



Original

Óxido nítrico en el condensado de aire espirado de individuos voluntarios sanos recolectado a través de un dispositivo reutilizable

Daniella Alves Vento*, Lívia Arcêncio y Alfredo José Rodrigues

Departamento de Cirugía y Anatomía, Escuela de Medicina de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 19 de julio de 2011

Aceptado el 20 de noviembre de 2011

On-line el 13 de enero de 2012

Palabras clave:

Condensado de aire espirado

Óxido nítrico

Monitorización no invasiva

R E S U M E N

Fundamento: El análisis del condensado de aire espirado (o exhalado) es una técnica no cruenta que permite determinar diversas sustancias volátiles y no volátiles producidas en las vías respiratorias, y cuya medición puede ser útil para el diagnóstico y la supervisión de diversas enfermedades respiratorias.

Objetivos: El objetivo del presente estudio fue producir un dispositivo reutilizable, de bajo coste, para obtener muestras del condensado de aire espirado en individuos voluntarios sanos y determinar la concentración de óxido nítrico en la muestra recolectada.

Material y métodos: El dispositivo se fabricó con un tubo de vidrio de borosilicato en forma de U. El tubo se introdujo en un recipiente con hielo y en el extremo distal se adaptaron válvulas respiratorias unidireccionales. Acto seguido, se determinó el óxido nítrico en el condensado de aire espirado (CAE) mediante un método de quimioluminiscencia.

Resultados: El coste total del dispositivo fue de 120,20 dólares. Las muestras de CAE se obtuvieron a partir de 116 individuos de ambos sexos, de 20-70 años de edad. El volumen medio del condensado de aire espirado obtenido durante 10 min fue de $1,0 \pm 0,6$ ml y el nivel medio del óxido nítrico fue de $12,99 \pm 14,38$ μ M (mediana, 8,72 μ M). No hubo correlación entre los niveles de óxido nítrico en el condensado de aire espirado y la edad o el sexo.

Conclusión: Demostramos que es posible fabricar un dispositivo de bajo coste, eficiente y reutilizable, para obtener y determinar los niveles de óxido nítrico en el CAE. Tampoco hemos identificado una correlación entre los valores de óxido nítrico presente en el CAE obtenido a través de este método, la edad y el sexo.

© 2011 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Nitric Oxide in the Exhaled Breath Condensate of Healthy Volunteers Collected With a Reusable Device

A B S T R A C T

Keywords:

Exhaled breath condensate

Nitric oxide

Noninvasive monitorization

Background: The analysis of exhaled breath condensate (EBC) is a non-invasive technique that enables the determination of several volatile and nonvolatile substances produced in the respiratory tract, whose measurement may be useful for the diagnosis and monitoring of several respiratory diseases.

Objective: The aim of this study was to produce a low-cost reusable device in order to sample exhaled breath condensate in healthy adult volunteers, and to determine the concentration of nitric oxide in the sample collected.

Material and methods: The apparatus was made with a U-shaped tube of borosilicate glass. The tube was placed in a container with ice, and unidirectional respiratory valves were fitted to the distal end. Afterwards, nitric oxide was measured in the exhaled breath condensate (EBC) by chemiluminescence.

Results: The total cost of the device was \$120.20. EBC samples were obtained from 116 volunteers of both sexes, aged between 20 and 70. The mean volume of exhaled breath condensate collected during 10 minutes was 1.0 ± 0.6 mL, and the mean level of nitric oxide was 12.99 ± 14.38 μ M (median 8.72 μ M). There was no correlation between the nitric oxide levels in the exhaled breath condensate and age or gender.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: daniellaavento@usp.br (D. Alves Vento).

Conclusion: We demonstrate that it is possible to fabricate a low-cost, efficient, reusable device in order to collect and determine nitric oxide levels in EBC. We have identified no correlation between the nitric oxide levels present in the EBC obtained with this method with either age or sex.

