

## Estrés oxidativo en el condensado exhalado de pacientes con infección pulmonar grave

P.V. Romero<sup>a</sup>, B. Rodríguez<sup>a</sup>, S. Martínez<sup>a</sup>, R. Cañizares<sup>b</sup>, D. Sepúlveda<sup>b</sup> y F. Manresa<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Neumología. Hospital Universitario de Bellvitge. IDIBELL. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Universitario de Bellvitge. IDIBELL. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

**OBJETIVO:** El estrés oxidativo forma parte esencial de la cadena de acontecimientos que conducen al estado inflamatorio de la vía aérea tras la agresión bacteriana. El objetivo del presente trabajo ha sido investigar si el análisis del condensado del vapor exhalado (CER) de pacientes con infección pulmonar grave refleja las alteraciones del estado oxidativo de la interfase aérea.

**PACIENTES Y MÉTODOS:** Se ha estudiado a un total de 48 pacientes divididos en 4 grupos: sujetos sin enfermedad respiratoria (n = 14), pacientes con neumonía multilobular (n = 13), con enfermedad pulmonar obstructiva crónica sobreinfectados (n = 14) y con neumonía grave ventilados mecánicamente (n = 7). Se obtuvo una muestra de CER en las primeras 72 h tras el ingreso y se determinó la concentración de nitrito, nitrato, 8-isoprostano y mieloperoxidasa (MPO).

**RESULTADOS:** Se apreciaron variaciones significativas de la concentración de nitrito, 8-isoprostano y MPO en los pacientes respecto del grupo control, pero no entre los diferentes grupos de pacientes. La concentración de MPO se relacionó con las concentraciones de 8-isoprostano y nitrato normalizadas para el valor de nitrito.

**CONCLUSIONES:** El análisis de la concentración de 8-isoprostano y MPO en el CER permite apreciar el estrés oxidativo en la interfase aérea de los pacientes con infección pulmonar grave.

**Palabras clave:** Neumonía. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Especies reactivas del nitrógeno. Especies reactivas del oxígeno. Inflamación pulmonar. 8-isoprostano. Mieloperoxidasa. Nitrato. Nitrito.

### Introducción

En el pulmón normal, el equilibrio entre antioxidantes y oxidantes es suficiente para mantener en estado altamente reducido los fluidos que tapizan las vías aéreas y

### Analysis of Oxidative Stress in Exhaled Breath Condensate From Patients With Severe Pulmonary Infections

**OBJECTIVE:** Oxidative stress is an intrinsic part of the chain of events leading to inflammation of the airways caused by bacterial infection. The aim of this study was to determine whether analysis of exhaled breath condensate from patients with severe lung infections reveals changes in the redox state at the airway surface.

**PATIENTS AND METHODS:** The study included a total of 48 subjects divided into 4 groups: individuals without respiratory disease (n=14), patients with multilobar pneumonia (n=13), patients who had chronic obstructive pulmonary disease with superinfection (n=14), and mechanically ventilated patients with severe pneumonia (n=7). A sample of exhaled breath condensate was obtained within the first 72 hours of hospital admission and the concentrations of nitrite, nitrate, 8-isoprostane, and myeloperoxidase (MPO) were determined.

**RESULTS:** Significant differences in the concentrations of nitrite, 8-isoprostane, and MPO were observed between patients and individuals without respiratory disease but no differences were found between the 3 patient groups. The concentration of MPO was correlated with the concentrations of 8-isoprostane and nitrate, which were normalized to the nitrite concentration.

**CONCLUSIONS:** Analysis of the concentrations of 8-isoprostane and MPO in exhaled breath condensate allows assessment of oxidative stress in the airways of patients with severe lung infections.

**Key words:** Pneumonia. Chronic obstructive pulmonary disease. Reactive nitrogen species. Reactive oxygen species. Pulmonary inflammation. 8-isoprostane. Myeloperoxidase. Nitrate. Nitrite.

Trabajo subvencionado por una beca SEPAR-2002 y por la Red Respira (ISCIII RTIC 03/111, proyecto CER)

Correspondencia: Dr. P.V. Romero.  
 Laboratorio de Función Pulmonar, Servicio de Neumología.  
 Hospital Universitario de Bellvitge. IDIBELL.  
 Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.  
 Correo electrónico: pvromero@csub.scs.es

Recibido: 14-3-2005; aceptado para su publicación: 24-5-2005.

llenar los espacios extracelulares. El incremento de la concentración de sustancias oxidantes o la disminución o el consumo excesivo de antioxidantes origina la pérdida de este equilibrio. Cuando esto ocurre se habla de estrés oxidativo. En respuesta a la agresión bacteriana, y especialmente a la producción de lipopolisacáridos, los macrófagos y el endotelio se activan expresando en la superficie moléculas de adhesión, que permiten la trans migración de neutrófilos desde el espacio vascular al interior del alvéolo o la vía aérea en general<sup>1</sup>. Los neutrófilos activados producen una gran cantidad de oxidantes, los cuales suelen clasificarse según su origen en: sustan-

cias reactivas derivadas del oxígeno (ROS) y sustancias reactivas derivadas del óxido nítrico (RNS)<sup>2</sup>. La producción de óxido nítrico (NO) por la sintetasa del NO genera óxido nítrico (NO·) y sus derivados nitrito (NO<sub>2</sub>) y nitrato (NO<sub>3</sub>). El NO, al reaccionar con el oxígeno, genera el poderoso oxidante peroxinitrito (OONO·). El estrés oxidativo conduce a la peroxidación lipídica de la membrana celular y a la formación de una nueva serie de prostanoïdes, derivados por oxidación del ácido araquidónico y de las prostaglandinas, llamados isoprostanos<sup>3</sup>.

