

Métodos de valoración de la inflamación de las vías respiratorias

J.B. Gáldiz Iturri

Servicio de Aparato Respiratorio. Hospital de Cruces. Baracaldo. Vizcaya. España.

Introducción

En la actualidad se acepta de manera unánime la importancia de la inflamación en la patogenia de enfermedades como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Asimismo, la importancia del tratamiento antiinflamatorio se asume como fundamental y piedra angular en cualquier pauta de actuación en el tratamiento de la enfermedad asmática. Es por ello que la valoración y monitorización de la inflamación en esta afección reviste un especial interés, y en los últimos años se han desarrollado varias técnicas que evalúan de manera no invasiva dicha inflamación.

La inflamación puede evaluarse de diversas formas. Por ejemplo, de manera indirecta, mediante la evaluación de los síntomas y signos del paciente con la utilización de técnicas que evalúan la función pulmonar, o bien por técnicas de imagen. Sin embargo, se presentan como más atractivas las técnicas que evalúan la inflamación bronquial de una manera directa, y son éstas las que se van a comentar en el presente capítulo.

Desde el punto de vista teórico, el patrón de referencia sería la toma directa de muestras bronquiales mediante técnicas broncoscópicas, pero son técnicas que pueden definirse como invasivas y que no pueden plantearse como de uso sistemático en la práctica clínica a la hora de la monitorización de la inflamación bronquial.

De manera similar a otros procedimientos diagnósticos, el método ideal sería aquel que cumpliera una serie de requisitos, como son: coste asumible, facilidad en la realización, no presentar complicaciones, posibilidad de repetirse, aplicable en un amplio rango de edades y enfermedades, existencia de técnicas estandarizadas, buena reproducibilidad y buena correlación con el patrón de referencia. La pregunta que surge es si en la actualidad poseemos tests para valorar la inflamación bronquial que cumplan estas características. La respuesta, aunque con algunas puntualizaciones, es afirmativa.

A efectos prácticos dividiremos los tests de valoración de la inflamación bronquial en aquellos que evalúan los mediadores, tanto volátiles —óxido nítrico (NO), monóxido de carbono, etano, pentano— como no volátiles, aire condensado, y aquellas técnicas que valoran la celularidad en el esputo, básicamente esputo inducido.

Óxido nítrico exhalado

El NO, una molécula declarada ya en 1992 como molécula del año por la revista *Science*, posee una estructura atómica muy simple, se comporta como radical libre, tiene una vida media muy corta y actúa como mensajero en una multitud de procesos como son la regulación de la circulación periférica, las reacciones inmunitarias, la función plaquetaria y la neurotransmisión.

De una manera simple, la producción de NO exhalado (NOe) se realiza a través del NO sintetasa. Existen 2 formas: *a*) la constitutiva, que es dependiente del calcio y se localiza en los órganos diana, como son el tejido endotelial y neuronal, y *b*) la forma inducida, que no es dependiente del calcio, se produce en cantidades superiores a la sustitutiva, tiene un factor relevante en varios procesos, como la sepsis o procesos inflamatorios del asma, y es producida por diferentes células como las citocinas, el factor de necrosis tumoral alfa, etc. La medición del NOe cuantificará tanto el NO producido de manera endógena a dicho nivel como el producido a nivel sistémico y secretado en el árbol bronquial. Se deberá evaluar, asimismo, la posibilidad de la existencia de NO exógeno principalmente procedente de la cavidad gástrica o de la ingesta de alimentos que posean altas concentraciones de esta sustancia^{1,2}.

Las fuentes endógenas de NOe en el tracto respiratorio incluyen principalmente las vías respiratorias. Es importante recalcar que los senos paranasales y las vías respiratorias altas son productores de NOe en cantidades muy altas, por lo que el método a emplear deberá evitar esta contaminación nasal³.

