



Original

Valor pronóstico del pH en el condensado de aire exhalado y de la fracción exhalada de óxido nítrico en la enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerosis sistémica



Alfredo Guillen-del Castillo^{a,*}, Sara Sánchez-Vidaurre^{b,c}, Carmen P. Simeón-Aznar^a, María J. Cruz^{b,c}, Vicente Fonollosa-Pla^a y Xavier Muñoz^{b,c,d}

^a Unitat de Malalties Autoimmunes Sistèmiques, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^b Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^c Ciber de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), España

^d Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 9 de mayo de 2016

Aceptado el 6 de septiembre de 2016

On-line el 27 de diciembre de 2016

Palabras clave:

Aire exhalado

Enfermedad pulmonar intersticial

Óxido nítrico

pH

Esclerosis sistémica

R E S U M E N

Introducción: La enfermedad pulmonar intersticial (EPI) es una de las principales causas de muerte en los pacientes con esclerosis sistémica (ES). En este estudio se investigaron biomarcadores en el aire exhalado (AE) y en el condensado de aire exhalado (CAE) y se analizó su posible papel como factores pronóstico de la EPI en pacientes con ES.

Métodos: Se analizó prospectivamente la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO) y el monóxido de carbono exhalado (COe) en AE, y se determinaron los valores de pH, nitritos, nitratos e interleucina-6 en CAE, en 35 pacientes con ES. La tomografía computarizada de alta resolución (TACAR) torácica mostró signos de EPI en 12 pacientes, no estando presentes en los 23 restantes. En el momento de la inclusión se determinaron los biomarcadores en el AE y en el CAE, y durante los 4 años de seguimiento se efectuaron anualmente pruebas de función respiratoria.

Resultados: No se observaron diferencias entre grupos en los valores iniciales de los diferentes biomarcadores. En todos los pacientes examinados los valores disminuidos de pH en CAE se asociaron con una reducción en la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) durante el seguimiento. Valores disminuidos de FeNO se correlacionaron con una menor capacidad vital forzada (FVC) inicial y a los 4 años, así como con una reducción de FVC y DLCO durante el seguimiento. En los pacientes con EPI los valores más altos de COe se correlacionaron con FVC más disminuidas al inicio. En el conjunto de la cohorte se identificó una menor supervivencia libre de progresión en los pacientes con un pH en CAE inferior a 7,88 y en los que presentaban un FeNO inferior a 10,75 ppb (Log Rank: $p=0,03$ y $p<0,01$, respectivamente).

Conclusiones: Los biomarcadores en el AE y en el CAE son útiles para detectar pacientes con una mayor probabilidad de presentar un deterioro de la función pulmonar durante el seguimiento de la enfermedad.

© 2016 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Prognostic Role of Exhaled Breath Condensate pH and Fraction Exhaled Nitric Oxide in Systemic Sclerosis Related Interstitial Lung Disease

A B S T R A C T

Keywords:

Exhaled breath

Interstitial lung disease

Nitric oxide

pH

Systemic sclerosis

Introduction: Interstitial lung disease (ILD) is one of the major causes of death in systemic sclerosis (SSc). This study investigated exhaled breath (EB) and exhaled breath condensate (EBC) biomarkers in patients with SSc and analyzed their role as a prognostic tool in SSc-related ILD.

Methods: Fraction exhaled nitric oxide (FeNO) and exhaled carbon monoxide (eCO) measured in EB, together with pH, nitrite, nitrate and interleukin-6 levels measured in EBC were prospectively analyzed in 35 patients with SSc. Twelve patients had established ILD by chest high-resolution computed tomography (HRCT), and 23 patients showed no evidence of ILD. EB and EBC biomarkers were determined at inclusion, and pulmonary function tests were annually performed during 4 years of follow-up.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: alguille@vhebron.net (A. Guillen-del Castillo).

