, según los modelos de Tsoukias y Pietropaoli y CCI (entre paréntesis: intervalo de confianza 95%) en el grupo sanos.

|      | <b>Tsoukias</b>           | <b>Pietropaoli</b>        | <b>CCI ( IC 95%)</b> |
|------|---------------------------|---------------------------|----------------------|
| SANO | Calv,NO: 2,1 $\pm$ 1,5    | Calv,NO: 2,2 $\pm$ 1,6    | 0,97 (0,96-0,98)     |
|      | J'awNO: 831,8 $\pm$ 417,8 | J'awNO: 816,3 $\pm$ 409,1 | 0,99 (0,99-0,99)     |

Posteriormente a los modelos bicompartimentales, Condorelli y sus colaboradores desarrollaron un algoritmo para caracterizar el intercambio del ON, teniendo en cuenta la morfología en trompeta de la vía aérea e incluyendo la difusión axial. Esta modificación del modelo bicompartimental original propuesto por Tsoukias y George tiene en cuenta el flujo lineal del aire desde el alveolo a la boca y corrige para la contaminación del aire alveolar con ON procedente de la luz bronquial que refluye hacia el alveolo (difusión axial). En consecuencia evita que se infravalore el ON elaborado en el compartimento bronquial y que se sobreestime el producido en la zona alveolar.

Cuando comparamos en nuestra población los valores de  $J'_{awNO}$  y  $Calv,NO$  obtenidos por el modelo de bicompartimental según Tsoukias y el modelo de difusión axial según Condorelli encontramos diferencias estadísticamente significativas. Valores de  $J'_{awNO}$  en torno a 831,8 (Tsoukias) vs 1410,1 pl/s (Condorelli), y de  $Calv,NO$  2,1 (Tsoukias) vs 0,9 ppb (Condorelli). La correlación entre ambos valores según los diferentes métodos de cálculo, fue significativamente fuerte;  $r: 0,87$ ,  $p= 0,000$  para  $Calv,NO$  y  $r: 0,99$ ;  $p= 0,000$  para  $J'_{awNO}$ . El análisis de concordancia mostró un CCI de 0,67 (IC 95%: 0,54-0,76) para  $J'_{awNO}$  y un CCI de 0,79 (IC 95%: 0,72-0,85) para  $Calv,NO$ .

## 5.3 DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN AIRE EXHALADO EN PACIENTES ASMÁTICOS

### 5.3.1 Análisis descriptivo

En el conjunto de pacientes asmáticos los valores de ONe, J'awNO y Calv,NO no siguieron una distribución normal, los valores se describen como mediana y rango intercuartílico.

**Tabla 18.** Valores ON en el grupo de pacientes asmáticos, a distintos flujos de medición, y para Calv,NO y J'awNO, según diferentes modelos matemáticos. Valores expresados como mediana y rango intercuartílico (IQR).

|                            | <b>Grupo asma<br/>(n: 237)</b> |
|----------------------------|--------------------------------|
| ONe (50 ml/s) ppb          | 37 (IQR: 17,1-72,1)            |
| ONe (100 ml/s) ppb         | 20,3 (IQR: 9,6-39,6)           |
| ONe (150 ml/s) ppb         | 15 (IQR: 6,7-27,4)             |
| ONe (200 ml/s) ppb         | 13 (IQR: 6,3-25)               |
| ONe (250 ml/s) ppb         | 10 (IQR: 5-20)                 |
| Calv,NO (Tsoukias) ppb     | 2,1 (IQR: 1-5,7)               |
| J'awNO (Tsoukias) pl/s     | 1700 (IQR: 778,3-3366,7)       |
| Calv,NO (Pietropaolli) ppb | 2,6 (IQR: 1- 6,7)              |
| J'awNO (Pietropaolli) pl/s | 1608,5 (IQR:748,8-3294,2)      |
| Calv,NO (Condorelli) ppb   | 0,4 (IQR: -1,2-1,9)            |
| J'awNO (Condorelli) pl/s   | 2890 (IQR: 1323,1-5723,4)      |

Las tablas 19 y 20 muestran los valores de Calv,NO y J'awNO, obtenidos según los modelos matemáticos de Tsoukias, Pietropaolli y Condorelli en los distintos grupos de edad, y sexo, tanto en sujetos sanos como en asmáticos. Los valores se expresan como media  $\pm$  DE.

**Tabla 19. Valores de Calv,NO y J'awNO (media ± DE) según los modelos bicompartimentales de Toukias y Pietropaoli y el modelo de difusión axial de Condorelli. Valores para asmáticos y sanos en los distintos grupos de edad y sexo.**

|      |             | HOMBRES                                     |   |   | MUJERES                                       |   |   |
|------|-------------|---|---|---|---|---|---|
|      |             | <30<br>(n= 31)                              | 30-50<br>(n= 36)                              | >50<br>(n= 16)                                | <30<br>(n= 44)                                | 30-50<br>(n= 62)                              | >50<br>(n= 46)                                |
| ASMA | Tsoukias    | Calv,NO:4,6 ± 4,5<br>J'awNO:2406,1 ± 1917,2 | Calv,NO:8,5 ± 10,5<br>J'awNO:3189,9 ± 2909    | Calv,NO: 5,1 ± 4,3<br>J'awNO: 3058,9 ± 3592,8 | Calv,NO:2,4 ± 2,2<br>J'awNO: 2046,8 ± 1610,7  | Calv,NO:3,5 ± 4<br>J'awNO:2964,6 ± 3110,3     | Calv,NO: 3 ± 3,9<br>J'awNO:1723 ± 1617,7      |
|      | Pietropaoli | Calv,NO:5,4 ± 5,3<br>J'awNO:2326,3 ± 1875,6 | Calv,NO:9,8 ± 11,5<br>J'awNO:5755,9 ± 16030,8 | Calv,NO: 6,2 ± 5,9<br>J'awNO: 2958,6 ± 3447,6 | Calv,NO:2,6 ± 2,6<br>J'awNO:2019,7 ± 1589,2   | Calv,NO:4,2 ± 4,6<br>J'awNO:2895 ± 3071,2     | Calv,NO. 3,4 ± 4,6<br>J'awNO: 1632,6 ± 1606,9 |
|      | Condorelli  | Calv,NO:1,3 ± 3,8<br>J'awNO:4087,4 ± 3261,1 | Calv,NO:4,2 ± 8,3<br>J'awNO:7917,3 ± 16486,6  | Calv,NO: 0,9 ± 2,5<br>J'awNO: 5200,2 ± 6107,7 | Calv,NO:-0,3 ± 2,7<br>J'awNO O:3479,7 ± 2738, | Calv,NO:-0,45 ± 4,6<br>J'awNO:5039,8 ± 5287,5 | Calv,NO: 0,7 ± 4<br>J'awNO: 2929,1 ± 2750,2   |
|      |             | <30<br>(n= 22)                              | 30-50<br>(n=16)                               | >50<br>(n= 13)                                | <30<br>(n= 44)                                | 30-50<br>(n= 39)                              | >50<br>(n= 20)                                |
| SANO | Tsoukias    | Calv,NO: 2 ± 1,5<br>J'awNO: 838,1 ± 410,9   | Calv,NO: 2,2 ± 1,4<br>J'awNO: 1017,9 ± 565,5  | Calv,NO: 2,5 ± 1,4<br>J'awNO: 1103,8 ± 496,7  | Calv,NO: 1,8 ± 1,4<br>J'awNO: 696,5 ± 264,1   | Calv,NO: 1,9 ± 1,4<br>J'awNO: 799,8 ± 391,7   | Calv,NO: 2,7 ± 1,9<br>J'awNO: 859,3 ± 470     |
|      | Pietropaoli | Calv,NO: 2,4 ± 1,8<br>J'awNO: 801,6 ± 376,6 | Calv,NO: 2,3 ± 1,6<br>J'awNO: 997,4 ± 550,9   | Calv,NO: 2,6 ± 1,5<br>J'awNO: 1095,7 ± 496,9  | Calv,NO: 2 ± 1,6<br>J'awNO: 683,7 ± 266,2     | Calv,NO: 2 ± 1,5<br>J'awNO: 793,6 ± 383,4     | Calv,NO: 2,9 ± 2<br>J'awNO: 842,3 ± 465,8     |
|      | Condorelli  | Calv,NO: 0,9 ± 1<br>J'awNO: 1424,8 ± 698,5  | Calv,NO: 0,6 ± 1,4<br>J'awNO: 1730,5 ± 961,3  | Calv,NO: 1,1 ± 1,4<br>J'awNO: 1876,5 ± 844,4  | Calv,NO: 0,9 ± 1,5<br>J'awNO:1171,8 ± 471,9   | Calv,NO: 0,9 ± 1,3<br>J'awNO: 1359,4 ± 666,2  | Calv,NO: 1,5 ± 2<br>J'awNO: 1460 ± 799,1      |

**Tabla 20. Valores de Calv,NO y J'awNO (media ± DE) según los modelos bicompartimentales de Tsoukias y Pietropaoli y el modelo de difusión axial de Condorelli.** Valores para asmáticos no fumadores y sin tratamiento esteroideo y sanos sin historia de tabaquismo, en los distintos grupos de edad y sexo.

|      |             | HOMBRES                                      |   |   | MUJERES                                       |  |  |
|------|-------------|--|---|---|---|--|--|
|      |             | <30<br>(n= 16)                               | 30-50<br>(n= 17)                              | >50<br>(n= 4)                                 | <30<br>(n= 24)                                | 30-50<br>(n= 17)                             | >50<br>(n= 13)                                 |
| ASMA | Tsoukias    | Calv,NO:6,2 ± 5,1<br>J'awNO:3108,5 ± 1976,1  | Calv,NO:9,4 ± 12,3<br>J'awNO:3961,8 ± 2955,6  | Calv,NO: 8,2 ± 6,1<br>J'awNO: 5777,6 ± 4562,5 | Calv,NO:3,04 ± 2,6<br>J'awNO: 2401,5 ± 1431,7 | Calv,NO:5,1 ± 5,1<br>J'awNO:4786,6 ± 4228    | Calv,NO: 2 ± 2,1<br>J'awNO:1815,3 ± 1893,9     |
|      | Pietropaoli | Calv,NO:7,5 ± 6<br>J'awNO:2983,8 ± 1956,4    | Calv,NO:11,4 ± 13,5<br>J'awNO:3784,5 ± 2874,3 | Calv,NO: 9,4 ± 8,2<br>J'awNO: 5676,3 ± 4329,5 | Calv,NO:3,2 ± 3,1<br>J'awNO:2366,1 ± 1411,8   | Calv,NO:5,2 ± 5,4<br>J'awNO:4766,3 ± 4243,1  | Calv,NO. 2,4 ± 2,2<br>J'awNO: 1778,4 ± 1857,2  |
|      | Condorelli  | Calv,NO:2,1 ± 4,6<br>J'awNO:5278,8 ± 3365,1  | Calv,NO:4,1 ± 10,3<br>J'awNO:6735,1 ± 5024,5  | Calv,NO: 0,4 ± 1,9<br>J'awNO: 9821,8± 7756,2  | Calv,NO:-0,1 ± 2,9<br>J'awNO :4082,5 ± 2433,8 | Calv,NO:-1,4 ± 6,7<br>J'awNO:8137,3 ± 7187,6 | Calv,NO: -0,4 ± 3,2<br>J'awNO: 3086,1 ± 3219,7 |
|      |             | <30<br>(n= 21)                               | 30-50<br>(n=13)                               | >50<br>(n= 13)                                | <30<br>(n= 38)                                | 30-50<br>(n= 31)                             | >50<br>(n= 17)                                 |
| SANO | Tsoukias    | Calv,NO: 2,1 ± 1,5<br>J'awNO: 863,3 ± 403,3  | Calv,NO: 2,1 ± 1,4<br>J'awNO: 1165,7 ± 497,8  | Calv,NO: 2,5 ± 1,4<br>J'awNO: 1103,8 ± 496,7  | Calv,NO: 1,7 ± 1,5<br>J'awNO: 703,8 ± 270,2   | Calv,NO: 1,8 ± 1,4<br>J'awNO: 829,8 ± 395,3  | Calv,NO: 2,6 ± 2,1<br>J'awNO: 953,9 ± 440,5    |
|      | Pietropaoli | Calv,NO: 2,5 ± 1,9<br>J'awNO: 825,3 ± 368,8  | Calv,NO: 2,4 ± 1,6<br>J'awNO: 1139,2 ± 496,2  | Calv,NO: 2,6 ± 1,5<br>J'awNO: 1095,7 ± 496,9  | Calv,NO: 1,8 ± 1,7<br>J'awNO: 694,7 ± 271,6   | Calv,NO: 1,9 ± 1,5<br>J'awNO: 821,2 ± 384,1  | Calv,NO: 2,7 ± 2,2<br>J'awNO: 937,7 ± 431,2    |
|      | Condorelli  | Calv,NO: 0,9 ± 1,1<br>J'awNO: 1467,6 ± 685,6 | Calv,NO: 0,3 ± 1,2<br>J'awNO: 1981,6 ± 864,3  | Calv,NO: 1,1 ± 1,4<br>J'awNO: 1876,5 ± 844,4  | Calv,NO: 0,8 ± 1,6<br>J'awNO: 1182,4 ± 485,6  | Calv,NO: 0,7 ± 1,3<br>J'awNO: 1410,4 ± 672,4 | Calv,NO: 1,3 ± 2,1<br>J'awNO: 1621,6 ± 748,8   |

### **5.3.2 Análisis de concordancia de los valores de Calv,NO y J'awNO obtenidos aplicando diferentes modelos matemáticos en pacientes asmáticos**

La correlación entre los valores de Calv,NO y J'awNO obtenidos según las ecuaciones de Tsoukias y Pietropaolli fue significativamente fuerte ( r: 0,97; p: 0,000 y r: 0,99; p:0,000 respectivamente). Los CCI, al igual que el grupo de sujetos sanos, también fueron altos: 0,98 (IC 95%: 0,97-0,98) para Calv,NO y 0,99 ( IC 95%: 0,99-0,99) para J'awNO.

La correlación entre ambos valores calculados según Tsoukias o Condorelli fue moderada (Calv,NO: r: 0,76; p: 0,000 y J'awNO: r: 0,63; p: 0,000). Los CCI fueron: 0,75 ( IC 95%: 0,68-0,81) para los valores de Calv,NO y 0,5 (IC 95%: 0,35-0,61) para los de J'awNO.

### **5.3.3 Análisis de concordancia entre los valores de óxido nítrico exhalado a 250 ml/s y los niveles predichos a partir de una ecuación de regresión lineal**

Tal y como hemos descrito previamente, la técnica de espiración constante a múltiples flujos (desde 50 a 300 ml) nos permite calcular el componente bronquial y alveolar del ON. Sin embargo, durante la realización de la técnica, flujos espiratorios superiores a 200 ml no siempre son fáciles de conseguir y mantener entre los sujetos. En nuestro trabajo, de los 237 asmáticos solo 122 (52%) pudieron completar la espiración con flujos de 200 y 250 ml/s, mientras que el grupo de sujetos sanos solo 92 sujetos (41,6%) la terminaron . Estudios previos han demostrado una correlación entre los valores

de ONe medido a 50 ml/s y los del ONe a 250 ml/s. Además se han desarrollado ecuaciones de regresión lineal con tal de predecir el valor del ONe a 250 ml/s a partir del ONe a 50 ml/s. El objetivo de este análisis fue identificar la relación entre los valores medidos de ONe a 250 ml/s y los predichos a partir de una ecuación de regresión lineal propuesta en la literatura ( $ONE_{50\text{ ml/s}} = 2,886 \times ONE_{250\text{ ml/s}}$ )<sup>202</sup>.

Para este estudio se incluyeron 73 individuos de la muestra entre sujetos sanos y asmáticos. De nuevo, la concordancia de los datos obtenidos se evaluó aplicando el CCI y el análisis de las diferencias individuales de (Bland y Altman).

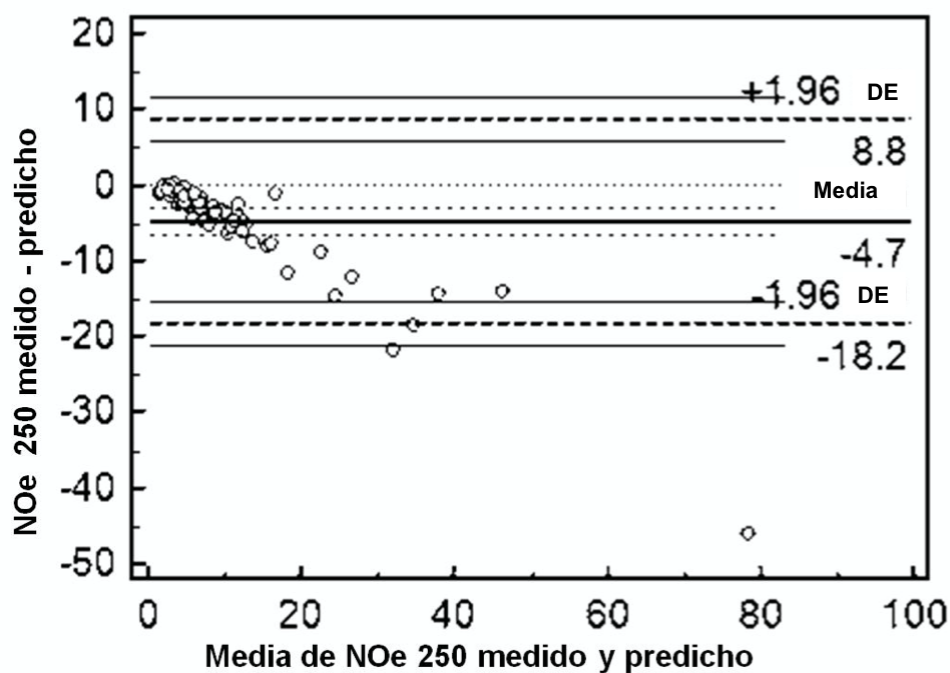
La correlación entre ONe a 250 ml/s medido y el predicho fue altamente significativa ( $r: 0,98; p < 0,001$ ). La tabla siguiente muestra los valores (media  $\pm$  DE) del ONe (ppb) medido y su valor predicho, así como el correspondiente CCI.

**Tabla 21. Valores (media  $\pm$  DE) del ONe (ppb) medido y su valor predicho, así como el correspondiente CCI.**

| <b>NOe-250 ml/s<br/>Medido</b> | <b>NOe -250 ml/s<br/>Predicho</b> | <b>ICC (CI 95%)</b> |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 9,58 $\pm$ 9,84                | 15,02 $\pm$ 17,09                 | 0,88 (0,81-0,93)    |



El estudio de Blant y Altman mostró una media de las diferencias (ONe 250 medido- ONe 250 predicho) de -4,7 ppb con un intervalo de concordancia del 95% que osciló entre - 18,2 y 8,8.



**Figura 18.** Representación gráfica de la diferencia entre cada par de mediciones de la ONe frente a su media según el método de Bland y Altman.

Los resultados muestran que las determinaciones de ONe medido a 250 ml/s y los valores predichos por la fórmula de regresión lineal propuesta en la literatura fueron equivalentes.

## **5.4 ANÁLISIS UNIVARIADO DIFERENCIAL ENTRE ASMÁTICOS Y SANOS, PARA LOS VALORES DE ÓXIDO NÍTRICO**

De los 91 pacientes asmáticos, no fumadores y sin tratamiento esteroideo, en los que se determinó el valor del óxido nítrico exhalado a 50 ml/s, el valor mínimo obtenido fue de 5,4 ppb y el máximo 290 ppb. La media del grupo fue de  $71,1 \pm 61$  ppb. Entre los 91 sujetos sanos estudiados, sin antecedentes de tabaquismo, el valor mínimo de ONe fue de 5,4 ppb, y el máximo de 48,2 ppb. La media del grupo fue de  $19,6 \pm 9,3$  ppb. La diferencia entre el valor del óxido nítrico exhalado obtenido en el grupo de sujetos sanos y en el de pacientes asmáticos fue estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ), aunque encontramos una superposición amplia de valores en ambos grupos.

También encontramos diferencias estadísticamente significativas en los valores de ONe a los flujos de 100, 150, 200 y 250 ml, entre asmáticos y sanos, y entre los valores de  $Calv,NO$  y  $J'awNO$ .

Los resultados del análisis de comparación de medias (t de student) de oxido nítrico entre asmáticos y sujetos sanos se exponen en la siguiente tabla.

**Tabla 22.** Diferencias en los valores de ONe, Calv,NO y J'awNO entre sanos y asmáticos.

|   | <b>Asmáticos</b> | <b>Sanos</b>   | <b>Valor p</b> |
|---|------------------|----------------|----------------|
| <b>ONe (50 ml/s)</b><br>ppb             | 71,1± 61         | 19,6 ± 9,3     | 0,000          |
| <b>ONe (100 ml/s)</b><br>ppb            | 39,4 ± 33,1      | 11,1 ± 5,3     | 0,000          |
| <b>ONe (150 ml/s)</b><br>ppb            | 27,1 ± 23        | 7,8 ± 3,6      | 0,000          |
| <b>ONe (200 ml/s)</b><br>ppb            | 25,4 ± 23,3      | 6,3 ± 3,1      | 0,000          |
| <b>ONe (250 ml/s)</b><br>ppb            | 20,1 ± 19,7      | 5,2 ± 2,5      | 0,000          |
| <b>Calv,NO</b><br>(Tsoukias) ppb        | 5,2 ± 6,8        | 2,1 ± 1,6      | 0,000          |
| <b>J'awNO</b><br>(Tsoukias) pl/s        | 3327,5 ± 2896,6  | 880,6 ± 449,7  | 0,000          |
| <b>Calv,NO</b><br>(Pietropaolli)<br>ppb | 6,1 ± 7,7        | 2,3 ± 1,8      | 0,000          |
| <b>J'awNO</b><br>(Pietropaolli)<br>pl/s | 3249,6 ± 2860,9  | 865,3 ± 438,8  | 0,000          |
| <b>Calv,NO</b><br>(Condorelli) ppb      | 0,7 ± 6,1        | 0,9 ± 1,5      | 0,9            |
| <b>J'awNO</b><br>(Condorelli) pl/s      | 5655,8 ± 4924,9  | 1491,1 ± 773,6 | 0,000          |

## **5.5 INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES VARIABLES SOBRE EL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO EN SUJETOS SANOS. ANÁLISIS UNI Y BIVARIADO**

Se analizó la influencia de las siguientes variables: edad, sexo, IMC y tabaquismo, sobre los niveles de ONe y sus componentes alveolar y bronquial, en el grupo de sujetos sanos. Para ello se incluyeron en el análisis todos los individuos sanos, con o sin antecedentes de tabaquismo (n = 154).

Encontramos diferencias estadísticamente significativas en los valores de ONe (50 ml/s) y J'awNO entre hombres y mujeres (24,5 vs 18,6 ppb y 1904,8 vs 1416,7 pl/s respectivamente), y entre el grupo de normopeso y sobrepeso (18,6 vs 23,7 ppb y 1404,2 vs 1866,4 pl/s), siendo éstos superiores tanto en los varones así como entre el grupo de sobrepeso.

También encontramos diferencias significativas entre los valores de ONe y J'awNO entre jóvenes y mayores (17,8 vs 25,2 ppb y 1348,7 vs 1963,5 pl/s, respectivamente). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas para los valores de Calv,NO aunque la tendencia fue a un aumento progresivo de los mismos con la edad.

Tal y como queda reflejado en la literatura los sujetos fumadores activos presentaron niveles más bajos de J'awNO , Calv,NO y ONe.

Ver tablas 23 y 24.

