



Original

## Patrones inflamatorios en niños asmáticos basados en la determinación de óxido nítrico alveolar



Paula Corcuera-Elosegui<sup>a</sup>, Olaia Sardón-Prado<sup>a,b,\*</sup>, Ane Aldasoro-Ruiz<sup>a</sup>, Javier Korta-Murua<sup>a,b</sup>, Javier Mintegui-Aramburu<sup>a</sup>, José I. Emparanza-Knorr<sup>c</sup> y Eduardo G. Pérez-Yarza<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup> Sección de Neumología Infantil, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Guipúzcoa, España

<sup>b</sup> Departamento de Pediatría, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), San Sebastián, Guipúzcoa, España

<sup>c</sup> Unidad de Epidemiología (CIBER-ESP), Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Guipúzcoa, España

<sup>d</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Respiratorias (CIBERES), San Sebastián, Guipúzcoa, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 11 de mayo de 2014

Aceptado el 1 de julio de 2014

On-line el 11 de octubre de 2014

#### Palabras clave:

Asma

Niños

Óxido nítrico alveolar

Categorías inflamatorias

### R E S U M E N

**Introducción:** El óxido nítrico (NO) puede medirse a nivel proximal (flujo máximo NO en vía aérea [ $J_{awNO}$ ]) y distal (concentración alveolar de NO [ $CA_{NO}$ ]). Se han descrito 4 patrones inflamatorios en asmáticos, aunque su relevancia no ha sido bien establecida. El objetivo ha sido determinar el  $J_{awNO}$  y la  $CA_{NO}$  para establecer 4 categorías inflamatorias en asmáticos.

**Material y métodos:** Estudio transversal de una muestra de niños sanos y asmáticos. Determinación de NO exhalado a flujos múltiples. De acuerdo con el modelo bicompartimental se obtuvieron la  $CA_{NO}$  y el  $J_{awNO}$ . En asmáticos se realizó cuestionario de control de asma (CAN) y espirometría forzada. Categorización de pacientes en tipo I ( $J_{awNO}$  y  $CA_{NO}$  normal), tipo II ( $J_{awNO}$  elevado y  $CA_{NO}$  normal), tipo III ( $J_{awNO}$  y  $CA_{NO}$  elevados) y tipo IV ( $J_{awNO}$  normal y  $CA_{NO}$  elevado). Estudio de correlación entre  $FE_{NO,50}$ ,  $J_{awNO}$  y  $CA_{NO}$  mediante R de Spearman. Análisis de la varianza y comparaciones pareadas, mediante corrección post hoc de Bonferroni.

**Resultados:** Se estudiaron 162 niños: 49 (32,23%) controles sanos y 103 (67,76%) asmáticos. Se excluyeron 10 niños, 4 (2,4%) porque las determinaciones fueron incorrectas y 6 (3,7%) porque las determinaciones no siguieron el modelo lineal (valores de  $CA_{NO}$  negativos). En controles la  $FE_{NO,50}$  (ppb) (mediana y rango) fue 11,5 (1,6-27,3),  $J_{awNO}$  (pl/s) 516 (98,3-1.470) y  $CA_{NO}$  (ppb) 2,2 (0,1-4,5). De los asmáticos, 44 (42,7%) se categorizaron en tipo I, 41 (39,8%) en tipo II, 14 (13,5%) en tipo III y 4 (3,88%) en tipo IV. Buena correlación entre  $J_{awNO}$  y  $FE_{NO,50}$  ( $r=0,97$ ). No hubo asociación entre  $J_{awNO}$  y  $CA_{NO}$ . Disminución significativa de  $FEV_1/FVC$  en tipo III (media  $79,8 \pm 7,5$ ). La morbilidad fue significativamente superior en tipos III y IV.

**Conclusiones:** Los valores de normalidad obtenidos son similares a los previamente publicados. Los asmáticos con  $CA_{NO}$  elevado presentaron mayor morbilidad. No hay correlación entre inflamación proximal y distal.

© 2014 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Inflammatory Patterns in Asthmatic Children Based on Alveolar Nitric Oxide Determination

#### A B S T R A C T

**Introduction:** Nitric oxide (NO) levels can be measured at proximal (maximum airway NO flux [ $J_{awNO}$ ]) and distal (alveolar NO concentration [ $CA_{NO}$ ]) levels. Four inflammatory patterns have been described in asthmatic individuals, although their relevance has not been well established. The objective was to determine  $J_{awNO}$  and  $CA_{NO}$  in order to establish four inflammatory categories in asthmatics.

**Material and methods:** Cross-sectional study of a sample consisting of healthy and asthmatic children. Exhaled NO was determined at multiple flows.  $J_{awNO}$  and  $CA_{NO}$  were obtained according to the two-compartment model. The asthma control questionnaire (ACQ) and spirometry were administered

#### Keywords:

Asthma

Children

Alveolar nitric oxide

Inflammatory categories

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: osardon@gmail.com (O. Sardón-Prado).

to asthmatic children. Patients were categorized as type I (normal  $J'_{awNO}$  and  $C_{ANO}$ ), type II (elevated  $J'_{awNO}$  and normal  $C_{ANO}$ ), type III (elevated  $J'_{awNO}$  and  $C_{ANO}$ ) and type IV (normal  $J'_{awNO}$  and elevated  $C_{ANO}$ ). Correlation between  $FE_{NO,50}$ ,  $J'_{awNO}$  and  $C_{ANO}$  was analyzed using Spearman's R Correlation Test. Analysis of variance and paired comparisons were performed using the Bonferroni correction.

**Results:** One hundred sixty-two children were studied, of whom 49 (32.23%) were healthy controls and 103 (67.76%) asthmatics. In the control subjects,  $FE_{NO,50}$  (ppb)(median and range) was 11.5 (1.6 to 27.3),  $J'_{awNO}$  (p/s) was 516 (98.3 to 1470) and  $C_{ANO}$  (ppb) was 2.2 (0.1 to 4.5). Forty-four (42.7%) of the asthmatic participants were categorized as type I, 41 (39.8%) as type II, 14 (13.5%) as type III and 4 (3.88%) as type IV. Good correlation was observed between  $J'_{awNO}$  and  $FE_{NO,50}$  ( $r = 0.97$ ). There was no association between  $J'_{awNO}$  and  $C_{ANO}$ .  $FEV_1/FVC$  decreased significantly in type III (mean  $79.8 \pm 7.5$ ). Morbidity was significantly higher in types III and IV.