Se trata de una técnica en la que existe consenso respecto al método de realización, y todas las normativas⁴⁻⁶ insisten en algunos puntos considerados claves, como son: *a*) el flujo espiratorio en el que se realiza la maniobra. A mayor flujo se obtendrán valores menores de

Correspondencia: Dr. J.B. Gáldiz.
Servicio de Aparato Respiratorio. Hospital de Cruces.
Pza. de Cruces, s/n. 48903 Baracaldo. Vizcaya. España.
Correo electrónico: jbgaldiz@heru.osakidetza.net

NOe, y *b*) la medición del NOe da por sentado que éste se produce de manera continua en las vías respiratorias. La mezcla durante la espiración de las cifras de NO producido en el alvéolo y el producido en las vías respiratorias hace que la maniobra de medición sea dependiente del flujo y se pueda acumular, incrementar, si se produce apnea durante la realización de la prueba. La American Thoracic Society⁶ recomienda un flujo espiratorio de 50 ml/s. Otro aspecto metodológico fundamental es evitar la contaminación nasal, para lo cual la maniobra espiratoria se efectuará con una resistencia de ± 5 cmH₂O, suficientes para cerrar el velo del paladar a la posible contaminación nasal. Otros aspectos como el número de maniobras, la reproducibilidad o las características de los aparatos se encuentran perfectamente reflejados en las normativas internacionales publicadas. La técnica que cuantifica el NOe se considera segura y reproducible, y puede utilizarse en mediciones repetidas.

Óxido nítrico y asma

La enfermedad donde más experiencia se posee sobre la posible utilidad del NOe es el asma. Existen numerosos trabajos⁷⁻⁹ que han demostrado un aumento de los valores del NOe en el asma, secundarios, probablemente, a la activación del NO sintetasa 2 en las células inflamatorias y epiteliales^{10,11}. Aunque este aumento no es específico del asma, los valores aumentados del NO sirven para diferenciar esta enfermedad de otros procesos que producen, por ejemplo, tos crónica¹². Se conoce la relación entre los valores elevados de NO y la atopia en pacientes asmáticos, con una buena correlación entre los valores de NOe y otros marcadores de atopia como las pruebas cutáneas de inmunoglobulina E y eosinofilia¹³.

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que la elevación del NOe y la PC20 —concentración teórica de histamina o metacolina que produce un descenso del 20% del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) en relación con su valor inicial— son los tests más específicos para caracterizar el asma. Respecto a la PC20, el NOe tiene la ventaja de su menor coste y laboriosidad en la realización¹⁴, y es además un marcador útil ante la exposición de agentes ambientales^{15,16}. Asimismo, estudios recientes han demostrado que es un parámetro útil en el control del paciente asmático. Una ventaja del NOe como parámetro de control¹⁷ es que su incremento puede observarse antes que el deterioro de la hiperreactividad bronquial, PC20, aumento en la cifra de eosinófilos o deterioro de la función pulmonar durante exacerbaciones producidas al descender la dosis de corticoides^{18,19}. Otros autores han confirmado que la cifra de NOe estaría relacionada con diversos marcadores de control del paciente asmático, como son los síntomas, la puntuación en el índice de disnea y el uso de la medicación²⁰.

Jones et al²¹ observaron un aumento del NOe en pacientes asmáticos no tratados correctamente o inestables con el tratamiento recibido. Valoraron el NOe junto con otros parámetros —la respuesta bronquial al suero hi-

pertónico (4,5%) y el esputo inducido—, con el objetivo de evaluar la pérdida de control en un grupo de pacientes asmáticos a quienes se retiró el tratamiento esteroideo. Estudiaron a 75 pacientes en esta situación para valorar si se producía una pérdida de control del asma o si alcanzaban un período de estabilidad de 6 semanas. En 60 (77,9%) pacientes se consideró que habían sufrido pérdida de un buen control de su proceso asmático. Se observaron muy buenas correlaciones entre los cambios en los valores de NOe y los síntomas ($p = 0,0001$), FEV₁ ($p = 0,002$), la cifra de eosinófilos en el esputo ($p = 0,0002$) y la PD15 en el test de suero hipertónico ($p = 0,0002$), con diferencias entre el grupo en el que se consideraba que existía pérdida de control y aquel en que no la había. En ambos grupos, los cambios en la cifra de NOe, incrementos del 60% o valores iniciales elevados tenían un valor predictivo positivo entre el 80 y el 90% de pérdida de control en el asma. La conclusión de los autores era que el NOe constituía un parámetro útil en la valoración del control clínico del paciente asmático, con la ventaja añadida de su simplicidad.