**Tabla 23.** Influencia de las diferentes variables sobre los valores de óxido nítrico exhalado en sujetos sanos.

|                            | <b>Oxido nítrico exhalado<br/>Media <math>\pm</math> DE</b> |                                     | <b>Análisis<br/>univariante P</b> |
|----------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Sexo                       | <b>Hombre</b><br>24,5 $\pm$ 13,8                            | <b>Mujer</b><br>18,6 $\pm$ 8,7      | 0,001                             |
| Edad                       | <b>Jóvenes</b><br>17,8 $\pm$ 9,8                            | <b>Mayores</b><br>25,2 $\pm$ 13,4   | 0,001                             |
| IMC                        | <b>Normopeso</b><br>18,6 $\pm$ 10,2                         | <b>Sobrepeso</b><br>23,7 $\pm$ 12,3 | 0,007                             |
| Tabaquismo                 | <b>Si</b><br>13 $\pm$ 6,6                                   | <b>No</b><br>20,7 $\pm$ 11,1        | 0,001                             |
| <b>Correlación Pearson</b> |   |                                     |                                   |
| Edad                       | r:0,26  |                                     | 0,001                             |
| IMC                        | r:0,26  |                                     | 0,001                             |
| Tabaquismo                 | r:-0,24   |                                     | 0,001                             |

**Tabla 24.** Influencia de las diferentes variables sobre los valores de óxido nítrico alveolar y bronquial en sujetos sanos.

|  | <b>Calv,NO<br/>(Condorelli)<br/>(media ± DE)</b> | <b>Análisis<br/>Univariante<br/>P</b> | <b>J'awNO<br/>(Condorelli)<br/>(media ± DE)</b> | <b>Análisis<br/>Univariante<br/>P</b> |
|--|--|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| Sexo<br><i>Hombre</i><br><i>Mujer</i>                | 0,7 ± 1,4<br>0,8 ± 1,6                           | 0,52                                  | 1904,8 ± 1135,5<br>1416,7 ± 739,4               | 0,001                                 |
| Edad<br><i>Jóvenes</i><br><i>Mayores</i>             | 0,8 ± 1,5<br>0,8 ± 1,7                           | 0,99                                  | 1348,7 ± 800,9<br>1963,5 ± 1141                 | 0,002                                 |
| IMC<br><i>Normopeso</i><br><i>Sobrepeso</i>          | 0,9 ± 1,6<br>0,5 ± 1,4                           | 0,15                                  | 1404,2 ± 831,3<br>1866,4 ± 1044,1               | 0,003                                 |
| Tabaquismo<br><i>Si</i><br><i>No</i>                 | 1,6 ± 1,2<br>0,8 ± 1,5                           | 0,015                                 | 919,4 ± 541,9<br>1590,6 ± 927,3                 | 0,001                                 |
| <b><i>Coefficiente de correlación de Pearson</i></b> |  |                                       |   |                                       |
| Edad   | r:-0,008   | 0,92                                  | r:0,26  | 0,001                                 |
| IMC  | r:-0,08  | 0,32                                  | r:0,26  | 0,001                                 |
| Tabaquismo   | r: 0,18  | 0,015                                 | r:-0,25   | 0,001`                                |

## **5.6 INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES VARIABLES SOBRE EL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO EN EL GRUPO DE ASMÁTICOS. ANÁLISIS UNI Y BIVARIADO**

Se analizó la influencia de las siguientes variables sobre el óxido nítrico exhalado en el grupo de pacientes con asma sin tratamiento corticoideo y no fumadores (n= 91): edad, sexo, IMC, antecedentes de atopia y/o rinitis, tratamiento recibido, valores de función pulmonar, resultados del test de provocación bronquial, cuestionarios de calidad de vida y grado de control de la enfermedad evaluado por los cuestionarios ACT y ACQ.

### **5.6.1 Antecedentes personales**

En este grupo de pacientes asmáticos, se objetivaron diferencias en los valores de Calv,NO entre hombres y mujeres siendo éstos significativamente mayores entre los hombres ( -0,6 vs 2,7 ppb).

También encontramos niveles superiores de ONe y J'awNO entre los pacientes de mediana edad, con respecto al grupo de jóvenes y mayores, siendo las diferencias estadísticamente significativas.

Por otra parte, no encontramos diferencias significativas en los valores de ONe, Calv,NO y J'awNO entre el grupo de asmáticos con normopeso y sobrepeso.

Tal y como viene descrito en la literatura los asmáticos fumadores presentaron valores de ONe y J'awNO significativamente más bajos ( 36,4 vs 71 ppb y 2861,3 vs 5655,8 pl/s; p= 0,001, respectivamente). Los valores de Calv,NO fueron superiores en el grupo de sujetos fumadores aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( 1,7 vs 0,7; p=0,5).

### **5.6.2 Test cutáneos a neuroalergenos**

40 pacientes tenían antecedentes de pruebas cutáneas a neuroalergenos positivos. En este subgrupo de pacientes, la media del valor de ONe fue ligeramente superior (78,8 ppb) que en el grupo con pruebas negativas (65,2 ppb), pero sin ser la diferencia estadísticamente significativa. Tampoco hallamos diferencias significativas para los valores de Calv,NO y J'awNO (-0,02 vs 1,8 ppb y 5235,1 vs 6204,8 pl/s respectivamente).

### **5.6.3 Niveles de IgE**

Los sujetos con un nivel de IgE  $\geq 100$  UI/ml tuvieron un valor más elevado de óxido nítrico exhalado (88,4 ppb), estadísticamente significativo ( $p:0,045$ ), que los sujetos con una IgE  $< 100$  UI/ml (57,5 ppb) No hubo diferencias significativas para los componentes alveolar y bronquial del óxido nítrico, aunque estos valores fueron superiores en el grupo con IgE elevadas. Al analizar de forma cuantitativa la correlación entre el nivel de IgE y el valor de ONe y J'awNO, encontramos una correlación directa moderada y estadísticamente significativa ( $r: 0,4$ ;  $p: 0,001$ ). No encontramos correlación para la Calv,NO.

### **5.6.4 Niveles de eosinófilos**

Los sujetos con un porcentaje de eosinófilos  $\geq 6\%$  presentaron una cifra más elevada de óxido nítrico exhalado (100,28 vs 61,6 ppb) y J'awNO (8150,8 vs 4870,7 pl/s), que los asmáticos con un recuento  $< 6\%$ , de forma significativa ( $p = 0,015$  y  $0,010$  respectivamente). Al analizar de forma cuantitativa la correlación entre el recuento de eosinófilos y el valor de ONe y J'awNO, esta



fue moderada pero estadísticamente significativa ( $r= 0,4$ ;  $p:0,001$ ). No encontramos correlación con los valores de Calv,NO.

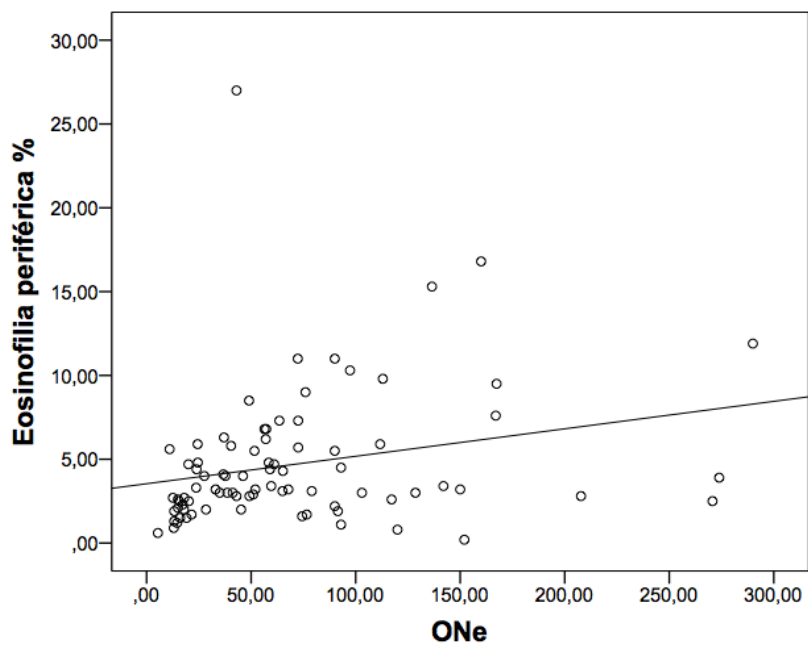


Figura 19. Correlación entre ONE y eosinofilia periférica.

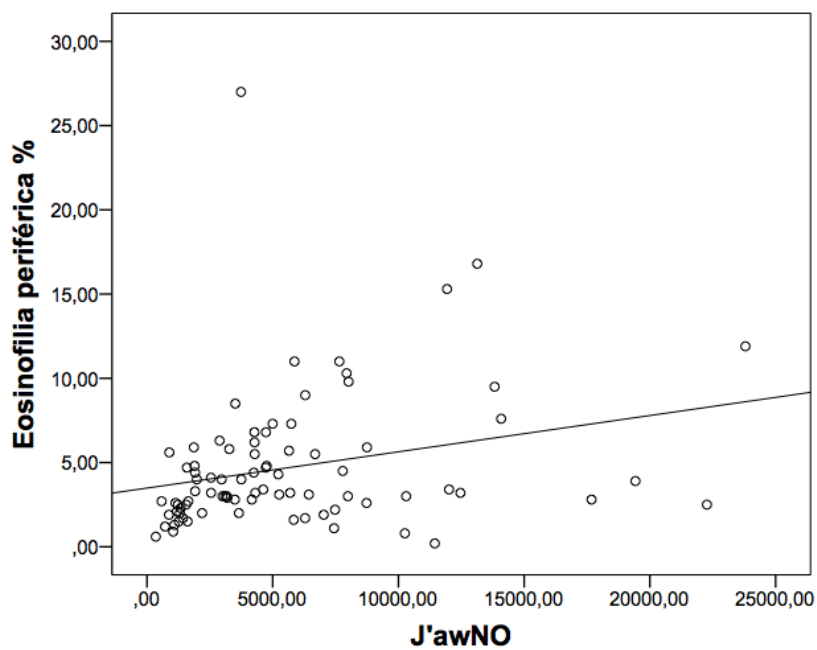
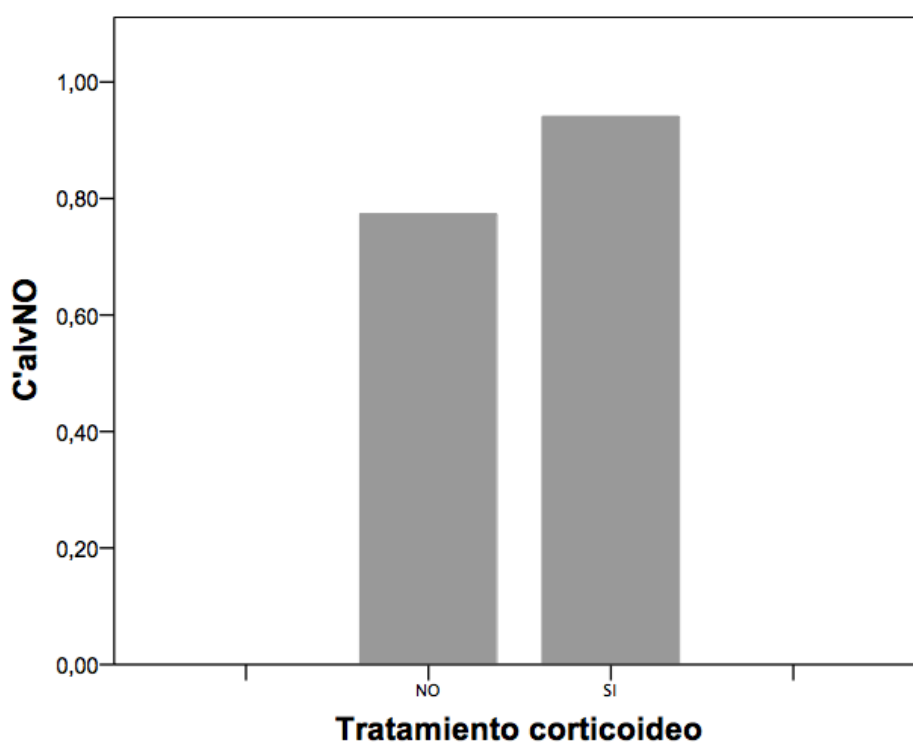


Figura 20. Correlación entre J'awNO y eosinofilia periférica.

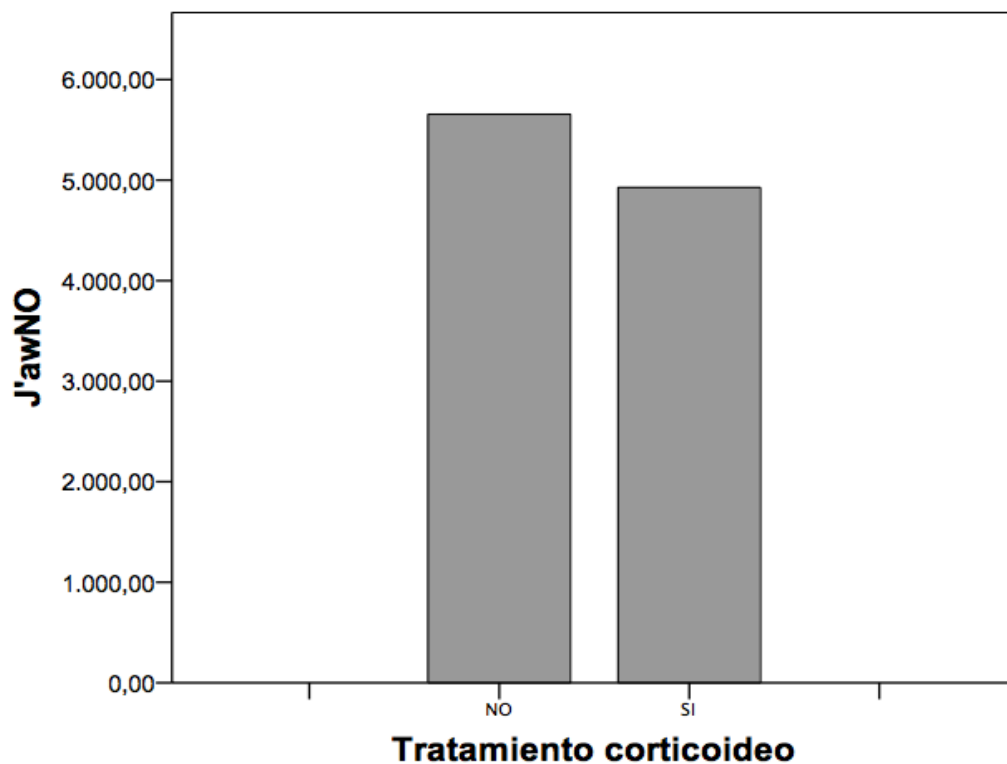
### 5.6.5 Tratamiento corticoideo

91 pacientes asmáticos incluidos en el estudio, no llevaban tratamiento esteroideo. En ellos, el valor medio de ONe fue de 71,1 ppb  $\pm$  61.

94 asmáticos tomaban corticoides inhalados. La media del óxido nítrico exhalado fue de 50,1  $\pm$  49,3. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p=0,011$ ). Sin embargo, tal y como se ve en las siguientes figuras, no encontramos diferencias significativas para los valores de Calv,NO y J'awNO.

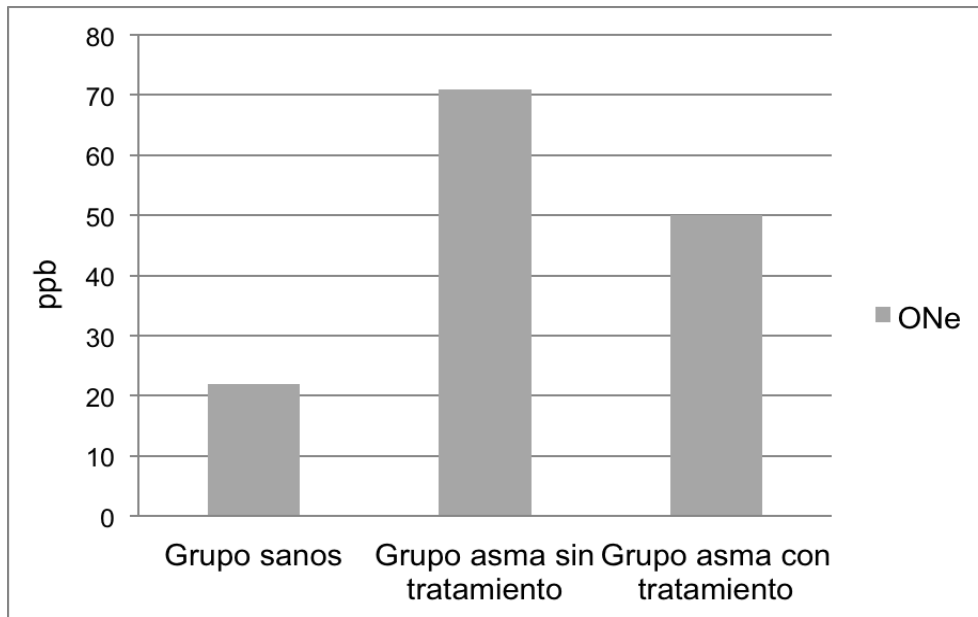


**Figura 21a.** Valores medios de Calv,NO en el grupo de pacientes con y sin tratamiento corticoideo.

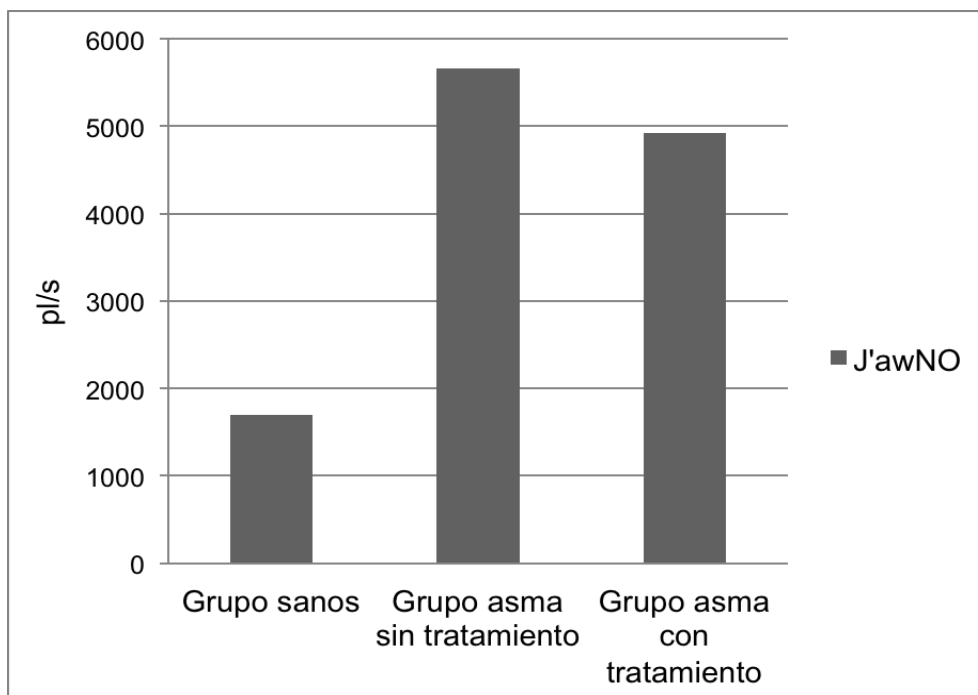


**Figura 21b.** Valores medios de J'awNO en el grupo de pacientes con y sin tratamiento corticoideo.

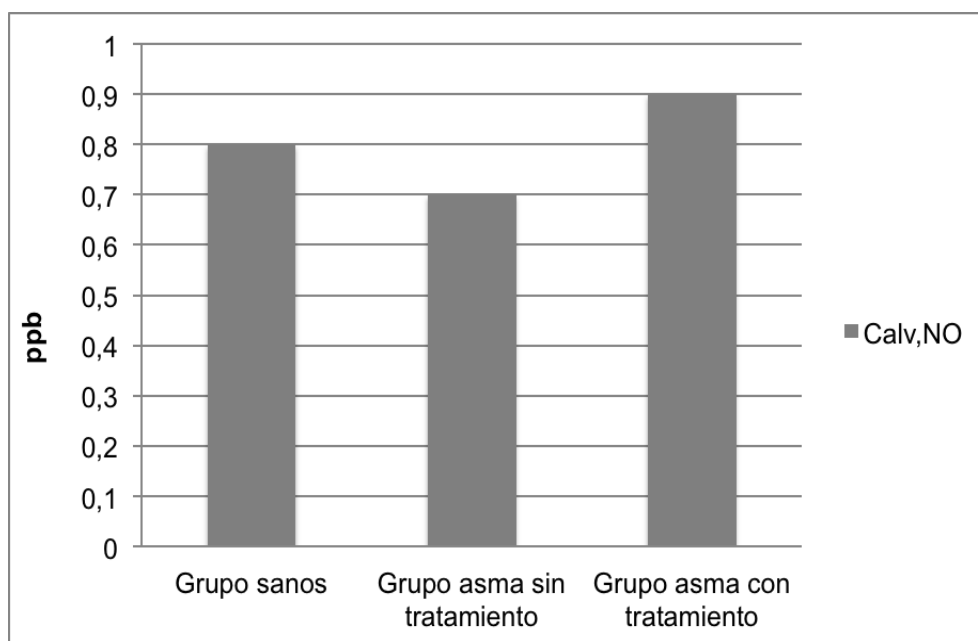
Al comparar las diferencias en los valores de ONe y J'awNO, entre el grupo de sujetos sanos y los pacientes con asma, según recibieran o no tratamiento con corticoides inhalados, la diferencia fue significativa tanto entre los pacientes que no recibían tratamiento con corticoides y los del grupo de sujetos sanos, como entre los pacientes que sí recibían tratamiento con corticoides y los sujetos sanos. No encontramos diferencias para los valores de Calv,NO. (Ver figuras 22 a-c).



**Figura 22a.** Comparación del resultado del óxido nítrico exhalado en los pacientes según recibieran o no tratamiento con corticoides inhalado y el grupo de sujetos sanos.



**Figura 22b.** Comparación del resultado del componente bronquial del óxido nítrico exhalado en los pacientes según recibieran o no tratamiento con corticoides inhalado y el grupo de sujetos sanos.



**Figura 22c.** Comparación del resultado del componente alveolar del óxido nítrico exhalado en los pacientes según recibieran o no tratamiento con corticoides inhalados y el grupo de sujetos sanos.

### 5.6.6 Oxido nítrico y prueba broncodilatadora

Entre el grupo de pacientes con asma, no fumadores y sin tratamiento corticoideo (n= 91), el 32% tuvo un TBD positivo.

Encontramos diferencias significativas en el nivel de ONe y J'awNO entre el grupo que presentó un TBD positivo y aquellos que no lo presentaron (124,8 vs 61,1 ppb y 9766,6 vs 4885,6 pl/s respectivamente). No hubo diferencias significativas para los valores de Calv,NO.

Los valores de ONe, y J'awNO presentaron una correlación positiva significativa con el porcentaje de cambio de FEV<sub>1</sub>, y el de los flujos mesoespiratorios en el TBD (Tabla 25).

**Tabla 25.** Correlación entre el porcentaje de cambio en el Test broncodilatador para el FEV<sub>1</sub>, FVC y FEV<sub>25-75</sub>, y el ONe, Calv,NO y J'awNO. Rho de Spearman.

|                                     | ONe              | Calv,NO         | J'awNO           |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|------------------|
| <b>% Cambio FEV<sub>1</sub></b>     | r= 0,4, p: 0,001 | r= 0,2, p:0,09  | r= 0,3, p:0,004  |
| <b>% Cambio FVC</b>                 | r= 0,2, p: 0,04  | r= 0,2 p: 0,1   | r= 0,2, p: 0,07  |
| <b>% Cambio FEV<sub>25-75</sub></b> | r= 0,4, p:0,001  | r= 0,01, p: 0,9 | r= 0,4, p: 0,001 |

### 5.6.7 Hiperrespuesta bronquial y nivel de óxido nítrico exhalado

De los 91 pacientes diagnosticados de asma que no recibían tratamiento con corticoides y eran no fumadores, 75 completaron el test de provocación bronquial. El valor medio de PC<sub>20</sub> fue de 2,3 ± 2,4 mg/ml y de deltaFVC 10,2% ± 5,6%. Encontramos una correlación inversa entre los valores de deltaFVC y los valores de ONe (r: -0,25; p= 0,03) y J'awNO (r: -0,25; p= 0,03), así como para los valores de PC<sub>20</sub>, y ONe y J'awNO (r: -0,3; p= 0,02 y r: -0,25; p= 0,03, respectivamente).