© 2011 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Se ha propuesto el análisis de los biomarcadores en el condensado de aire espirado (CAE) como una técnica no cruenta de investigación de diversas enfermedades respiratorias inflamatorias y no inflamatorias y como herramienta de seguimiento de estas enfermedades¹⁻⁴. Entre los biomarcadores de interés, el óxido nítrico (NO), un radical libre que puede participar en una amplia variedad de reacciones bioquímicamente pertinentes, ha emergido como un marcador biológico importante⁵⁻⁸. El NO espirado se ha investigado intensamente y parece ser un marcador de utilidad para el asma⁹ y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)¹⁰. También se ha demostrado que sus valores aumentan en pacientes con cáncer de pulmón¹¹ y puede correlacionarse con las puntuaciones clínicas de lesión pulmonar¹².

A pesar de la disponibilidad comercial de dispositivos para la recolección del CAE, estos dispositivos son desechables y en muchos países no están fácilmente disponibles, sobre todo en los países en desarrollo, donde los costes de importación limitan su uso sistemático en la práctica clínica. Además, apenas se dispone de información sobre el contenido de NO en el CAE de individuos sanos. Algunos estudios proporcionan los valores de la concentración media en individuos sanos (tabla 1), y la variabilidad de los valores puede deberse a los diferentes tipos de dispositivos utilizados.

Por esta razón, para resolver estas dificultades decidimos fabricar el instrumento propuesto por Horváth et al.¹³ en nuestra institución con unas pocas modificaciones, para obtener y analizar el NO en el CAE de una cohorte de adultos sanos.

Métodos

El presente estudio fue aprobado por el comité de investigación de nuestra institución (número de protocolo HCRP 4167/2009). Todos los experimentos se efectuaron de acuerdo con los principios éticos para la investigación médica emprendida en seres humanos (World Medical Association, Declaración de Helsinki).

Individuos voluntarios

Se reclutaron 116 individuos voluntarios, sanos, de ambos sexos, de 20-70 años de edad, y se les asignó a grupos, estratificados de acuerdo con la edad en estratos de 10 años. Se excluyó a cualquier individuo voluntario con antecedentes de tabaquismo, drogadicción, enfermedad pulmonar y/o sistémica crónica, incluidas alergias; enfermedad infecciosa respiratoria aguda en los 30 últimos días, exposición reciente y/o constante a formaldehído y ozono; uso de fármacos como los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, inhibidores de la fosfodiesterasa, fármacos donantes de NO (nitroprusiato), esteroides, oximetazolina, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos. También se excluyó a cualquier individuo que hubiera ingerido alimentos 2 h antes de la recolección de CAE o hubiera practicado ejercicio físico extenuante, consumido bebidas alcohólicas o cualquier medicación en las 24 h previas.

Dispositivo de recolección de condensado de aire espirado

En pocas palabras, el dispositivo se fabricó con un tubo de cristal en forma de U (cristal de borosilicato Duran® Schott-Rohrglas, Mitterteich, Alemania), de 18 mm de grosor. En el extremo distal inferior del tubo de cristal se efectuó una abertura en la que se conectó un tubo de polipropileno (capacidad de 1,5 ml, Axygen Inc., California, EE. UU.) para la recolección del CAE. En el otro extremo abierto del tubo se conectaron válvulas respiratorias unidireccionales (K Takaoka, São Paulo, Brasil), que permiten separar el aire inhalado (ambiental) del exhalado, para dirigir todo el aire espirado a través del tubo. En el extremo opuesto se conectó un neumotacómetro digital (Ventronic II, DHD Healthcare, Nueva York, EE. UU.). La figura 1 muestra el diseño y las dimensiones del tubo de cristal, y el ensamblado para la recolección de CAE.