**Conclusions:** Normal values obtained are similar to those previously reported. Asthmatics with high  $C_{ANO}$  showed higher morbidity. No correlation was found between proximal and distal inflammation.

© 2014 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

El asma es la enfermedad crónica más frecuente de las vías inferiores en la infancia. Cursa con hiperreactividad bronquial y una obstrucción variable al flujo aéreo. Se caracteriza por episodios de sibilancias, tos y/o dificultad respiratoria<sup>1</sup>.

Las diversas guías internacionales para el manejo del asma<sup>1,2</sup> clasifican la enfermedad en función de la gravedad o el grado de control y no consideran el grado de inflamación de la vía aérea, aunque sugieren realizar estudios para evaluar si la monitorización de la inflamación puede mejorar el manejo de la enfermedad en la práctica clínica<sup>3,4</sup>. En este sentido, hay evidencias que señalan que el control del asma se correlaciona con el grado de inflamación, siendo mayores los síntomas cuando la inflamación alcanza los compartimentos pulmonares más distales<sup>5,6</sup>.

Diversos estudios muestran el interés por diferenciar entre el origen proximal de la inflamación (medida indirectamente mediante la fracción exhalada de óxido nítrico a un flujo de 50 ml/s;  $FE_{NO,50}$  y flujo máximo de NO en vía aérea;  $J'_{awNO}$ ) y/o la inflamación distal (medida a través de la concentración alveolar de NO;  $C_{ANO}$ ) del NO en niños<sup>7</sup> y adultos con asma<sup>8</sup>. Se han relacionado los valores de  $C_{ANO}$  elevados con el asma mal controlada en niños<sup>7</sup> y en adultos, con síntomas nocturnos persistentes<sup>9</sup>, con asma grave mal controlada<sup>10</sup> y refractaria a tratamiento<sup>11</sup>, así como con el riesgo de agudización<sup>12</sup>. Sin embargo, existen pocos estudios en adultos dirigidos a clasificar a los pacientes según la localización y/o la extensión de la inflamación<sup>13</sup>, y menos aún que lo hagan a través de la determinación del NO en niños<sup>14</sup>.

En este sentido, Puckett et al.<sup>14</sup> han comunicado patrones clínicos de asma distintos cuando categorizaron a los asmáticos en 4 tipos inflamatorios, basados en medidas de la  $C_{ANO}$  y  $J'_{awNO}$ . Los niños con valores de  $C_{ANO}$  elevados tuvieron peor control de asma y mayor morbilidad, independientemente de la atopía, de la terapia con glucocorticoides inhalados y de la función pulmonar. Sin embargo, está todavía por aclarar el papel de esta compartimentalización en la práctica diaria, así como la estandarización de la técnica.

El objetivo principal de este artículo ha sido definir 4 fenotipos inflamatorios en niños asmáticos mediante la determinación de óxido nítrico a nivel de vía respiratoria proximal ( $J'_{awNO}$ ) y distal o alveolar ( $C_{ANO}$ ) y relacionarlos con las manifestaciones clínicas presentadas por los niños.

## Material y métodos

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética y de Investigación del Hospital Universitario donde se realizó. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado y el permiso de los padres y/o tutores así como del niño, si por edad del mismo se

requería según la legislación vigente, para la explotación de los datos obtenidos.

Estudio transversal con recogida prospectiva de datos de una muestra consecutiva de niños entre 6 y 16 años diagnosticados de asma según GINA 2012<sup>2</sup>. Los pacientes fueron seleccionados en consultas externas de Neumología Infantil entre enero y agosto de 2012. Fueron incluidos pacientes asmáticos sin tratamiento de base y pacientes asmáticos que recibían tratamiento con glucocorticoides inhalados. Además, durante el mismo periodo de tiempo y con la misma metodología, se reclutó una muestra de niños sanos de la misma edad.

Fueron excluidos los pacientes con agudización asmática o infección respiratoria en el momento que se realizó la consulta. Además, se excluyeron los que declinaron participar, los que no cumplieron los criterios de inclusión, los que no colaboraron para realizar las técnicas requeridas o los que presentaron enfermedades o morbilidades asociadas.

La gravedad y el grado de control del asma se han clasificado según GINA 2012<sup>2</sup>. Se ha definido rinitis alérgica como signos y síntomas compatibles, IgE específica en sangre (clase III o superior) y/o prick test positivo a uno o más aeroalérgenos; alergia alimentaria, como signos y síntomas compatibles con IgE específica en sangre (clase III o superior), y dermatitis atópica, por signos y síntomas compatibles<sup>2,15</sup>.

En todos los pacientes incluidos se realizó, antes de la espirometría forzada, la determinación de NO exhalado a respiración única y a flujos múltiples (50, 100 y 200 ml/s) con sistema *on-line* y analizador de quimioluminiscencia estacionario (Eco Medics AG-CLD 88 sp- Suiza) con adaptadores de flujo DENOX 88, siguiendo las recomendaciones de la *European Respiratory Society* (ERS) y la *American Thoracic Society* (ATS) publicadas en 2005<sup>16</sup>. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se calculó el valor medio de las 3 medidas para cada flujo correspondiente con una variabilidad entre ellas inferior al 10%.

En este estudio se ha aplicado el modelo bicompartimental y la ecuación de Tsoukias y George<sup>17</sup> para el cálculo de la  $C_{ANO}$  y el  $J'_{awNO}$ . Sin embargo, se han desarrollado también otros modelos de mayor complejidad que no hemos utilizado para este proyecto<sup>18-20</sup>. Se realizó calibración diaria de flujo y volumen y calibración mensual del NO.