**Tabla 26.** Influencia de las diferentes variables sobre los valores de óxido nítrico alveolar y bronquial en sujetos asmáticos (no fumadores y sin tratamiento esteroideo).

|   | <b>Calv,NO<br/>(Condorelli)<br/>(media ± DE)</b> | <b>Análisis<br/>Univariante<br/>P</b> | <b>J'awNO<br/>(Condorelli)<br/>(media ± DE)</b>       | <b>Análisis<br/>Univariante<br/>P</b> |
|---|--|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| Sexo<br><i>Hombre</i><br><i>Mujer</i>                     | 2,7 ± 7,6<br>-0,6 ± 4,5                          | 0,009                                 | 6439,1± 4781,6<br>5119,1± 4993,6                      | 0,2                                   |
| Edad<br><i>&lt;30</i><br><i>30-50</i><br><i>&gt;50</i>    | 0,7 ± 3,8<br>1,3 ± 8,9<br>-0,2 ± 2,9             | 0,7                                   | 4561,1 ± 2863,8<br>7436,2 ± 6147,7<br>4670,9 ± 5265,8 | 0,03                                  |
| IMC<br><i>Normopeso</i><br><i>Sobrepeso</i>               | -0,006 ± 4,8<br>1,2 ± 6,9                        | 0,3                                   | 5826,5 ± 5124,3<br>5786,3 ± 4946,3                    | 0,9                                   |
| Prick test<br><i>Positivo</i><br><i>Negativo</i>          | 1,8 ± 7,2<br>-0,02 ± 5,1                         | 0,1                                   | 6204,8 ± 4780,9<br>5235,1 ± 5090,5                    | 0,4                                   |
| IgE<br><i>≥ 100</i><br><i>&lt;100</i>                     | 1,8 ± 8,4<br>-0,5 ± 3,7                          | 0,2                                   | 6973,2 ± 5069,1<br>4648,7 ± 5967,9                    | 0,06                                  |
| Eosinofilia<br>en sangre<br><i>≥ 6%</i><br><i>&lt; 6%</i> | -1,4±5,9<br>1 ± 5,9                              | 0,1                                   | 8150,8 ± 5350,1<br>4870,7 ± 4511,2                    | 0,01                                  |
| TBD<br><i>Positivo</i><br><i>Negativo</i>                 | 4,2 ± 12,3<br>-0,05 ± 3,5                        | 0,2                                   | 9766,6 ± 6218,8<br>4885,6 ± 4597,3                    | 0,007                                 |

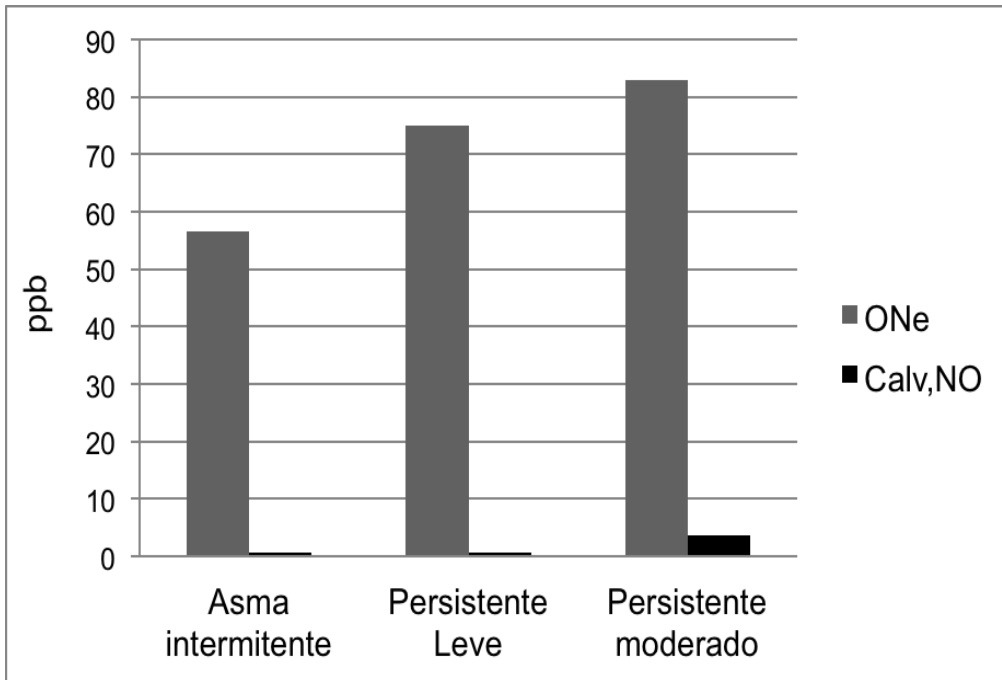
**Tabla 27.** Influencia de las diferentes variables sobre los valores de óxido nítrico alveolar y bronquial en sujetos asmáticos (no fumadores y sin tratamiento esteroideo).

| <b>Coefficiente de correlación de Spearman</b> |                |     |               |       |
|--|----------------|-----|---------------|-------|
|  | <b>Calv,NO</b> |     | <b>J'awNO</b> |       |
| Edad   | r:-0,13        | 0,2 | r:0,02        | 0,8   |
| IMC  | r: -0,04       | 0,7 | r:0,04        | 0,7   |
| IgE  | r: 0,06        | 0,6 | r:0,4         | 0,001 |
| Eosinofilia en sangre                          | r: -0,1        | 0,3 | r: 0,4        | 0,001 |
| PC <sub>20</sub>                               | r: 0,4         | 0,8 | r:-0,25       | 0,03  |
| deltaFVC                                       | r: 0,01        | 0,9 | r:-0,25       | 0,03  |
| ACT  | r: 0,09        | 0,4 | r:-0,2        | 0,9   |
| ACQ  | r: 0,005       | 0,9 | r:0,08        | 0,5   |
| AQLQ-Sm  | r: -0,005      | 0,9 | r:0,1         | 0,4   |

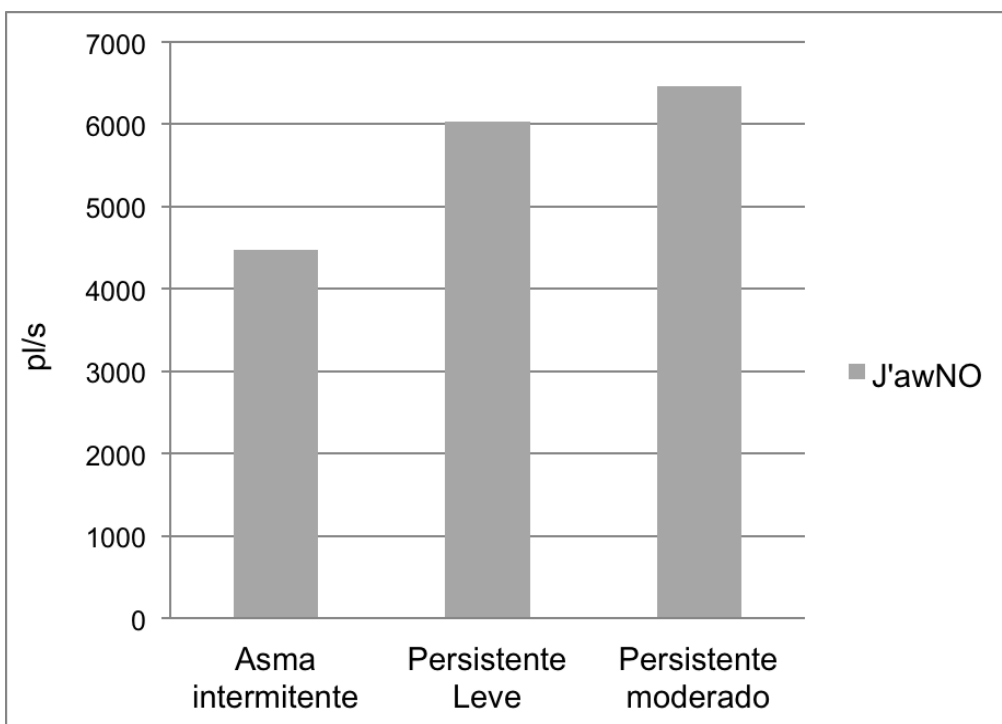


### **5.6.8 Óxido nítrico exhalado, nivel de gravedad y grado de control de la enfermedad**

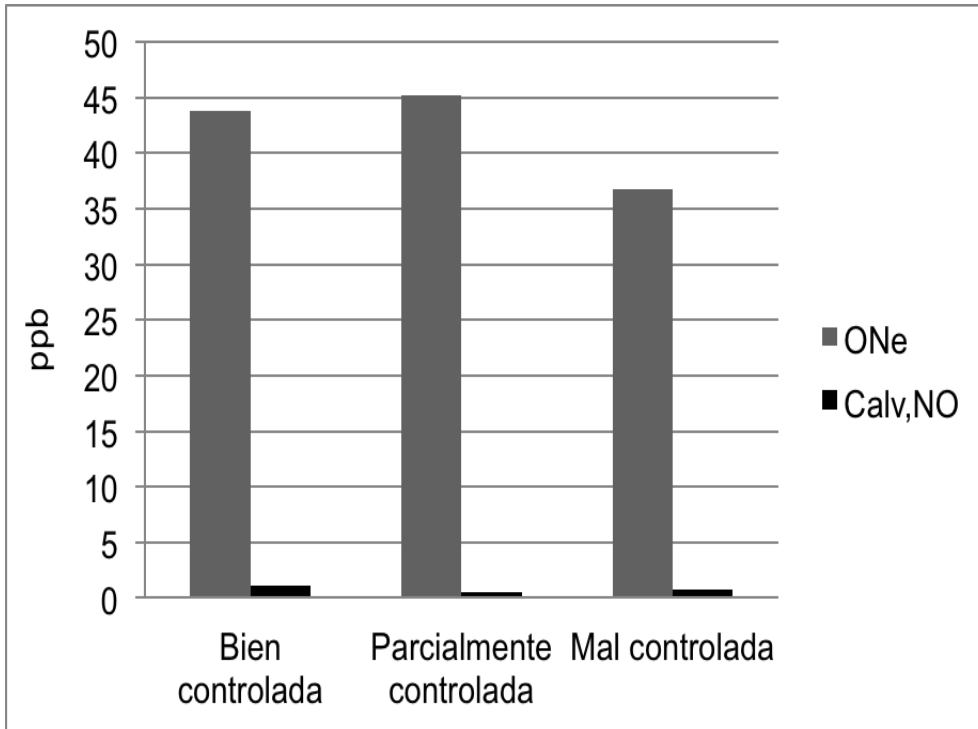
Las puntuaciones de los cuestionarios sobre el control del asma; ACT y ACQ fueron las siguientes (media  $\pm$  DE): 20,21  $\pm$  4,3 y 0,9  $\pm$  0,85, respectivamente. No encontramos correlación significativa entre los niveles del ONe, Calv,NO y J'awNO, y las puntuaciones de dichos cuestionarios. Aunque encontramos niveles más elevados de ONe, Calv,NO y J'awNO en los pacientes con mayor gravedad de la enfermedad, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tampoco encontramos diferencias significativas entre los parámetros de inflamación y los diferentes niveles de control del asma ( Ver figuras 23 y 24).



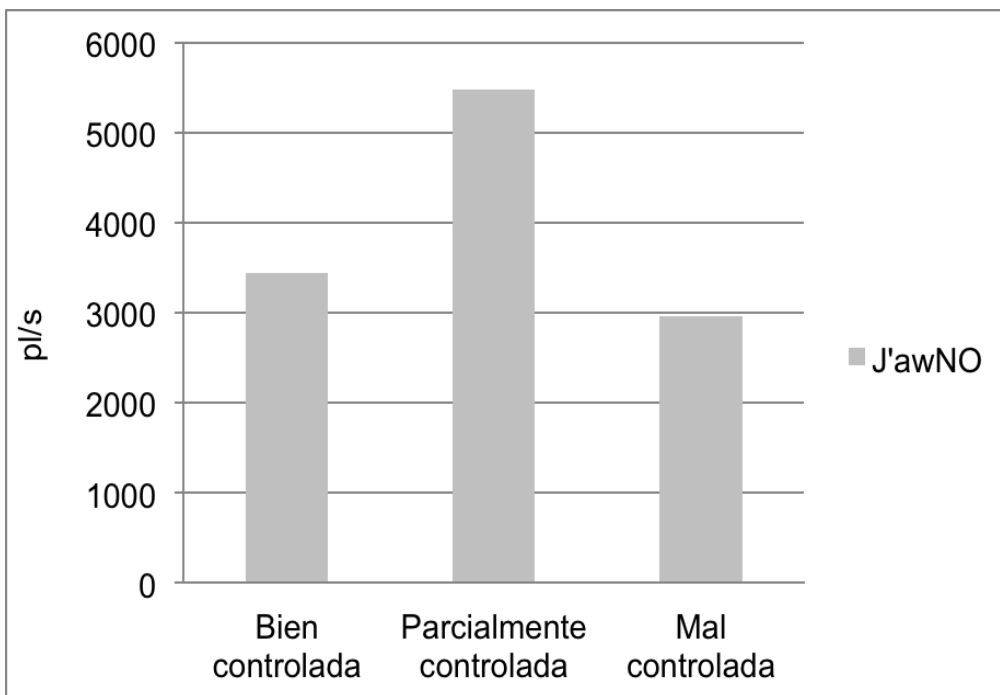
**Figura 23a.** Valor medio de ONe y Calv,NO en los distintos grupos de gravedad de asma en el conjunto de pacientes asmáticos sin tratamiento esteroideo.



**Figura 23b.** Valor medio de J'awNO en los distintos grupos de gravedad de asma en el conjunto de pacientes asmáticos sin tratamiento esteroideo.



**Figura 24a.** Valor medio de ONe y Calv,NO en los distintos grupos de control de asma en el conjunto de pacientes asmáticos en tratamiento esteroideo.



**Figura 24b.** Valor medio de J'awNO en los distintos grupos de control de asma en el conjunto de pacientes asmáticos en tratamiento esteroideo.

### 5.6.9 Oxido nítrico exhalado y calidad de vida

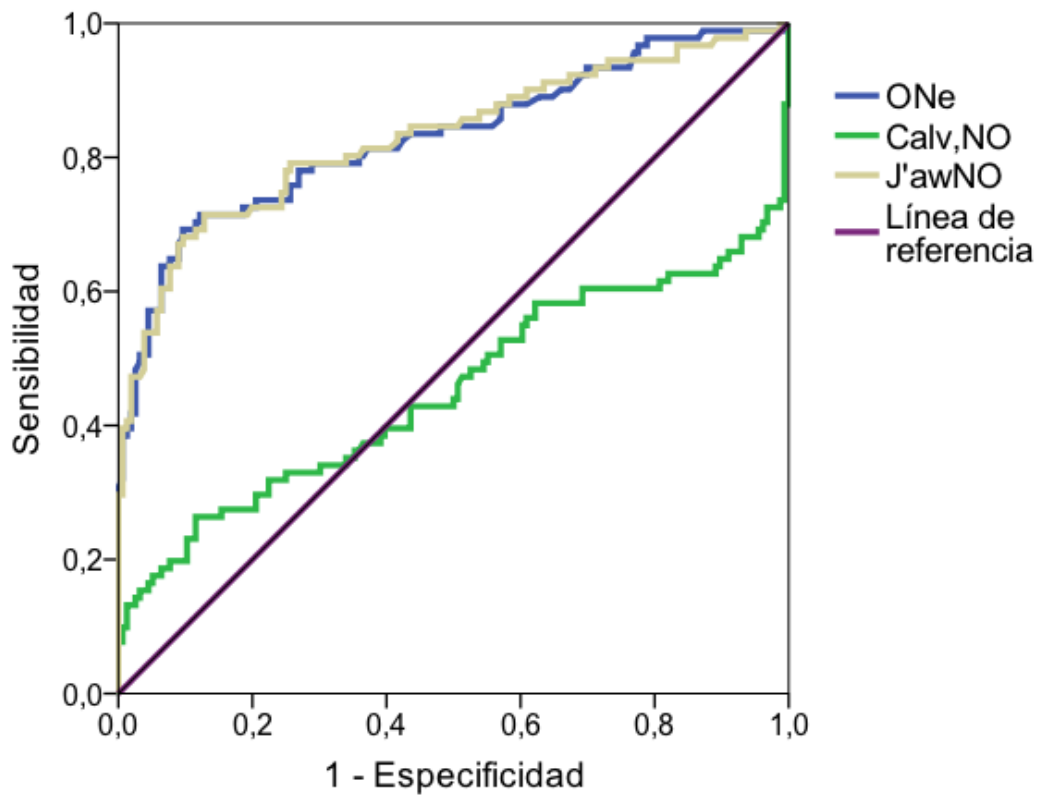
Las puntuaciones del cuestionario de calidad de vida AQLQ-Sm fueron las siguientes (media  $\pm$  DE): puntuación total:  $5,7 \pm 1,1$ , dimensión ahogo:  $5,8 \pm 1,1$ , estado de ánimo:  $5,3 \pm 1,3$ , restricción social:  $5,9 \pm 1,2$  y preocupación:  $5,7 \pm 1,1$ . No encontramos correlación significativa entre los valores de ONe, Calv,NO y J'awNO y las diferentes puntuaciones del cuestionario de calidad de vida. Por el contrario encontramos una correlación moderada significativa entre las distintas dimensiones del cuestionario de Sydney y el nivel de control de la enfermedad medida por los cuestionarios ACT y ACQ ( ver Tabla 28).

**Tabla 28.** Correlación entre las puntuaciones del cuestionario AQLQ-Sm y el nivel de control de la enfermedad, estimado por el ACT y ACQ. Rho de Spearman.

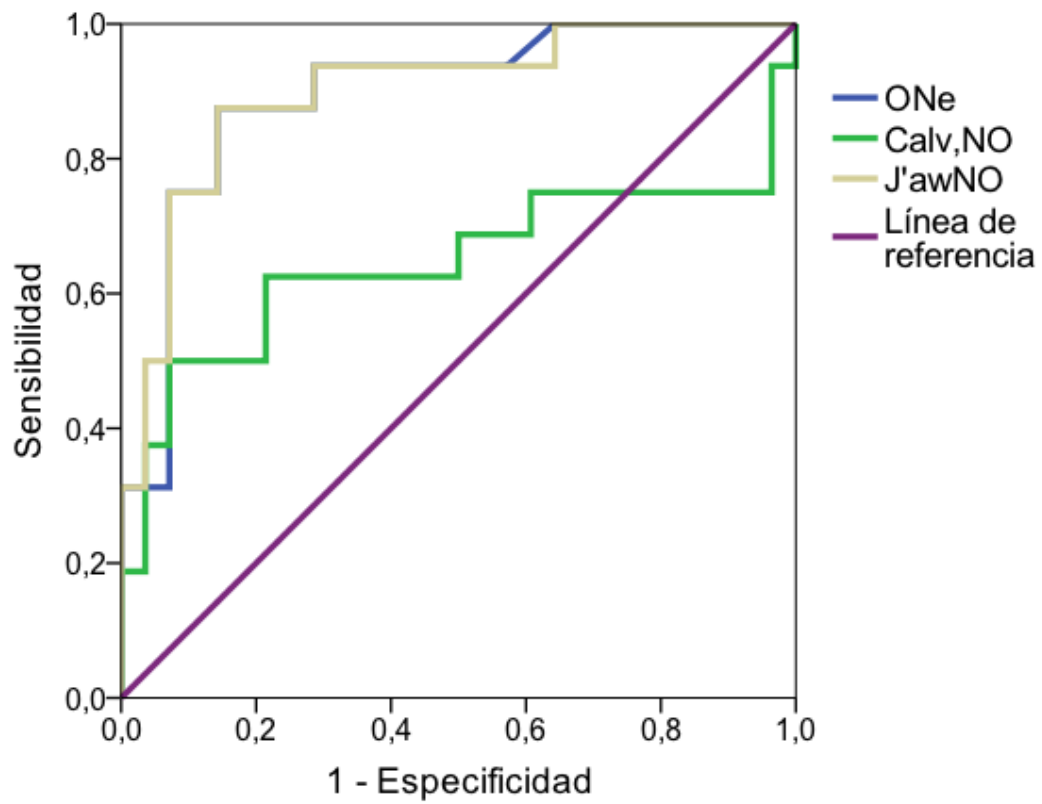
|                                     | Puntuación ACT  | Puntuación ACQ  |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| <b>Puntuación global AQLQ-Sm</b>    | r:0,7, P< 0,001 | r:0,7, P< 0,001 |
| <b>Dimensión ahogo</b>              | r:0,7, P< 0,001 | r:0,6, P< 0,001 |
| <b>Dimensión estado de ánimo</b>    | r:0,6, P< 0,001 | r:0,6, P< 0,001 |
| <b>Dimensión restricción social</b> | r:0,5, P< 0,001 | r:0,6, P< 0,001 |
| <b>Dimensión preocupación</b>       | r:0,7, P< 0,001 | r:0,7, P< 0,001 |

## **5.7 CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS VARIABLES: ONe, Calv,NO Y J'awNO. RESULTADOS DEL ANÁLISIS BAYESIANO**

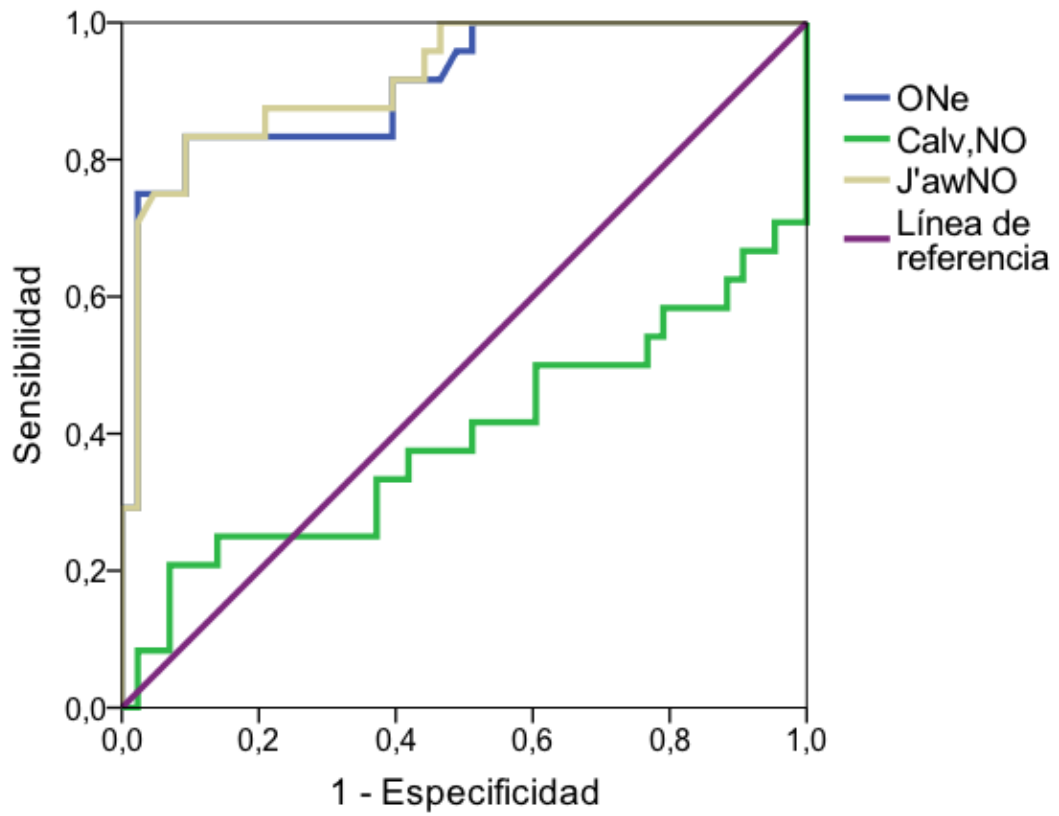
En el global de la población de estudio, excluyendo fumadores y pacientes en tratamiento con esteroides, se analizó el valor diagnóstico de ONe, Calv,NO y J'awNO (según la ecuación de Condorelli), a través del cálculo de la sensibilidad, especificidad y área bajo la curva ROC para cada punto de corte. El punto de corte óptimo para ONe se estableció en 35 ppb con una sensibilidad del 70% y especificidad del 88%, para J'awNO fue 2500 pl/s con una sensibilidad del 71% y especificidad del 87%, y para Calv,NO 2,5 ppb con una sensibilidad del 26% y E del 87% (Ver Tablas 29-31). Las áreas bajo la curva para el diagnóstico de asma fueron para ONe: 0,83 (95% IC 0.77-0.88), J'awNO 0.83 (95% IC: 0.77-0.88), y Calv,NO 0,45 (95% IC: 0,37-0,54) (Figura 25). Al analizar las áreas por edades y género encontramos en jóvenes e independientemente del sexo un aumento del área bajo la curva para ONe 0,90 y J'awNO 0,91. Ver Figuras 26 y 27.