Las peroxidasas del granulocito, tales como la mieloperoxidasa (MPO) del neutrófilo, desempeñan un importante papel en el desencadenamiento del estrés oxidativo. En los neutrófilos, el peróxido de hidrógeno generado a partir de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (y relativamente menos reactivo) es metabolizado por la MPO, en presencia de iones cloro, a ácido hipocloroso, el cual es un poderoso oxidante. Éste es un importante mecanismo antibacteriano, pero a su vez produce efectos citotóxicos<sup>4,5</sup>.

La condensación del vapor exhalado (CER), que es una técnica de muestreo de los fluidos que tapizan el espacio aéreo mediante la congelación del vapor exhalado por el sujeto, permite el análisis de las sustancias disueltas en él por el proceso de arrastre que se produce en la interfase aérea<sup>6</sup>. La dilución en el vapor de agua exhalado de las micropartículas arrastradas no permite la determinación cuantitativa de la composición bioquímica de la interfase, aunque sí su caracterización cualitativa, especialmente mediante las relaciones internas entre los parámetros bioquímicos, las cuales son relativamente inmunes a los procesos de dilución, aunque difíciles de interpretar<sup>7</sup>. La determinación de parámetros de estrés oxidativo en el exhalado se ha aplicado, con mayor o menor fortuna, al diagnóstico de la inflamación en procesos respiratorios crónicos —enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)<sup>8,9</sup>, asma<sup>10,11</sup>, fibrosis intersticial<sup>12</sup> y fibrosis quística<sup>13</sup>, entre otros—, aunque escasamente en situaciones de agresión broncopulmonar aguda grave, como es el caso de la neumonía multifocal o la sobreinfección aguda de la EPOC<sup>14</sup>.

El presente trabajo se ha basado en la hipótesis de que un proceso inflamatorio de la magnitud de la infección pulmonar debería de manifestarse con alteraciones del estado redox de la interfase y caracterizarse por un incremento de sustancias oxidantes en el CER. Su objetivo ha sido determinar si el análisis del CER permite constatar la hipótesis anterior en pacientes con neumonía grave y sobreinfección de la EPOC. Un grupo de sujetos sin enfermedad respiratoria ha actuado como control.

## Pacientes y métodos

### Sujetos

Se ha estudiado a un total de 48 pacientes, divididos en 4 grupos:

1. Grupo control, compuesto por 14 pacientes ingresados para cirugía programada, sin antecedentes de enfermedad respiratoria, con radiografía de tórax normal y no fumadores o ex fumadores de más de 2 años.

2. Grupo de pacientes afectados de neumonía multilobular, constituido por 13 sujetos ingresados por neumonía de diver-

sas etiologías (7 neumonías neumocócicas, una neumonía por *Legionella* y 5 casos sin identificación precisa del germen). Todos ellos presentaban hipoxemia al ingresar y 2 tenían antecedentes de EPOC.

3. Grupo de pacientes con diagnóstico de sobreinfección de EPOC, compuesto por 14 pacientes. En 3 casos los pacientes presentaban simultáneamente bronquiectasias y el germen infectante resultó ser *Pseudomonas aeruginosa*; en el resto no se obtuvo diagnóstico microbiológico concluyente. Los criterios utilizados para establecer el diagnóstico de sobreinfección bronquial fueron los propuestos por Anthonisen et al<sup>15</sup>.

4. Un grupo de 7 pacientes con neumonía grave en ventilación mecánica fue estudiado en la unidad de cuidados intensivos. Excepto en un caso con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y neumonía por *Pneumocystis carinii*, en el resto el germen infectante fue el neumococo.

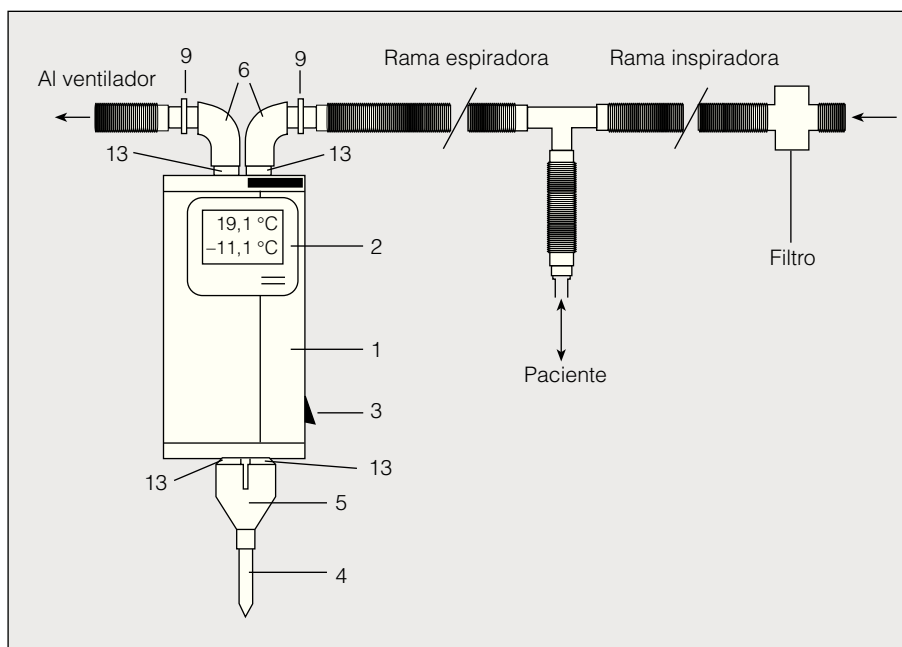
Según los criterios autorizados por el Comité de Ética del Hospital de Bellvitge, se informó del protocolo del estudio y de sus objetivos a todos los pacientes (o familiares en su caso), que dieron su libre consentimiento para participar en él. Excepto el grupo control, todos los pacientes recibían aporte suplementario de oxígeno, con una fracción inspiratoria de oxígeno (FiO<sub>2</sub>) que oscilaba entre 0,8 en los casos más graves (sepsis por neumococo, neumonía por *P. carinii*, etc.) y 0,24 o 3 l/min con gafas nasales en los casos más leves. La oxigenoterapia se mantuvo en todos los pacientes durante la colección de exhalado (en el caso de gafas nasales se pasó a la administración de un 24% de oxígeno con sistema Venturi).