Monitorización

Uno de los aspectos valorados para la posible utilización del NOe en los pacientes asmáticos ha sido como parámetro útil en la monitorización de la enfermedad y como marcador útil del efecto antiinflamatorio del tratamiento. Existen numerosos trabajos²²⁻²⁴ que demuestran un descenso rápido, en pocas horas, del NOe tras tratamiento corticoide, sobre todo cuando éste se administra nebulizado, aunque en general el mayor descenso en las cifras del NO se observa al cabo de un mes y esta respuesta es dependiente de la dosis. En la monitorización del asma existen evidencias que indicarían que el descenso del NO es más rápido que el de otros parámetros, como la cifra de eosinófilos en el esputo inducido u otros parámetros habituales de función pulmonar.

Asimismo, la cifra de NOe estaría incrementada en pacientes con asma sintomática. Lanz et al²⁵ estudiaron una población infantil en la que observaron reducciones muy significativas del NO que se correlacionaban con la mejoría del FEV₁. Esta relación entre cifras altas y gravedad de los síntomas del asma la han valorado también otros autores²⁶, que han encontrado relación entre las cifras de NOe en los pacientes con más síntomas, mayor gravedad y mayor necesidad de medicación de rescate. Esta relación se encuentra igualmente en pacientes sintomáticos aun a pesar de recibir un tratamiento agresivo (corticoides orales).

Como ya se ha comentado, las cifras de NOe se modifican rápidamente con la toma de corticoides inhalados, aunque este descenso se ha observado, asimismo, con otros fármacos antiinflamatorios como los antileucotrienos. En un trabajo ya clásico, Bisgaard et al²⁷ estudiaron una población infantil tratada con montelukast, en la que observaron descensos significativos del NOe que se acompañaban de una mejoría de los síntomas clínicos. Este efecto de los antileucotrienos se atribuye a un descenso de las citocinas inflamatorias e inducción del NO sintetasa 2.

Los corticoides orales disminuyen las cifras de NOe en pacientes con asma y no inducen cambios en los pacientes sin dicha enfermedad. Algún trabajo²⁸ encuentra relación entre el incremento del FEV₁ tras ensayar el tratamiento con corticoides orales y el valor basal de NO. Así, cifras basales de NOe elevadas tienen un alto valor predictivo positivo (83%) de que exista mejoría significativa (> 15%) en el FEV₁ tras dicho ensayo con corticoides orales. Recientemente²⁹, en un estudio doble ciego cruzado se ha evaluado el efecto de la budesonida en la función pulmonar y en diferentes marcadores de inflamación, entre ellos la PC20, el número de eosinófilos y el lavado broncoalveolar. Tras el tratamiento con corticoides inhalados se observaron un aumento del FEV₁ y un descenso de los marcadores inflamatorios, salvo en el lavado broncoalveolar. Durante la evolución, tras el tratamiento con corticoides inhalados, esta correlación entre los diferentes marcadores empeoraba, y los autores conjeturaban que probablemente cada marcador representa diferentes procesos de la inflamación.

Gravedad

En general, el NOe se eleva a medida que se observa una mayor obstrucción. Es importante hacer hincapié en la influencia que la obstrucción bronquial tiene desde un punto metodológico en la medición del NOe, pues cuando existe esta obstrucción la mucosa libre para el intercambio del NOe es menor. Respecto a la relación con la PC20, parece lógico suponer que, a mayor inflamación, mayor hiperreactividad bronquial. Son varios los estudios que encuentran esta relación, sobre todo en pacientes que no reciben tratamiento con corticoides inhalados³⁰.