Después de cada utilización, las piezas de teflón y silicona se limpiaron con agua y jabón y se introdujeron en un recipiente con ácido peracético (Anioxyde 1000, Anios, Pavê Du Moulin, Lille, Francia) a una concentración de 1.471 partes por millón durante 30 min. Acto seguido, se aclararon en agua y se secaron. El tubo de cristal se aclaró con abundante agua destilada (Milli-q) y se esterilizó usando autoclave (HI VAC, Baumer, São Paulo, Brasil).

Obtención del condensado del aire espirado

Se dieron instrucciones a todos los voluntarios acerca de los pasos necesarios, que se repitieron en un dispositivo similar antes de la obtención del CAE. Justo antes de la obtención, los individuos se enjuagaron la boca con agua destilada. Utilizando una pinza nasal, se dieron instrucciones a los individuos para que respiraran de forma tranquila a través de la boquilla del dispositivo durante 10 min. Durante todo el procedimiento, tanto el tubo de cristal como el vial de recolección se mantuvieron cubiertos de hielo triturado, mezclado con sal, a una temperatura de -10°C , con una monitorización constante con un termómetro digital (Minipa, MVP363, China).

Almacenamiento y preparación del condensado de aire espirado

El vial con las alícuotas del condensado de aire obtenido se mantuvo en hielo y se transportó rápidamente hasta un congelador, donde se mantuvieron a -70°C para su análisis posterior. Para el análisis, se desproteinizó el CAE de cada individuo con etanol puro (4°C) durante 30 min y acto seguido se mantuvo en el congelador durante 30 min (-20°C). Después de este período, se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 min utilizando una centrifugadora refrigerada.

Evaluación del NO

El NO en el CAE se determinó mediante quimioluminiscencia^{4,14}. En pocas palabras, la detección de NO se basa en la observación de la reacción del ozono con el NO, que produce NO_2 y, al estabilizarse, puede medirse por quimioluminiscencia, ya que emite una radiación lumínica que es proporcional a la concentración de NO en el aire espirado. La luminiscencia generada se determina mediante

Tabla 1
Valores de los estudios publicados que analizaron la concentración de óxido nítrico (NO)

Autor	Año	Lugar	n	Edad (valores medios)	Método	Valores medios de NOx (μM)
Ganas et al. ²⁵	2001	Grecia	10	23 (4)	Artesano	0,63
Franklin et al. ²⁶	2006	Australia	25	23-55	Artesano	1,82
Dressel et al. ²⁷	2010	Alemania	26	31 (8,3)	EcoScreen®	3,73
Liu et al. ²³	2007	Australia	15	65 (9,38)	Artesano	9,89
Hoffmeyer et al. ²⁴	2007	Alemania	16	26-62	EcoScreen®	7,11
Ojoo et al. ²²	2005	Londres	15	39 (10)	Artesano	11,4

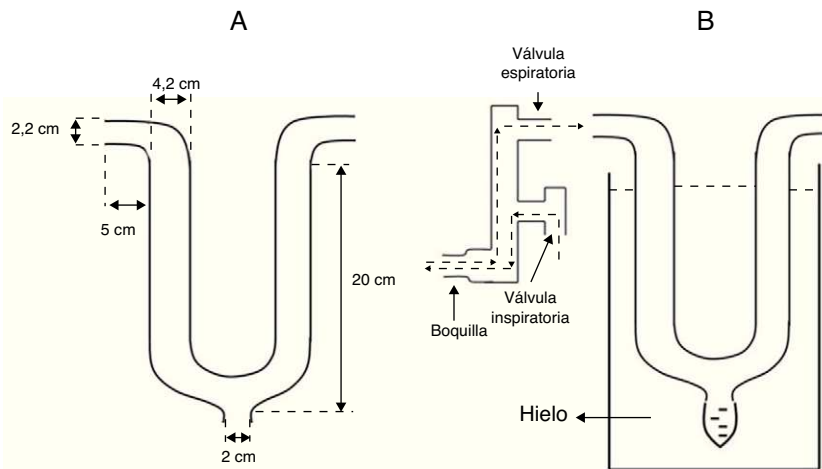


Figura 1. Diseño y dimensiones del tubo de cristal y del sistema de válvulas para la recolección del condensado de aire espirado (CAE).

un tubo fotomultiplicador sensible y es directamente proporcional a los valores de NO. El análisis se efectúa en el dispositivo Nitric Oxide Analyzer, 280i NOA (Sievers, Boulder, CO, EE. UU.).