### Obtención y procesamiento de la muestra de condensado exhalado

El CER se obtuvo dentro de las primeras 72 h del ingreso en los pacientes de los grupos EPOC y neumonía; inmediatamente tras el ingreso en el grupo control, y dentro de las primeras 72 h de su diagnóstico en la unidad de cuidados intensivos en los pacientes con neumonía y ventilación mecánica. Se obtuvo a la cabecera del paciente mediante congelación del vapor exhalado, para lo que se utilizó el condensador ANACON (Biostec, Valencia, España), generador de frío a través de una bomba termoeléctrica. Los pacientes que respiraban espontáneamente se conectaron al condensador mediante un circuito unidireccional que intercalaba un tubo corrugado de 45 cm. En los pacientes con ventilación mecánica el condensador se intercaló en el circuito espiratorio a 60 cm de distancia del tubo en T y el filtro humidificador se retiró (en la figura 1 se muestra el esquema del montaje del condensador en el circuito de ventilación). La muestra se obtuvo a temperaturas inferiores a -10 °C, con un período de obtención mínimo de 15 min. Los pacientes se enjuagaron la boca antes de cada medición y se les permitió interrumpirla para tragar saliva o cuando lo pedían. Se mantuvieron la administración de oxígeno y los parámetros de ventilación mecánica en su caso. La muestra se descongeló y dividió en alícuotas de 0,2 ml para su estudio bioquímico posterior. Las alícuotas se conservaron a -80 °C hasta el momento de su análisis.

### Análisis de los parámetros bioquímicos

La cantidad total de NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub> se determinó mediante la reacción de Gries (II) utilizando el equipo colorimétrico de Cayman (Michigan, EE.UU.). El NO<sub>2</sub> se determinó añadiendo reactivo de Gries (1% sulfanilamida; 0,1% naftilediamina; 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) directamente a 80 µl de muestra no preprocesada. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente y en ausencia de luz se leyó la absorbancia a 550 nm. La sensibilidad absoluta de la técnica en estas condiciones fue de 0,1 µM.



**Fig. 1.** Condensador ANACON instalado en el circuito de ventilación mecánica. El condensador se intercala en la rama espiratoria del circuito de ventilación mediante 2 adaptadores (9) y 2 codos elásticos (6). El aire exhalado es conducido hacia los tubos de condensación (13) que atraviesan el cuerpo del condensador (1). Una pieza en Y (5) cierra el circuito con el tubo colector de condensado exhalado (4). Un termómetro (2) permite monitorizar la temperatura de condensación. 3: interruptor de condensación.

Se construyeron 2 curvas estándar de 6 puntos entre 0,1 y 10  $\mu\text{M}$  que se ajustaron potencialmente para obtener la concentración de  $\text{NO}_2$  por interpolación. A los valores por debajo de 0,1  $\mu\text{M}$  (no detectables) se les asignó 0 (o 0,05  $\mu\text{M}$  para cálculos logarítmicos).

El  $\text{NO}_3$  se midió como  $\text{NO}_2$  tras conversión enzimática mediante la adición de  $\text{NO}_3$  reductasa, en presencia del cofactor NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido), a 80  $\mu\text{l}$  de muestra no preconicionada. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente se añadió el reactivo de Gries y se procedió como en el caso de la determinación de  $\text{NO}_2$ . Al resultado total de la lectura de la concentración de  $\text{NO}_2$  más  $\text{NO}_3$  se sustrajo la concentración de  $\text{NO}_2$  obtenida anteriormente.

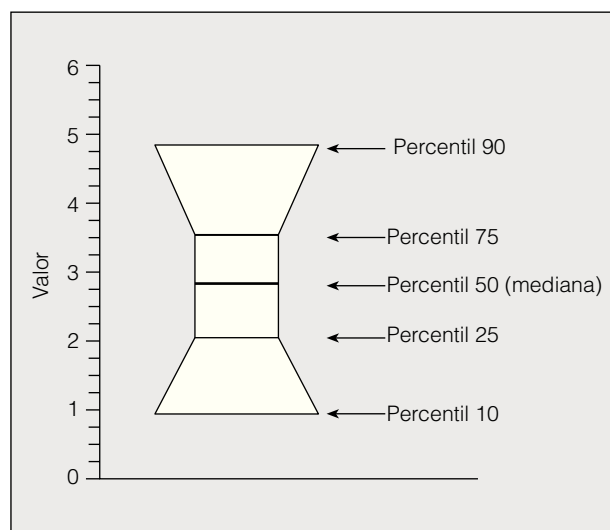
La concentración de 8-isoprostano se midió mediante técnica de enzimoimmunoanálisis con el equipo específico de Cayman (Michigan, EE.UU.) para 8-isoprostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ . No se realizó preconicionamiento o purificación de las muestras antes de la determinación. Se utilizaron 50  $\mu\text{l}$  por determinación y se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de trazador de 8-isoprostano colinesterasa y 50  $\mu\text{l}$  de antisuero anti-8-isoprostano. Tras incubación durante 18 h a temperatura ambiente y a cubierto de la luz se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de reactivo de Ellman a los pocillos lavados con *buffer*, y después de 90 min de reacción se leyó la absorbancia a 420 nm. Se construyeron 2 curvas estándar entre 2 y 32  $\text{pg/ml}$ . La sensibilidad de la técnica en estas condiciones fue suficiente para discriminar 2  $\text{pg/ml}$ . Entre 2 y 1  $\text{pg/ml}$  la concentración se obtuvo por extrapolación retrógrada. En 2 pacientes del grupo de neumonía no se efectuó la determinación de 8-isoprostano.