Relación con otros marcadores de asma

Los parámetros de evaluación habituales, como los relativos a la función pulmonar, el FEV₁ y el pico de flujo espiratorio, no reflejan directamente la inflamación bronquial y en pacientes con asma leve pueden no aportar demasiada información, sobre todo si se valoran en relación con la eficacia del tratamiento antiinflamatorio. Se acepta una buena correlación entre el NOe y otros marcadores como el esputo inducido, pero algunos trabajos no han podido encontrar esta correlación con la cifra de eosinófilos en la mucosa bronquial.

Respecto a la relación entre cifras de NOe con otros marcadores de asma, como los tests de función pulmonar, el test de metacolina o el esputo inducido, hay que tener en cuenta que parámetros como la PC20 o el FEV₁ no miden directamente la inflamación, por lo que su correlación con el NOe no siempre es alta. En general se acepta una buena correlación con las cifras de eosinófilos, y algunos autores han encontrado asimismo una buena correlación con la PC20 o con las variaciones en el pico de flujo espiratorio, sobre todo en pacientes no tratados con esteroides^{23,29,31,32}.

No existe acuerdo sobre la relación con los hallazgos obtenidos mediante técnicas broncoscópicas. Algunos autores³³ han encontrado relación entre la expresión del

NO sintetasa inducible en los bronquios y las cifras de NOe, y han observado que fármacos como los corticoides inhalados disminuyen ambos marcadores.

Utilidad en otras enfermedades

La utilidad del NOe se ha valorado en otras afecciones diferentes del asma. Así, en pacientes con EPOC estable se han observado cifras similares a las de la población sana. En cambio, se ha apreciado una elevación del NOe en pacientes con EPOC descompensada, aumento que se explica por la inflamación neutrofílica que presentan estos pacientes³⁴. Asimismo, en pacientes con bronquiectasias se ha observado un aumento del NOe que se correlaciona con la extensión radiológica de la afectación bronquiectásica y que disminuye en los pacientes tratados con corticoides, de manera similar a lo que sucede en los pacientes asmáticos³⁵. En pacientes con tos crónica hay trabajos³⁶ que han demostrado la utilidad de la medición del NOe en el diagnóstico del asma como productora de esa tos crónica, diferenciando a los pacientes en que la tos era secundaria a un proceso asmático.

Aire condensado

La técnica del aire condensado consiste en la medición de sustancias no volátiles de la fase líquida de la respiración mediante el empleo de temperaturas bajas. Se trata de una técnica no invasiva que asume que la composición del aire condensado refleja los cambios bioquímicos en el fluido de las vías respiratorias. Se supone que el líquido de la superficie de las vías respiratorias se aerosoliza cuando el flujo se hace turbulento durante la maniobra de la inspiración, lo que, desde un punto de vista teórico, haría que las moléculas encontradas en el condensado reflejaran la superficie líquida de las vías respiratorias.

Aspectos metodológicos

Se puede afirmar que durante la respiración a volumen corriente no existen apenas componentes procedentes de las vías respiratorias superiores en el aire condensado, ya que el flujo laminar no es suficiente para producir forma de aerosol. Así, en comparación con las vías respiratorias inferiores, la superficie de las vías respiratorias superiores es pequeña y la evaporización de las sustancias en esa zona puede no apreciarse, con excepción de las sustancias volátiles (NO), cuya concentración es muy elevada.

La técnica carece en la actualidad de consensos o acuerdos metodológicos, pues todavía existen discrepancias acerca de su realización y posterior valoración. No está bien definida la eliminación de factores como la posible contaminación de moléculas procedentes de lugares como la boca o la nasofaringe. Asimismo, aún debe evaluarse correctamente la influencia de la contaminación salivar, de la dieta, de la concentración de solutos, del pH, etc.

La realización del test es sencilla, ya que el paciente debe respirar a través de una boquilla con válvula de doble vía que condensa y enfría el aire espirado. Éste se enfriará a -10 °C, temperatura a la que el hidrógeno y

otros componentes no gaseosos precipitarán en las paredes interiores del tubo de recogida. El período de recolección, dependiendo del objetivo que se desee analizar, se podrá definir bien por el tiempo (unos 15 min es suficiente), o por haber alcanzado un volumen predeterminado de volumen-minuto.