En todos los asmáticos incluidos se ha realizado espirometría forzada (MasterLab. Versión 5.3. Viasis®, Wuerzburg, Alemania) según recomendaciones ATS/ERS<sup>21</sup>. Para calcular el porcentaje sobre la normalidad, se han utilizado las ecuaciones de Zapletal<sup>22,23</sup>.

Así mismo, se realizó historia clínica, exploración física y cumplimentación del cuestionario de control de asma (CAN)<sup>24</sup>, por los padres (menores de 9 años) o por los propios pacientes (a partir de 9 años). El cuestionario CAN consta de 9 preguntas (en relación con los síntomas presentados en las últimas 4 semanas) con 4 opciones

de respuesta (0-4) cada una, con una puntuación final que oscila entre 0 (mejor control) y 36 puntos (peor control).

Según datos publicados en la literatura, se han considerado para la  $FE_{NO,50}$  un punto de corte de normalidad  $\leq 25$  ppb<sup>25,26</sup>,  $\geq 80\%$  para el valor relativo (% predicho) de  $FEV_1$ <sup>1,2</sup> y menor de 8 puntos para el cuestionario CAN<sup>24</sup>. En el caso de la  $CA_{NO}$  y el  $J'aw_{NO}$ , se ha considerado el punto de corte de normalidad el límite superior calculado para el grupo de niños sanos incluidos en este estudio.

En el grupo de asmáticos se establecieron 4 tipos inflamatorios basados en la  $CA_{NO}$  y el  $J'aw_{NO}$ : tipo I ( $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$  normal), tipo II ( $J'aw_{NO}$  elevado y  $CA_{NO}$  normal), tipo III ( $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$  elevados) y tipo IV ( $J'aw_{NO}$  normal y  $CA_{NO}$  elevado).

Las variables cuantitativas analizadas han sido la edad (años), el peso (kg), la talla (cm), la determinación de NO (ppb) a 3 flujos espiratorios ( $FE_{NO,50}$ ,  $FE_{NO,100}$ ,  $FE_{NO,200}$ ), la  $CA_{NO}$  (ppb) y el  $J'aw_{NO}$  (pl/s). En el grupo de asmáticos, además, la puntuación obtenida en el cuestionario CAN (puntos), el volumen espiratorio forzado en el primer segundo ( $FEV_1$  en porcentaje sobre el predicho), la capacidad vital forzada (FVC en porcentaje sobre el predicho), el cociente  $FEV_1/FVC$  (en porcentaje sobre el predicho) y el flujo espiratorio forzado entre el 25 y 75% de la FVC ( $FEF_{25-75}$  en porcentaje sobre el predicho).

Se han analizado las variables cualitativas sexo, rinitis alérgica, sensibilización a neumoalérgenos, dermatitis atópica, alergia alimentaria, gravedad y grado de control del asma, el tratamiento recibido y la morbilidad presentada en el último mes definida como presencia de al menos una agudización, incluyendo las que hayan requerido glucocorticoide oral, asistencia en servicio de urgencias y/o ingreso hospitalario en las últimas 4 semanas.

Se ha realizado estudio de correlación entre la  $FE_{NO,50}$ , el  $J'aw_{NO}$  y la  $CA_{NO}$  mediante R de Spearman. Dado que el tratamiento habitual con glucocorticoides inhalados (GCI) puede actuar como factor de confusión en los valores obtenidos de  $FE_{NO,50}$ ,  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$ , se realizó análisis estadístico ajustando para la variable GCI mediante análisis de regresión múltiple.

Análisis descriptivo de las variables para cada tipo inflamatorio y comparación de las características clínicas mediante prueba de  $\chi^2$  para las variables cualitativas: sexo, atopia personal, tratamiento, grado de control,  $FEV_1 \geq 80\%$ ,  $CAN < 8$ , morbilidad y Kruskal-Wallis para el resto de variables. También se ha realizado análisis de la varianza y comparaciones pareadas entre los tipos inflamatorios mediante corrección post hoc de Bonferroni.

El tamaño muestral se ha estimado en función de los coeficientes de correlación esperados según datos publicados en la literatura<sup>7,9,14</sup>.

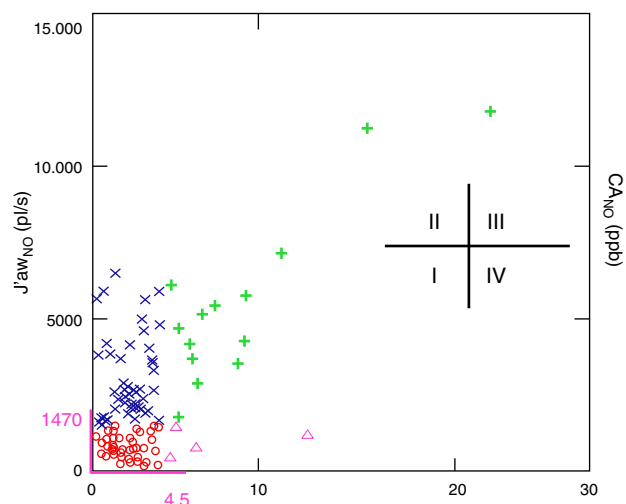
En todos los casos se ha establecido un nivel alfa de 5% y paquete estadístico SYSTAT 9.0<sup>TM</sup>.

## Resultados

Se ha estudiado una cohorte formada por 162 niños. De los incluidos, en 158 (97,5%) se realizaron todas las determinaciones correctamente distribuidos en 49 (32,2%) controles sanos, 23 (15,1%) asmáticos sin tratamiento y 80 (52,5%) asmáticos tratados con GCI.

De los incluidos, en 6 casos (100% asmáticos) las determinaciones de NO no siguieron el modelo lineal (valores de  $CA_{NO}$  negativos), por lo que fueron excluidos. Así mismo, también fueron excluidos 4 niños (2,4%) en los que las determinaciones de NO no se realizaron correctamente. No hubo diferencias significativas en la edad, el peso, la  $FE_{NO,50}$  ni la espirometría forzada respecto al grupo de sujetos incluidos en el estudio.