Análisis estadístico

Para verificar la distribución de los datos se usaron la prueba de Shapiro-Wilk y gráficos Q-Q. Los resultados se presentan como medias \pm desviación estándar y/o medianas y cuartiles. Para las comparaciones se usaron la prueba de la U de Mann-Whitney y la de Kruskal-Wallis. Se efectuó una estimación de la curva usando un procedimiento de regresión para verificar la relación entre las variables. Todos los procedimientos estadísticos se efectuaron utilizando el programa informático SPSS 15.0.

Resultados

En la tabla 2 se muestra la demografía. No se produjeron efectos adversos durante o después del procedimiento de recolección de CAE. El coste total de dispositivo, incluido el tubo de cristal y las válvulas respiratorias unidireccionales, fue de 120,2 dólares (56,68 y 63,52 dólares, respectivamente).

El volumen medio de CAE fue de $1,0 \pm 0,6$ ml. El volumen total de CAE durante la recolección fue de $95,3 \pm 42$ l. El valor medio del NO en el CAE fue de $12,99 \pm 14,38$ μM (mediana, 8,72; C1-C3; 4,31-15,54 μM). Las diferencias en el contenido de NO en el CAE entre grupos de edad no fueron significativas (tabla 3). Tampoco fueron significativas las diferencias entre ambos sexos (tabla 4).

No hubo una correlación entre el NO en el CAE y la edad (fig. 2), ni entre el volumen del CAE y el contenido de NO ($p = 0,994$; $r = 0,001$). Sin embargo, hubo una correlación positiva significativa entre el volumen de CAE y el volumen de aire espirado ($p < 0,001$; $r = 0,622$).

Discusión

Hay evidencias que demuestran el importante papel desempeñado por el NO en la fisiopatología de diversas enfermedades respiratorias, como el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la fibrosis quística (FQ), el asma, la hipertensión pulmonar (HP), las bronquiectasias, la disfunción mucociliar primaria, las enfermedades pulmonares intersticiales y otras enfermedades de las vías respiratorias^{5,7}. En los estudios publicados se ha documentado que en pacientes asmáticos aumentan los valores de NO en el aire espirado^{15,16} y los niveles de nitrito en el CAE, comparado con individuos sanos, posiblemente debido a la presencia de un estado inflamatorio¹⁷. La monitorización de las concentraciones de NO en el aire espirado es un marcador emergente de inflamación eosinófila en el asma que facilita el diagnóstico, la supervisión de la progresión de la enfermedad y la valoración de la respuesta al tratamiento¹⁸.

En pacientes con EPOC también se observan valores de NO espirado significativamente más altos que los encontrados en fumadores y no fumadores sanos¹⁹. Pero con respecto a los valores de los metabolitos de NO (NOx) en el CAE, los estudios han demostrado que en ex fumadores con EPOC los valores son más bajos en comparación con los detectados en individuos sanos, no fumadores y ex fumadores^{17,19}.

El NO en el aire espirado disminuye significativamente tras cirugía cardíaca en seres humanos. Esto puede ser consecuencia de una disminución de la producción endógena de NO debido a la lesión endotelial vascular pulmonar²⁰. Esta disminución en la producción de NO espirado puede asociarse con cambios de la función mecánica respiratoria durante la hipoxia. No obstante, se ha documentado que, tras reoxigenación, los valores de NO siguen siendo bajos, lo que posiblemente indica una lesión del epitelio bronquial²¹. Por consiguiente, el CAE también puede usarse en la supervisión y el estudio de las enfermedades respiratorias y para valorar la eficacia del tratamiento^{15,19}.