Las sustancias que se pueden analizar con esta técnica, aunque en concentraciones pequeñas, son muy numerosas. Por ejemplo, se pueden analizar sustancias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), prostanoides (prostaglandinas 1 y 2, tromboxano 2), leucotrienos, eicosanoides, proteínas, citocinas y sustancias derivadas del NO como peroxinitritos y nitritos.

En general, las indicaciones del aire condensado son muy amplias, desde el análisis del estado inflamatorio en las vías respiratorias bajas y la determinación del efecto inflamatorio tras exposiciones potencialmente perjudiciales, hasta la monitorización de procesos inflamatorios que afecten a las vías respiratorias inferiores.

Comparación con el óxido nítrico exhalado

El NO es una molécula que se encuentra en el ambiente. El método de esta técnica, como se ha comentado antes, está suficientemente estandarizado: se requiere de un equipamiento costoso y hay que ser precisos en la realización de la maniobra para no cometer errores que influyan en los resultados. La ventaja potencial del aire condensado sería la posibilidad de medir una gran cantidad de sustancias utilizando esta técnica con diversidad de marcadores, entre ellos la nitrotirosina, derivada del NO, que se puede encontrar en altas concentraciones en el aire condensado³⁷.

Peróxido de hidrógeno

Es un marcador sensible de los procesos oxidativos que se producen en el pulmón y en las vías respiratorias, y su utilidad se ha estudiado en varias enfermedades como la EPOC, el asma, la fibrosis quística, etc. Su incremento se debe a la activación de células como los eosinófilos y los neutrófilos, que producen un aumento del oxígeno, el cual favorece la formación de H_2O_2 . Es una sustancia volátil y los aumentos de H_2O_2 se equilibran en las vías respiratorias con el aire. Su eliminación se produce por acción de la catalasa, que se encuentra en escasa cantidad en las vías respiratorias, por lo que las cifras de H_2O_2 pueden considerarse un buen marcador del estrés oxidativo pulmonar.

En el asma se ha visto una buena correlación con otros marcadores inflamatorios como el esputo inducido³⁸ y la PC20, de modo que se han encontrado cifras elevadas de este marcador en casos de asma inestable aun a pesar de que se hubieran observado descensos del NOe tras corticoterapia.

En pacientes con EPOC se observa un aumento muy considerable de las cifras de H_2O_2 , y se han encontrado cifras muy elevadas de este marcador en las exacerbaciones^{39,40}. En relación con el hábito tabáquico, se sabe que produce aumento muy considerable de las cifras de H_2O_2 en los pacientes fumadores⁴¹⁻⁴³. Sin embargo, este

marcador no ha sido capaz de discriminar pacientes con EPOC fumadores y no fumadores, y no existe relación entre las cifras de este marcador y el grado de tabaquismo.

Isoprostanos

Son una nueva clase de prostanoides procedentes de la peroxidación lipídica del ácido araquidónico. Son sustancias estables que se pueden encontrar en tejidos y fluidos normales. Existen datos que indican que se trata de sustancias que poseen actividad biológica propia. En el asma se ha observado aumento del 8-isoprostano, cuyas concentraciones guardan relación con el grado de gravedad y no descienden tras el tratamiento con corticoides, lo que induciría a pensar que los corticoides inhalados no tienen efecto en el estrés oxidativo. Asimismo, en pacientes con EPOC se ha observado una relación entre los valores de isoprostanos en las reagudizaciones; en esta circunstancia se han encontrado cifras elevadas en pacientes con EPOC, tanto si son fumadores activos como ex fumadores, lo que apuntaría a que los valores de estas sustancias dependen más del estrés oxidativo y la inflamación que del hábito tabáquico^{44,45}.