No se objetivaron diferencias significativas en la edad, el peso, la talla ni el sexo entre el grupo control de niños sanos y el grupo de asmáticos ( $p > 0,05$ ) (tabla 1).



Scatterplot entre  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$ .  $J'aw_{NO}$  normal  $< 1470$  (pl/s) y  $CA_{NO}$  normal  $< 4,5$  (ppb) (en morado). Tipo I (círculo):  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$  normales; Tipo II (aspa):  $J'aw_{NO}$  elevado y  $CA_{NO}$  normal; Tipo III (cruz):  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$  elevados; Tipo IV (triángulo):  $J'aw_{NO}$  normal y  $CA_{NO}$  elevado.

**Figura 1.** Categorías de óxido nítrico exhalado basadas en el umbral superior de  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$  obtenidos en el grupo de niños sanos.

En el grupo de controles sanos, la  $FE_{NO,50}$  (ppb) (mediana y rango) fue 11,5 (1,6-27,3), el  $J'aw_{NO}$  (pl/s) 516 (98,3-1470) y la  $CA_{NO}$  (ppb) 2,2 (0,1-4,5) (tabla 1).

En el caso de la  $CA_{NO}$  y el  $J'aw_{NO}$  se ha considerado el punto de corte de normalidad el límite superior calculado para el grupo de niños sanos ( $< 4,5$  ppb para la  $CA_{NO}$  y  $< 1470$  pl/s para el  $J'aw_{NO}$ ).

Se observó una asociación estrecha entre el  $J'aw_{NO}$  y la  $FE_{NO,50}$  ( $r = 0,97$ ;  $p < 0,05$ ) y también, aunque de menor grado, entre  $J'aw_{NO}$  y  $FE_{NO,100}$  ( $r = 0,62$ ) y  $J'aw_{NO}$  y  $FE_{NO,200}$  ( $r = 0,4$ ). Sin embargo, no se encontró asociación significativa entre la  $CA_{NO}$  y el  $J'aw_{NO}$  ( $r = -0,001$ ) ni entre la  $CA_{NO}$  ni la  $FE_{NO,50}$  ( $r = -0,002$ ). El análisis estadístico fue ajustado por tratamiento habitual con GCI mediante regresión lineal múltiple y no se encontraron diferencias en los resultados obtenidos. Partiendo de este punto, y basados en los límites superiores del  $J'aw_{NO}$  y la  $CA_{NO}$  en el grupo de sujetos sanos, se clasificó a los asmáticos ( $n = 103$ ) en los 4 tipos inflamatorios previamente referidos (fig. 1). En el grupo de asmáticos, el tipo más frecuente fue el I ( $n = 44$ ; 42,7%, seguido del tipo II ( $n = 41$ ; 39,8%), siendo mucho menos frecuentes los patrones inflamatorios tipo III ( $n = 14$ ; 13,5%) y IV ( $n = 4$ ; 3,8%) (tabla 2).

No se encontraron diferencias en cuanto al sexo ni la edad entre los 4 tipos inflamatorios (tabla 2).

Respecto a la atopia, se halló una sensibilización (prick test positivo) a los neumoalérgenos estudiados significativamente menor ( $p = 0,01$ ) en el grupo de asmáticos incluidos en el fenotipo I (70,4%) respecto al resto (95,1, 92,8 y 100% para fenotipos II, III y IV, respectivamente).

Respecto al tratamiento de base con GCI, no se encontraron diferencias entre los 4 grupos (86,3, 70,7, 71 y 75% para tipos I, II, III y IV, respectivamente).

Las diferencias existentes entre los 4 fenotipos inflamatorios descritos respecto a  $J'aw_{NO}$ ,  $CA_{NO}$  y la  $FE_{NO,50}$  se representan en la tabla 2.

El grupo de asmáticos es, en general, un grupo de niños con asma leve bien controlada (mediana de puntuación en el CAN 5; rango 0-29) y espirometría basal normal (media  $FEV_1 = 99,7\%$ ; media  $FEV_1/FVC = 85\%$ ). En este sentido, respecto a la función pulmonar (espirometría basal forzada), el cociente  $FEV_1/FVC$  fue significativamente menor en el fenotipo III (media de  $79,8 \pm 7,5$ ) que en el I

**Tabla 1**  
Características descriptivas de los niños sanos y asmáticos incluidos

	Sanos (n = 49)	Asmáticos (n = 103)	p
Edad (años), media ± DE	10,1 ± 1,9	10,5 ± 2,7	0,9
Peso (kg), media ± DE	38 ± 13,9	41,6 ± 13,9	0,17
Talla (cm), media ± DE	139,4 ± 13,1	144,3 ± 15,4	0,13
FE <sub>NO,50</sub> (ppb), mediana (rango)	11,5 (1,6-27,3)	35,4 (3,5-234)	<0,001
FE <sub>NO,100</sub> (ppb), mediana (rango)	7,6 (1-18,8)	20 (3-200)	<0,001
FE <sub>NO,200</sub> (ppb), mediana (rango)	4,7 (0,96-10,7)	12,3 (2,7-187)	<0,001
CA <sub>NO</sub> (ppb), mediana (rango)	2,2 (0,1-4,5)	2,7 (0,1-24)	0,022
J'aw <sub>NO</sub> (pl/s), mediana (rango)	516 (98,3-1.470)	1.703 (120-11.805)	<0,001
FEV <sub>1</sub> (% teórico), media ± DE	x	99,3 ± 13	-
FVC (% teórico), media ± DE	x	100 ± 9,7	-
FEV <sub>1</sub> /FVC (% teórico), media ± DE	x	83,9 ± 7,1	-
FEF <sub>25-75</sub> (% teórico), media ± DE	x	82,3 ± 22	-
CAN (puntuación), media ± DE	x	6,8 ± 6,5	-

CAN: cuestionario de control de asma; CA<sub>NO</sub>: concentración alveolar de óxido nítrico; DE: desviación estándar; FEF<sub>25-75</sub>: flujo espiratorio forzado entre el 25 y 75% de la FVC; FE<sub>NO,100</sub>: fracción exhalada de óxido nítrico a un flujo de 100 ml/s; FE<sub>NO,200</sub>: fracción exhalada de óxido nítrico a un flujo de 200 ml/s; FE<sub>NO,50</sub>: fracción exhalada de óxido nítrico a un flujo de 50 ml/s; FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; J'aw<sub>NO</sub>: flujo máximo de óxido nítrico en la vía aérea; NO: óxido nítrico; pl/s: picolitros/segundo; ppb: partes por billón.