**Figura 25.** Curvas ROC indicando el valor diagnóstico para asma del ONe, J'awNO y Calv,NO en la población total del estudio.



**Figura 26.** Curvas ROC indicando el valor diagnóstico para asma del ONE, J'awNO y Calv,NO en el grupo hombres , menores de 30 años.



**Figura 27.** Curvas ROC indicando el valor diagnóstico para asma del ONE, J'awNO y Calv,NO en el grupo mujeres , menores de 30 años.



**Tabla 29.** Valor diagnóstico para ONe.

| <b>ONe</b> | <b>S*</b> | <b>E*</b> | <b>VPP*</b> | <b>VPN*</b> |
|------------|-----------|-----------|-------------|-------------|
| <b>5</b>   | 100%      | 0%        | 37%         | 100%        |
| <b>10</b>  | 98%       | 11%       | 39%         | 94%         |
| <b>15</b>  | 90%       | 33%       | 43%         | 85%         |
| <b>20</b>  | 82%       | 58%       | 53%         | 84%         |
| <b>25</b>  | 73%       | 75%       | 63%         | 83%         |
| <b>30</b>  | 71%       | 85%       | 73%         | 83%         |
| <b>35</b>  | 70%       | 88%       | 77%         | 83%         |
| <b>40</b>  | 65%       | 92%       | 83%         | 81%         |
| <b>45</b>  | 58%       | 94%       | 84%         | 80%         |
| <b>50</b>  | 55%       | 95%       | 87%         | 78%         |

\*S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

**Tabla 30.** Valor diagnóstico para J'awNO.

| <b>J'awNO</b> | <b>S*</b> | <b>E*</b> | <b>VPP*</b> | <b>VPN*</b> |
|---------------|-----------|-----------|-------------|-------------|
| 150           | 100%      | 1%        | 37%         | 100%        |
| 500           | 98%       | 3%        | 37%         | 80%         |
| 1000          | 92%       | 24%       | 42%         | 88%         |
| 1500          | 84%       | 53%       | 51%         | 85%         |
| 2000          | 72%       | 76%       | 63%         | 82%         |
| 2500          | 71%       | 87%       | 76%         | 84%         |
| 3000          | 64%       | 91%       | 80%         | 82%         |
| 3500          | 58%       | 94%       | 84%         | 79%         |
| 4000          | 54%       | 94%       | 89%         | 78%         |
| 4500          | 47%       | 98%       | 93%         | 76%         |

\*S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

**Tabla 31.** Valor diagnóstico para Calv,NO.

| <b>Calv,NO</b> | <b>S*</b> | <b>E*</b> | <b>VPP*</b> | <b>VPN*</b> |
|----------------|-----------|-----------|-------------|-------------|
| 0,2            | 56%       | 39%       | 35%         | 60%         |
| 0,5            | 50%%      | 43%       | 34%         | 60%         |
| 0,8            | 42%       | 54%       | 35%         | 61%         |
| 1              | 38%       | 60%       | 36%         | 62%         |
| 1,5            | 33%       | 72%       | 41%         | 64%         |
| 2              | 27%       | 81%       | 46%         | 66%         |
| 2,5            | 26%       | 87%       | 54%         | 66%         |
| 3              | 19%       | 91%       | 55%         | 66%         |
| 3,5            | 16%       | 95%       | 67%         | 66%         |
| 4              | 14%       | 97%       | 72%         | 66%         |

\*S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

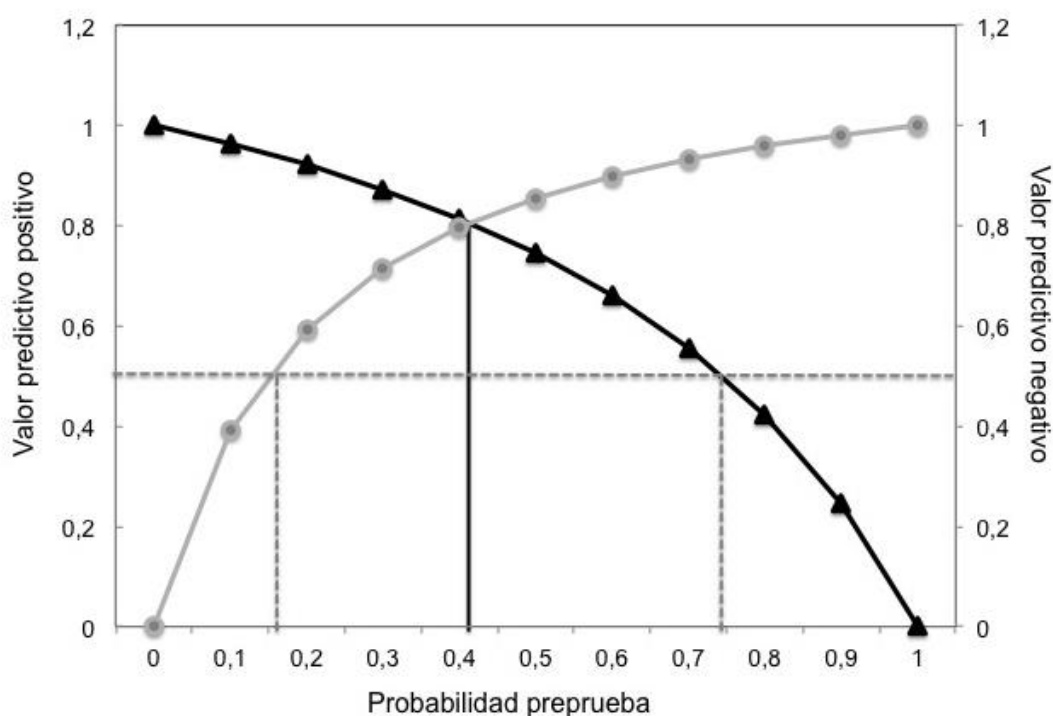
Si utilizamos como puntos de corte valores superiores a 50 o inferiores a 25, tal y como se proponen en el documento de la ATS<sup>84</sup>, el 39,1% de nuestros asmáticos tendría valores superiores a 50 ppb mientras que un porcentaje similar; 37,9%, presentaría valores inferiores a 25. En el grupo de sujetos sanos un 75,9% tendría valores encuadrables en la normalidad ( inferiores a 25 ppb) mientras que hasta un 3,6% tendría valores superiores a 50. Tanto en asmáticos como en el grupo de sujetos sanos un porcentaje en torno al 20% tendría valores entre 25-50 ppb.

**Tabla 32.** Porcentaje de pacientes con valores de oxido nítrico superiores o inferiores a 25-50 ppb ( puntos de corte propuestos por ATS para el diagnóstico de asma) en el global de la muestra entre asmáticos y sanos.

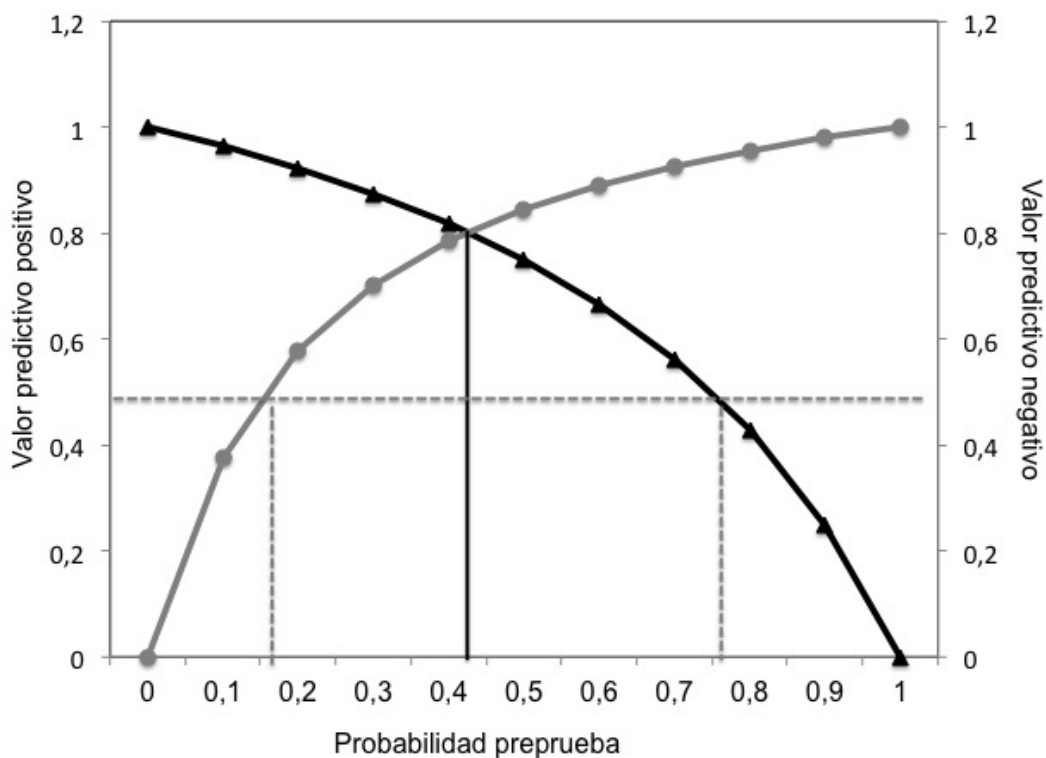
| <b>Asma</b> |               | <b>N</b> | <b>%</b> |
|-------------|---------------|----------|----------|
| <b>NO</b>   | ONe < 25 ppb  | 168      | 75,9%    |
|             | ONe 25-50 ppb | 45       | 20,5%    |
|             | ONe > 50 ppb  | 8        | 3,6%     |
| <b>SI</b>   | ONe < 25 ppb  | 90       | 37,9%    |
|             | ONe 25-50 ppb | 55       | 23%      |
|             | ONe > 50 ppb  | 92       | 39%      |

En la figura 28, se muestra como utilizando para ONe el punto de corte de 35 ppb, varían las probabilidades posprueba de presentar o no asma tras un resultado positivo (  $ONe > 35$  ppb) o negativo (  $ONe < 35$  ppb). En nuestro caso el mejor resultado se alcanza cuando la PPP está alrededor del 49% con un intervalo de seguridad entre el 21 y el 81 %.

La figura 29 muestra los resultados para el J'awNO, siendo éstos superponibles.

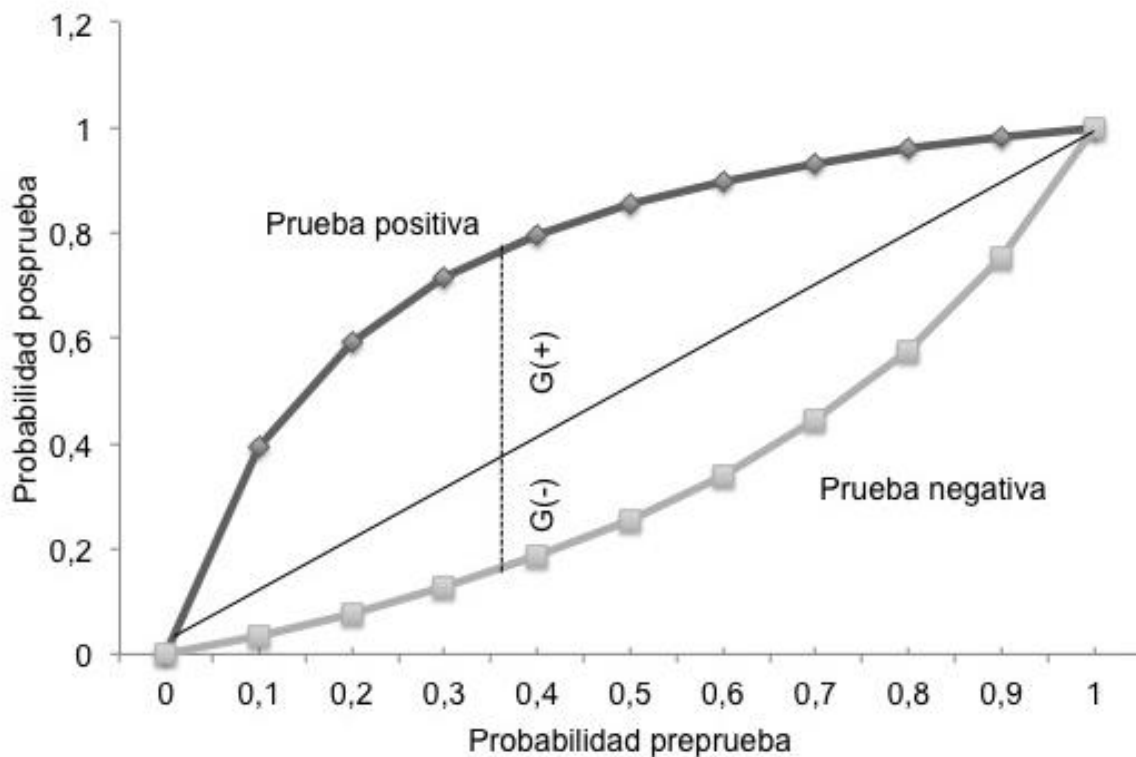


**Figura 28.** Curvas de probabilidad posprueba de presentar asma tras un resultado positivo ( línea gris) o de no presentarla tras un resultado negativo ( línea negra) utilizando una cifra de óxido nítrico exhalado de 35 ppb como valor de corte. El punto donde se cruzan ambas líneas se corresponde con la probabilidad preprueba para ese valor de óxido nítrico exhalado (0,48).



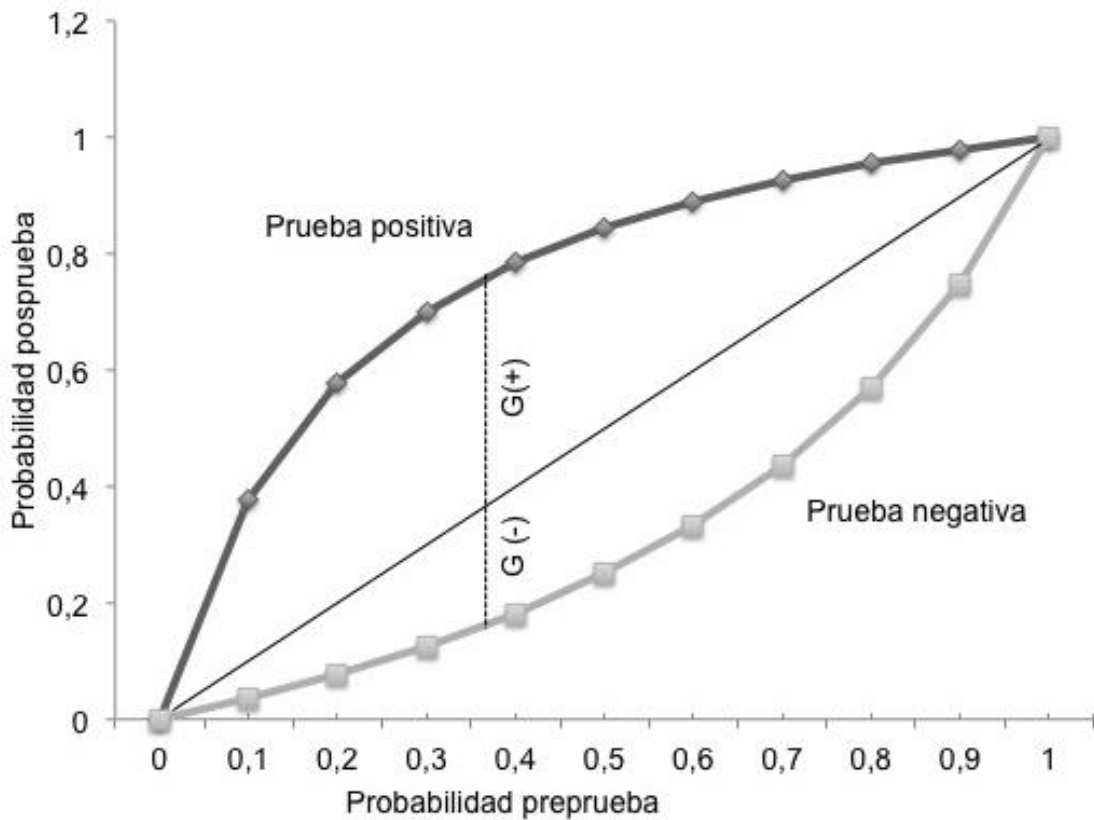
**Figura 29.** Curvas de probabilidad posprueba de presentar asma tras un resultado positivo ( línea gris) o de no presentarla tras un resultado negativo ( línea negra) utilizando una cifra de óxido nítrico bronquial de 2500 pl/s como valor de corte. El punto donde se cruzan ambas líneas se corresponde con la probabilidad preprueba para ese valor de óxido nítrico exhalado (0,48).

Las ganancias diagnósticas para ONe y J'awNO se pueden visualizar en las figuras 30 y 31. En función de la probabilidad preprueba (PPP en abscisas), las dos curvas dan los valores de las probabilidades posprueba de la enfermedad según el resultado de la prueba sea positivo (curva superior) o negativo (curva inferior). La ganancia diagnóstica aportada por un resultado positivo en la determinación de ONe ( ONe > 35 ppb) es igual a 0,41; mientras que la ganancia diagnóstica aportada por un resultado negativo (ONe < 35 ppb) es igual a 0,19. La ganancia total o contenido diagnóstico de la determinación de ONe, teniendo en cuenta la prevalencia de asma en nuestra muestra (0,36), es igual a la suma de ambas ganancias: 0,6.



**Figura 30.** Probabilidad posprueba después de un resultado positivo o negativo de la prueba (ONe). G (+): ganancia positiva. G (-): ganancia negativa.

La ganancia diagnóstica positiva para el punto de corte de J'awNO de 2500 pl/s fue de 0,4 mientras que la ganancia negativa fue de 0,2, siendo la ganancia total de 0,6. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica.



**Figura 31.** Probabilidad posprueba después de un resultado positivo o negativo de la prueba (J'awNO). G (+): ganancia positiva. G (-): ganancia negativa.

Dichos resultados apoyan la utilidad del ONe en el estudio diagnóstico de asma en aquellos casos en los que se encuentre elevado, mientras que un valor negativo no podría descartar la enfermedad. Los valores de J'awNO arrojan resultados similares a los del ONe, no aportando mayor valor al diagnóstico de la enfermedad.



## 5.8 TÉCNICAS MULTIVARIANTES

El estudio de las interrelaciones existentes entre variables se hizo utilizando técnicas del análisis multivariante.

### 5.8.1 Análisis factorial

Con el fin de identificar grupos homogéneos de variables que correlacionen mucho entre sí e independientemente de otros grupos o factores, que nos ayuden a definir y explicar mejor la enfermedad, se realizó un análisis factorial. El objetivo del mismo fue analizar las correlaciones entre los marcadores de inflamación (Calv,NO y J'awNO) y el resto de variables clínicas, demográficas y funcionales utilizadas habitualmente en la valoración del asma. Para ello, se incluyeron en el análisis, los pacientes diagnosticados de asma, independientemente del tratamiento de mantenimiento con corticoides o de su hábito tabáquico. Para el estudio estadístico se utilizó el análisis factorial de componentes principales (Rotación Varimax).

La solución factorial obtenida detectó tres factores (varianza explicada (VE) total = 52,2%). El primer factor (VE= 20,3%) indicó que al menos en las mujeres atópicas cuanto mayor es su edad y peso corporal mayor es también el porcentaje de caída del FVC durante el test de provocación bronquial. El segundo factor (VE = 16,4%) señaló que cuanto menor es el grado de obstrucción y de hiperrespuesta bronquial mejor es el estado de salud y el grado de control de la enfermedad. El tercer factor (VE: 15,4%) agrupó los valores de Calv,NO y J'awNO (en relación inversa) con el porcentaje de eosinofilia en sangre periférica y un mayor grado de hiperrespuesta bronquial.

**Tabla 33. Matriz de cargas de factores rotados (método varimax) que explica el 57,2% de la varianza.**

| <b>Factores resultantes del análisis factorial*</b> |                  |                  |                  |
|---|------------------|------------------|------------------|
|   | <b>1 (20,3%)</b> | <b>2 (16,4%)</b> | <b>3 (15,4%)</b> |
| <b>Edad</b>   | 0,8              |                  |                  |
| <b>Sexo</b>   | 0,6              |                  |                  |
| <b>IMC</b>  | 0,5              |                  |                  |
| <b>FEV<sub>1</sub></b>                              |                  | 0,6              |                  |
| <b>Delta FVC</b>                                    | 0,7              |                  |                  |
| <b>PC<sub>20</sub></b>                              |                  | 0,7              | -0,4             |
| <b>Atopia</b>                                       | 0,6              |                  |                  |
| <b>Eosinofilia periférica</b>                       |                  |                  | 0,8              |
| <b>ACQ</b>  |                  | -0,7             |                  |
| <b>AQLQ-Sm</b>                                      |                  | 0,7              |                  |
| <b>Calv,NO</b>                                      |                  |                  | -0,6             |
| <b>J'awNO</b>                                       |                  |                  | 0,8              |

\*Entre paréntesis figura el porcentaje de la varianza que explica cada factor

# DISCUSIÓN

*“Lo propio del saber no es ni ver ni demostrar, sino interpretar”*

*Michel Foucault*



## 6 DISCUSIÓN

Existen múltiples trabajos publicados en los que se analiza el papel del ONe en el diagnóstico del asma, sin embargo todavía se dispone de poca información sobre sus componentes alveolar y bronquial y su posible utilidad en la toma de decisiones diagnósticas o terapéuticas. Este estudio, fue diseñado para determinar los valores de normalidad de los componentes alveolar y bronquial del ONe, y evaluar su aplicabilidad en la valoración global del paciente asmático.

Los objetivos de nuestro trabajo han sido principalmente dos:

- Determinar la utilidad, y eficacia del óxido nítrico exhalado y sus componentes alveolar y bronquial en el diagnóstico del asma.
- Evaluar el comportamiento de ONe,  $J'_{aw}NO$  y  $Calv,NO$ , en relación al resto de indicadores clínicos, de laboratorio y funcionales de la enfermedad.