Results: No differences at baseline biomarkers levels were found between groups. In all patients studied, low EBC pH levels were associated with a decreased diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) during follow-up. Low FeNO levels were correlated with lower forced vital capacity (FVC) at baseline, 4 years of follow-up and with a decrease in FVC and DLCO during monitoring. Among ILD patients, high eCO levels were correlated with lower baseline FVC. In the global cohort, a worse progression-free survival was identified in patients with EBC pH values lower than 7.88 and FeNO levels lower than 10.75 ppb (Log Rank $P = .03$ and $P < .01$, respectively).

Conclusions: EB and EBC could help to detect patients likely to present a deterioration on lung function during follow up.

© 2016 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad del tejido conjuntivo caracterizada por una disfunción endotelial que condiciona una vasculopatía de pequeño vaso, disfunción fibroblástica con una producción excesiva de colágeno y alteraciones inmunológicas¹. En la actualidad, la enfermedad pulmonar intersticial (EPI) es una de las primeras causas de muerte en la ES^{2,3}. La prevalencia de EPI en la ES varía dependiendo de la población estudiada, la definición y la sensibilidad de los métodos utilizados para su diagnóstico de comprobación. Goh et al.⁴ propusieron un sencillo esquema de estratificación basado en la extensión de la enfermedad en la tomografía computarizada de alta resolución (TACAR) y su repercusión en las pruebas de función respiratoria (PFR), con el que se obtenía la mejor predicción de progresión de la enfermedad y de mortalidad a largo plazo. Recientemente se ha descrito que la interleucina-6 (IL-6) sérica es un factor de predicción de progresión de la EPI-ES, en concreto en pacientes con enfermedad leve en estadios iniciales⁵.

Una característica frecuente de la EPI-ES es el aumento de células inflamatorias en el lavado broncoalveolar^{6,7}. Sin embargo, este hallazgo no se correlaciona con la supervivencia ni con la progresión a largo plazo⁸, por lo que únicamente se utiliza para excluir la presencia de una infección y con fines de investigación³. Aunque se ha descrito que el análisis de diversos biomarcadores tanto en el esputo inducido como en el aire exhalado (AE) y en el condensado de aire exhalado (CAE) en la afectación pulmonar de la esclerodermia pueden ser útiles⁹⁻¹³, su posible valor sigue siendo motivo de controversia y es necesario disponer de otros biomarcadores obtenidos por métodos no invasivos capaces de pronosticar la progresión de la enfermedad.

El propósito de nuestro estudio fue determinar mediante métodos no invasivos (AE y/o CAE) el proceso inflamatorio autoinmune que provoca la EPI-ES. En este contexto, se plantearon 2 objetivos principales. El primero fue analizar biomarcadores en AE y CAE de pacientes con ES en función de la presencia o ausencia de EPI, y estudiar su asociación con las PFR iniciales. El segundo fue determinar si dichos biomarcadores se correlacionaban con la progresión de la enfermedad al cabo de 4 años y si tenían un posible valor pronóstico.

Métodos

Pacientes

Se llevó a cabo un estudio prospectivo en el que se incluyó a 35 pacientes de raza blanca (32 mujeres) con diagnóstico de ES que cumplían los criterios de clasificación ACR/EULAR 2013¹⁴, que disponían de una TACAR inicial y en los que se realizó un seguimiento durante 4 años. Los pacientes fueron evaluados consecutivamente en la Unidad de Esclerodermia de nuestro hospital y controlados por el mismo médico especialista cada 4 meses en los casos que presentaban EPI moderada-grave o cada 6 meses en aquellos sin afectación pulmonar o con EPI leve, de acuerdo con las

recomendaciones de las guías internacionales¹⁵. El Comité ético del hospital aprobó el estudio y, en cumplimiento con la Declaración de Helsinki, todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado para participar. Los criterios de exclusión comprendieron la presencia de otras enfermedades respiratorias inflamatorias (tales como asma, EPOC u otras), atopia o una infección respiratoria durante el mes anterior a la inclusión en el estudio.