Leucotrienos

Se han descrito valores detectables de los leucotrienos B_4 , C_4 , D_4 , E_4 y F_4 en el aire condensado de pacientes asmáticos y sujetos normales⁴⁶. Se ha observado también que la retirada del tratamiento corticoide se asocia a un incremento significativo de las cifras de antileucotrienos en el aire condensado⁴⁷, y parece existir cierto grado de especificidad entre los diferentes leucotrienos. Algunos trabajos señalan que el leucotrieno B_4 estaría aumentado en pacientes asmáticos y en pacientes con EPOC, a diferencia de otros leucotrienos como el E_4 , que sólo estaría aumentado en el asma.

Esputo inducido

El análisis del esputo como técnica útil en el diagnóstico de enfermedades respiratorias estuvo inicialmente enfocado al estudio de enfermedades infecciosas (p. ej., tuberculosis). La utilización del esputo para el recuento de células, primordialmente en el estudio de la inflamación bronquial, es más tardía. Este recuento se puede realizar en el esputo espontáneo o bien induciendo su producción (esputo inducido). En la actualidad se puede considerar que esta técnica se halla perfectamente asentada dentro de la práctica habitual del estudio de la inflamación bronquial y su realización está estandarizada⁴⁸⁻⁵².

Existen diferentes métodos, aunque en nuestro medio el más comúnmente utilizado es el Pizzichini⁵³. Es una técnica que presenta una buena reproducibilidad, sin complicaciones reseñables, y que puede utilizarse en diferentes enfermedades, aunque es en el asma en la que se posee más experiencia. No obstante, algunos trabajos recientes señalan su utilidad en otras enfermedades⁵⁴. En

relación con la seguridad y reproducibilidad del esputo inducido, en un estudio multicéntrico reciente Fahy et al⁵⁵ evaluaron a 79 pacientes con asma moderada y grave a quienes practicaron la prueba del esputo inducido en 2 visitas diferentes. Estos autores encontraron que, tras la realización del esputo inducido, el FEV₁ descendió más del 20% respecto al valor obtenido posbroncodilatador en el 14% de los pacientes y en el 25% de los pacientes que presentaban un FEV₁ basal prebroncodilatador entre el 40 y el 60% del predicho. Todos los pacientes respondieron al broncodilatador, sin que se describieran broncoconstricciones refractarias. Respecto a la reproducibilidad del test en comparación con otros de inflamación bronquial (PC20, proteínas catiónicas del eosinófilo, triptasa) se observó una reproducibilidad similar, sin variaciones en los diferentes centros que participaban en el estudio. Estos autores concluyen que el esputo inducido es una técnica segura que se puede aplicar sin complicaciones en la práctica diaria.

Control del asma

Existen varios estudios⁵⁶⁻⁵⁸ que han valorado la utilidad del esputo inducido en el control del asma, con resultados, en general, concluyentes en el sentido de que se trata de una técnica válida para evaluar el control del paciente asmático. Así, Jatakanon et al⁵⁶ evaluaron la utilidad del esputo inducido como marcador de la pérdida de control del asma inducida por la retirada de los corticoides inhalados mediante el estudio de una población de 15 pacientes con asma moderada tratados con dosis medias de 800 g de budenosida. La duración del estudio fue de 8 semanas. Se evaluó a los pacientes utilizando diferentes tests funcionales (NO, metacolina y espirometría) en cada visita con una frecuencia bisemanal. Se observó que tanto la cifra de eosinófilos en el esputo como el NOe predecían de manera correcta la pérdida de control del asma, definido éste por cuestionarios clínicos de control y por la necesidad de medicación de rescate.

Conclusión

En resumen, se puede concluir que la valoración de la inflamación por métodos no invasivos se va incorporando de manera paulatina a la práctica diagnóstica y de control de enfermedades como el asma. Aunque todas las técnicas descritas tienen sus limitaciones, lo cual es también extensible a otras técnicas (valoración de la hiperreactividad, variabilidad del pico de flujo espiratorio, FEV₁, broncodilatación, síntomas, etc.), el futuro de estas técnicas es prometedor, si bien hay que matizar que algunas (aire condensado) no se encuentran en la actualidad lo suficientemente estandarizadas para preconizar su uso en la práctica diaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, et al. Intragastric nitric oxide production in humans: measurement in expelled air. *Gut* 1994;35:1543.
- Zetterquist W, Pedroletti C, Lundberg JO, et al. Salivary contribution to exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 1999;13:327.