### 6.1 VIABILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO Y SUS COMPONENTES ALVEOLAR Y BRONQUIAL

La determinación del óxido nítrico exhalado por la técnica *online*, de espiración constante a volumen corriente nos ha permitido cuantificar indirectamente y de forma rápida, sencilla y fiable la inflamación de la vía aérea en el asma. En nuestro trabajo todos los sujetos incluidos, tanto en el grupo de pacientes afectados de asma como en el grupo control, fueron capaces de realizar la determinación del ONe a 50 ml/s. Ninguno de ellos describió efectos

secundarios o reacciones adversas a la prueba. Tanto el grupo de pacientes como el de sujetos sanos realizaron varias espiraciones, desde capacidad pulmonar total, a 4 flujos de espiración constante distintos; 100, 150, 200 y 250 ml/s. Encontramos dificultades para obtener los valores de óxido nítrico exhalado a flujos iguales o superiores a 200 ml/s, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes. Dada la fuerte correlación entre los valores de ONe obtenidos a 50 ml/s y a 250 ml/s, tal y como se ha descrito previamente<sup>202</sup>, utilizamos una fórmula de regresión lineal, publicada en la literatura, para estimar de manera indirecta el valor del ONe a 250 ml a partir de los valores a 50 ml/s. Las determinaciones de ONe medido a 250 ml/s y su valor predicho (utilizando la ecuación de regresión lineal) fueron equivalentes. La media de las diferencias (ONe 250 medido - ONe 250 predicho) fue de - 4,7 ppb con un intervalo de concordancia del 95% que osciló entre -18,2 y 8,8. De esta manera comprobamos que en aquellos pacientes que no pueden completar la determinación del ONe a 250 ml/s, ésta podría estimarse indirectamente utilizando la ecuación propuesta, permitiendo así el desarrollo del modelo bicompartimental.

Para el cálculo de  $Calv,NO$  y  $J'awNO$  se utilizaron los valores correspondientes a los flujos de 100 y 150 ml/s. La técnica de espiración constante a múltiples flujos permitió determinar de forma sencilla, fiable y precisa los valores de  $Calv,NO$  y  $J'awNO$ .

#### Reproducibilidad en la medición del óxido nítrico en aire exhalado.

En nuestro trabajo analizamos la reproducibilidad del ONe, así como de los valores de  $Calv,NO$  y  $J'awNO$ , en un subgrupo de sujetos sanos. Para determinar los valores de  $Calv,NO$  y  $J'awNO$ , aplicamos el modelo

bicompartimental según Tsoukias. Todos los valores mostraron una adecuada repetitividad, presentando escasa variabilidad a lo largo de los días. Estos resultados son comparables con los obtenidos en trabajos previos como el de Kharitonov et al <sup>143</sup>, en el que se determinó el ONe en 59 individuos (30 sanos y 29 diagnosticados de asma leve) durante cinco días consecutivos en los adultos y dos días consecutivos en los niños. La medición se realizó también con un analizador de quimioluminiscencia, siguiendo las recomendaciones de la ATS, recogándose en cada sesión 3 exhalaciones correctamente practicadas. La reproducibilidad tanto en sujetos sanos como asmáticos fue muy elevada e incluso superior a la estudiada con los métodos convencionales para analizar la inflamación, con un coeficiente de reproducibilidad de 2,11 ppb y un CCI de 0,99 (límites de concordancia del análisis de Bland-Altman  $\pm$  2,92 ppb). Estos resultados también fueron objetivados por el grupo de Bohadana et al<sup>203</sup> quienes analizaron la reproducibilidad del ONe, en 39 sujetos sanos, durante cinco días consecutivos, sin encontrar diferencias significativas entre las diferentes determinaciones (límites de concordancia del análisis de Blant y Altman  $\pm$  3,56). Tampoco encontraron diferencias en función del sexo o entre fumadores y no fumadores.

Sánchez et al<sup>204</sup> analizaron la reproducibilidad intradía, al estudiar las cifras de ONe obtenidas de forma consecutiva en un mismo día (tres determinaciones separadas por 10 min) en un mismo sujeto sano. Además demostraron que las concentraciones obtenidas de ONe eran independientes de la dieta, sexo e IMC.

## Concordancia entre modelos de cálculo para la obtención de $J'_{awNO}$ y $Calv,NO$ .

Durante las últimas décadas, se ha intensificado el estudio de los cambios dinámicos del ON en la vía aérea, desarrollándose diferentes modelos matemáticos que permiten cuantificar los distintos parámetros independientes del flujo.

En la descripción inicial del modelo bicompartimental se utilizaron 2 flujos de espiración, entre 100 y 500 ml/s y se calcularon los parámetros  $J'_{awNO}$  y  $Calv,NO$  que se obtienen de contrastar la concentración de ON para cada flujo utilizado ( $VNO$ , pl/s) con el flujo espiratorio de cada espiración ( $VE$ , ml/s) de tal forma que la pendiente de la recta resultante es  $Calv,NO$  y la intersección es  $J'_{awNO}$ . Las ecuaciones de Tsoukias et al y Pietropaoli et al, entre otras, permitieron su cálculo.

En nuestro trabajo los valores de  $Calv,NO$  y  $J'_{awNO}$  fueron calculados según las ecuaciones de Tsoukias<sup>153</sup> y Pietropaoli<sup>157</sup>. El análisis de concordancia entre los valores obtenidos por ambos modelos matemáticos mostró una alta coincidencia, tanto en el grupo de sujetos sanos como en el de asmáticos, siendo ambos cálculos equivalentes, y por tanto intercambiables sin necesidad de introducir ajustes.

## Modelo bicompartimental y modelo de difusión axial.

También hemos comprobado como la aplicación del modelo de difusión axial, tal y como queda reflejado en la literatura, supone una corrección en los valores de  $J'_{awNO}$  y  $Calv,NO$ , mostrando un descenso en el valor de óxido nítrico a nivel alveolar y un aumento del componente bronquial<sup>162,170,205</sup>.



## 6.2 VALORES NORMALES DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO, ALVEOLAR Y BRONQUIAL

Los valores de ONe varían dependiendo de los métodos de determinación utilizados y de las características de la población de estudio. Debido a ello existen en la literatura múltiples análisis con ecuaciones de predicción que intentan establecer valores de referencia y que muestran una gran variabilidad así como un bajo valor predictivo<sup>206,207</sup>, incluso inferior a las ecuaciones sobre valores espirométricos, en parte justificado por los múltiples factores de confusión que interfieren en la determinación de ONe<sup>208</sup>.

Así en 2006, Olivieri et al<sup>209</sup> en 204 sujetos sanos, no fumadores, no atópicos y con edades entre 19-65 años estableció un valor medio de ONe de  $10,9 \pm 4,7$  ppb y unos valores de referencia entre 3,8 y 19,7 ppb. Más tarde, Travers et al<sup>210</sup> en 193 individuos sanos demostraron unos valores de referencia entre  $7,8 \pm 41.1$  ppb, independientemente de la edad, y encontraron valores superiores en el sexo masculino, en los sujetos con atopia y en los no fumadores.

En nuestro estudio, los valores medios  $\pm$  DE para ONe, Calv,NO y J'awNO fueron:  $18,7 \pm 8,6$  ppb (intervalo de referencia : 2,6 - 36 ppb ),  $0,9 \pm 1,4$  ppb (intervalo de referencia: -(2,1) - 3,7 ppb) y  $1410,5 \pm 715,7$  pl/s (intervalo de referencia: 86,4- 2879 pl/s), respectivamente. Los valores de ONe coinciden con los expuestos anteriormente por otros autores. En la tabla 30 se resumen la metodología y resultados de la determinación del óxido nítrico en las publicaciones más relevantes de la última década.

Más recientemente, y ante los resultados dispares de los valores de referencia propuestos en los últimos años, algunos autores plantean el uso de

puntos de corte que permitan mejorar el rendimiento diagnóstico del ONe. Así por ejemplo, en el trabajo de Shaw et al<sup>110</sup> se propone un punto de corte de 26 ppb como valor clínicamente significativo, al correlacionarse con un recuento de eosinófilos en esputo inducido > 2%. Teniendo en cuenta las limitaciones de las ecuaciones de referencia y de acuerdo con esta nueva metodología, en 2011 la ATS recomendó usar puntos de corte de ONe clínicamente significativos, con el objetivo de discernir entre asmáticos y sanos, estableciendo que una ONe > 50 ppb (35 ppb en < 12 años) era un indicador de inflamación eosinofílica y de respuesta al tratamiento con corticoides y una cifra < 25 ppb (20 en < 12 años) indicaba lo contrario <sup>84</sup>.

Choong See et al<sup>211</sup>, con el fin de validar los puntos de corte propuestos por la ATS así como de establecer rangos de normalidad propios, examinaron 13.275 sujetos sanos entre 6 y 80 años de edad, participantes de la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición 2007-2010 de EEUU (National Health and Nutrition Examination Survey -NHANES). Determinaron el ONe a una tasa de flujo espiratorio de 50 ml/s usando un dispositivo de quimioluminiscencia y siguiendo las recomendaciones de la ATS y la ERS. Los autores objetivaron que en la población infantil (6-11 años) los valores de ONe entre los percentiles 5<sup>o</sup> y 95<sup>o</sup> se encontraban entre 3.5 y 36 ppb, mientras que en mayores de 12 y hasta los 80 años de edad, estos valores oscilaban entre 3.5 y 39 ppb. Esto significa que valores de ONe > 36 ppb en menores de 12 años y > 39 ppb en adultos son indicadores de la inflamación en la vía aérea.

Las ecuaciones de predicción explicaron solamente el 10.3 % de la variación del ln(ONe) entre los 6 y 11 años de edad, y el 15.7% entre los 12 y 80 años. Entre un 39 y 45% de la población general presentó valores de ln

(ONe) superiores a dos desviaciones estándar sobre las medias estimadas. A la luz de los resultados, los autores manifiestan que en la población general existe una amplia variación de ONe hecho que dificulta la determinación de valores de normalidad y la predicción de los mismos por modelos de regresión lineal múltiple. Los autores asumen que el 95% de la población sana de EE.UU no tiene inflamación de las vías aéreas clínicamente significativa, sin embargo aplicando sus propios puntos de corte calculan una prevalencia de inflamación de la vía aérea, en individuos sanos, del 39% en < 12 años y 44% entre los 12 y 80 años. Por otra parte aplicando los umbrales superiores de la ATS (35 ppb y 50 ppb) estas cifras serían del 5% y 3%, respectivamente. Estos resultados sugieren que la población con alteraciones de la ONe no excede el 5% y que, tal como recomienda la ATS aplicar valores umbrales resulta más apropiado que recurrir a los rangos de referencia.

Nuestros datos muestran que en el grupo de sujetos sanos ninguno presentó valores de ONe superiores al umbral de 50 ppb propuesto por la ATS mientras que en el grupo de asmáticos hasta un 38,4% presenta valores inferiores a 25 ppb. Si ajustamos el análisis excluyendo fumadores y antecedentes de atopia o rinitis y sujetos en tratamiento corticoideo encontramos datos similares; ninguno de los sujetos sanos con valores de ONe > 50 ppb y un 26,4 % de los pacientes con valores de ONe < 25 ppb.

En nuestro trabajo, estudiamos los puntos de corte con mayor sensibilidad y especificidad para definir asma, aplicando el análisis bayesiano, siendo para el ONe de 35 ppb. Teniendo en cuenta dicho valor encontramos 12 sujetos sanos con niveles superiores al mismo, mientras que 111 asmáticos (47%) presentaban niveles < 35 ppb de ONe. Si seleccionamos solo aquellos

sujetos sin antecedentes de tabaquismo o tratamiento esteroideo encontramos 27 pacientes (29,6%) con niveles bajos. Estos datos se aproximan a los obtenidos aplicando los puntos de corte de ATS. Confirmamos así el valor de su uso en el estudio diagnóstico de la enfermedad, siendo un resultado negativo, poco útil para descartar la enfermedad.

Existen pocas publicaciones en las que se determine los valores de normalidad para Calv,NO y J'awNO obtenidos, aplicando el modelo bicompartimental y las correcciones para la difusión axial de Condorelli. Hogman et al<sup>212</sup> mostró valores entre 0 y 4 ppb para Calv,NO y Gelb et al<sup>213</sup> rangos entre 0,8 y 6,6 ppb y diferencias significativas con la edad.

En nuestro trabajo, el valor medio de Calv,NO, según Tsoukias y Condorelli, ( $2,1 \pm 1,5$  ppb y  $0,9 \pm 1,4$ , respectivamente), se encuentra dentro de los valores de referencia descritos en la literatura médica para personas sanas (1,0–5,6 ppb)<sup>167,171,212-214</sup>, al igual que los valores de J'awNO ( $831,8 \pm 417,8$  pl/s y  $1410,5 \pm 715,7$  pl/s, respectivamente) cuyo rango de referencia en la literatura se sitúa en torno a 420–1.280 pl/s<sup>80,153,156,157,159,167</sup>.

**Tabla 34. Metodología y resultados de la determinación del óxido nítrico exhalado en adultos sanos.**

| <b>Autor</b>                         | <b>n</b> | <b>Población</b>                    | <b>“Valores normales”</b> | <b>Analizador</b>                               |
|--------------------------------------|----------|-------------------------------------|---------------------------|---|
| <b>Kharitonov 2003<sup>143</sup></b> | 59       | Adultos y niños                     | 16,3 ppb                  | NIOX<br>(Aerocrine AB,<br>Stockholm,<br>Sweden) |
| <b>Buchvald 2005<sup>215</sup></b>   | 405      | Niños 4-17 años                     | 9,7 ppb                   | NIOX<br>(Aerocrine AB,<br>Stockholm,<br>Sweden) |
| <b>Olivierei 2006<sup>209</sup></b>  | 204      | Varones no fumadores<br>no asma     | 4,5-20,6 ppb              | CLD 88<br>(Ecomedics,<br>Switzerland)           |
|                                      |          | Mujeres no fumadores no<br>asma     | 3,6-18,6 ppb              |   |
| <b>Olin 2007<sup>216</sup></b>       | 3,376    | Adultos con o si atopia             | 25-56 ppb                 | NIOX<br>(Aerocrine AB,<br>Stockholm,<br>Sweden) |
| <b>Travers 2007<sup>210</sup></b>    | 3500     | Hombres no fumadores<br>no atópicos | 9,5-47,4 ppb              | NIOX<br>(Aerocrine AB,<br>Stockholm,<br>Sweden) |
|                                      |          | Hombres no fumadores<br>atópicos    | 11,2-56,5 pp              |   |
|                                      |          | Hombres fumadores no<br>atópicos    | 7,5-38,4 ppb              |   |
|                                      |          | Hombres fumadores y<br>atópicos     | 8,8-45,9 ppb              |   |
|                                      |          | Mujeres, no fumadoras<br>no atopia  | 7,5—37,4                  |   |
|                                      |          | Mujeres, no fumadoras,<br>atopia    | 8,8-44,6                  |   |
| Mujeres, fumadoras, no<br>atopia     | 5,9-30,5 |                                     |                           |   |
| Mujeres, fumadoras,<br>atopia        | 6,9-36,4 |                                     |                           |   |

|                                       |     |   |          |                                       |
|---------------------------------------|-----|---|----------|---------------------------------------|
| <b>Dressel<br/>2008<sup>206</sup></b> | 897 | Hombres no fumadores<br>no atópicos, 165 cm | 19,5 ppb | NOA 280 ,<br>Sievers ,<br>Boulder, CO |
|                                       |     | Hombres no fumadores<br>atópicos, 165 cm    | 29,1 pp  |                                       |
|                                       |     | Hombres fumadores no<br>atópicos, 175 cm    | 12,2 ppb |                                       |
|                                       |     | Hombres fumadores y<br>atópicos, 165 cm     | 18,3 ppb |                                       |
|                                       |     | Mujeres, no fumadoras<br>no atopia, 160 cm  | 15,7     |                                       |
|                                       |     | Mujeres, no fumadoras,<br>atopia, 160 cm    | 23,5     |                                       |
|                                       |     | Mujeres, fumadoras, no<br>atopia, 160 cm    | 9,9      |                                       |
|                                       |     | Mujeres, fumadoras,<br>atopia, 160 cm       | 14,7     |                                       |

\*Adaptado de Interpretation of exhaled nitric oxide levels for clinical applications. An official ATS clinical practice Guideline<sup>84</sup>.

### 6.3 UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO

Se han propuesto diversas utilidades para la determinación de óxido nítrico exhalado, algunas de las cuales hemos podido valorar en el grupo de estudio:

- a) Ayuda en el diagnóstico de asma.

En nuestro estudio el valor medio del ONE en el grupo de asmáticos (sin tratamiento corticoideo ni historia de tabaquismo) fue de 71,1 ppb, mientras que en el grupo control fue de 19,6 ppb, siendo la diferencia estadísticamente significativa.

Los valores de Calv,NO y J'awNO en el grupo de asmáticos fueron de 0,7 ppb y 5655,8 pl/s respectivamente y en el grupo de sanos 0,9 ppb y 1491,1 pl/s. También encontramos diferencias estadísticamente significativas para los valores de J'awNO.

Sin embargo, hubo una superposición amplia de valores entre el grupo de pacientes y el grupo control, por lo que la determinación del ONe o de J'awNO, tal y como queda reflejado en trabajos previos no siempre nos permite discriminar adecuadamente entre la población sana y la asmática. Sabemos que el oxido nítrico es un marcador de inflamación eosinofílica y es posible que en muchos de nuestros pacientes la inflamación presente sea de tipo neutrofílico y no condicione elevaciones de oxido nítrico, además en pacientes que han sido tratados con corticoides, su valor podría ser falsamente negativo así como en pacientes fumadores en los que la determinación de ONe tendría un uso limitado. La relación entre inflamación neutrofílica y asma podría estar relacionada con la mayor producción de nitritos y de L-citrulina en lugar de L- arginina con la consiguiente disminución de ON por lo que los pacientes con inflamación neutrofílica presentarían valores de ONe disminuidos<sup>217</sup>.

También existen trabajos que han comprobado la utilidad de los parámetros que caracterizan el modelo bicompartimental, estudiando la capacidad de J'awNO para discriminar entre asma y no asma<sup>218</sup>, siendo ésta similar a la del ONe.

En general se considera que el Calv,NO no suele estar elevado o experimente un leve incremento en los pacientes con asma<sup>170</sup>, debido a la menor cuantía de la producción alveolar como al aumento de la capacidad de difusión alveolo-capilar, que facilita su rápido paso al lecho vascular, donde se une a la hemoglobina. En nuestro análisis, no encontramos diferencias en los niveles de Calv,NO.

b) Identificación de fenotipos.

En la literatura también hay varios trabajos que sugieren que el ONe podría diferenciar los distintos fenotipos de asma, al reflejar la inflamación eosinofílica de la vía aérea <sup>105,109,113,137</sup>. Nosotros observamos valores más elevados de ONe y J'awNO entre los sujetos que presentaban un recuento de eosinófilos superior al 6%, siendo las diferencias estadísticamente significativas. También los pacientes con antecedentes de pruebas cutáneas positivas, tenían valores de óxido nítrico, Calv,NO y J'awNO, superiores a aquellos sin antecedentes de atopía, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

c) Ayuda en la monitorización de la enfermedad y del tratamiento.

El tratamiento antiinflamatorio con corticoides inhalados y sistémicos, reduce las concentraciones de ONe de forma rápida, y dosis dependiente permitiendo su utilidad en el control del asma<sup>146-148</sup>. En nuestro trabajo hemos observado que la población asmática sin tratamiento corticoideo tiene un valor mayor de ONe y J'awNO que los que pacientes que llevan tratamiento con corticoides, siendo las diferencias estadísticamente significativas para los valores de ONe. También encontramos diferencias entre los valores de óxido nítrico exhalado y J'awNO, entre los sujetos sanos y el grupo de tratamiento esteroideo siendo los niveles menores en el grupo sujetos sanos. No encontramos diferencias significativas en cuanto a los valores de óxido nítrico alveolar.



Existen múltiples trabajos que han analizado la capacidad del óxido nítrico de orientar la respuesta al tratamiento con corticoides<sup>146,147</sup>. Se ha comprobado que en pacientes con asma leve-moderada, valores elevados de óxido nítrico predicen una pérdida de control de la enfermedad si se reduce o abandona el tratamiento corticoideo, mientras que niveles bajos pronostican una retirada segura<sup>219,220</sup>.

De manera similar, se ha demostrado que el J'awNO es sensible a los corticoides inhalados, así en el estudio de Lehtimaki et al, en 40 adultos con asma moderada-grave, el tratamiento con fluticasona disminuía los valores de J'awNO. A su vez se ha objetivado que la disminución del J'awNO inducida por los corticoides inhalados, se asocia a una reducción de la intensidad de los síntomas de asma, a una mejoría de la función pulmonar y a una disminución de marcadores séricos de inflamación eosinófila<sup>166</sup>. En nuestro grupo, los pacientes con tratamiento corticoideo presentaban valores más bajos de J'awNO, sin embargo las diferencias no fueron significativas.

### **6.3.1 Limitaciones de la determinación de óxido nítrico exhalado**

Entre los factores que influyen en la determinación del ONE encontramos:

- a) Las contaminaciones por ON externo o nasal. En nuestro trabajo hemos descartado la contaminación ambiental dado que la inspiración se realizaba desde el circuito a través de un filtro de cero y al espirar el sistema genera una presión de al menos 3-5 cmH<sub>2</sub>O, que ayuda a cerrar el paladar blando, y contribuye también a evitar la contaminación nasal y paranasal.
- b) Existen algunos trabajos que demuestran que existe un ritmo circadiano

en la producción de óxido nítrico exhalado constatándose que a primeras horas de la mañana es mayor. En nuestro estudio todas las determinaciones fueron realizadas por la mañana para evitar posibles factores de confusión.

- c) El ONe varía con el flujo; a menor flujo, mayor ONe. En nuestro trabajo utilizamos la técnica de espiración constante a diferentes flujos. Una limitación de nuestro estudio vino dada por la dificultad de realizar la espiración a flujos superiores o iguales a 200 ml/s.
- d) Maniobras respiratorias: Se ha descrito una disminución de los niveles de ON tras la realización de espirometría forzada. En nuestro trabajo todas las determinaciones de óxido nítrico se realizaron previamente a la realización de otras maniobras respiratorias (espirometría, TPB).
- e) Alimentos: Se ha demostrado que el consumo de alimentos ricos en nitratos, las bebidas con cafeína y agua pueden afectar los niveles de ONe, es por ello que los sujetos en nuestro trabajo no habían ingerido ningún alimento dos horas antes de la prueba.

## **6.4 ANÁLISIS DE FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO**

### **6.4.1 Factores fisiológicos, ambientales y patológicos**

Existen parámetros fisiológicos como la edad y el género, ambientales como el tabaco, y patológicos que podrían influenciar los niveles de óxido nítrico exhalado:

#### **6.4.1.1 Edad**

En la literatura no existen datos consistentes acerca de la relación entre el ONe y la edad. La mayoría de los estudios muestran valores de ONe superiores a medida que aumenta la edad <sup>206,221</sup>. Algunos autores postulan el aumento de tamaño de la vía aérea con la edad o cambios en la difusión de ON como posibles causas<sup>222</sup>.

Nosotros encontramos en el grupo de sujetos sanos, una correlación débil aunque estadísticamente significativa entre la edad y el valor del ONe y J'awNO. En el grupo de asmáticos no objetivamos dicha correlación.

En el grupo de sanos, los niveles de ONe, J'awNO y Calv,NO tienden a aumentar progresivamente con la edad tanto en hombres como en mujeres.

En los pacientes con asma, los valores más altos los encontramos en el conjunto de mediana edad, siendo los valores similares en los jóvenes y mayores.

#### **6.4.1.2 Género**

Existen discrepancias respecto al grado de influencia del género y el por qué de éste. El estudio de Olin et al<sup>221</sup> objetivó, valores inferiores de ONe en mujeres respecto a los hombres. Esta menor concentración puede deberse entre otros factores a una menor síntesis endógena de ON, diferencias en la altura, o a un área menor de superficie de la vía aérea que favorece una disminución en la capacidad de difusión de ON. También se han estudiado la influencia del estado hormonal y el ciclo menstrual con resultados contradictorios<sup>223</sup>.

Nosotros encontramos unos niveles de J'awNO, Calv,NO significativamente mayores en el sexo masculino respecto al femenino tanto en el grupo de pacientes y así como de ONe y J'awNO en el grupo control.