La concentración de MPO en el CER se determinó mediante técnica de enzimoimmunoanálisis con el equipo de IBL (Hamburgo, Alemania). La sensibilidad de la técnica es de 1 U/ml. Se construyeron 2 curvas de control de 6 puntos entre 1 y 100 U/ml. Entre 1 y 0,1 U/ml la concentración se obtuvo por extrapolación retrógrada. A los valores inferiores a 0,1 U/ml se les asignó el valor de 0 (o de 0,1 U/ml para los análisis logarítmicos). En 5 pacientes (3 del grupo de neumonía y 2 de neumonía ventilada) no se efectuó la determinación de MPO.

En todos los casos se realizó un análisis duplicado de las muestras y se computó el valor promedio.

#### Análisis estadístico

Debido a la falta de normalidad en la distribución de la mayoría de las variables se utilizaron preferentemente pruebas no paramétricas, tales como el test de comparación de grupos independientes de Kruskal-Wallis, en lugar del análisis paramétrico de ANOVA. La descripción de los grupos en las figuras se ha efectuado mediante la representación de la mediana y los percentiles del 10, el 25, el 75 y el 90%, en un gráfico cuya interpretación es como se muestra en la figura 2. En ausencia de normalidad de las muestras no se realizó análisis de covariancia, por lo que la influencia de la concentración de oxígeno se evaluó a través de la correlación de rangos de Spearman en los pacientes. La correlación de Pearson se utilizó en algunas ocasiones, a pesar de su carácter paramétrico, aunque la asociación se confirmó en todos los casos por correlación de Spearman.



**Fig. 2.** Interpretación del gráfico de cajas.

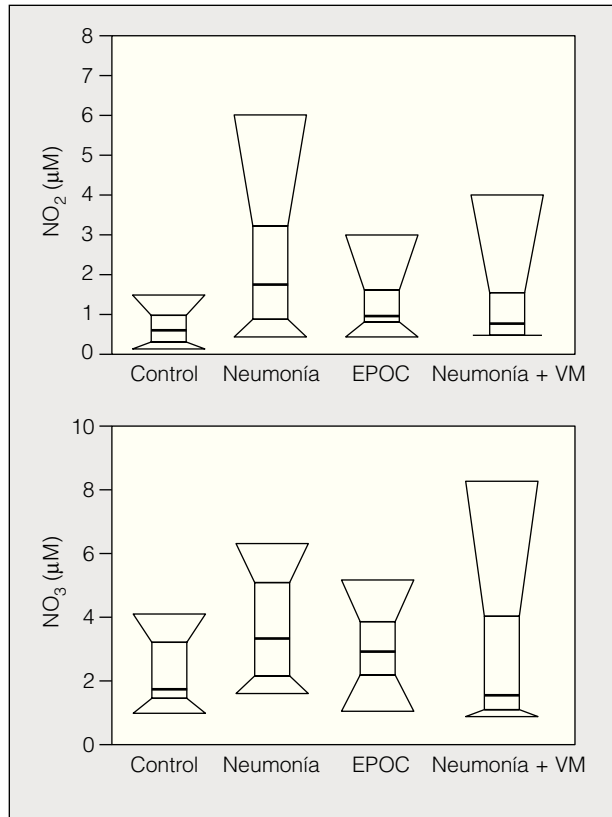


Fig. 3. Distribución de las concentraciones de nitrito (NO<sub>2</sub>) y nitrato (NO<sub>3</sub>) en los grupos de sujetos estudiados. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; VM: ventilación mecánica.

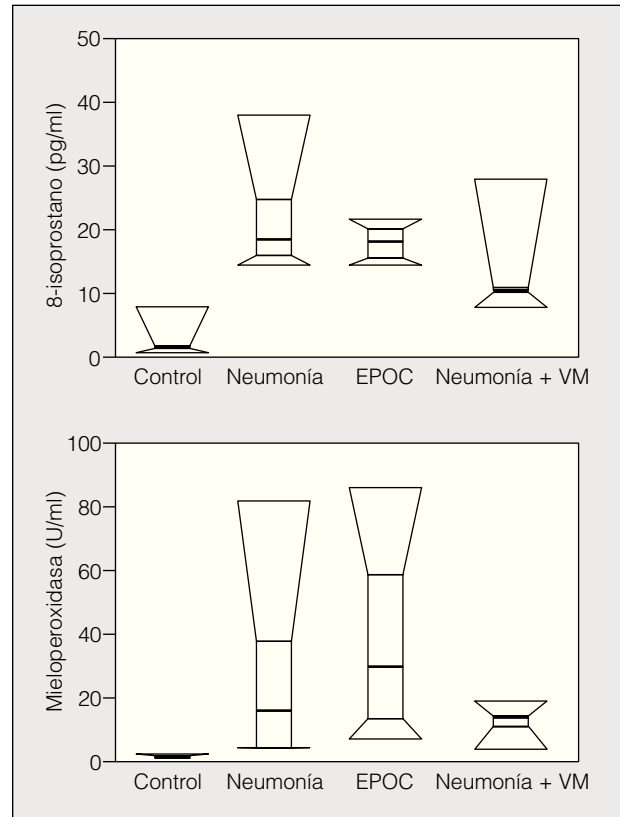


Fig. 4. Distribución de las concentraciones de 8-isoprostano y mieloperoxidasa en el condensado exhalado de los 4 grupos de sujetos estudiados. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; VM: ventilación mecánica.