Tabla 2
Datos demográficos

	Grupos de edad (años)				
	20-30	31-40	41-50	51-60	61-70
Mujeres/hombres	21/14	7/11	18/6	14/6	14/5
Edad media (años)	26,7 ± 1,45	33,8 ± 3,0	45,35 ± 2,5	54,7 ± 3,0	63,81 ± 2,74
Peso (kg)	69,84 ± 18	83,55 ± 15,3	68,47 ± 13,28	68,12 ± 15,33	68,35 ± 11,53
Estatura (cm)	163,70 ± 29	171,88 ± 8,83	164,45 ± 9,02	147,61 ± 50,69	160,85 ± 7,1
Volumen corriente (ml)	554 (456-652) ^a	594,01 (455-732) ^a	552 (428-675) ^a	465 (315-615) ^a	528 (396-659) ^a
Volumen minuto (l)	8,67 (7,18-10,16) ^a	8,82 (7,03-10,62) ^a	8,41 (6,93-9,88) ^a	9,90 (6,81-12,99) ^a	9,45 (7,43-11,47) ^a
Frecuencia respiratoria (min)	12,4 (11,20-13,61) ^a	12,70 (11,05-14,50) ^a	12,95 (11,32-14,57) ^a	13,55 (11,56-15,53) ^a	15,05 (11,97-18,14) ^a

^a Intervalo de confianza del 95%.**Tabla 3**
Óxido nítrico (NO) en el condensado de aire espirado (CAE) para cada grupo de edad

	Grupos de edad (años)						p
	20-70	20-30	31-40	41-50	51-60	61-70	
N	112	34	18	24	17	19	0,301 ^a
Media	12,99	12,54	10,47	16,99	9,71	14,09	
Error estándar	1,35	3,02	2,25	3,96	1,32	1,92	
Desviación estándar	14,38	17,64	9,58	19,42	5,47	8,40	
Intervalo de confianza del 95%	10,30-15,69	6,38-18,70	5,70-15,23	8,79-25,19	6,89-12,52	10,04-18,14	
Mediana	8,72	6,90	6,49	9,14	9,40	12,45	
C ₁ -C ₃	1,11-93,45	4,03-13,51	3,10-17,50	3,72-20,18	6,58-11,25	9,65-19,62	

^a Prueba de Kruskal-Wallis.

En el presente estudio demostramos que el dispositivo que fabricamos es reutilizable, eficaz para la recolección de CAE y de coste razonable. El volumen de CAE que pudimos recolectar fue suficiente para valorar y determinar el NO, y creemos que es suficiente para el análisis de otros biomarcadores. Además, con esta metodología hemos determinado el contenido de NO en el CAE de individuos sanos y hemos demostrado que los valores de NO en el CAE de individuos sanos no se correlacionan con la edad y/o sexo.

De forma parecida a los resultados del presente estudio, Cruz et al.¹ no identificaron una correlación entre la edad y la concentración de NO en el CAE.

El contenido de NO en el CAE detectado es similar a lo descrito por Ojoo et al.²², Liu et al.²³ y Hoffmeyer et al.²⁴ pero mayor que los valores descritos por Ganas et al.²⁵, Franklin et al.²⁶ y Dressel et al.²⁷. Sin duda, las diferencias entre dispositivos y la determinación del NO son responsables de esta variabilidad. Además, es necesario tener en cuenta que la mayoría de estas investigaciones utilizaron muestras a pequeña escala.