- Kharitonov SA. Exhaled nitric oxide and carbon monoxide in asthma. *Eur Respir J* 2000;16:781-92.
- Kharitonov SA, Chung FK, Evans DJ, O'Connor BJ, Barnes PJ. The elevated level of exhaled nitric oxide in asthmatic patients is mainly derived from the lower respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1773-80.
- Kharitonov SA, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. *Eur Respir J* 1997;10:1683-93.
- ATS statment. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:2104-17.
- Alving K, Wietzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air in asthmatics. *Eur Respir J* 1993;6:1368-70.
- Kharitonov SA, Yates DH, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebouerne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343:133-5.
- Persson MG, Zetterstrom O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994;343:146-7.
- Hamid Q, Spingall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howard PH, Redington A, et al. Introduction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993;342:1510-3.
- Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled corticosteroids. *FASEB J* 1998;12:923-37.
- Chatkin JM, Ansarin K, Silkoff PE, McClean P, Gutiérrez C, Zamel N, et al. Exhaled nitric oxide as a non-invasive assessment of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1810-3.
- Ho LP, Wood FT, Robson A, Innes JA, Greening AP. Atopy influences exhaled nitric oxide levels in adult asthmatics. *Chest* 2000;118:1327-31.
- Henriksen AH, Lingaas-Holmen T, Sue-Chu M, Bjermer L. Combine use of exhaled nitric oxide and hyperresponsiveness in characterizing asthma in a large population survey. *Eur Respir J* 2000;15:849-55.
- Steerengerg PA, Snelder JB, Fisher PH, Vos JG, Van Loveren H, Van Amsterdam JGC. Increased exhaled nitric oxide on days with high outdoor air pollution is of endogenous origin. *Eur Respir J* 1999;13:334-7.
- Van Amsterdam, Verlaan BP, Van Loveren H, Elzakker BG, Vos SG, Opperhunen A, et al. Air pollution is associated with increased level of exhaled nitric oxide in non smoking healthy subjects. *Arch Environ Health* 1999;54:331-5.
- Kharitonov SA. Exhaled nitric oxide and carbon monoxide in asthma. *Eur Respir J* 1999;9:212-8.
- Kharitonov SA, Yates DH, Chung KF, Barnes PJ. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur Respir J* 1996;9:196-201.
- 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.
- Sippel JM, Holden WE, Tilles SA, O'Hollaren M, Cook J, Thukkani N, et al. Exhaled nitric oxide levels correlate with measures of disease control in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:645-50.
- Jones SL, Kittelson J, Cowan J, Flannery E, Hancox R, Christene R, et al. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:738-43.
- Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. Inhaled glucocorticosteroids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:454-7.
- Kharitonov SA, Yates DH, Chung KF, Barnes PJ. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur Respir J* 1996;9:196-201.
- Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, Caramori M, Chapman K, Gutiérrez C, et al. Exhaled nitric oxide and bronchial reactivity during and after inhaled beclomethasone in mild asthma. *J Asthma* 1998;35:473-9.
- Lanz MJ, Leung DY, Wjite CW. Comparison of exhaled nitric oxide to spirometry during emergency treatment of asthma exacerbations with glucocorticosteroids in children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82:161.
- Strling RG, Kharitonov SA, Campbell D, Robinson D, Durham SR, Chung KF, et al. Exhaled NO is elevated in difficult asthma and correlates with symptoms and disease severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. *Thorax* 1998;53:1030-4.