### **6.4.1.3 Peso**

No encontramos diferencias significativas entre los valores de óxido nítrico y el peso en el grupo de pacientes asmáticos. En el grupo de sujetos sanos encontramos una correlación positiva siendo los valores de ONe y J'awNO superiores en el grupo de sujetos con sobrepeso. Los datos de la literatura al respecto son ambiguos. Existen trabajos que muestran una correlación positiva entre peso y ONe<sup>224-226</sup> así como una disminución en pacientes que perdieron peso<sup>225</sup>, sin embargo no existen estudios poblacionales que demuestren esta asociación en sujetos sanos. Por otra parte, la obesidad en pacientes asmáticos se ha asociado con un descenso de los niveles de ONe, independientemente de la gravedad del asma<sup>227-229</sup>, sin demostrarse efecto de la pérdida de peso en dichos valores<sup>230</sup>. En nuestro grupo de pacientes asmáticos la mayoría se encontraban en situación de normopeso o sobrepeso ligero, hecho que puede justificar la ausencia de correlación entre los niveles de óxido nítrico y ONe.

No encontramos correlación, ni en el grupo de sujetos sanos ni en el de asmáticos, entre el peso y la Calv,NO.

### **6.4.1.4 Tabaquismo**

Se han demostrado valores de ONe inferiores en los individuos fumadores respecto a los no fumadores<sup>231</sup>, estos hallazgos se han atribuido a la disminución de la actividad de la iNOS en las células epiteliales bronquiales y de eNOS en las células endoteliales por el efecto del tabaco<sup>232,233</sup>.

En nuestro trabajo también encontramos diferencias significativas en cuanto a los niveles de ONe y J'awNO en relación al hábito tabáquico, tanto en el grupo de sujetos sanos como en el de asmáticos. No encontramos dichas diferencias para los valores de Calv,NO, que tiende a estar más elevado en el

grupo de fumadores, posiblemente debido a un aumento de la actividad inflamatoria a nivel alveolar o de los bronquiolos respiratorios inducida por el tabaco.

#### **6.4.1.5 Atopia**

Diversos trabajos han investigado las posibles diferencias en los niveles de ONe entre asmáticos atópicos y no atópicos. Parece que hay acuerdo en que el ONe sería mayor en sujetos asmáticos con antecedentes de alergia, independientemente de la función pulmonar<sup>234</sup>.

Nosotros encontramos, al igual que en la bibliografía, una relación directa entre el ONe y la eosinofilia. En cambio dicha relación no se mantuvo con el nivel de IgE total.

En la bibliografía también se asocia la positividad del prick a neuroalergenos con mayores niveles de ONe. En nuestro caso, aunque los valores de ONe fueron superiores en los sujetos afectados de asma con prick test positivo, la diferencia no fue significativa.

#### **6.4.1.6 Tratamiento**

Se ha descrito ampliamente cómo el tratamiento esteroideo reduce los niveles de ONe<sup>76,150,235,236</sup>. Es por ello que se ha propuesto su uso para evaluar la respuesta al tratamiento y la cumplimentación del mismo. En nuestro trabajo encontramos niveles reducidos de ONe y J'awNO en pacientes en tratamiento con corticoides y/o antagonistas de los leucotrienos. No encontramos influencia sobre los valores de óxido nítrico alveolar. En general, nuestro grupo de pacientes asmáticos, eran asma estables con una afectación funcional leve y un buen grado de control con niveles basales bajos Calv,NO.

## **6.5 RELACION DE LOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN CON LAS VARIABLES UTILIZADAS EN LA EVALUACIÓN DEL PACIENTE ASMÁTICO**

### **6.5.1 Óxido nítrico y función pulmonar**

En la literatura, tampoco existen estudios concluyentes que indiquen una clara relación entre los niveles de ONe o sus componentes alveolar y bronquial y los parámetros habituales de función pulmonar. Los trabajos publicados hasta la fecha, muestran resultados discordantes y relaciones muy débiles, que además, tienden a desaparecer cuando los pacientes son tratados con corticosteroides. Es frecuente encontrar pacientes con asma alérgica y niveles de ONe elevados que presentan pruebas funcionales normales. Por otra parte, en asmas graves que presentan importante alteración funcional podemos objetivar valores de óxido nítrico bajos, reflejando aspectos distintos y a la vez complementarios de la enfermedad.

En nuestro trabajo no encontramos correlación significativa entre los valores de óxido nítrico y el grado de obstrucción bronquial estimado mediante el cociente  $FEV_1/FVC$ , ni con los valores de FVC ni  $FEV_1$ . Por el contrario, sí que encontramos correlación significativa entre los valores de ONe y el porcentaje de cambio del FVC,  $FEV_1$  y flujos mesoespiratorios en la prueba broncodilatadora, y entre el  $J'awNO$  y el porcentaje de cambio para  $FEV_1$  y los flujos mesoespiratorios en el test broncodilatador. No encontramos correlación entre los valores de  $Calv,NO$  y las pruebas de función pulmonar.

En este sentido, el trabajo de Ciprandi et al, centrado en población pediátrica con antecedentes de atopia y con asma o rinitis, evidenció una

marcada correlación entre el ONE y la respuesta al test broncodilatador, sugiriendo el papel de la determinación del ONE como predictor de la reversibilidad bronquial<sup>237</sup>. Los valores de ONE pueden verse influenciados por el calibre de la vía aérea, motivo por el que algunos autores sugieren interpretar los cambios en sus valores en el contexto de los cambios en el grado de obstrucción de la vía aéreas y proponen su uso como biomarcador que refleja tanto la inflamación en la vía aérea como los cambios en la función pulmonar<sup>238</sup>.

La relación del J'awNO con la reversibilidad bronquial se evaluó en el trabajo de Puckett et al<sup>169</sup> en 179 niños con asma leve (69 sin tratamiento previo con esteroides) y en 21 controles sanos no atópicos ni asmático de la misma edad, la repuesta broncodilatadora alcanzó una moderada correlación el con J'awNO, aunque solo en los niños que no habían recibido tratamiento corticoideo. Se comprobó que un incremento del FEV1 > 8% tras la administración de broncodilatadores presenta un elevado valor predictivo positivo para detectar un J'awNO elevado.

En nuestro estudio tanto el ONE, como el J'awNO reflejarían el grado de reversibilidad a la obstrucción de la vía aérea siendo un predictor de la respuesta al tratamiento broncodilatador.

### **6.5.2 Óxido nítrico e hiperrespuesta bronquial**

La relación entre el metabolismo del óxido nítrico y la reactividad bronquial en el asma también es compleja. Parece existir una correlación entre la determinación de ONE y la presencia de hiperreactividad bronquial medida por la concentración de metacolina a la que la que se detecta un descenso del

20% del FEV<sub>1</sub>% basal (PC<sub>20</sub>), en pacientes jóvenes con asma atópica y no atópica para inhalación con histamina<sup>78,239-241</sup>.

En el presente trabajo, hallamos una correlación negativa y significativa entre el grado de hipersensibilidad medido por la PC<sub>20</sub> y el de inflamación bronquial. En relación a esto, Lehtimäki et al<sup>167</sup>, objetivó, en pacientes con asma estable y sin uso previo de corticoides inhalados, una correlación entre el J'awNO y la hiperrespuesta bronquial, en concreto con la pendiente de la curva dosis- respuesta de metacolina.

También encontramos correlación entre los valores de deltaFVC, que reflejarían el grado de atrapamiento aéreo durante el TPB y los niveles de ONe y su componente bronquial.

No encontramos correlación entre los valores de Calv,NO y los datos de hiperrespuesta bronquial o atrapamiento aéreo, quizás porque ambas, reflejan características propias de las vías aéreas de cada paciente, sin relación con la inflamación más distal.

### **6.5.3 Correlación con medidas del control y calidad de vida en la enfermedad**

Si los niveles de óxido nítrico reflejan el grado de control de la enfermedad es un tema todavía a debate.

En nuestro trabajo los niveles de Calv,NO y J'awNO no han sido útiles para diferenciar grados de gravedad o control del asma. Tampoco encontramos correlación entre los valores de óxido nítrico y las puntuaciones del cuestionario ACT y ACQ. Sin embargo, algunos autores como Senna et al han encontrado una correlación entre los niveles de ONe a 50 ml/s y los valores de ACT en pacientes con asma de reciente diagnóstico y sin tratamiento



esteroideo<sup>242</sup>. Además, Michils et al mostraron que la capacidad del ONe de predecir el grado de control de la enfermedad se reduce en pacientes que utilizan tratamiento corticoideo, hecho que podría explicar la discrepancia de resultados<sup>243</sup>. Más tarde los mismos autores han objetivado que valores altos de ONe (> 45 ppb) excluyen un buen control del asma, estimado con el cuestionario ACQ de una forma fiable ( VPN: 89%)<sup>244</sup>. Menzies et al también encontraron una correlación significativa entre los niveles de ONe y los síntomas de la enfermedad<sup>245</sup>. Sin embargo, trabajos más recientes muestran resultados contrarios, y al igual que nuestro trabajo, no encuentran correlación significativa entre los valores de los cuestionarios de control de la enfermedad y los niveles de ON<sup>246,247</sup>, hecho que resulta comprensible ya que no es infrecuente encontrar pacientes asintomáticos con evidencia de actividad inflamatoria y al contrario, pacientes muy sintomáticos con escasa inflamación, probablemente porque los cuestionarios de control de la enfermedad y la determinación del óxido nítrico miden aspectos diferentes de la enfermedad.

Existen pocas publicaciones que analicen la relación entre el control de la enfermedad y los componentes alveolar y bronquial del ON. En una cohorte de 44 pacientes asmáticos, no fumadores, y en situación de estabilidad clínica en tratamiento con corticoides inhalados, Gelb et al encontró que niveles elevados de Calv,NO aumentan por 3 el riesgo relativo de exacerbación grave ( IC 95%; 0,9-9,9) y valores anormales de J'awNO aumentan el riesgo por 2,4 ( 1,0-5,6), sugiriendo una asociación entre Calv,NO y grado de control<sup>248</sup>. Sin embargo, en dicho estudio los valores de Calv,NO fueron sobreestimados ya que no se corrigieron para la difusión axial. Nuestros resultados confirman los datos de Berry et al que no encuentra correlación entre los componentes

alveolar y bronquial de ON y el cuestionario de control AQQ<sup>172</sup>. Más recientemente Mahut et al tampoco encuentran relación entre los valores de Calv,NO y J'awNO y los valores de ACT<sup>249</sup>. Una posible explicación a éstas disparidades radicaría en las diferencias en las poblaciones de estudio. Nuestro grupo de asmáticos, sin tratamiento corticoideo, era un grupo en general con un asma leve, bien controlado y espirometría basal normal. La inclusión de población con mayor grado de gravedad podría modificar nuestros resultados.

Tampoco encontramos relación entre la severidad de nuestros enfermos, valorada según criterios GINA y el los niveles de ON. Trabajos recientes han objetivado niveles elevados de Calv,NO en pacientes con asma refractaria o con escasa respuesta al tratamiento corticoideo y proponen su uso como marcador de inflamación distal o remodelado<sup>171,172,250</sup>. Mahut et al encontraron correlación entre los valores de Calv,NO y PCE en el BAL y flujos mesoespiratorios<sup>249</sup>. Nosotros no encontramos dicha correlación quizás porque la gran mayoría de nuestros pacientes estaban bien controlados, y presentaban un asma intermitente leve-moderado, con niveles bajos de Calv,NO.

Diversos autores han investigado el impacto del asma en la calidad de vida del paciente. Sin embargo, la relación entre calidad de vida e inflamación de las vías respiratorias no está suficientemente analizada. En nuestro trabajo hemos estudiado si la inflamación de las vías respiratorias, se asocia con la calidad de vida, medida por el cuestionario AQLQ-Sm, sin encontrar relación entre dicho cuestionario y los niveles de óxido nítrico. Resultados similares se obtuvieron en el trabajo de Scichilone et al en el que se estudiaron 22 asmáticos leves con rinitis concomitante. El Rhinasthma se utilizó para medir

calidad de vida y el ACT para evaluar el grado de control de la enfermedad. No se encontró relación entre la calidad de vida y los valores de  $Calv, NO$  y  $J'awNO$ . Sin embargo, cuando los sujetos fueron divididos en asma controlada ( $ACT \geq 20$ ) y no controlada ( $ACT < 20$ ), el óxido nítrico alveolar correlacionó significativamente con la calidad de vida en los asmáticos no controlados. Estos resultados sugieren que, en el asma no controlada, la inflamación de la vía aérea periférica podría ser responsable de la alteración de la calidad de vida<sup>251</sup>. En nuestro grupo no encontramos correlación entre los datos de calidad de vida y los marcadores de inflamación, independientemente del grado de control de la enfermedad. Si que encontramos una correlación fuerte y significativa entre grado control (ACT y ACQ) y calidad de vida (AQLQ-Sm). Dichos resultados sugieren que la calidad de vida no se ve influenciada por el grado de inflamación de la vía aérea, siendo ésta determinada por otras variables dependientes de los síntomas, gravedad y control de la enfermedad.

## **6.6 PUNTOS DE CORTE EN EL DIAGNÓSTICO DE ASMA, ANÁLISIS BAYESIANO**

Tal y como hemos comentado previamente, el rendimiento diagnóstico de la medición del ONe en el asma, está condicionado por los resultados, no siempre concordantes, de los diversos trabajos sobre valores de normalidad de óxido nítrico. Así, ante el escaso valor predictivo de las ecuaciones de referencia y los resultados dispares de los valores de normalidad, las últimas normativas recomiendan la utilización de puntos de corte adecuados, para discernir entre sujetos con o sin presencia de inflamación eosinofilia en la vía aérea. En este sentido, más que utilizar un punto de corte único, la mayoría de

autores proponen el empleo de distintos valores, para la exclusión o el diagnóstico de asma.

En nuestro trabajo, determinamos los puntos de corte con mejor S y E para el diagnóstico de la enfermedad, obteniendo una rentabilidad diagnóstica superponible para ONe y J'awNO, siendo escasa la utilidad del Calv,NO, al menos, en el diagnóstico de la enfermedad. Las curvas de eficacia diagnóstica nos han permitido establecer como mejor punto de corte el que presenta una alta S (0,7) y E (0,8), en el caso de ONe sería 35 ppb y en el de J'awNO 2500 pl/s. De haber escogido cifras de ONe o J'awNO más elevadas, hubiera aumentado la especificidad, a costa de perder sensibilidad y capacidad de identificar posibles enfermos. Asimismo se calculó la probabilidad posprueba de asma tras un resultado positivo ( $ONE > 35$  ppb o  $J'awNO > 2500$  pl/s) y la probabilidad posprueba tras un resultado negativo ( $ONE < 35$  ppb o  $J'awNO < 2500$  pl/s). En el presente trabajo, el mejor resultado se obtiene cuando la probabilidad preprueba es del 48%. Es decir, la situación en que resulta más útil medir el ONe para el diagnóstico de asma, es aquella en la que el clínico prevé que el paciente tiene aproximadamente el 50% de probabilidades de desarrollar asma y el 50% de no desarrollarla. Nuestros hallazgos muestran que dicha determinación solo debería considerarse si la probabilidad preprueba de asma se encuentra entre 0,21 y 0,81. Si la probabilidad preprueba es menor que 0,21 la probabilidad posprueba sería  $< 0,5$  y no aceptable. Por otro lado si la probabilidad preprueba es superior a 0,81, los resultados de la determinación de óxido nítrico no aumentarían significativamente la probabilidad preprueba. La determinación del J'awNO tal y como se ve reflejado en los resultados no

aportaría ningún beneficio al ONe en la evaluación diagnóstica del paciente asmático, al ser los resultados para J'awNO superponibles.

Dada la baja S y E para los valores de Calv,NO obtenidos, su cálculo no tendría valor, al menos en el grupo de pacientes con asma leve y, estables clínicamente, como los representados en nuestra muestra.

La diferencia entre la probabilidad de tener asma antes y después de la prueba es la ganancia diagnóstica, que representa la contribución de la prueba al diagnóstico de asma. La suma de la ganancia diagnóstica positiva y negativa es el contenido diagnóstico de la prueba.

En nuestro trabajo el contenido diagnóstico de ONe y J'awNO fue de 0,6. La máxima ganancia positiva de la prueba en nuestro estudio (0,4) se alcanza cuando la probabilidad preprueba es de 0,3, por debajo de este nivel la ganancia positiva desciende. De manera similar, la ganancia negativa máxima (0,3), se alcanza cuando la probabilidad preprueba es de 0,6. Así el contenido diagnóstico de asma es máximo cuando la probabilidad de asma se encuentra entre 0,3-0,6. Los resultados son superponibles para ONe y J'awNO.

## 6.7 ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO UNA APROXIMACIÓN MULTIDIMENSIONAL

El análisis factorial es una técnica estadística que permite la identificación y agrupación de datos en factores o dimensiones en los que las variables que los conforman presentan una alta correlación entre sí, sin solaparse con las variables de otros grupos. Esta técnica estadística se ha utilizado ampliamente para validar cuestionarios de control y calidad de vida en asma<sup>252-256</sup>. Además, en los últimos años, se han publicado diversos trabajos que han incorporado dicho análisis, con el fin de estudiar los diferentes dominios de la enfermedad. En este sentido, algunos autores han objetivado como los síntomas de asma, y los datos de función pulmonar, no siempre correlacionan entre sí, formando parte de áreas distintas del paciente<sup>257-259</sup>. Además cuando se introducen en el examen los marcadores de inflamación, éstos suelen correlacionar significativamente entre sí, sin formar parte de otros grupos formados por los síntomas o los datos de función pulmonar<sup>260,261</sup>.

El objetivo principal del análisis factorial en la presente tesis, fue el de conocer la relación entre Calv,NO y J'awNO, y las diferentes variables (clínicas, analíticas, funcionales etc) utilizadas habitualmente en el diagnóstico y seguimiento del asma, con el fin de entender mejor el papel de ambos biomarcadores, en la descripción general de la enfermedad<sup>201</sup>. Nuestro examen identificó tres factores que explicarían el 52,2% de la varianza común del asma. El primero y el que mayor varianza de la enfermedad explicaría, describe como, al menos en las mujeres cuanto mayor es su edad, y peso corporal, menor es la sensibilidad alérgica y mayor es también el porcentaje de caída del FVC

durante el test de provocación bronquial. Estos datos estarían en consonancia con los estudios de clusters de Haldar et al <sup>113</sup> y Moore et al <sup>8</sup>. Ambos trabajos identifican a un conjunto de pacientes obesos de edad más avanzada (sobre todo mujeres) con asma de inicio en la edad adulta y menor atopia (cluster 3). Este grupo representaría el 10% de los enfermos con asma grave y con pautas de tratamiento más complejas. En estos pacientes objetivamos también como el IMC participa en la respuesta bronco constrictora durante el test de provocación bronquial provocando mayor atrapamiento aéreo a medida que se incrementa su valor, de forma independiente de otros parámetros de función pulmonar e inflamación. En esta línea existen trabajos que demuestran una relación exponencial entre el IMC y la capacidad de reserva funcional (FRC) con una reducción de ésta, incluso en personas con sobrepeso. Una baja FRC aumenta el riesgo de limitación del flujo espiratorio y del cierre excesivo de las vías aéreas, siendo este más marcado durante la respuesta broncoconstrictora<sup>262</sup>. La interacción de asma y obesidad es por tanto compleja, la obesidad puede empeorar el asma o simplemente aumentar los síntomas respiratorios, sin embargo, en los pacientes estudiados, esto no se traduce en un peor control, evaluado por el cuestionario ACQ ni por una peor calidad de vida, tal y como nos muestran los resultados del análisis factorial.

El segundo factor señaló, que el estado de salud y el grado de control de la enfermedad están predominantemente determinados, según las variables estudiadas, con el mayor o menor grado de hiperrespuesta bronquial y obstrucción. El control del asma se define como el grado en el que las manifestaciones de la enfermedad están ausentes o se ven reducidas a su mínima expresión; es un concepto muy amplio pero refleja la idoneidad del

tratamiento. Aunque existen diferencias entre países, hasta la fecha los datos indican que aproximadamente el 70% de los asmáticos tienen mal controlada la enfermedad<sup>263,264</sup>. En los estudios que analizan el control del asma se intentan identificar las variables que se asocian con ese control deficiente, con vistas a modificarlas si ello es posible. Así, en las distintas publicaciones, se han descrito variables clínicas, demográficas, socioeconómicas y antropométricas que pueden afectar al control del asma, como sexo, raza, índice de masa corporal, tabaquismo, nivel de educación, actividad física, tratamiento y gravedad de la propia enfermedad. En nuestro trabajo FEV<sub>1</sub> y PC<sub>20</sub> fueron los parámetros más fuertemente asociados al control y calidad de vida en el asma.

Finalmente el tercer factor agruparía los biomarcadores Calv,NO y J'awNO con el porcentaje de eosinofilia en sangre periférica, corroborando la correlación entre el ON y la eosinofilia, ampliamente estudiada en la literatura. Estos datos son comparables a trabajos previos como el de Holt et<sup>265</sup> en el que los autores estudian sobre una población infantil de asmáticos estables, diferentes variables clínicas, funcionales, biomarcadores etc, y su relación con respecto al estado de salud del paciente. En su análisis factorial obtienen 5 factores que explican entre un 50-60% de la varianza de la enfermedad. En uno de los factores encontraron agrupadas los valores de IgE, prick test, el conteo de eosinófilos y los datos de hiperrespuesta bronquial. Cuando introducen en el análisis el ONe, éste se asocia a los marcadores de inflamación y atopia, sin formar parte de otros factores en los que se incluyen variables clínicas o funcionales. Esta falta de correlación de los biomarcadores, con otras esferas de la enfermedad, sugiere su utilidad como complemento a



las herramientas habituales utilizadas para el seguimiento de la misma y la mejor caracterización y definición del paciente asmático.

En nuestro trabajo introducimos los valores de  $Calv,NO$  y  $J'awNO$ , hasta ahora no utilizados en los razonamientos factoriales, objetivando su correlación independiente de otras esferas de la enfermedad, con un comportamiento similar al del  $ONe$ .

En definitiva, los datos del análisis factorial, apoyarían el uso de los biomarcadores en la práctica clínica habitual, con el fin de monitorizar la enfermedad desde una visión multidimensional. Sin embargo, debido al pequeño tamaño muestral de nuestro grupo, los resultados deberían ser confirmados en el tiempo y con una población más amplia.



# **CONCLUSIONES**



## 7 CONCLUSIONES

- 1) En nuestro laboratorio la determinación de ONe con la técnica de espiración a múltiples flujos nos ha permitido desarrollar el modelo bicompartimental. Se establecieron valores de referencia para ONe entre 2,6-36 ppb con un valor medio de  $18,7 \pm 8,6$  ppb y, para J'awNO y Calv,NO, según Condorelli et al, entre 86,4-2879 pl/s con un valor medio de  $1404,5 \pm 715,7$  y entre (-2,1)-3,7ppb con un valor medio de  $0,9 \pm 1,4$ , respectivamente.
- 2) En población sana y no fumadora, los valores de Calv,NO y J'awNO aplicando el modelo lineal de Tsoukias y el de Pietropaoli, son reproducibles y presentan una escasa variabilidad a lo largo de los días.
- 3) Los valores de Calv,NO y J'awNO estimados mediante la aplicación de los modelos lineales de Tsoukias y Pietropaoli muestran una gran consistencia, siendo superponibles, y por tanto intercambiables sin necesidad de introducir ajustes.
- 4) La determinación de los componentes del óxido nítrico exhalado por el modelo de difusión axial (Condorelli et al) implica un descenso en el valor del óxido nítrico a nivel alveolar y un aumento del componente bronquial.
- 5) La rentabilidad diagnóstica del J'awNO es similar a la del ONe mientras que los niveles de Calv,NO no suelen estar elevados o experimentan un leve incremento en pacientes con asma leve-moderado, no siendo útiles para el diagnóstico de asma. Valores de ONe > 35 ppb y de J'awNO >

2500 pl/s se asocian al diagnóstico de asma con una S del 70% y E del 88% con un AUC 0,83.

- 6) El estudio de los componentes de inflamación eosinofílica, expresado por medio de ONe, J'awNO y Calv,NO, se muestra independiente de otros parámetros funcionales, demográficos o de control de la enfermedad, en el análisis multivariado.