### Resultados

En la tabla I se muestran algunas características relevantes de la población estudiada: distribución por sexos, edad, gasometría arterial el día del estudio y temperatura corporal del paciente en el momento de la recogida del CER. La relación presión arterial de oxígeno/FiO<sub>2</sub> permite comprobar que el trastorno de la oxigenación era importante en los 3 grupos de pacientes.

En la figura 3 se muestra la distribución de NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub> en los 4 grupos de sujetos. La comparación estadística de la diferencia entre grupos fue significativa para el NO<sub>2</sub> ( $\chi^2 = 12,2$ ;  $p = 0,007$ ), pero no para el NO<sub>3</sub> ( $\chi^2 = 6,63$ ;  $p = 0,084$ ). La diferencia entre grupos para el NO<sub>2</sub> fue debida a los valores más bajos observados en sujetos normales, ya que cuando se investigó la diferencia entre los 3 grupos de pacientes no se apreció diferencia significativa ( $\chi^2 = 3,27$ ;  $p = 0,19$ ). En la figura 4

se muestra la distribución de la concentración de MPO y 8-isoprostano en el CER, en los 4 grupos estudiados. La comparación entre grupos mostró diferencias significativas tanto para la concentración de 8-isoprostano ( $\chi^2 = 30,5$ ;  $p < 0,0001$ ) como para la concentración de MPO ( $\chi^2 = 30,0$ ;  $p < 0,0001$ ), debido al importante aumento de las concentraciones observadas en el CER de los pacientes, respecto de los valores bajos (a menudo indetectables) obtenidos en los sujetos del grupo control. La comparación de los grupos de pacientes entre sí no ofreció, sin embargo, significación estadística ( $\chi^2 = 5,05$ ;  $p = 0,079$ , y  $\chi^2 = 4,94$ ;  $p = 0,084$  para 8-isoprostano y MPO, respectivamente). No se apreció relación significativa entre la FiO<sub>2</sub> y ninguno de los parámetros bioquímicos estudiados en el exhalado.

La MPO mostró una relación lineal con la concentración de 8-isoprostano relativa a la de NO<sub>2</sub> (R de Spear-

TABLA I  
Análisis estadístico descriptivo de los grupos estudiados

Grupo	N	Sexo: V/M	Edad (años)	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	TR (°C)
Control	14	12/2	62,86 ± 2,96	—	—	—	35,9 ± 0,28
EPOC	14	14/0	68,14 ± 1,88	54,92 ± 8,3	56,7 ± 18,3	226 ± 47	36,5 ± 0,52
Neumonía	13	9/4	62,85 ± 2,96	56,92 ± 7,3	38,7 ± 4,6	210 ± 33	37,1 ± 0,9
Neumonía + VM	7	7/0	39,86 ± 14,8	118,8 ± 23,0	41,8 ± 8,1	186 ± 48	37,9 ± 37,9

Los datos se expresan como media ± desviación estándar.

V: varón; M: mujer; PaO<sub>2</sub>: presión arterial de oxígeno; PaCO<sub>2</sub>: presión arterial de anhídrido carbónico; FiO<sub>2</sub>: fracción inspiratoria de oxígeno; TR: temperatura del paciente durante la recogida del condensado exhalado; VM: ventilación mecánica; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

man = 0,417; p = 0,027, y R de Pearson = 0,583; p = 0,001) o de la relación  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  (R de Spearman = 0,589; p = 0,001, y R de Pearson = 0,4792; p = 0,009) en los pacientes con infección pulmonar (fig. 5).

### Discusión

El diagnóstico no invasivo de la inflamación de la vía aérea es un objetivo complejo, que se ha abordado utilizando diversas técnicas, con un grado de eficacia y seguridad diagnóstica muy variable<sup>16</sup>. El muestreo del CER no es ajeno a cierta polémica debido a la gran variabilidad de los resultados y a la escasez de estudios sistemáticos sobre los factores metodológicos que inciden en ella<sup>17</sup>. No obstante, la facilidad de su utilización, la ausencia de iatrogenia asociada y la buena tolerancia de la técnica estimulan el análisis de las condiciones clínicas de su aplicación.

En este contexto se ha abordado el presente estudio, sin otro objetivo que el de comprobar si, en caso de infección pulmonar grave, el CER es capaz de reflejar el estrés oxidativo inherente a la inflamación pulmonar. La selección de los pacientes se realizó atendiendo al criterio básico de infección pulmonar diagnosticada clínica y radiológicamente, e insuficiencia respiratoria asociada como signo de gravedad. No se atendió a otros criterios de selección, debido al carácter inespecífico del fenómeno estudiado (estrés oxidativo).

La variabilidad inherente a la determinación de parámetros bioquímicos en el CER obedece a factores ligados al método (contaminación buconasal, patrón ventilatorio, etc.), a las condiciones clínicas de recogida (oxigenoterapia, ventilación mecánica, entre otras) o a aspectos inherentes a la composición del CER (dilución, baja concentración de la sustancia a analizar, etc.)<sup>18</sup>. Aunque no se ha podido sistematizar algunos aspectos metodológicos, limitados por las condiciones clínicas de los pacientes, sí se puede comentar la eventual influencia de algunos de ellos.

La contaminación buconasal es una fuente importante de RNS y, finalmente, de ROS, incluso con pinzas nasales<sup>19,20</sup>. Aunque las diferencias entre los grupos de pacientes no son significativas, la distribución de  $\text{NO}_3$  en los ventilados parece aproximarse más a la del grupo control que a la del grupo de pacientes con neumonía no ventilados, lo cual podría quizá explicarse por la contaminación procedente de vías superiores altamente productoras de RNS. Aparte de esta consideración, el patrón observado en pacientes con intubación traqueal era similar al de los pacientes con respiración bucal, lo cual permite aceptar *a priori* que las variaciones apreciadas tuvieron su origen en las vías aéreas inferiores.