Hasta la fecha, no hay pruebas suficientes con respecto a la correlación entre el contenido de NO en CAE y la edad y/o el sexo. En consecuencia, la American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS)²⁸ ha recomendado que se tengan en cuenta tanto la edad como el sexo como factores que pueden afectar a la concentración de los biomarcadores en el CAE. Por esta razón, consideramos que el presente estudio contribuye a responder a estas preguntas. Al igual que en otros estudios¹, en la presente

investigación no se ha encontrado una correlación entre la edad y el sexo y la concentración de NO en el CAE, lo que contribuye a responder a esta pregunta.

También es motivo de preocupación la influencia de los parámetros ventilatorios en el CAE y su contenido. La correlación entre el volumen minuto y el volumen de CAE recolectado encontrada fue la predecible, al igual que han descrito otros investigadores. Liu et al.²⁹ encontraron la misma correlación y sugirieron que el volumen minuto y el volumen corriente predecirían el volumen del CAE. También observaron que el sexo y la edad no producían un efecto significativo sobre el volumen del CAE. Montuschi⁴ también documentó que el volumen de CAE es directamente proporcional al momento de la obtención y la frecuencia respiratoria de aire espirado. Y Franklin et al.²⁶ han demostrado que los flujos respiratorios no influyen en el NO disuelto en el CAE de adultos sanos, un factor que también merece la atención del investigador, de acuerdo con los resúmenes publicados de un seminario organizado por la ATS²⁸.

Otro problema que merece atención es el momento de la recolección del condensado. Una recolección a lo largo de 10 min produjo un volumen suficiente para el análisis del NO, y probablemente de otros marcadores. Los tiempos más prolongados podrían traducirse en mayores volúmenes, puesto que Lema et al.³⁰ obtuvieron 1,5 ml después de 15 min, y Vaughan et al.³¹ observaron que el aumento del período de recolección incrementa el volumen obtenido. Optamos por un período de 10 min porque es bien tolerado y se traduce en un volumen medio de 1-2 ml, según lo recomendado

Tabla 4
Óxido nítrico (NO) en el condensado de aire espirado (CAE) y volumen del condensado por sexo

	Sexo								Valor de p ^a
	Mujeres				Hombres				
	n	Media	DE	Mediana	n	Media	DE	Mediana	
NO(μM)	73	12,96	13,42	9,82	39	13,05	16,21	8,30	0,847
Volumen exhalado	73	97,26	45,35	83,64	39	91,66	35,16	87,40	0,837
Volumen CAE (ml)	73	1,03	0,67	0,80	39	0,98	0,71	0,80	0,440

DE, desviación estándar.

^a Prueba de Mann-Whitney.

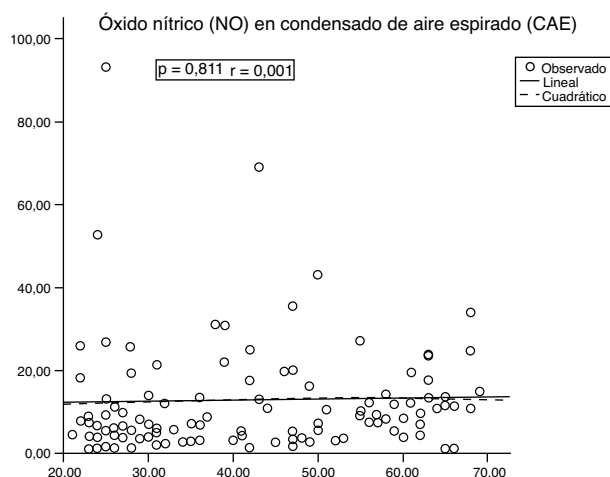


Figura 2. Correlación entre el óxido nítrico (NO) (μM) en el condensado de aire espirado (CAE) y la edad (años).

en los resúmenes publicados del seminario organizado por la ATS. Además, es necesario verificar la influencia potencial de las temperaturas durante la recolección y el almacenamiento, al igual que verificar cualquier influencia del material usado para fabricar el dispositivo.