# **BIBLIOGRAFÍA**





## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Plaza V. Guía Española para el Manejo del Asma. *Arch Bronconeumol*. 2015;51:2-54.
2. Djukanovic R. Bronchoscopy as a research tool for the study of asthma pathogenesis and effects of antiasthma drugs. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98:S41-45; discussion S64-46.
3. Diamant Z, Boot JD, Mantzouranis E, Flohr R, Sterk PJ, Gerth van Wijk R. Biomarkers in asthma and allergic rhinitis. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010;23:468-481.
4. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.
5. Holgate ST. Asthma: more than an inflammatory disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2002;2:27-29.
6. Cookson WO, Moffatt MF. Genetics of asthma and allergic disease. *Hum Mol Genet*. 2000;9:2359-2364.
7. Barnes KC. Evidence for common genetic elements in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:S192-200.
8. Moore WC, Bleecker ER, Curran-Everett D, et al. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:405-413.
9. Agache I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*. 2012;67:835-846.
10. Siroux V, Basagana X, Boudier A, et al. Identifying adult asthma phenotypes using a clustering approach. *Eur Respir J*. 2011;38:310-317.

11. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*. 2006;368:804-813.
12. Wenzel SE. Phenotypes in asthma: useful guides for therapy, distinct biological processes, or both? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:579-580.
13. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1001-1008.
14. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:101-108.
15. Balzar S, Chu HW, Strand M, Wenzel S. Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:431-439.
16. Chu HW, Balzar S, Westcott JY, et al. Expression and activation of 15-lipoxygenase pathway in severe asthma: relationship to eosinophilic phenotype and collagen deposition. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:1558-1565.
17. Payne DN, Adcock IM, Wilson NM, Oates T, Scallan M, Bush A. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1376-1381.

18. Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119:1043-1052; quiz 1053-1044.
19. Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6:256-259.
20. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344:30-37.
21. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med.* 2002;346:1699-1705.
22. Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest.* 1999;104:985-993.
23. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 1990;323:1033-1039.
24. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991;21:361-374.
25. Ramos-Barbon D, Presley JF, Hamid QA, Fixman ED, Martin JG. Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma. *J Clin Invest.* 2005;115:1580-1589.
26. Ramos-Barbon D, Fraga-Iriso R, Brienza NS, et al. T Cells localize with proliferating smooth muscle alpha-actin+ cell compartments in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:317-324.
27. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:89-95.

28. Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, et al. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:S9-23.
29. Wadsworth S, Sin D, Dorscheid D. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. *J Asthma Allergy.* 2011;4:77-86.
30. Erzurum SC, Gaston BM. Biomarkers in asthma: a real hope to better manage asthma. *Clin Chest Med.* 2012;33:459-471.
31. Villa JR GG, 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;45:479-482.
32. Parra A, Sanz ML, Vila L, Prieto I, Dieguez I, Oehling AK. Eosinophil soluble protein levels, eosinophil peroxidase and eosinophil cationic protein in asthmatic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 1999;9:27-34.
33. 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;25:167-174.
34. Vanto T, Koskinen P. Serum eosinophil cationic protein in the evaluation of asthma severity in children. *Allergy.* 1998;53:415-419.
35. Lowhagen O, Wever AM, Lusuardi M, et al. The inflammatory marker serum eosinophil cationic protein (ECP) compared with PEF as a tool to decide inhaled corticosteroid dose in asthmatic patients. *Respir Med.* 2002;96:95-101.

36. Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:59-99.
37. Jia G, Erickson RW, Choy DF, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:647-654 e610.
38. Takayama G, Arima K, Kanaji T, et al. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:98-104.
39. Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, et al. Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. *Allergy.* 2002;57:173-177.
40. Leung TF, Wong CK, Chan IH, Ip WK, Lam CW, Wong GW. Plasma concentration of thymus and activation-regulated chemokine is elevated in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:404-409.
41. Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, et al. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med.* 2007;357:2016-2027.
42. Cai C, Yang J, Hu S, Zhou M, Guo W. Relationship between urinary cysteinyl leukotriene E4 levels and clinical response to antileukotriene treatment in patients with asthma. *Lung.* 2007;185:105-112.
43. Rabinovitch N, Zhang L, Gelfand EW. Urine leukotriene E4 levels are associated with decreased pulmonary function in children with persistent airway obstruction. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:635-640.

44. Magnussen H, Holz O. Monitoring airway inflammation in asthma by induced sputum. *Eur Respir J*. 1999;13:5-7.
45. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl*. 2002;37:1s-2s.
46. Grootendorst DC, Sont JK, Willems LN, et al. Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:769-779.
47. Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:1715-1721.
48. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. 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.
49. Kulkarni NS, Hollins F, Sutcliffe A, et al. Eosinophil protein in airway macrophages: a novel biomarker of eosinophilic inflammation in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:61-69 e63.
50. Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:64-72.
51. Ko FW, Diba C, Roth M, et al. A comparison of airway and serum matrix metalloproteinase-9 activity among normal subjects, asthmatic patients, and patients with asthmatic mucus hypersecretion. *Chest*. 2005;127:1919-1927.

52. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1945-1950.
53. Macfarlane AJ, Dworski R, Sheller JR, Pavord ID, Kay AB, Barnes NC. Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 hours after allergen inhalation in atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1553-1558.
54. Wood LG, Garg ML, Simpson JL, et al. Induced sputum 8-isoprostane concentrations in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:426-430.
55. Meijer RJ, Postma DS, Kauffman HF, Arends LR, Koeter GH, Kerstjens HA. Accuracy of eosinophils and eosinophil cationic protein to predict steroid improvement in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2002;32:1096-1103.
56. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005;26:523-548.
57. Ueno T, Kataoka M, Hirano A, et al. Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. *Respirology.* 2008;13:654-663.
58. Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, et al. Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest.* 2001;120:1136-1139.
59. 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;166:1345-1349.

60. Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, et al. Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations. *Thorax*. 2003;58:505-509.
61. Montuschi P, Barnes PJ, Ciabattini G. Measurement of 8-isoprostane in exhaled breath condensate. *Methods Mol Biol*. 2010;594:73-84.
62. Battaglia S, den Hertog H, Timmers MC, et al. Small airways function and molecular markers in exhaled air in mild asthma. *Thorax*. 2005;60:639-644.
63. Hunt JF, Fang K, Malik R, et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:694-699.
64. Moser B, Bodrogi F, Eibl G, Lechner M, Rieder J, Lirk P. Mass spectrometric profile of exhaled breath--field study by PTR-MS. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005;145:295-300.
65. Fens N, Zwinderman AH, van der Schee MP, et al. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:1076-1082.
66. Dragonieri S, Schot R, Mertens BJ, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:856-862.
67. Giner J, Sibila O, Plaza V. La nariz electronica. *Inflamometría en asma y cómo medir la inflamación bronquial. Manual SEPAR de procedimientos*. 2015:77-80.
68. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest*. 2006;130:1541-1546.



69. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181:852-857.
70. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J.* 1993;6:1368-1370.
71. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet.* 1994;343:133-135.
72. Kharitonov SA, Yates D, Springall DR, et al. Exhaled nitric oxide is increased in asthma. *Chest.* 1995;107:156S-157S.
73. Massaro AF, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM. Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:800-803.
74. Persson MG, Zetterstrom O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet.* 1994;343:146-147.
75. Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:892-896.
76. Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:454-457.
77. Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, et al. Exhaled nitric oxide and bronchial reactivity during and after inhaled beclomethasone in mild asthma. *J Asthma.* 1998;35:473-479.

78. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax*. 1998;53:91-95.
79. van Rensen EL, Straathof KC, Veselic-Charvat MA, Zwinderman AH, Bel EH, Sterk PJ. Effect of inhaled steroids on airway hyperresponsiveness, sputum eosinophils, and exhaled nitric oxide levels in patients with asthma. *Thorax*. 1999;54:403-408.
80. American Thoracic S, European Respiratory S. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:912-930.
81. Baraldi E, de Jongste JC, European Respiratory Society/American Thoracic Society Task F. Measurement of exhaled nitric oxide in children, 2001. *Eur Respir J*. 2002;20:223-237.
82. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J*. 1997;10:1683-1693.
83. Recommendations for standardized procedures for the on-line and off-line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:2104-2117.
84. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:602-615.

85. Koshland DE, Jr. The molecule of the year. *Science*. 1992;258:1861.
86. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-526.
87. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:175-195.
88. Stewart L, Katial R. Exhaled nitric oxide. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27:571-586; v.
89. Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, et al. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 1988;154:213-216.
90. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. 1993;268:12231-12234.
91. Marshall HE, Stamler JS. NO waiting to exhale in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:685-687.
92. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-2012.
93. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:707-736.
94. Silkoff PE, Robbins RA, Gaston B, Lundberg JO, Townley RG. Endogenous nitric oxide in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:438-448.
95. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1:217-224.

96. 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.
97. 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.
98. Ricciardolo FL, Timmers MC, Geppetti P, et al. Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:198-204.
99. Morris CR, Poljakovic M, Lavrishia L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM, Jr. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:148-153.
100. 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. *J Immunol*. 2000;164:5970-5980.
101. Batra J, Pratap Singh T, Mabalirajan U, Sinha A, Prasad R, Ghosh B. Association of inducible nitric oxide synthase with asthma severity, total serum immunoglobulin E and blood eosinophil levels. *Thorax*. 2007;62:16-22.
102. Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A, et al. Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with NOS1 genotype. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:2043-2047.

103. Kharitonov SA, Lubec G, Lubec B, Hjelm M, Barnes PJ. L-arginine increases exhaled nitric oxide in normal human subjects. *Clin Sci (Lond)*. 1995;88:135-139.
104. Lara A, Khatri SB, Wang Z, et al. Alterations of the arginine metabolome in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:673-681.
105. Silkoff PE, Lent AM, Busacker AA, et al. Exhaled nitric oxide identifies the persistent eosinophilic phenotype in severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:1249-1255.
106. Lim S, Jatakanon A, Meah S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma. *Thorax*. 2000;55:184-188.
107. Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. *Thorax*. 2003;58:528-532.
108. Lex C, Ferreira F, Zacharasiewicz A, et al. Airway eosinophilia in children with severe asthma: predictive values of noninvasive tests. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:1286-1291.
109. Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1175-1179.
110. Shaw DE, Berry MA, Thomas M, et al. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:231-237.

111. 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. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16:52-58.
112. Pedroletti C, Lundahl J, Alving K, Hedlin G. Exhaled nitric oxide in asthmatic children and adolescents after nasal allergen challenge. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16:59-64.
113. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:218-224.
114. Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, et al. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:418-424.
115. Jouaville LF, Annesi-Maesano I, Nguyen LT, Bocage AS, Bedu M, Caillaud D. Interrelationships among asthma, atopy, rhinitis and exhaled nitric oxide in a population-based sample of children. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:1506-1511.
116. Nair P, Kjarsgaard M, Armstrong S, Efthimiadis A, O'Byrne PM, Hargreave FE. Nitric oxide in exhaled breath is poorly correlated to sputum eosinophils in patients with prednisone-dependent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:404-406.
117. Tseliou E, Bessa V, Hillas G, et al. Exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate pH in severe refractory asthma. *Chest.* 2010;138:107-113.

118. Hanania NA, Wenzel S, Rosen K, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:804-811.
119. Warke TJ, Fitch PS, Brown V, et al. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax.* 2002;57:383-387.
120. 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. *Eur Respir J.* 1999;13:1391-1395.
121. Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, et al. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:738-743.
122. Schleich FN, Seidel L, Sele J, et al. Exhaled nitric oxide thresholds associated with a sputum eosinophil count  $\geq 3\%$  in a cohort of unselected patients with asthma. *Thorax.* 2010;65:1039-1044.
123. Strunk RC, Szefer SJ, Phillips BR, et al. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:883-892.
124. Deykin A, Massaro AF, Drazen JM, Israel E. Exhaled nitric oxide as a diagnostic test for asthma: online versus offline techniques and effect of flow rate. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1597-1601.
125. 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.

126. Fortuna AM, Feixas T, Gonzalez M, Casan P. Diagnostic utility of inflammatory biomarkers in asthma: exhaled nitric oxide and induced sputum eosinophil count. *Respir Med.* 2007;101:2416-2421.
127. Berkman N, Avital A, Breuer R, Bardach E, Springer C, Godfrey S. Exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma: comparison with bronchial provocation tests. *Thorax.* 2005;60:383-388.
128. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, et al. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:473-478.
129. Kowal K, Bodzenta-Lukaszyk A, Zukowski S. Exhaled nitric oxide in evaluation of young adults with chronic cough. *J Asthma.* 2009;46:692-698.
130. Saito J, Sato S, Hasunuma H, et al. Off-line fractional exhaled nitric oxide measurement is useful to screen allergic airway inflammation in an adult population. *J Asthma.* 2007;44:805-810.
131. Leon de la Barra S, Smith AD, Cowan JO, Peter Herbison G, Robin Taylor D. Predicted versus absolute values in the application of exhaled nitric oxide measurements. *Respir Med.* 2011;105:1629-1634.
132. Pedrosa M, Cancelliere N, Barranco P, Lopez-Carrasco V, Quirce S. Usefulness of exhaled nitric oxide for diagnosing asthma. *J Asthma.* 2010;47:817-821.
133. Cordeiro D, Rudolphus A, Snoey E, Braunstahl GJ. Utility of nitric oxide for the diagnosis of asthma in an allergy clinic population. *Allergy Asthma Proc.* 2011;32:119-126.



134. Matsunaga K, Hirano T, Akamatsu K, et al. Exhaled nitric oxide cutoff values for asthma diagnosis according to rhinitis and smoking status in Japanese subjects. *Allergol Int.* 2011;60:331-337.
135. Schneider A, Schwarzbach J, Faderl B, Welker L, Karsch-Volk M, Jorres RA. FENO measurement and sputum analysis for diagnosing asthma in clinical practice. *Respir Med.* 2013;107:209-216.
136. Guía Española Para el Manejo del Asma. *Arch Bronconeumol.* 2009;45:1-35.
137. Hastie AT, Moore WC, Meyers DA, et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:1028-1036 e1013.
138. Pijnenburg MW, Bakker EM, Lever S, Hop WC, De Jongste JC. High fractional concentration of nitric oxide in exhaled air despite steroid treatment in asthmatic children. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:920-925.
139. 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.
140. de Jongste JC, Carraro S, Hop WC, Group CS, Baraldi E. Daily telemonitoring of exhaled nitric oxide and symptoms in the treatment of childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:93-97.
141. Petsky HL, Cates CJ, Li A, Kynaston JA, Turner C, Chang AB. Tailored interventions based on exhaled nitric oxide versus clinical symptoms for asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009CD006340.

142. Gibson PG. Using fractional exhaled nitric oxide to guide asthma therapy: design and methodological issues for Asthma Treatment Algorithm studies. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:478-490.
143. Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, Meah S, Barnes PJ. Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J*. 2003;21:433-438.
144. Ekroos H, Karjalainen J, Sarna S, Laitinen LA, Sovijarvi AR. Short-term variability of exhaled nitric oxide in young male patients with mild asthma and in healthy subjects. *Respir Med*. 2002;96:895-900.
145. Pijnenburg MW, Floor SE, Hop WC, De Jongste JC. Daily ambulatory exhaled nitric oxide measurements in asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006;17:189-193.
146. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:453-459.
147. Szeffler SJ, Martin RJ, King TS, et al. Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:410-418.
148. Knuffman JE, Sorkness CA, Lemanske RF, Jr., et al. Phenotypic predictors of long-term response to inhaled corticosteroid and leukotriene modifier therapies in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:411-416.
149. Katsara M, Donnelly D, Iqbal S, Elliott T, Everard ML. Relationship between exhaled nitric oxide levels and compliance with inhaled corticosteroids in asthmatic children. *Respir Med*. 2006;100:1512-1517.

150. Jatakanon 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;54:108-114.
151. Jorres RA. Modelling the production of nitric oxide within the human airways. *Eur Respir J*. 2000;16:555-560.
152. Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, et al. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:260-267.
153. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol (1985)*. 1998;85:653-666.
154. Silkoff PE, McClean PA, Caramori M, Slutsky AS, Zamel N. A significant proportion of exhaled nitric oxide arises in large airways in normal subjects. *Respir Physiol*. 1998;113:33-38.
155. Tsoukias NM, Tannous Z, Wilson AF, George SC. Single-exhalation profiles of NO and CO<sub>2</sub> in humans: effect of dynamically changing flow rate. *J Appl Physiol (1985)*. 1998;85:642-652.
156. Silkoff PE, Sylvester 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;161:1218-1228.
157. Pietropaoli AP, Perillo IB, Torres A, et al. Simultaneous measurement of nitric oxide production by conducting and alveolar airways of humans. *J Appl Physiol (1985)*. 1999;87:1532-1542.
158. Hogman M, Holmkvist T, Wegener T, et al. Extended NO analysis applied to patients with COPD, allergic asthma and allergic rhinitis. *Respir Med*. 2002;96:24-30.

159. George SC, Hogman M, Permutt S, Silkoff PE. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. *J Appl Physiol (1985)*. 2004;96:831-839.
160. Hogman M, Drca N, Ehrstedt C, Merilainen P. Exhaled nitric oxide partitioned into alveolar, lower airways and nasal contributions. *Respir Med*. 2000;94:985-991.
161. Tsoukias NM, Shin HW, Wilson AF, George SC. A single-breath technique with variable flow rate to characterize nitric oxide exchange dynamics in the lungs. *J Appl Physiol (1985)*. 2001;91:477-487.
162. Condorelli P, Shin HW, Aledia AS, Silkoff PE, George SC. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant flow exhalations and an axial diffusion model. *J Appl Physiol (1985)*. 2007;102:417-425.
163. Shin HW, Condorelli P, George SC. A new and more accurate technique to characterize airway nitric oxide using different breath-hold times. *J Appl Physiol (1985)*. 2005;98:1869-1877.
164. Condorelli P, Shin HW, George SC. Characterizing airway and alveolar nitric oxide exchange during tidal breathing using a three-compartment model. *J Appl Physiol (1985)*. 2004;96:1832-1842.
165. Paredi P, Kharitonov SA, Meah S, Barnes PJ, Usmani OS. A novel approach to partition central and peripheral airway nitric oxide. *Chest*. 2014;145:113-119.
166. Lehtimäki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, Turjanmaa V, Moilanen E. Inhaled fluticasone decreases bronchial but not alveolar nitric oxide output in asthma. *Eur Respir J*. 2001;18:635-639.

167. Lehtimaki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, et al. Extended exhaled NO measurement differentiates between alveolar and bronchial inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1557-1561.
168. Mahut B, Delacourt C, Zerah-Lancner F, De Blic J, Harf A, Delclaux C. Increase in alveolar nitric oxide in the presence of symptoms in childhood asthma. *Chest.* 2004;125:1012-1018.
169. Puckett JL, Taylor RW, Leu SY, et al. An elevated bronchodilator response predicts large airway inflammation in mild asthma. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45:174-181.
170. Kerckx Y, Michils A, Van Muylem A. Airway contribution to alveolar nitric oxide in healthy subjects and stable asthma patients. *J Appl Physiol (1985).* 2008;104:918-924.
171. Gelb AF, Taylor CF, Nussbaum E, et al. Alveolar and airway sites of nitric oxide inflammation in treated asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:737-741.
172. Berry M, Hargadon B, Morgan A, et al. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. *Eur Respir J.* 2005;25:986-991.
173. Lehtimaki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, Turjanmaa V, Moilanen E. Increased alveolar nitric oxide concentration in asthmatic patients with nocturnal symptoms. *Eur Respir J.* 2002;20:841-845.
174. Shelhamer JH, Levine SJ, Wu T, Jacoby DB, Kaliner MA, Rennard SI. NIH conference. Airway inflammation. *Ann Intern Med.* 1995;123:288-304.

175. Pelaia G, Vatrella A, Busceti MT, et al. Cellular Mechanisms Underlying Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in Asthma. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:879783.
176. Pare PD, Bai TR. The consequences of chronic allergic inflammation. *Thorax.* 1995;50:328-332.
177. Ricciardolo FL, Sorbello V, Ciprandi G. A pathophysiological approach for FeNO: A biomarker for asthma. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2015.
178. Ricciardolo FL. Revisiting the role of exhaled nitric oxide in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2014;20:53-59.
179. Deppong CM, Green JM. Experimental advances in understanding allergic airway inflammation. *Front Biosci (Schol Ed).* 2013;5:167-180.
180. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2010;11:577-584.
181. Quirce S, Sastre J. New causes of occupational asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011;11:80-85.
182. Carsin A, Bienvenu J, Pacheco Y, Devouassoux G. [Physiopathology of aspirin intolerant asthma]. *Rev Mal Respir.* 2012;29:118-127.
183. Munoz X, Bustamante V, Lopez-Campos JL, Cruz MJ, Barreiro E. Usefulness of noninvasive methods for the study of bronchial inflammation in the control of patients with asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015;166:1-12.
184. Puckett JL, George SC. Partitioned exhaled nitric oxide to non-invasively assess asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;163:166-177.

185. Guía española para el manejo del asma. *Arch Bronconeumol.* 2009;45:2-35.
186. Burney PG, Chinn S, Britton JR, Tattersfield AE, Papacosta AO. What symptoms predict the bronchial response to histamine? Evaluation in a community survey of the bronchial symptoms questionnaire (1984) of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. *Int J Epidemiol.* 1989;18:165-173.
187. Vega JM, Badia X, Badiola C, et al. Validation of the Spanish version of the Asthma Control Test (ACT). *J Asthma.* 2007;44:867-872.
188. 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;14:902-907.
189. Perpina M, Belloch A, Pascual LM, de Diego A, Compte L. [The quality of life in asthma: an evaluation of the AQLQ questionnaire for its use on a Spanish population. Asthma Quality of Life Questionnaire]. *Arch Bronconeumol.* 1995;31:211-218.
190. Burney PG, Laitinen LA, Perdrizet S, et al. Validity and repeatability of the IUATLD (1984) Bronchial Symptoms Questionnaire: an international comparison. *Eur Respir J.* 1989;2:940-945.
191. Garcia-Rio F, Calle M, Burgos F, et al. Spirometry. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch Bronconeumol.* 2013;49:388-401.
192. Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1986;22:217-224.

193. Perpina Tordera M, Garcia Rio F, Alvarez Gutierrez FJ, et al. Guidelines for the study of nonspecific bronchial hyperresponsiveness in asthma. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch Bronconeumol*. 2013;49:432-446.
194. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, et al. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl*. 1993;16:53-83.
195. Scichilone N, Battaglia S, Olivieri D, Bellia V. The role of small airways in monitoring the response to asthma treatment: what is beyond FEV1? *Allergy*. 2009;64:1563-1569.
196. Rodrigo GJ, Arcos JP, Nannini LJ, et al. Reliability and factor analysis of the Spanish version of the asthma control test. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;100:17-22.
197. Zhou X, Ding FM, Lin JT, Yin KS. Validity of asthma control test for asthma control assessment in Chinese primary care settings. *Chest*. 2009;135:904-910.
198. Schatz M, Sorkness CA, Li JT, et al. Asthma Control Test: reliability, validity, and responsiveness in patients not previously followed by asthma specialists. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:549-556.
199. Thomas M, Kay S, Pike J, et al. The Asthma Control Test (ACT) as a predictor of GINA guideline-defined asthma control: analysis of a multinational cross-sectional survey. *Prim Care Respir J*. 2009;18:41-49.