El patrón ventilatorio influye en la cantidad de CER recogido<sup>21</sup>, pero también puede afectar a su calidad, pues se ha comprobado una relación entre el flujo espiratorio y la concentración de peróxido de hidrógeno en el CER<sup>22</sup> y entre la concentración de  $\text{NO}_2$  y el volumen corriente<sup>23</sup>. Al no haberse medido el volumen corriente o el flujo espirado en los sujetos respirando espontáneamente, no se pudo ajustar por esta magnitud. Los pacientes con ventilación mecánica, en quienes sí se dis-

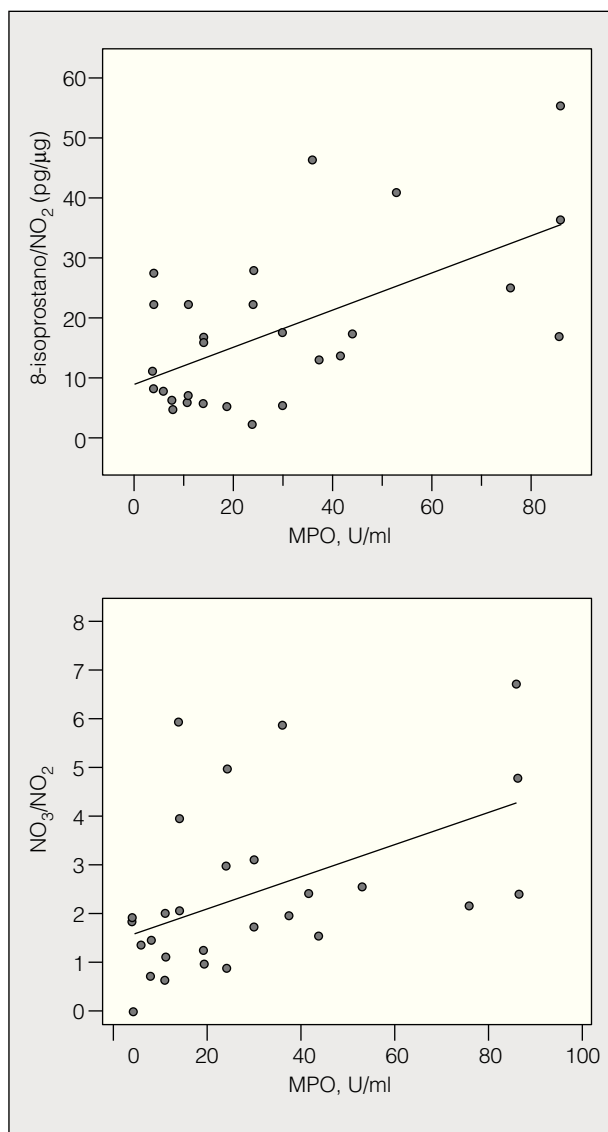


Fig. 5. Correlaciones lineales entre la mieloperoxidasa (MPO) y las concentraciones de 8-isoprostan y nitrato ( $\text{NO}_3$ ), normalizadas para la concentración de nitrato ( $\text{NO}_2$ ) en pacientes con infección pulmonar grave.

pone de estas mediciones, son pocos para obtener una evaluación del efecto, con lo que no se puede descartar que, al menos en parte, la variabilidad observada pudiese estar en relación con diferencias en el flujo espiratorio y con el arrastre de partículas desde la interfase.

La  $\text{FiO}_2$  es otro importante parámetro de confusión, ya que se ha comprobado que incrementa la concentración de parámetros de estrés oxidativo en el CER de sujetos normales y de pacientes con EPOC expuestos<sup>24</sup>. La falta de relación entre la  $\text{FiO}_2$  y la concentración de ROS y RNS en el exhalado no es garantía de que no exista efecto de confusión. La  $\text{FiO}_2$  en el momento del muestreo no es el parámetro adecuado para medir el efecto de la administración de oxígeno sobre el estado redox de la vía aérea, ya que su efecto es probablemente acumulativo<sup>24</sup>. A pesar de ello, aunque la  $\text{FiO}_2$  induzca la expresión de ROS en el exhalado, su participación

es, en la práctica, inseparable de la propia enfermedad estudiada en el ámbito clínico y queda incluida en el objetivo central del estudio.

La elevada variabilidad de los resultados obtenidos en los pacientes puede también corresponder a diferentes momentos evolutivos del proceso en cada una de las enfermedades estudiadas. Aunque se ha estudiado la composición del CER en las primeras 72 h tras el ingreso, en realidad el período transcurrido desde el inicio de los síntomas es muy variable, con pródromos que oscilan entre 12 h y una semana en las neumonías, e incluso superiores en pacientes con EPOC. El inicio del proceso agudo, relativamente menos impreciso en las neumonías, es difícil de determinar en la mayor parte de las exacerbaciones de la EPOC. Un análisis en que se tomó el punto de inicio de los síntomas como referencia no ofreció una tendencia evolutiva apreciable para ninguno de los parámetros en los pacientes con neumonía. El bajo número de éstos y la imprecisión del parámetro "días desde el inicio de los síntomas" no permiten aventurar una interpretación. Tampoco existen estudios previos que permitan orientar sobre este aspecto.

Las concentraciones de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$  en nuestra población control fue similar a la observada en sujetos normales de estudios previos<sup>25,26</sup>. Lo mismo sucedió con la concentración de 8-isoprostano en los controles<sup>27</sup>. No se ha hallado estudios previos en que se determinase la MPO en el exhalado de sujetos normales; sin embargo, las bajas concentraciones de MPO en el esputo inducido de los sujetos sanos ( $0,1-1 \mu\text{g/ml}$ )<sup>28</sup> hace sospechar que su concentración en el CER sea prácticamente indetectable en ausencia de enfermedad inflamatoria pulmonar.