Grupos del estudio

La población de estudio se dividió en 2 grupos: el grupo de EPI, formado por 12 pacientes con EPI, definida como evidencia radiológica de enfermedad intersticial en la TACAR, y que incluyó un paciente con hipertensión pulmonar asociada a EPI (HP-EPI), y el grupo de control, formado por 23 pacientes con ES que no presentaban signos de EPI, entre los cuales se incluyeron 2 pacientes con hipertensión arterial pulmonar (HAP) aislada. La HP se definió como presión arterial pulmonar media (PAPm) ≥ 25 mmHg medida por cateterismo cardíaco derecho (CCD). La presencia de HP-EPI se consideró si el diagnóstico de HP se realizaba ante un paciente con EPI y capacidad vital forzada (FVC) inferior al 60% del valor teórico o enfermedad intersticial moderada o grave en la TACAR¹⁶. La HAP aislada se diagnosticó mediante CCD, de acuerdo con las guías internacionales^{16,17}. También se registraron otras comorbilidades de la ES, como se ha descrito anteriormente¹⁸. Al inicio del estudio, a todos los pacientes se les realizó PFR completas y se les recogió la fracción exhalada de NO (FeNO), monóxido de carbono (CO) exhalado (COe) y el CAE. Se indicó a los pacientes que no consumieran alimentos ni fumarán durante las 2 y 24 h previas a la extracción de las muestras, respectivamente. Todas las muestras se analizaron en el mismo laboratorio.

Pruebas de función respiratoria

Las espirometrías, volúmenes pulmonares estáticos y estudios de difusión pulmonar anuales se efectuaron mediante un equipo MasterLab (MasterLab, Jaegger, Alemania), siguiendo las recomendaciones de la ERS-ATS¹⁹. Se analizaron las PFR en la evolución según el cambio en el porcentaje teórico de FVC o en la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO), en comparación con la visita de inicio.

Determinación de la fracción exhalada de óxido nítrico

Las determinaciones de FeNO se realizaron mediante el dispositivo NIOX MINO[®] (Aerocrine AB, Solna, Suecia) de acuerdo con las guías vigentes²⁰. Durante el proceso los pacientes permanecieron en sedestación y con una pinza nasal, inhalando aire libre de NO a través del dispositivo y a continuación exhalaban a un flujo fijo de 50 ml/s durante aproximadamente 10 s. Para el análisis se utilizó la primera medición técnicamente aceptable de la FeNO²¹.

Tabla 1
Variables demográficas y características iniciales de los pacientes incluidos en el estudio