**Tabla 2**  
Características de las 4 categorías inflamatorias definidas en función de los valores de J'aw<sub>NO</sub> y CA<sub>NO</sub> obtenidos en los niños sanos

	Tipo I NO normal	Tipo II NO predominio proximal	Tipo III NO proximal y distal	Tipo IV NO predominio distal	p global	Comparación pareada
	Asmáticos (103)					
n (%)	44 (42,7)	41 (39,8)	14 (13,5)	4 (3,8)		
Edad (años), media ± DE	9,9 ± 0,41	10,7 ± 1,9	11,9 ± 0,73	9,3 ± 1,4	NS	-
Sexo (h/m)	27/17	24/17	10/4	3/1	NS	-
Atopia, n (%)						
R. alérgica	33 (75)	36 (87,8)	12 (85,7)	4 (100)	NS	-
D. atópica	14 (31,8)	20 (48,7)	3 (21,4)	1 (25)	NS	-
A. alimentaria	9 (20,4)	1 (2,4)	0 (0)	2 (50)	NS	-
Sensibilización neumalérgica	31 (70,4)	39 (95,1)	13 (92,8)	4 (100)	0,009	I < II, III, IV
FE <sub>NO,50</sub> (ppb)	15,4 (3,5-54,1)	53 (19-109,6)	95,7 (28,6-234)	36,5 (14,5-44,4)	<0,001	II, III > I/III > II/III > IV
CA <sub>NO</sub> (ppb)	1,8 (0,1-4,4)	2,45 (0,2-4,4)	6,9 (4,7-24)	5,6 (4,7-12,9)	<0,001	I < III, IV/II < III, IV
J'aw <sub>NO</sub> (pl/s) (mediana y rango)	684 (120-2.348)	2.651 (1.515-6.475)	4.894 (1.770-11.805)	1.003 (466-1.445)	<0,001	II, III > I/III > II/II, III > IV
FEV <sub>1</sub> (%)	102 ± 13,1	96,1 ± 12,4	96,7 ± 14	98,5 ± 14,2	NS	-
FVC (%)	100 ± 9,6	98,8 ± 10,2	101,5 ± 10,5	97,4 ± 6,8	NS	-
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	85,8 ± 6,3	82,3 ± 7,5	79,8 ± 7,5	85,3 ± 7,9	0,03	I > III
FEF <sub>25-75</sub> (%), media ± DE	88,2 ± 22,3	76,3 ± 21,3	73,8 ± 24	82,5 ± 25	NS	-
CAN (puntos), mediana y rango	4 (0-29)	6 (0-26)	6 (0-27)	7,5 (3-17)	NS	-
CAN ≥ 8, n (%)	12 (27,2)	16 (39,2)	6 (42,8)	2 (50)	NS	-
Mal o parcial control, n (%)	7 (15,9)	12 (29,2)	6 (42,8)	1 (25)	NS	-
Tratamiento, n (%) - GCI	38 (86,3)	29 (70,7)	10 (71,4)	3 (75)	NS	-
Morbilidad, n (%)	2 (4,5)	7 (17)	7 (50)	1 (25)	0,001	III > I, II

CAN: cuestionario de control de asma; CA<sub>NO</sub>: concentración alveolar de óxido nítrico; D. atópica: dermatitis atópica; DE: desviación estándar; FEF<sub>25-75</sub>: flujo espiratorio forzado entre el 25 y 75% de la FVC; FE<sub>NO,50</sub>: fracción exhalada de óxido nítrico a un flujo de 50 ml/s; FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; GCI: glucocorticoides inhalados; h/m: hombre/mujer; J'aw<sub>NO</sub>: flujo máximo de óxido nítrico en la vía aérea; Morbilidad: presencia de al menos una agudización incluyendo las que hayan requerido corticoide oral, asistencia en Servicio de Urgencias o ingreso, en las últimas 4 semanas; NO: óxido nítrico; pl/s: picolitros/segundo; ppb: partes por billón; R. alérgica: rinitis alérgica.

(media 85,8 ± 6,3). Las diferencias en el cociente FEV<sub>1</sub>/FVC entre el resto de fenotipos no fueron significativas. Para el resto de las variables espirométricas estudiadas no hubo diferencias entre los 4 grupos (tabla 2). Teniendo en cuenta el número de participantes incluidos en el tipo iv (únicamente 4), se realizó un nuevo análisis combinando los grupos iii y iv como grupo con CA<sub>NO</sub> alto y no se encontraron diferencias en los resultados obtenidos.

El porcentaje de pacientes con el FEV<sub>1</sub> < 80% (indicativo de mal control)<sup>2</sup> fue del 4,5, del 7,3, del 7,1 y del 25% para los tipos i, ii, iii y iv, respectivamente. Aunque los pacientes incluidos en los fenotipos con una CA<sub>NO</sub> baja (i y ii) presentaron un FEV<sub>1</sub> < 80% en un porcentaje menor que los incluidos en los fenotipos con la CA<sub>NO</sub> elevada (iii y iv) (6,2% versus 11,1%), no se encontraron diferencias significativas (p = 0,42).

Así mismo, no se encontraron diferencias (p = 0,5) en la puntuación del cuestionario CAN entre las 4 categorías (4, 6, 6 y 7,5 para los fenotipos i, ii, iii, iv, respectivamente) estudiadas. Combinando los

grupos con CA<sub>NO</sub> baja (i y ii) y CA<sub>NO</sub> alta (iii y iv), no se encontraron diferencias significativas. El porcentaje de pacientes con CAN ≥ 8, indicativo de mal control<sup>21</sup>, fue del 27,2, del 39,2, del 42,8 y del 50% para los tipos i, ii, iii y iv, respectivamente. No hubo diferencias (p = 0,35) entre los pacientes incluidos en los fenotipos con una CA<sub>NO</sub> baja (i y ii) y aquellos con una CA<sub>NO</sub> elevada (iii y iv) (33% versus 44,4%).