200. Fermanian J. [Measuring agreement between 2 observers: a quantitative case]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 1984;32:408-413.
201. Riekert KA, Eakin M. Factor analysis: a primer for asthma researchers. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:1181-1183.
202. Smith AD, Cowan JO, Taylor DR. Exhaled nitric oxide levels in asthma: Personal best versus reference values. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:714-718 e714.
203. Bohadana A, Michaely JP, Teculescu D, Wild P. Reproducibility of exhaled nitric oxide in smokers and non-smokers: relevance for longitudinal studies. *BMC Pulm Med*. 2008;8:4.
204. Sanchez Gutierrez C, Romero Romero B, Jimenez Solis R, Castillo Gomez J. [Reproducibility of the technique for measuring nitric oxide in exhaled air in healthy subjects]. *Arch Bronconeumol*. 2001;37:371-374.
205. Shin HW, George SC. Impact of axial diffusion on nitric oxide exchange in the lungs. *J Appl Physiol (1985)*. 2002;93:2070-2080.
206. Dressel H, de la Motte D, Reichert J, et al. Exhaled nitric oxide: independent effects of atopy, smoking, respiratory tract infection, gender and height. *Respir Med*. 2008;102:962-969.
207. Karrasch S, Ernst K, Behr J, et al. Exhaled nitric oxide and influencing factors in a random population sample. *Respir Med*. 2011;105:713-718.
208. Crapo RO, Morris AH, Gardner RM. Reference spirometric values using techniques and equipment that meet ATS recommendations. *Am Rev Respir Dis*. 1981;123:659-664.
209. Olivieri M, Talamini G, Corradi M, et al. Reference values for exhaled nitric oxide (reveno) study. *Respir Res*. 2006;7:94.

210. Travers J, Marsh S, Aldington S, et al. Reference ranges for exhaled nitric oxide derived from a random community survey of adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:238-242.
211. 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.
212. Hogman M, Lafih J, Merilainen P, Broms K, Malinovsky A, Janson C. Extended NO analysis in a healthy subgroup of a random sample from a Swedish population. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2009;29:18-23.
213. Gelb AF, George SC, Camacho F, Fraser C, Flynn Taylor C, Shakkottai S. Increased nitric oxide concentrations in the small airway of older normal subjects. *Chest.* 2011;139:368-375.
214. Shin HW, Rose-Gottron CM, Perez F, Cooper DM, Wilson AF, George SC. Flow-independent nitric oxide exchange parameters in healthy adults. *J Appl Physiol (1985).* 2001;91:2173-2181.
215. Buchvald F, Baraldi E, Carraro S, et al. Measurements of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:1130-1136.
216. 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.
217. Ramesh G, Jindal SK, Ganguly NK, Dhawan V. Increased nitric oxide production by neutrophils in bronchial asthma. *Eur Respir J.* 2001;17:868-871.

218. Linn WS, Rappaport EB, Berhane KT, Bastain TM, Salam MT, Gilliland FD. Extended exhaled nitric oxide analysis in field surveys of schoolchildren: a pilot test. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44:1033-1042.
219. Pijnenburg MW, Hofhuis W, Hop WC, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide predicts asthma relapse in children with clinical asthma remission. *Thorax.* 2005;60:215-218.
220. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, et al. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:1077-1082.
221. Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, Lissner L, Bake B, Toren K. Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest.* 2006;130:1319-1325.
222. Masters IB, Ware RS, Zimmerman PV, et al. Airway sizes and proportions in children quantified by a video-bronchoscopic technique. *BMC Pulm Med.* 2006;6:5.
223. 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.
224. Depalo A, Carpagnano GE, Spanevello A, et al. Exhaled NO and iNOS expression in sputum cells of healthy, obese and OSA subjects. *J Intern Med.* 2008;263:70-78.
225. Maniscalco M, de Laurentiis G, Zedda A, et al. Exhaled nitric oxide in severe obesity: effect of weight loss. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;156:370-373.

226. Maestrelli P, Ferrazzoni S, Visentin A, et al. Measurement of exhaled nitric oxide in healthy adults. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2007;24:65-69.
227. Barros R, Moreira A, Fonseca J, et al. Obesity and airway inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:1501-1502.
228. 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. *Respir Res.* 2007;8:32.
229. van Veen IH, Ten Brinke A, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Airway inflammation in obese and nonobese patients with difficult-to-treat asthma. *Allergy.* 2008;63:570-574.
230. Maniscalco M, Zedda A, Faraone S, et al. Weight loss and asthma control in severely obese asthmatic females. *Respir Med.* 2008;102:102-108.
231. Malinowski A, Janson C, Holmkvist T, Norback D, Merilainen P, Hogman M. Effect of smoking on exhaled nitric oxide and flow-independent nitric oxide exchange parameters. *Eur Respir J.* 2006;28:339-345.
232. Hoyt JC, Robbins RA, Habib M, et al. Cigarette smoke decreases inducible nitric oxide synthase in lung epithelial cells. *Exp Lung Res.* 2003;29:17-28.
233. Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19:819-825.

234. Franklin PJ, Stick SM, Le Souef PN, Ayres JG, Turner SW. Measuring exhaled nitric oxide levels in adults: the importance of atopy and airway responsiveness. *Chest*. 2004;126:1540-1545.
235. Silkoff PE, McClean P, Spino M, Erlich L, Slutsky AS, Zamel N. Dose-response relationship and reproducibility of the fall in exhaled nitric oxide after inhaled beclomethasone dipropionate therapy in asthma patients. *Chest*. 2001;119:1322-1328.
236. Jones SL, Herbison P, Cowan JO, et al. Exhaled NO and assessment of anti-inflammatory effects of inhaled steroid: dose-response relationship. *Eur Respir J*. 2002;20:601-608.
237. Ciprandi G, Tosca MA, Capasso M. High exhaled nitric oxide levels may predict bronchial reversibility in allergic children with asthma or rhinitis. *J Asthma*. 2013;50:33-38.
238. Haccuria A, Michils A, Michiels S, Van Muylem A. Exhaled nitric oxide: a biomarker integrating both lung function and airway inflammation changes. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:554-559.
239. Langley SJ, Goldthorpe S, Custovic A, Woodcock A. Relationship among pulmonary function, bronchial reactivity, and exhaled nitric oxide in a large group of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003;91:398-404.
240. Ciprandi G, Tosca MA, Capasso M. Exhaled nitric oxide in children with allergic rhinitis and/or asthma: a relationship with bronchial hyperreactivity. *J Asthma*. 2010;47:1142-1147.

241. Cirillo I, Ricciardolo FL, Medusei G, Signori A, Ciprandi G. Exhaled nitric oxide may predict bronchial hyperreactivity in patients with allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;160:322-328.
242. Senna G, Passalacqua G, Schiappoli M, Lombardi C, Wilcock L. Correlation among FEV<sub>1</sub>, nitric oxide and asthma control test in newly diagnosed asthma. *Allergy.* 2007;62:207-208.
243. Michils A, Baldassarre S, Van Muylem A. Exhaled nitric oxide and asthma control: a longitudinal study in unselected patients. *Eur Respir J.* 2008;31:539-546.
244. Michils A, Louis R, Peche R, Baldassarre S, Van Muylem A. Exhaled nitric oxide as a marker of asthma control in smoking patients. *Eur Respir J.* 2009;33:1295-1301.
245. Menzies D, Jackson C, Mistry C, Houston R, Lipworth BJ. Symptoms, spirometry, exhaled nitric oxide, and asthma exacerbations in clinical practice. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008;101:248-255.
246. Shirai T, Furuhashi K, Suda T, Chida K. Relationship of the asthma control test with pulmonary function and exhaled nitric oxide. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008;101:608-613.
247. Khalili B, Boggs PB, Shi R, Bahna SL. Discrepancy between clinical asthma control assessment tools and fractional exhaled nitric oxide. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008;101:124-129.
248. Gelb AF, Flynn Taylor C, Shinar CM, Gutierrez C, Zamel N. Role of spirometry and exhaled nitric oxide to predict exacerbations in treated asthmatics. *Chest.* 2006;129:1492-1499.

249. Mahut B, Trinquart L, Le Bourgeois M, et al. Multicentre trial evaluating alveolar NO fraction as a marker of asthma control and severity. *Allergy*. 2010;65:636-644.
250. Mahut B, Delclaux C, Tillie-Leblond I, et al. Both inflammation and remodeling influence nitric oxide output in children with refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:252-256.
251. Scichilone N, Braido F, Taormina S, et al. Is health-related quality of life associated with upper and lower airway inflammation in asthmatics? *Biomed Res Int*. 2013;2013:539290.
252. Schatz M, Mosen D, Kosinski M, et al. Validation of the asthma impact survey, a brief asthma-specific quality of life tool. *Qual Life Res*. 2007;16:345-355.
253. Schatz M, Zeiger RS, Vollmer WM, et al. Development and validation of a medication intensity scale derived from computerized pharmacy data that predicts emergency hospital utilization for persistent asthma. *Am J Manag Care*. 2006;12:478-484.
254. Schatz M, Zeiger RS, Vollmer WM, et al. Validation of a beta-agonist long-term asthma control scale derived from computerized pharmacy data. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:995-1000.
255. Simeoni MC, Schmidt S, Muehlan H, Debensason D, Bullinger M, Group D. Field testing of a European quality of life instrument for children and adolescents with chronic conditions: the 37-item DISABKIDS Chronic Generic Module. *Qual Life Res*. 2007;16:881-893.

256. Plaza V, Fernandez-Rodriguez C, Melero C, et al. Validation of the 'Test of the Adherence to Inhalers' (TAI) for asthma and COPD patients. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2015.
257. Bailey WC, Higgins DM, Richards BM, Richards JM, Jr. Asthma severity: a factor analytic investigation. *Am J Med.* 1992;93:263-269.
258. Grazzini M, Scano G, Foglio K, et al. Relevance of dyspnoea and respiratory function measurements in monitoring of asthma: a factor analysis. *Respir Med.* 2001;95:246-250.
259. Juniper EF, Wisniewski ME, Cox FM, Emmett AH, Nielsen KE, O'Byrne PM. Relationship between quality of life and clinical status in asthma: a factor analysis. *Eur Respir J.* 2004;23:287-291.
260. Leung TF, Wong GW, Ko FW, Lam CW, Fok TF. Clinical and atopic parameters and airway inflammatory markers in childhood asthma: a factor analysis. *Thorax.* 2005;60:822-826.
261. Rosi E, Ronchi MC, Grazzini M, Duranti R, Scano G. Sputum analysis, bronchial hyperresponsiveness, and airway function in asthma: results of a factor analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:232-237.
262. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181:315-323.
263. Chapman DG, Berend N, King GG, Salome CM. Increased airway closure is a determinant of airway hyperresponsiveness. *Eur Respir J.* 2008;32:1563-1569.
264. Diez Jde M, Barcina C, Munoz M, Leal M. Control of persistent asthma in Spain: associated factors. *J Asthma.* 2008;45:740-746.



265. Holt EW, Cook EF, Covar RA, Spahn J, Fuhlbrigge AL. Identifying the components of asthma health status in children with mild to moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1175-1180.



# **ABREVIATURAS**



## 9 ABREVIATURAS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| AAS                           | Ácido acetilsalicílico  |
| ACQ                           | Asthma control Questionaire   |
| ACT                           | Asthma control Test   |
| ADMA                          | Dimetilarginina asimétrica  |
| AINE                          | Antiinflamatorio no esteroideo  |
| ATS                           | American Thoracic Society   |
| AQLQ                          | Asthma quality of life questionnaire  |
| BD                            | Broncodilatadores   |
| Ca                            | Calcio  |
| Ca <sup>2+</sup>              | Calcio intracelular   |
| CAE                           | Condensado de aire exhalado   |
| Calv,NO                       | Concentración de ON en el aire alveolar   |
| CAM                           | Calmodulina   |
| Caw,NO                        | Concentración de ON en la pared bronquial                                       |
| CI                            | Corticoides inhalados   |
| CCI                           | Coeficiente de correlación intraclase   |
| CO <sub>2</sub>               | Dióxido de carbono  |
| COV                           | Compuestos orgánicos volátiles  |
| CP:                           | Coeficiente de probabilidad   |
| CPA                           | Célula presentadora de antígeno   |
| CSF-GM                        | Factor hematopoyético para la serie granulocito-monocito                        |
| Cys-LTs                       | Cisteinil-leucotrienos  |
| Daw,NO                        | Capacidad de difusión de ON en las vías aéreas                                  |
| DE                            | Desviación estándar   |
| deltaFVC                      | % de descenso de la FVC cuando el FEV <sub>1</sub> cae un 20% respecto al basal |
| E                             | Especificidad   |
| ERS                           | European Respiratory Society  |
| FAD                           | Dinucleótico de flavin adenina  |
| FEV <sub>1</sub>              | Volumen de espiración forzada en el primer segundo                              |
| FVC                           | Capacidad vital forzada   |
| FRC                           | Capacidad de reserva funcional  |
| G                             | Ganancia diagnóstica  |
| GEMA                          | Guía Española del asma  |
| GINA                          | Global initiative for asthma  |
| GMP <sub>c</sub>              | Guanosil monofosfato cíclico  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrógeno   |
| H <sub>4</sub> B              | Tetrahidrobiopterina  |
| IC                            | Intervalo de confianza  |
| IgE                           | Inmunoglobulina E   |
| IL                            | Interleucina  |
| IMC                           | Índice de masa corporal   |
| IQR                           | Rango intercuartílico   |
| IUALTD                        | International Union Against Lung and Tuberculosis Diseases                      |
| J'awNO                        | Flujo máximo de ON en el compartimento bronquial                                |
| LBA                           | Lavado bronquioalveolar   |
| MCP                           | Proteína quimiotáctica para monocito  |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| MNF                         | Mononucleótido de flavina  |
| MMP-9                       | Metaloproteinasa de la matriz 9  |
| MPD                         | Mieloperoxidasa  |
| N                           | Nitrógeno  |
| NADPH                       | Dinucleotido fosfato de nicotinamida adenina   |
| NANC                        | No adrenérgico no colinérgico  |
| NF-K $\beta$                | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas       |
| NO <sub>2</sub>             | Dióxido de nitrógeno   |
| O <sub>2</sub>              | Oxígeno  |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Radical libre Superoxido   |
| ON                          | Oxido nítrico  |
| ON <sup>+</sup>             | Catión nitrosilo   |
| ONe                         | Óxido nítrico exhalado   |
| ONOO <sup>-</sup>           | Peroxinitrito  |
| ONS                         | Óxido nítrico sintasa  |
| ONSc                        | Óxido nítrico sintasa constitutiva   |
| ONSe                        | Óxido nítrico sintasa endotelial   |
| ONSi                        | Óxido nítrico sintasa inducible  |
| ONSn                        | Óxido nítrico sintasa neuronal   |
| PCE                         | Proteína catiónica eosinofílica  |
| PCR                         | Proteína C reactiva  |
| PC <sub>20</sub>            | Concentración de metacolina capaz de provocar un descenso del 20% en el FEV <sub>1</sub> |
| PEo                         | Peroxidasa del eosinófilo  |
| PEX                         | Proteína X o neurotoxina derivada del eosinófilo   |
| PPB                         | Partes por billón  |
| PPP                         | Propabilidad preprueba   |
| Pr post                     | Probabilidad postprueba  |
| S                           | Sensibilidad   |
| SARP                        | Severe Asthma Research Program   |
| SEPAR                       | Sociedad Española de Neumología y Cirugía torácica                                       |
| SNOs                        | S-nitrosotioles  |
| SOD                         | Superóxido dismutasa   |
| TBD                         | Test broncodilatador   |
| TGF $\beta$                 | Factor de crecimiento transformante $\beta$  |
| TIMP                        | Tejido inhibidor de las metaloproteasas  |
| TNF- $\alpha$               | Factor alfa de necrosis tumoral $\alpha$   |
| uLTE-4                      | Leucotrieno E4 en orina  |
| V'                          | Flujo espiratorio  |
| V'NO                        | Tasa de eliminación de la ON desde las vías aéreas                                       |
| VE                          | Varianza explicada   |
| VPN                         | Valor predictivo negativo  |
| VPP                         | Valor predictivo positivo  |

# **ANEXOS**





## 10 ANEXOS

### Cuestionario de Síntomas bronquiales IUALTD (1987)

1. ¿Ha tenido alguna vez en los últimos 12 meses silbidos o pitos en el pecho?
2. ¿Ha tenido alguna vez en los últimos 12 meses sensación de opresión en el pecho por la noche o nada más al levantarse por la mañana?
3. ¿Tuvo falta de aire cuando los silbidos estaban presentes?
4. ¿Tuvo silbidos o pitos cuando estaba resfriado?
5. ¿Ha tenido alguna vez en los últimos 12 meses dificultad repentina para respirar durante el día, sin estar realizando ningún esfuerzo?
6. ¿Ha tenido alguna vez en los últimos 12 meses dificultad repentina para respirar después de hacer algún ejercicio?
7. ¿Se ha despertado por la noche alguna vez durante los últimos 12 meses por dificultad repentina para respirar?
8. ¿Se ha despertado por la noche alguna vez durante los últimos 12 meses por un ataque de tos?
9. ¿Tose habitualmente nada más levantarse por la mañana?
10. ¿Habitualmente saca flemas que vienen del pecho, nada más levantarse por la mañana?
11. ¿Ha sacado flemas de este tipo la mayoría de las mañanas durante por lo menos 3 meses al año?
12. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones describe mejor su respiración?
  - a) Nunca o rara vez tengo problemas para respirar.
  - b) Suelo tener frecuentes problemas al respirar pero siempre me repongo completamente.
  - c) Mi respiración nunca está del todo bien.
13. Cuando está en un lugar polvoriento de su casa o con animales (perros, gatos, pájaros), o cerca de plumas (almohadas, cojines, edredones) tiene siempre:
  - a) Sensación de opresión en el pecho.
  - b) Comienza a sentir falta de aire.
14. Cuando está en contacto con humos o con olores fuertes siempre tiene:
  - a) Sensación de opresión en el pecho.
  - b) Comienza a sentir falta de aire.
15. ¿Ha tenido alguna vez asma?
16. ¿En algún momento de los últimos 12 meses ha tenido un ataque de asma?
17. ¿Toma habitualmente medicamentos (inhaladores, vaporizaciones, pastillas, aerosoles etc., para el asma?

## Cuestionario ACT

1. En las últimas 4 semanas, ¿ durante cuánto tiempo le ha impedido el asma completar sus actividades habituales en el trabajo, los estudios o el hogar?
  1. Siempre
  2. Casi siempre
  3. A veces
  4. Pocas veces
  5. Nunca
  
2. Durante las últimas 4 semanas, ¿ con qué frecuencia ha notado que le ha faltado el aire?
  1. Más de una vez al día
  2. Una vez al día
  3. De 3 a 6 veces por semana
  4. Una o dos veces por semana
  5. Nunca
  
3. Durante las últimas 4 semanas, ¿ con qué frecuencia le han despertado por la noche o más temprano de la habitual por la mañana sus síntomas de asma (sibilancias, pitidos, tos , falta de aire, opresión en el pecho o dolor)?
  1. 4 noches o más por semana
  2. de 2 a 3 noches por semana
  3. Una vez por semana
  4. Una o dos veces
  5. Nunca
  
4. Durante las últimas 4 semanas, ¿ con qué frecuencia ha usado su inhalador de rescate o medicamento en nebulizador?
  1. 3 veces o más al día
  2. 1 ó 2 veces al día
  3. 2 ó 3 veces por semana
  4. una vez por semana o menos
  5. Nunca
  
5. ¿Hasta qué punto diría que su asma ha estado controlada durante las últimas 4 semanas?
  1. Nada controlada
  2. Mal controlada
  3. Algo controlada
  4. Bien controlada
  5. Totalmente controlada

## Cuestionario ACQ

1. En promedio, durante la última semana, ¿con qué frecuencia se despertó por la noche debido al asma?

0 : Nunca  
1 : Casi nunca  
2 : Unas pocas veces  
3 : Varias veces  
4 : Muchas veces  
5 : Muchísimas veces  
6 : Incapaz de dormir, debido al asma

2. En promedio, durante la última semana, ¿cómo fueron de graves los síntomas de asma que tuvo al despertarse por la mañana?

0 : No tuvo síntomas  
1: síntomas muy ligeros  
2: síntomas ligeros  
3: síntomas moderados  
4: síntomas bastante graves  
5: síntomas graves  
6: síntomas muy graves

3. En promedio, durante la última semana, ¿hasta qué punto el asma le limitó en sus actividades?

0 : Nada limitado  
1 : Muy poco limitado  
2 : Unas pocas veces  
3 : Poco limitado  
4 : Moderadamente limitado  
5 : Muy limitado  
6 : Extremadamente limitado

4. En promedio, durante la última semana, ¿hasta qué punto notó que le faltaba el aire debido al asma?

0 : Nada en absoluto  
1 : Muy poco  
2 : Un poco  
3 : Un poco  
4 : Moderadamente  
5 : Mucho  
6 : Muchísimo

5. En promedio, durante la última semana, ¿cuánto tiempo tuvo silbidos o pitidos en el pecho?

- 0 : Nunca
- 1 : Casi nunca
- 2 : Poco tiempo
- 3 : Parte del tiempo
- 4 : Mucho tiempo
- 5 : Casi siempre
- 6 : siempre

6. En promedio, durante la última semana ¿cuántas inhalaciones de la medicación que usa para aliviar rápidamente los síntomas (ventolin, terbasmin o buto-asma) utilizó al día?

- 0 : Ninguna
- 1 : 1-2 inhalaciones la mayoría de los días
- 2 : 3-4 inhalaciones la mayoría de los días
- 3 : 5-8 inhalaciones la mayoría de los días
- 4 : 9-12 inhalaciones la mayoría de los días
- 5 : 13-16 inhalaciones la mayoría de los días
- 6 : Más de 16 inhalaciones la mayoría de los días

7. Percentage de FEV<sub>1</sub> del valor de referencia: .....

(Marque con una X el porcentaje de FEV del valor de referencia en la columna siguiente)

- 0: > 95% del valor de referencia
- 1: 95-90% del valor de referencia
- 2: 89-80% del valor de referencia
- 3: 79-70% del valor de referencia
- 4: 69-60 % del valor de referencia
- 5: 59-50% del valor de referencia
- 6: <50% del valor de referencia

Cuestionario AQLQ-Sm

DURANTE LAS ÚLTIMAS 4 SEMANAS

1. Me he encontrado mal por episodios de respiración entrecortada

- Siempre
- Casi siempre
- Muchas veces
- Bastantes veces
- Algunas veces
- Casi nunca
- Nunca

2. Me he encontrado mal por ataques de pitos

- Siempre
- Casi siempre
- Muchas veces
- Bastantes veces
- Algunas veces
- Casi nunca
- Nunca

3. Me he encontrado mal por sentir peso en el pecho

- Siempre
- Casi siempre
- Muchas veces
- Bastantes veces
- Algunas veces
- Casi nunca
- Nunca

4. He reducido los paseos por la calle, incluso por las llanas, por culpa del asma

- Siempre
- Casi siempre
- Muchas veces
- Bastantes veces
- Algunas veces
- Casi nunca
- Nunca

5. He tenido que dejar de hacer las tareas ligeras de la casa, por culpa del asma

- Siempre
- Casi siempre

Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

6. He reducido los paseos por las calles empinadas, por culpa del asma

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

7. He tenido que dejar de hacer los trabajos más pesados de la casa, por culpa del asma

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

8. Me he encontrado cansado/a, o con falta de energía en general

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

9. No he podido dormir por la noche

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

10. Me he sentido triste o deprimido/a

Siempre

Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

11. Me he sentido disgustado/a conmigo mismo/a

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

12. Me he sentido ansioso/a, bajo tensión, o nervioso/a

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

13. He tenido la sensación de que el asma me está impidiendo conseguir lo que yo quiero en la vida

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

14. El asma me ha molestado en mi vida social

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

15. He tenido que dejar de ir a algunos sitios porque era malo para mi asma

Siempre

Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

16. He tenido que dejar de ir a algunos sitios porque tenía miedo de tener un ataque de asma y no encontrar ayuda

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

17. Por culpa de mi asma he tenido que reducir el tiempo que dedicaba al deporte, o a otras aficiones y actividades con las que me suelo entretener

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

18. En general, me he sentido limitado/a

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

19. He sentido que, el asma está controlando mi vida

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca



20. Me han venido a la cabeza preocupaciones por mi salud ( presente o futura) a causa del asma

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

21. Me han venido a la cabeza preocupaciones o pensamientos sobre si el asma acorta mi vida

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

22. Me parece que he necesitado demasiado los inhaladores

Siempre  
Casi siempre  
Muchas veces  
Bastantes veces  
Algunas veces  
Casi nunca  
Nunca