	Total (n = 35)	EPI (n = 12)	Controles (n = 23)	p
Mujeres	32 (91,4)	10 (83,3)	22 (95,7)	0,26
Edad, años	59,0 (42,0 a 68,0)	64,5 (52,5 a 70,2)	58,0 (36,0 a 67,0)	0,31
Fumadores activos	4 (11,4)	1 (8,3)	3 (13,0)	1,0
ES limitada	28 (80,0)	8 (66,7)	20 (87,0)	0,20
Tiempo transcurrido desde el primer síntoma, años	13,0 (3,5 a 28,3)	10,2 (1,5 a 35,4)	13,3 (5,0 a 28,3)	0,69
Tiempo transcurrido desde el primer síntoma no FR, años	7,1 (1,5 a 12,6)	7,6 (1,7 a 10,0)	7,1 (1,5 a 13,3)	0,71
ANA	35 (100)	12 (100)	23 (100)	n.a.
ACA	18 (51,4)	5 (41,7)	13 (56,5)	0,40
Scl-70	4 (11,4)	3 (25,0)	1 (4,3)	0,10
EPI	12 (34,2)	12 (100)	0 (0)	< 0,001
Duración de la EPI, años	-	1,4 (0,3 a 5,0)	-	n.a.
HP	3 (8,6)	1 (8,3)	2 (8,6)	1,0
HP-EPI	1 (2,9)	1 (8,3)	0 (0)	0,34
HAP aislada	2 (5,7)	0 (0)	2 (8,6)	0,53
Afección gastrointestinal	32 (91,4)	11 (91,7)	21 (91,3)	1,0
Afección de la motilidad esofágica	30 (85,7)	11 (91,7)	19 (82,6)	0,64
Afección gástrica	7 (20,0)	2 (2,4)	5 (21,7)	1,0
Afección cardíaca	13 (37,1)	6 (50,0)	7 (30,4)	0,29
Insuficiencia renal crónica	1 (2,9)	0 (0)	1 (4,3)	1,0
Hipertensión arterial	10 (28,6)	3 (25,0)	7 (6,6)	1,0
Dislipidemia	2 (5,7)	1 (8,3)	1 (4,3)	1,0
Diabetes mellitus	0 (0)	0 (0)	0 (0)	n.a.
Tratamiento inmunosupresor	7 (20)	5 (41,7)	2 (8,7)	0,03
Prednisona ≤ 5 mg/día	5 (14,3)	3 (25,0)	2 (8,7)	0,31
Micoftolato sódico	4 (11,4)	3 (25,0)	1 (4,3)	0,10
Ciclofosfamida i.v.	1 (2,9)	1 (8,3)	0 (0)	0,34
Fármacos no inmunosupresores	35 (100)	12 (100)	23 (100)	1,0
Inhibidores de la bomba de protones	35 (100)	12 (100)	23 (100)	1,0
Bloqueantes de los canales de calcio	22 (62,9)	7 (58,3)	15 (65,2)	0,72
Antiagregantes plaquetarios	15 (42,9)	6 (50,0)	9 (39,1)	0,72
IECA o ARA-II	10 (28,6)	1 (8,3)	9 (39,1)	0,11
N-acetilcisteína	2 (5,7)	2 (16,7)	0 (0)	0,11
Terapia con liberadores de NO	2 (5,7)	0 (0)	2 (8,7)	0,53

ACA: anticuerpos anticentrómero; ANA, anticuerpos antinucleares; ARA-II: antagonistas del receptor de la angiotensina II; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; ES: esclerosis sistémica; FR: fenómeno de Raynaud; HAP: hipertensión arterial pulmonar; HP: hipertensión pulmonar; IECA, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; i.v.: intravenoso; n.a.: no aplicable.

Para las variables continuas los datos se presentan mediante la mediana (rango intercuartílico [RIC]); para las variables categóricas, mediante n (%).

Tabla 2
TACAR, PFP, ecocardiografía y biomarcadores del aire exhalado y del condensado de aire exhalado al inicio del estudio

	EPI (n = 12)	Controles (n = 23)	p
Hallazgos en la TACAR	12 (100)	0 (0)	< 0,001
Opacidades en vidrio esmerilado	11 (91,7)	0 (0)	< 0,001
Opacidades reticulares	6 (50,0)	0 (0)	< 0,01
Panalización	1 (8,3)	0 (0)	0,36
Pruebas de función pulmonar			
FVC*	73,3 (62,3 a 91,9)	90,9 (83,7 a 103,0)	0,03
FEV ₁ *	81,2 (65,7 a 108,4)	98,9 (85,2 a 107,9)	0,09
FEV ₁ % (FEV ₁ /FVC)	80,9 (76,1 a 88,3)	80,6 (76,0 a 83,2)	0,13
TLC*	82,7 (70,9 a 92,6)	104,3 (95,8 a 111,5)	0,001
DLCO*	47,7 (41,2 a 59,1)	70,9 (59,1 a 86,6)	< 0,01
KCO*	55,2 (46,9 a 66,5)	67,3 (63,6 a 85,3)	0,02
Ecocardiografía			
PSVD, mmHg	35,0 (29,5 a 45,0)	31,0 (25,5 a 41,2)	0,60
Aire exhalado			
FeNO, ppb	10,5 (7,5 a 16,5)	12,0 (9,2 a 20,7)	0,23
COe, ppm	3,0 (2,0 a 4,0)	3,0 (2,0 a 8,2)	0,77
Condensado del aire exhalado			
pH	7,5 (6,9 a 7,9)	8,0 (7,4 a 8,2)	0,05
Nitrito, μM	3,7 (1,9 a 5,8)	3,2 (1,4 a 4,8)	0,57
Nitrito, μM	6,4 (3,5 a 10,9)	8,7 (5,8 a 13,8)	0,38
IL-6, pg/ml	0,06 (0,03 a 0,10)	0,07 (0,05 a 0,10)	0,61