El porcentaje de pacientes con asma parcial o mal controlada<sup>2</sup> fue del 15,9, del 29,2, del 42,8 y del 25% para los fenotipos i, ii, iii y iv, respectivamente. Las diferencias no fueron significativas (p = 0,15). Tampoco se encontraron diferencias (p = 0,35) en el grado de control al comparar las categorías con una CA<sub>NO</sub> baja (i y ii) respecto a las categorías con una CA<sub>NO</sub> elevada (iii y iv) (22,3% versus 38,8%).

Respecto a la morbilidad en el último mes, se encontraron diferencias significativas (p = 0,001) entre los fenotipos inflamatorios. El porcentaje de pacientes con al menos una agudización, incluyendo la necesidad de asistencia al área de urgencias y/o

hospitalización por asma en el último mes, fue del 4,5, del 7, del 50 y del 25% para los fenotipos I, II, III, IV, respectivamente. Esta diferencia fue significativa entre el fenotipo III y los fenotipos I ( $p < 0,001$ ) y II ( $p = 0,017$ ) (tabla 2). Como se ha reflejado previamente, combinando los grupos con  $CA_{NO}$  elevada (III y IV) y los grupos con  $CA_{NO}$  baja (I y II), la morbilidad registrada fue significativamente superior en aquellos pacientes con determinación elevada de la  $CA_{NO}$ .

## Discusión

En nuestra cohorte, al igual que lo publicado por otros autores<sup>7,14,27</sup>, no se encontró asociación entre el NO proximal ( $J'aw_{NO}$ ) y distal ( $CA_{NO}$ ); sin embargo, el  $J'aw_{NO}$  y la  $FE_{NO,50}$  están fuertemente asociados. Respecto a la función pulmonar, en concordancia con lo publicado<sup>14</sup>, el cociente  $FEV_1/FVC$  fue significativamente menor en el fenotipo III (media de  $79,8 \pm 7,5$ ) que en el fenotipo I (media  $85,8 \pm 6,3$ ). Respecto a la morbilidad presentada en el último mes, esta fue superior en el fenotipo III en comparación con el fenotipo I ( $p < 0,001$ ) y el II ( $p = 0,017$ ). Finalmente, los valores de normalidad encontrados de  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$  han sido similares a los publicados en la literatura.

El hecho de no encontrar asociación entre  $J'aw_{NO}$  y  $CA_{NO}$  indica que estas 2 determinaciones aportan información independiente. Por otro lado, la fuerte asociación encontrada entre el  $J'aw_{NO}$  y la  $FE_{NO,50}$  indica que un flujo de 50 ml/s es adecuado para determinar la NO de territorio proximal. El  $J'aw_{NO}$  no parece aportar información adicional, por lo que para caracterizar la inflamación proximal la determinación de la  $FE_{NO,50}$  podría ser suficiente<sup>27</sup>. La inflamación proximal no ha sido consistentemente asociada con el grado de control o con el riesgo de exacerbación en niños<sup>28,29</sup>. Una posibilidad para explicar estos hallazgos es la presencia de factores de confusión como los tratamientos con GCI o la atopía, que influyen en el NO proximal. En nuestra muestra, los pacientes asmáticos fueron incluidos consecutivamente sin tener en cuenta el tratamiento que recibían. En este sentido, el análisis estadístico fue ajustado para tratamiento con GCI mediante análisis de regresión múltiple y no se encontraron diferencias en los resultados. La mayoría de los asmáticos (80/103) recibían tratamiento diario con dosis bajas o medias de GCI (fluticasona 100 o 200  $\mu$ g/día) y no hubo diferencias en el uso de GCI entre los 4 tipos inflamatorios.

Todo esto ha permitido establecer 4 tipos inflamatorios: tipo I (NO normal), tipo II (NO de predominio proximal), tipo III (NO proximal y distal) y tipo IV (NO de predominio distal) (tabla 2). En nuestro estudio, los fenotipos sin inflamación distal (tipos I y II), al igual que lo publicado en otras series<sup>14</sup>, han sido los más frecuentes (82,5%).

En la espirometría forzada, el cociente  $FEV_1/FVC$  fue significativamente menor en el fenotipo III que en el fenotipo I. En este sentido, aunque el porcentaje de pacientes con el  $FEV_1 < 80\%$  (indicativo de mal control)<sup>2</sup> incluidos en los fenotipos con una  $CA_{NO}$  baja (I y II) fue inferior que en los incluidos en los fenotipos con la  $CA_{NO}$  elevada (III y IV) (6,2% versus 11,1%), no se encontraron diferencias. Para el resto de las variables espirométricas estudiadas no hubo diferencias entre los 4 grupos (tabla 2).

El porcentaje de pacientes con al menos una agudización, incluyendo la necesidad de glucocorticoides orales, asistencia a urgencias y/o ingreso en el último mes, fue significativamente superior en el fenotipo III en comparación con el fenotipo I ( $p < 0,001$ ) y el II ( $p = 0,017$ ) (tabla 2). Como comentamos previamente, combinando los grupos III y IV ( $CA_{NO}$  elevada) y los grupos I y II ( $CA_{NO}$  baja) la morbilidad registrada fue superior en los pacientes con  $CA_{NO}$  elevada. Estos hallazgos, consistentes con la literatura<sup>6,14</sup>, apoyan la presencia de distintos tipos inflamatorios basados en la localización y/o extensión de NO y sugieren que la presencia de inflamación distal podría ser una medida complementaria a la espirometría y/o a

la determinación de NO proximal para valorar el control de la enfermedad. Esta asociación entre la  $CA_{NO}$  elevada y mayor morbilidad en el último mes podría ser debida a la presencia de inflamación en el territorio más distal, lo que podría contribuir a la limitación del flujo aéreo<sup>30</sup>. Sin embargo, algunos autores<sup>31,32</sup> no encontraron asociación entre la  $CA_{NO}$ , el grado de control y la severidad de la enfermedad en niños y adultos con asma estable. Otros trabajos encontraron una  $FE_{NO,50}$  anormal y  $CA_{NO}$  normal durante las agudizaciones. En este sentido, Mahut et al.<sup>33</sup> publicaron que la utilidad del óxido nítrico alveolar en el asma está todavía por determinar.