El NO es un radical libre que posee un importante papel en la fisiopatología de la inflamación pulmonar. Su producción sistémica está aumentada en presencia de infección bacteriana<sup>29</sup>, lo que induce a pensar que el NO representaría un marcador inflamatorio local en la infección pulmonar. En un entorno acuoso, tal como el microambiente de la superficie de la vía aérea, la generación de NO puede estimarse a partir de la concentración de sus metabolitos,  $\text{NO}_2$ , y su derivado oxidado  $\text{NO}_3$ . La diferencia entre grupos respecto a la concentración de  $\text{NO}_2$  y la suma de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$  señalaría la producción de RNS. No hay, sin embargo, una explicación satisfactoria para la ausencia de diferencias entre grupos respecto de la concentración de  $\text{NO}_3$ .

Las alteraciones observadas en el exhalado de los pacientes con infección pulmonar grave parecen afectar más a la expresión de ROS (8-isoprostano, MPO) que de RNS. En modelos animales, la administración de lipopolisacáridos por inhalación determina un rápido (horas) influjo de leucocitos desde la sangre, principalmente neutrófilos<sup>1</sup>. La gran cantidad de neutrófilos presentes en los espacios aéreos de los pacientes con infección pulmonar hace pensar en esta fuente principal de oxidantes, sin descartar otras fuentes incluso exógenas, como la administración de elevadas concentraciones de oxígeno, como ya se ha destacado.

El desplazamiento del equilibrio redox hacia un estado oxidativo favorece la peroxidación de los lípidos de membrana. El resultado es la producción de isoprostano.

El 8-isoprostano (8-isoprostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ ) es, al contrario que la generalidad de estas sustancias, un compuesto estable, por lo que puede determinarse con cierta seguridad en los líquidos biológicos. Los isoprostanos se han utilizado como marcadores del estrés oxidativo en el pulmón<sup>30</sup> y su medición se acepta como un índice de la peroxidación lipídica *in vivo*<sup>31</sup>. Su aparición en el CER se ha asociado a la agresión celular de las ROS, y se han hallado transitoriamente elevados en el CER de pacientes con exacerbación de la EPOC<sup>8</sup> y en la lesión pulmonar aguda<sup>32</sup>. Al contrario de lo que sucede con los isoprostanos, la concentración de MPO en el CER no se ha estudiado hasta la fecha, por lo que no se dispone de referencias en la bibliografía. El incremento de la MPO observado en el CER de todos los pacientes con infección pulmonar indicaría la importancia de la reacción neutrófila y de la actividad oxidativa simultáneamente.

La correlación entre parámetros del exhalado puede estar desvirtuada por el efecto dilución. Relacionar  $\text{NO}_3$  y 8-isoprostano con la concentración de  $\text{NO}_2$  permite eliminar el efecto dilución, común a ambos parámetros, e interpretar el índice en función de la relación ROS/RNS. La utilización de relaciones en lugar de concentraciones absolutas tiene, por otro lado, la desventaja de que las variaciones pueden deberse tanto al numerador como al denominador, y su interpretación debe ser cautelosa<sup>7</sup>, razón por la cual dichas relaciones no se utilizan habitualmente en el análisis del exhalado. La MPO es un producto casi exclusivamente relacionado con la producción de ROS, mientras que el 8-isoprostano está producido por la peroxidación lipídica originada, tanto por ROS (oxígeno, peróxido de hidrógeno, OH<sup>-</sup>, etc.) como por derivados reactivos del NO (principalmente peroxinitrito). Por su parte, el  $\text{NO}_3$  deriva por oxidación del  $\text{NO}_2$  (indicador de la producción local de NO). Los cocientes 8-isoprostano/ $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  pueden así interpretarse como dependientes esencialmente del exceso de estrés oxidativo. En consecuencia, la relación entre la MPO y la relación 8-isoprostano/ $\text{NO}_2$  o  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  refleja el hecho de que la actividad oxidativa en la interfase aérea de los pacientes con infección pulmonar se halla altamente relacionada a la actividad neutrófila, tal como se ha postulado previamente<sup>2</sup>.

La concentración de 8-isoprostano y MPO en los sujetos sin enfermedad respiratoria es mucho menor que en los pacientes y, a menudo, prácticamente indetectable. La representación logarítmica (fig. 6) permite apreciar claramente 2 agrupaciones en el conjunto de los datos: la primera engloba a los sujetos sin enfermedad respiratoria y la segunda a los pacientes, con puntos de corte entre 8 y 10 pg/ml para el 8-isoprostano y de 2 a 5 U/ml para la MPO. Salvando las imprecisiones ligadas al método (variabilidad, carácter cualitativo de las mediciones, etc.), se puede afirmar que un incremento simultáneo de 8-isoprostano y MPO indica la existencia de un entorno oxidativo en la interfase aérea. En un estudio previo, Carpenter et al<sup>32</sup> hallan una elevación de 8-isoprostano en pacientes con síndrome de distrés respiratorio del adulto, lesión pulmonar aguda o sepsis, con un punto de corte respecto de los sujetos control de 25 pg/ml. Este valor es superior al hallado por nosotros,