Se requiere un mayor número de estudios no solo para usarlos como referencia de los diferentes biomarcadores sino también para determinar si puede ser útil un análisis secuencial para el seguimiento de la enfermedad de interés³².

Otro motivo de preocupación es el material usado en cada dispositivo. Los dispositivos EcoScreen® y Rtube® se fabrican, respectivamente, con teflón y aluminio¹⁹, pero los dispositivos manufacturados suelen fabricarse con cristal revestido de silicón^{13,33}. Consideramos que el cristal de borosilicato, aunque es más frágil, es de menor coste y también es inerte, lo que reduce la probabilidad de influir en el marcador analizado. Liu et al.²³ compararon los dispositivos EcoScreen® y Rtube® con dispositivos manufacturados con cristal revestido de silicón, pero las diferencias no fueron significativas, en comparación con cristal no recubierto. Soyer et al.³⁴ también obtuvieron mayores volúmenes de CAE utilizando el dispositivo EcoScreen® comparado con Rtube®, y Rosias et al.³⁵ encontraron que los dispositivos fabricados con cristal de borosilicato, cubiertos o no de silicón, eran más eficientes para determinar el 8-isoprostano y la albúmina, comparado con los fabricados con aluminio y teflón. Formularon la teoría de que el cristal posee menos propiedades adhesivas, lo que se traduce en un mayor número de moléculas disponibles en el CAE.

Por lo tanto, parece ser que los diferentes dispositivos pueden proporcionar resultados distintos para un mismo biomarcador, y no se ha alcanzado un consenso por lo que respecta al diseño y material más apropiados para cada biomarcador. Por lo tanto, son necesarios estudios adicionales para definir qué diseño y material son mejores para un biomarcador específico de interés en el CAE. Además, se requieren futuras investigaciones no solo para valorar los parámetros de referencia de los diferentes biomarcadores sino también para determinar si un análisis secuencial puede ser útil para el seguimiento de la enfermedad de interés³².

En conclusión, fabricamos un dispositivo reutilizable eficaz para la obtención de CAE y la valoración del contenido de NO. Además, hemos determinado el contenido de NO en el CAE de individuos voluntarios sanos y hemos demostrado que, usando esta metodología, el contenido de NO no se correlaciona con la edad o sexo.

Financiación

La presente investigación recibió financiación de la Foundation to Support Teaching and Research (FAEPA) y el National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brasil.

Conflicto de intereses

Los autores no han declarado conflicto de intereses.