Respecto a la puntuación del cuestionario  $CAN \geq 8$  (indicativo de mal control)<sup>24</sup>, no se encontraron diferencias entre los pacientes incluidos en los fenotipos con una  $CA_{NO}$  baja y aquellos con una  $CA_{NO}$  elevada, a diferencia de lo encontrado por otros autores<sup>14</sup> y el cuestionario de control de asma ACT (*Asthma control test*)<sup>34</sup>. En nuestro estudio elegimos el cuestionario CAN por tratarse en la actualidad del único cuestionario validado en población pediátrica española<sup>24</sup>. Así mismo, a pesar de que la proporción de asmáticos bien controlados ha sido superior en los fenotipos I y II y la de los asmáticos mal o parcialmente controlados ha sido superior en los fenotipos III y IV, no se encontraron diferencias en el grado de control al comparar los tipos con una  $CA_{NO}$  baja respecto a los tipos con una  $CA_{NO}$  elevada. El hecho de haber encontrado diferencias al analizar la variable cualitativa morbilidad y no al analizar el CAN podría atribuirse a que este último no incluye como ítem el uso de glucocorticoides orales durante las agudizaciones. Por otra parte, la cumplimentación del cuestionario podría haber infraestimado la sintomatología presentada en el último mes si lo comparamos con la medida objetiva del número de ingresos, el número de visitas a urgencias (recogidos a través de informes médicos) o el consumo de glucocorticoides orales (dato recogido a través de utilización de receta médica).

Por otro lado, debemos señalar que nuestra cohorte de asmáticos a estudio es en general un grupo con asma leve bien controlada y espirometría basal normal. Quizá la inclusión de asmáticos más graves podría haber modificado nuestros resultados.

Respecto a la atopía, al igual que otros autores<sup>14</sup>, sí encontramos diferencias entre fenotipos. Se halló una sensibilización (prick test positivo) a los neumoaérgenos estudiados menor ( $p = 0,01$ ) en el grupo de asmáticos incluidos en el fenotipo I (70,4%) en comparación con el resto (tipos II, III y IV).

A diferencia de lo publicado en otras series<sup>14</sup>, no se encontraron diferencias respecto al tratamiento con GCI. Según algunos trabajos<sup>11,35</sup>, la terapia con GCI no parece afectar a la  $CA_{NO}$  ni mejorar el control de los asmáticos con valores de  $CA_{NO}$  elevada. Sin embargo, la  $CA_{NO}$  y el control de asma sí responderían a los corticoides sistémicos, así como a los antagonistas de los leucotrienos. Aunque se requieren estudios longitudinales bien diseñados para determinar los tratamientos más adecuados para los asmáticos con  $CA_{NO}$  elevada, estos hallazgos apuntan a que la determinación de la existencia de inflamación distal podría ayudar en la elección del tratamiento en estos pacientes.

Dado que se han descrito diferencias significativas en las determinaciones de la  $CA_{NO}$  en función de la metodología utilizada<sup>36</sup>, se han realizado determinaciones de  $CA_{NO}$  y  $J'aw_{NO}$  en sanos con la metodología descrita previamente<sup>17</sup>. Los resultados obtenidos para la  $CA_{NO}$  (mediana 2,2 ppb; rango 0,1-4,5) y el  $J'aw_{NO}$  (mediana 516 pl/s; rango 98,33-1.470 pl/s) han sido similares a los descritos por otros autores<sup>7,14,27,37</sup>. Mahut et al.<sup>6</sup>, en cambio, encontraron niveles más elevados de  $CA_{NO}$  (media  $4,2 \pm 2$  ppb) y menores del  $J'aw_{NO}$  (media  $320 \pm 130$  pl/s). Estas diferencias podrían justificarse por tratarse de distintas poblaciones y/o por la metodología empleada<sup>36</sup>.

Una de las limitaciones más relevantes de este estudio ha sido la falta de estandarización de la técnica para la determinación de  $CA_{NO}$  y  $J'aw_{NO}$ . El modelo bicompartimental<sup>17</sup> posee algunas

limitaciones. Por un lado, los compartimentos propuestos pueden no ser totalmente estancos, y por otro lado las determinaciones obtenidas pueden variar en función del flujo seleccionado. La selección de los flujos empleados depende de la capacidad pulmonar del paciente y del grado de cooperación<sup>27</sup>.

## Conclusiones

El hallazgo principal de este trabajo ha sido que los tipos inflamatorios con valores elevados de NO alveolar (tipos III y IV) han presentado mayor morbilidad. Estos hallazgos apoyan la presencia de distintos patrones inflamatorios basados en la localización y/o extensión de NO y sugieren que la presencia de inflamación distal, determinada a través de la  $CA_{NO}$ , podría ser un instrumento de medida complementario a la espirometría y/o a la determinación de NO proximal a través de la  $J'aw_{NO}$  o la  $FE_{NO,50}$  para valorar el control de la enfermedad.

Finalmente, los valores de normalidad encontrados tanto de  $J'aw_{NO}$  como de la  $CA_{NO}$  han sido similares a los publicados previamente en la literatura.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en la redacción del manuscrito.

## Agradecimientos

A todos los pacientes que han participado y a sus familias, así como a toda la Sección de Neumología Infantil por su colaboración y dedicación para la realización de este estudio.