COe: monóxido de carbono exhalado; DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; FeNO: fracción exhalada de óxido nítrico; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FEV₁%; cociente FEV₁/FVC expresado en porcentaje; FVC: capacidad vital forzada; IL-6: interleucina-6; KCO: DLCO/volumen alveolar; n.a.: no aplicable; PSVD: presión sistólica ventricular derecha; TACAR: tomografía computarizada de alta resolución; TLC: capacidad pulmonar total. Datos expresados mediante la mediana (RIC).

* Porcentaje del valor teórico.

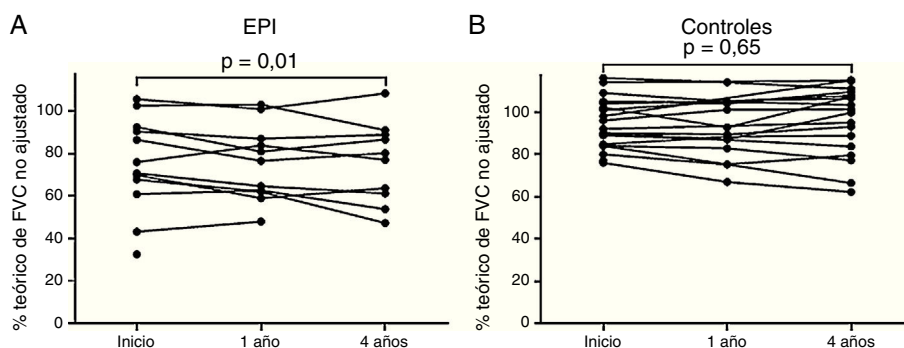


Figura 1. Valores de FVC iniciales y durante el seguimiento. En A y B se muestra la variación no ajustada del porcentaje teórico de FVC durante el seguimiento (cada punto representa un paciente) de los pacientes con EPI y los sujetos de control, respectivamente. En el grupo de EPI se observó una disminución de un 6,4% en la media de los valores de FVC durante el periodo de 4 años, en comparación con los valores iniciales (IC95%: $-11,2$ a $-1,6$; $p=0,01$) (A), mientras que en el grupo control no se observaron diferencias significativas (B). En el grupo de EPI la disminución de la FVC fue mayor que en el grupo de control ($p < 0,01$).

Determinación de monóxido de carbono exhalado

El CO exhalado se determinó con un sensor electroquímico mediante un dispositivo MicroCO (MicroCO; Micro Medical Ltd., Rochester, Kent, Reino Unido). Se solicitó a los pacientes que realizaran una inspiración profunda hasta la capacidad pulmonar total, retuviesen el aire durante 20 s y luego espirasen lenta y completamente a través de la boquilla. Se efectuaron 2 registros sucesivos, y los cálculos se efectuaron a partir de los valores máximos.

Obtención y procesamiento de las muestras de condensado de aire exhalado

El CAE se obtuvo mediante un condensador comercializado (EcoScreen; Jaeger, Würzburg, Alemania). Con la pinza nasal puesta, los pacientes respiraron a volumen corriente a través de una boquilla conectada al condensador. Se recogió un volumen fijo de 150 l de aire exhalado por paciente²². Las muestras de CAE se dividieron en alícuotas de 500 μ l para su procesamiento, una de las cuales se utilizó para determinar el pH tras la desgasificación y el resto se conservaron de inmediato a -70°C , y se analizaron durante el mes siguiente a su obtención.