27. Bisgaard H, Loland L, Oj JA. NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene receptor antagonist montelukast. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1227-31.
28. Little SA, Chalmers GW, MacLeod KJ, McSharry C, Thomson NC. Non invasive markers or airway inflammation as predictors of oral steroid responsiveness in asthma. *Thorax* 2000;55:232-4.
29. Lim S, Jatakanon A, John MGilbey T, O'Connor BJ, Fan Chung K, Barnes PJ. Effect of inhaled budesonide. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:22-30.
30. Dupond LJ, Rochette F, Demets MG, et al. Exhaled nitric oxide correlates with airway hyperresponsiveness in steroid naïve patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:894-8.
31. Jatakanon A, Kharitonov SA, Lim S, Barnes PJ. Effect of different doses of inhaled budesonide on markers of airway inflammation in patients with mild asthma. *Thorax* 1999;54:108-14.
32. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, et al. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers on inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J* 1999;13:1386.
33. Hamid Q, Spingall DR, Riveros-Moreno V. Introduction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993;342:1510.
34. Maziak W, Loukides S, Culpitt SV, Sullivan P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:998-1002.
35. Tracey WR, Xue C, Klinghofer V, Barlow J, Pollock JS, Fosterman U, et al. Immunocytochemical detection of inducible NO synthase in human lung. *Am J Physiol* 1994;266:L722-L7.
36. Chatkin JM, Ansarin K, Silkoff PE, McClean P, Gutiérrez C, Zamel N, et al. Exhaled nitric oxide as a non invasive assessment of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1810-3.
37. Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Chung FK, et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1042-6.
38. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foshino-Barbano MP, Resta O, Graniccioni E, Barnes PJ. Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. *Eur Respir J* 2003;21:589-93.
39. Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I. Increased atemcondensation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cit Care Med* 1996;154:813-6.
40. Nowak D, Antezak A, Krol M. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J* 1996;9:652-7.
41. Nowak D, Kasielsky M, Pietras T, Bialasiewicz P, Antezak A. Cigarette smoking does not increase hydrogen peroxide levels in expired breath condensate of patients with stable COPD. *Monaldi Arch Chest Dis* 1998;53:268-73.
42. Van Beurden WJ, Harff GA, Dekhurjzen PN, Van der Poel-Smet SM, Smeenk FW. Effects of inhaled corticosteroids with different lung deposition on exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients. *Respiration* 2003;70:242-8.
43. Montuschi P, Corradi M, Ciabattini C, Nigthngale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;199:160:216-20.
44. Practico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2alpha, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1709-14.
45. Becher G, Winsel K, Beck E, Neubauer G, Stresemann E. Breath condensate as a method of non-invasive assessment of inflammatory mediators from the lower airways. *Pneumologie* 1997;51(Suppl 2):456-9.
46. Reinhold P, Landgenberg A, Becher G, Rothe M. Breath condensate, a medium obtained by a non invasive method for the detection of inflammatory mediators of the lung. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1999;112:254-9.
47. Hanazava T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in breath condensate in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1273-6.
48. Belda J, Leigh R, Paramesweran K, O'Byrne P, Sears M, Hargreave F. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:475-8.
49. Belda J. El esputo inducido como procedimiento diagnóstico y de seguimiento en la enfermedad respiratorias. *Arch Bronconeumol* 2001;37:271-3.
50. Spanavello A, Beghe B, Bainchi A, Migliori GB, Ambrosetti M, Neri M. Comparison of two methods of processing induced sputum: selected vs entire sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:665-8.
51. Pizzichini MM, Popov TA, Efthimidis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:866-9.
52. Belda J, Giner J, Casan P, Sanchis J. Esputo inducido en asma: estudio de validez y reproducibilidad. *Arch Bronconeumol* 1997;33:325-30.
53. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squiallace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:308-17.
54. Beeh KM, Beiek J, Kornmaaa O, Mander A, Buhl R. Long term repeatability of induced sputum cells and inflammatory markers in stable, moderate severe COPD. *Chest* 2003;123:778-83.
55. Fahy SV, Boushey HA, Lazarus SC, Manger EA, Cherniak RM, Chinchilli VM, et al. Safety and reproducibility of sputum induction in asthmatic subjects in a multicenter study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;163:1470-5.
56. 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.
57. Silkoff PE, Truden JB, Gibbs R, Wenzel S. The relationship of induced sputum inflammatory cells and BAL and biopsy. *Chest* 2003;123(Suppl 3):371-2.
58. Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* 2003;58:116-21.