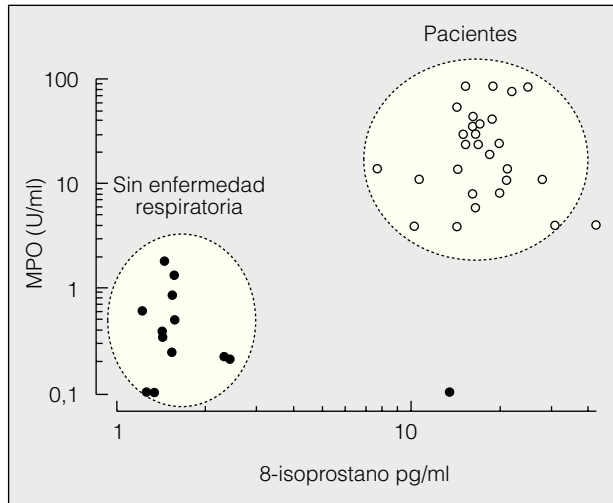


Fig. 6. Gráfico que representa la concentración de 8-isoprostano y la de mieloperoxidasa (MPO) en el condensado exhalado de sujetos sin enfermedad respiratoria (puntos) y pacientes (círculos). Se aprecian claramente 2 agrupaciones bien diferenciadas (línea discontinua).

diferencia que podría radicar en la técnica utilizada. En este sentido cabe destacar que los valores hallados por Carpenter et al<sup>32</sup> en la población de referencia son también superiores a los hallados por Van Hoydonck et al<sup>27</sup> en el CER de sujetos normales. Debido a la gran variabilidad inherente a la técnica, parece necesario utilizar más de un parámetro para poder definir el estado oxidativo de la interfase aérea.

En conclusión, el análisis de CER permite detectar el estrés oxidativo de la interfase aérea de pacientes con infección pulmonar grave mediante la determinación de la concentración de 8-isoprostano y MPO.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a D.<sup>a</sup> Neus Gómez el trabajo analítico desarrollado.

### BIBLIOGRAFÍA

- Vass G, Huszar E, Barat E, Valyon M, Kiss D, Penzes I, et al. Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:850-5.
- Crapo JD. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage. *Eur Respir J Suppl.* 2003;44:4S-6S.
- Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation—a review. *Curr Med Chem.* 2003;10:1723-40.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of *Staphylococcus aureus* by neutrophils. *Infect Immun.* 1996;64:3512-7.
- Winterbourn CC, Kettle AJ. Reactions of superoxide with myeloperoxidase and its products. *Jpn J Infect Dis.* 2004;57:S31-3.
- Rahman I, Kelly F. Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research. *Free Radic Res.* 2003;37:1253-66.
- Effros RM, Biller J, Foss B, Hoagland K, Dunning MB, Castillo D, et al. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:1500-5.
- Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax.* 2003;58:294-8.

- Van Beurden WJ, Smeenk FW, Harff GA, Dekhuijzen PN. Markers of inflammation and oxidative stress during lower respiratory tract infections in COPD patients. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2003;59:273-80.
- Huszar E, Vass G, Vizi E, Csoma Z, Barat E, Molnar Vilagos G, et al. Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur Respir J.* 2002;20:1393-8.
- Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, Pesci A, Ghiro L, Bodini A, et al. Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations. *Thorax.* 2003;58:505-9.
- Carpagnano GE, Kharitonov SA, Wells AU, Pantelidis P, Du Bois RM, Barnes PJ. Increased vitronectin and endothelin-1 in the breath condensate of patients with fibrosing lung disease. *Respiration.* 2003;70:154-60.
- Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM, Hodson ME, Kharitonov SA. Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:1109-12.
- Effros RM, Su J, Casaburi R, Shaker R, Biller J, Dunning M. Utility of exhaled breath condensates in chronic obstructive pulmonary disease: a critical review. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11:135-9.
- Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med.* 1987;106:196-204.
- Galdiz Iturri JB. Métodos de valoración de la inflamación de las vías respiratorias. *Arch Bronconeumol.* 2004;40 Supl 5:2-7.
- González Mangado N. Análisis del condensado exhalado: ¿una técnica con futuro? *Arch Bronconeumol.* 2005;41:540-1.
- Almonacid C, Castela J, Izquierdo JL. Condensado de aire exhalado en patología respiratoria. *Rev Patol Respir.* 2004;7:123-30.
- Vass G, Huszar E, Barat E, Valyon M, Kiss D, Penzes I, et al. Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:850-5.
- Latzin P, Beck J, Bartenstein A, Griese M. Comparison of exhaled breath condensate from nasal and oral collection. *Eur J Med Res.* 2003;8:505-10.
- De Lema JB; González M, Vigil L, Casan P. Condensado exhalado: estandarización de la recogida de muestras en voluntarios sanos. *Arch Bronconeumol.* 2005;4:584-6.
- Schleiss MB, Holz O, Behnke M, Richter K, Magnussen H, Jorres RA. The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur Respir J.* 2000;16:1115-8.
- Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, Lange T, Engelmann L, Schauer J, et al. Exhaled breath condensate nitrite and its relation to tidal volume in acute lung injury. *Chest.* 2003;124:1046-52.
- Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Supplementary oxygen in healthy subjects and those with COPD increases oxidative stress and airway inflammation. *Thorax.* 2004;59:1016-9.
- Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax.* 2001;56:456-61.
- Corradi M, Pesci A, Casana R, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, et al. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide.* 2003;8:26-30.
- Van Hoydonck PG, Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, Schouten EG, Dupont LJ, Temme EH. Quantitative analysis of 8-isoprostane and hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Eur Respir J.* 2004;23:189-92.
- Nightingale JA, Rogers DF, Chung KF, Barnes PJ. No effect of inhaled budesonide on the response to inhaled ozone in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:479-86.
- Wheeler MA, Smith SD, García-Cardena G, Nathan CF, Weiss RM, Sessa WC. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest.* 1997;99:110-6.
- Rahman I, Biswas SK. Non-invasive biomarkers of oxidative stress: reproducibility and methodological issues. *Redox Rep.* 2004;9:125-43.
- Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: their role as an index of oxidant stress status in human pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:S25-30.
- Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest.* 1998;114:1653-9.