## Bibliografía

- Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, Custovic A, Gern J, Lemanske R, et al. International consensus on (ICON) pediatric asthma. *Allergy*. 2012;67:976-97.
- From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2012 [consultado 1 Oct 2014]. Disponible en: <http://www.ginasthma.org/>
- Van der Valk RJ, Baraldi E, Stern G, Frey U, de Jongste JC. Daily exhaled nitric oxide measurements and asthma exacerbations in children. *Allergy*. 2012;67:265-71.
- Jayaram L, Pizzichinni MM, Cook RJ, Boulet LP, Lemiere C, Pizzichinni E, et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell count: Effect on exacerbations. *Eur Respir J*. 2006;27:483-94.
- Payne DN, Qiu Y, Zhu J, Peachey L, Scallan M, Bush A, et al. Airway inflammation in children with difficult asthma: Relationships with airflow limitation and persistent symptoms. *Thorax*. 2004;59:862-9.
- Mahut B, Delacourt C, Zerah-Lancner F, de Blic J, Harf A, Delclaux C. Increase in alveolar nitric oxide in the presence of symptoms in childhood asthma. *Chest*. 2004;125:1012-8.
- Paraskakis E, Brindicci C, Fleming L, Krol R, Kharitonov SA, Wilson NM, et al. Measurement of bronchial and alveolar nitric oxide production in normal children and children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:260-7.
- García-Río F, Casitas R, Romero D. Utility of two-compartment models of exhaled nitric oxide in patients with asthma. *J Asthma*. 2011;48:329-34.
- Lehtimäki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, Turjanmaa V, Moilanen E. Increased alveolar nitric oxide concentration in asthmatic patients with nocturnal symptoms. *Eur Respir J*. 2002;20:841-5.
- Scichilone N, Battaglia S, Taormina S, Modica V, Pozzeco E, Bellia V. Alveolar nitric oxide and asthma control in mild untreated Asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131:1513-7.
- Berry M, Hargadon B, Morgan A, Shelley M, Richter J, Shaw D, et al. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: Evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. *Eur Respir J*. 2005;25:986-91.
- Gelb AF, Flynn Taylor C, Shinar CM, Gutierrez C, Zamel N. Role of spirometry and exhaled nitric oxide to predict exacerbations in treated asthmatics. *Chest*. 2006;129:1492-9.
- Nadif R, Siroux V, Oryszczyn MP, Ravault C, Pison C. Heterogeneity of asthma according to blood inflammatory patterns. *Thorax*. 2009;64:374-80.
- Puckett JL, Taylor RW, Leu S, Guignon O, Aledia A, Galant S, et al. Clinical patterns in asthma based on proximal and distal airway nitric oxide categories. *Respir Res*. 2010;11:47.
- Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M, et al. European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: A PRACTALL consensus report. *Allergy*. 2008;63:5-34.
- ATS/ERS Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:912-30.
- Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol*. 1998;85:653-66.
- Högman M, Drač N, Ehrstedt C, Meriläinen P. Exhaled nitric oxide partitioned into alveolar, lower airways and nasal contributions. *Respir Med*. 2000;94:985-91.
- Silkoff PE, Sylvester JT, Zamel N, Permutt S. Airway nitric oxide diffusion in asthma: Role in pulmonary function and bronchial responsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1218-28.
- Condorelli P, Shin HW, Aledia AS, Silkoff PE, George SC. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant flow exhalations and an axial diffusion model. *J Appl Physiol*. 2007;102:417-25.
- Miller MR, Hankinson V, Brusasco RO, Burgos R, Casaburi A, Coates R, et al. ATS/ERS Task Force Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26:319-38.
- Zapletal A, Samanek M, Tuma S, Ruth C, Paul T. Assessment of airway function in children. *Bull Physiopathol Respir*. 1972;8:535-44.
- Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, et al. Interpretative strategies for lung function tests ATS/ERS Task Force: Standardisation of Lung Function Testing. *Eur Respir J*. 2005;26:948-68.
- Pérez-Yarza EG, Badía X, Badiola C, Cobos N, Garde J, Ibero M, et al. CAN investigator Group. Development and validation of a questionnaire to assess asthma control in pediatrics. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44:54-63.
- Buchvald F, Baraldi E, Carraro S, Gaston B, de Jongste J, Pijnenburg MW, et al. Measurements of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:1130-6.
- Malmberg LP, Petäys T, Haahtela T, Laatikainen T, Jousilahti P, Vartiainen E, et al. Exhaled nitric oxide in healthy nonatopic school-age children: Determinants and height-adjusted reference values. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41:635-42.
- Linn WS, Rappaport EB, Eckel SP, Berhane KT, Zhang Y, Salam MT, et al. Multiple-flow exhaled nitric oxide, allergy, and asthma in a population of older children. *Pediatr Pulmonol*. 2013;48:885-96.
- Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, et al. A clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:1077-82.
- Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med*. 2005;26:2163-73.
- Sutherland ER, Martin RJ, Bowler RP, Zhang Y, Rex MD, Kraft M. Physiologic correlates of distal lung inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:1046-50.
- Kerckx Y, Michils A, Van Muylem A. Airway contribution to alveolar nitric oxide in healthy subjects and stable asthma patients. *J Appl Physiol*. 2008;104:918-24.
- Mahut B, Trinquart L, le Bourgeois M, Becquemin MH, Beydon N, Aubourg F, et al. Multicentre trial evaluating alveolar NO fraction as a marker of asthma control and severity. *Allergy*. 2010;65:636-44.
- Mahut B, Delclaux C. Usefulness of alveolar nitric oxide measurement in asthma: Still debated. *Allergy Clin Immunol*. 2013;132:1255-6.
- Liu AH, Zeiger R, Sorkness C, Mahr T, Ostrom N, Burgess S, et al. Development and cross-sectional validation of the Childhood Asthma Control Test. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:817-25.
- Fritscher LG, Rodrigues MT, Zamel N, Chapman KR. The effect of montelukast on exhaled nitric oxide of alveolar and bronchial origin in inhaled corticosteroid-treated asthma. *Respir Med*. 2009;103:296-300.
- Puckett JL, Taylor RW, Galant SP, George SC. Impact of analysis interval on the multiple exhalation flow technique to partition exhaled nitric oxide. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45:182-91.
- Sepponen A, Lehtimäki L, Huhtala H, Kaila M, Kankaanranta H, Moilanen E. Alveolar and bronchial nitric oxide output in healthy children. *Pediatr Pulmonol*. 2008;43:1242-8.