Bibliografía

- Cruz MJ, Sanchez-Vidaurre S, Romero PV, Morell F, Munoz X. Impact of age on pH, 8-isoprostane, and nitrogen oxides in exhaled breath condensate. *Chest*. 2009;135:462-7.
- González-Mangado N. Analysis of exhaled breath condensate: A technique with a future? *Arch Bronconeumol*. 2005;41:540-1.
- Liu J, Thomas PS. Exhaled breath condensate as a method of sampling airway nitric oxide and other markers of inflammation. *Medical Science Monitor*. 2005;11:MT53-62.
- Montuschi P. Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: Methodological aspects and potential clinical applications. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2007;1:5-23.
- Barnes JP, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*. 1993;48:1034-43.
- Barreto L, Correia C, Muscará M. Óxido nítrico: propiedades e potenciais usos terapêuticos. *Quim Nova*. 2005;28:1046-54.
- Hart MC. Nitric oxide in adult lung disease. *Chest*. 1999;115:1407-17.
- Vanni DS, Horstmann B, Benjo AM, Daher JPL, Kanaan S, Sleiman M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43:181-9.
- Murugan A, Prys-Picard C, Calhoun WJ. Biomarkers in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;15:12-8.
- Clini E, Bianchi L, Pagani M, Ambrosino N. Endogenous nitric oxide in patients with stable COPD: Correlates with severity of disease. *Thorax*. 1998;53:881-3.
- Liu CY, Wang CH, Chen TC, Lin HC, Yu CT, Kuo HP. Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthase in patients with primary lung cancer. *Br J Cancer*. 1998;78:534-41.
- 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.
- Horvath I, Hunt J, Barnes PJ. Breath AETFE. Exhaled breath condensate: Methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005;26:523-48.
- Reis G. Estudo do nitrito do condensado do exalado pulmonar. Padronização de método. Universidade de São Paulo (USP): Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP); 2008.
- Kharitonov SA. Exhaled markers of inflammatory lung diseases: Ready for routine monitoring? *Swiss Medical Weekly*. 2004;134:175-92.
- 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.
- 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 - Biology and Chemistry*. 2003;8:26-30.
- Cobos Barroso N, Pérez-Yarza EG, Sardon Prado O, Reverté Bover C, Gartner S, Korta Murua J. Exhaled nitric oxide in children: A noninvasive marker of airway inflammation. *Arch Bronconeumol*. 2008;44:41-51.
- Liu J, Sandrini A, Thurston MC, Yates DH, Thomas PS. Nitric oxide and exhaled breath nitrite/nitrates in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiration*. 2007;74:617-23.
- Beghetti M, Silkoff PE, Caramori M, Holtby HM, Slutsky AS, Adatia I. Decreased exhaled nitric oxide may be a marker of cardiopulmonary bypass-induced injury. *Ann Thorac Surg*. 1998;66:532-4.
- Pearl JM, Nelson DP, Wellmann SA, Raake JL, Wagner CJ, McNamara JL, et al. Acute hypoxia and reoxygenation impairs exhaled nitric oxide release and pulmonary mechanics. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;119:931-8.
- Ojoo J, Mulrennan S, Kastelik J, Morice AH, Redington AE, et al. Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis. *Thorax*. 2005;60:22-6.
- Liu J, Conrad DH, Chow S, Tran VH, Yates DH, Thomas PS. Collection device influence the constituents of exhaled breath condensate. *Eur Respir J*. 2007;30:807-8.
- Hoffmeyer F, Harth V, Merget R, Goldscheid N, Heinze E, Degens P, et al. Exhaled breath condensate analysis: Evaluation of a methodological setting for epidemiological field studies. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58:289-98.
- Ganas K, Loukides S, Papatheodorou G, Panagou P, Kalogeropoulos N. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir Med*. 2001;95:649-54.

26. Franklin P, Moeller A, Hall GL, Horak F, Patterson H, Stick SM. Variability of nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate. *Respir Med.* 2006;100:123–9.
27. Dressel H, Muller F, Fischer R, Rommelt H, Hohlfeld M, Behr B, et al. Independent information of nonspecific biomarkers in exhaled breath condensate. *Respiration.* 2010;80:401–9.
28. ATS workshop proceedings: Exhaled nitric oxide and nitric oxide oxidative metabolism in exhaled breath condensate – Executive summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:811–3.
29. Liu J, Thomas PS. Relationship between exhaled breath condensate volume and measurements of lung volumes. *Respiration.* 2007;74:142–5.
30. Lema JB, González M, Vigil L, Casan P. Exhaled breath condensate: Standardized collection of samples from healthy volunteers. *Arch Bronconeumol.* 2005;41:584–6.
31. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski T, Turner R, Nguyen T, Smith A, et al. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J.* 2003;23:889–94.
32. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.* 2004;84:731–65.
33. Marteus H, Tornberg DC, Weitzberg E, Schedin U, Alving K. Origin of nitrite and nitrate in nasal and exhaled breath condensate and relation to nitric oxide formation. *Thorax.* 2005;60:219–25.
34. Soyer O, Dizdar E, Keskin O, Lilly C, Kalayci O. Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. *Allergy.* 2006;61:1016–8.
35. Rosias P, Robreoks C, Niemarkt H, Kester A, Vernooy J, Suykerbuyk J, et al. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *European Respir J.* 2006;28:1036–41.