El pH del CAE se determinó tras la desgasificación con helio (350 ml/min durante 10 min) mediante un pH-metro calibrado (Modelo GLP 21; Crison Instruments SA, Barcelona, España) con una precisión en el pH de $\pm 0,01$ y una sonda para pequeños volúmenes (Crison 50 28; Crison Instruments SA, Barcelona, España). La sonda se calibró diariamente con tampones estándar de 7,02 y 4,00²³.

Las concentraciones de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) se determinaron mediante una prueba colorimétrica basada en la reacción de Griess (Cayman Chemical Company, EE.UU.). Los valores de concentración se obtuvieron mediante un lector de microplacas a 540 nm de absorbancia. La sensibilidad de la prueba fue de 1 μM para los nitritos y de 2,5 μM para los nitratos.

Las concentraciones de IL-6 se evaluaron mediante un análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de alta sensibilidad disponible comercialmente (Bender MedSystems GmbH, Austria). La sensibilidad de la prueba era de 0,03 pg/ml.

Análisis estadístico

Se efectuaron pruebas no paramétricas para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Los datos categóricos se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher. En cuanto a los datos continuos, las diferencias intergrupos se analizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney, y para las comparaciones intragrupo se utilizó la

prueba de Wilcoxon para datos apareados. Las asociaciones entre variables se estudiaron mediante la correlación de Spearman. Se utilizaron curvas de eficacia diagnóstica (ROC) junto con el método del índice de Youden para determinar el valor umbral de cada biomarcador que demostrara la mayor sensibilidad y especificidad en la predicción de una disminución de un 10% en la FVC o de un 15% en la DLCO, o la muerte. La prueba de Log Rank se utilizó para determinar la supervivencia libre de progresión (SLP) durante el seguimiento, cuyo objetivo primario fue la aparición de un evento combinado negativo, definido por la disminución desde la visita de inicio de un 10% en la FVC, la disminución del 15% en la DLCO o muerte. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Los diferentes análisis estadísticos se efectuaron mediante SPSS 20.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago) y GraphPad InStat4 (GraphPad Software Inc., San Diego).

Resultados

Datos iniciales

Los datos demográficos y las características iniciales de la población del estudio se muestran en la [tabla 1](#). La mediana (rango intercuartílico [RIC]) de edad fue de 59,0 (42,0 a 68,0) años. En todos los pacientes con EPI, la TACAR fue compatible con neumonía intersticial no específica, y no se observó ningún signo de EPI en los sujetos del grupo control. La mediana de duración de la enfermedad pulmonar en el grupo de EPI fue de 1,4 años. En el momento de la inclusión, 7 pacientes recibían tratamiento inmunosupresor.

Las pruebas de imagen, PFR y biomarcadores iniciales se detallan en la [tabla 2](#). Al inicio del estudio los grupos presentaban diferencias significativas en FVC, TLC, DLCO y KCO, con valores más disminuidos en el grupo de EPI. En ambos grupos se analizaron los biomarcadores del AE y del CAE iniciales. No se observaron diferencias estadísticas en la FeNO ni en el COe. Sin embargo, se halló una asociación positiva entre la FeNO y la FVC inicial ($r=0,41$, $p=0,03$). En el grupo de EPI se observó una correlación negativa entre los niveles de COe y la FVC inicial ($r=-0,75$, $p < 0,01$). En cuanto a los biomarcadores del CAE, no hubo diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, al analizar a 11 pacientes que presentaban opacidades en vidrio deslustrado en la TACAR, la mediana del pH del CAE fue significativamente más baja que en los pacientes en los que no se constató este patrón radiológico (7,4 vs. 8,0, $p=0,02$). No se observaron otras asociaciones entre los hallazgos de la TACAR y los valores de biomarcadores al inicio del estudio.

En un subestudio en el que se excluyó a los 7 pacientes que recibían tratamiento inmunosupresor se observaron las mismas diferencias en las PFR y los biomarcadores del AE y CAE iniciales.

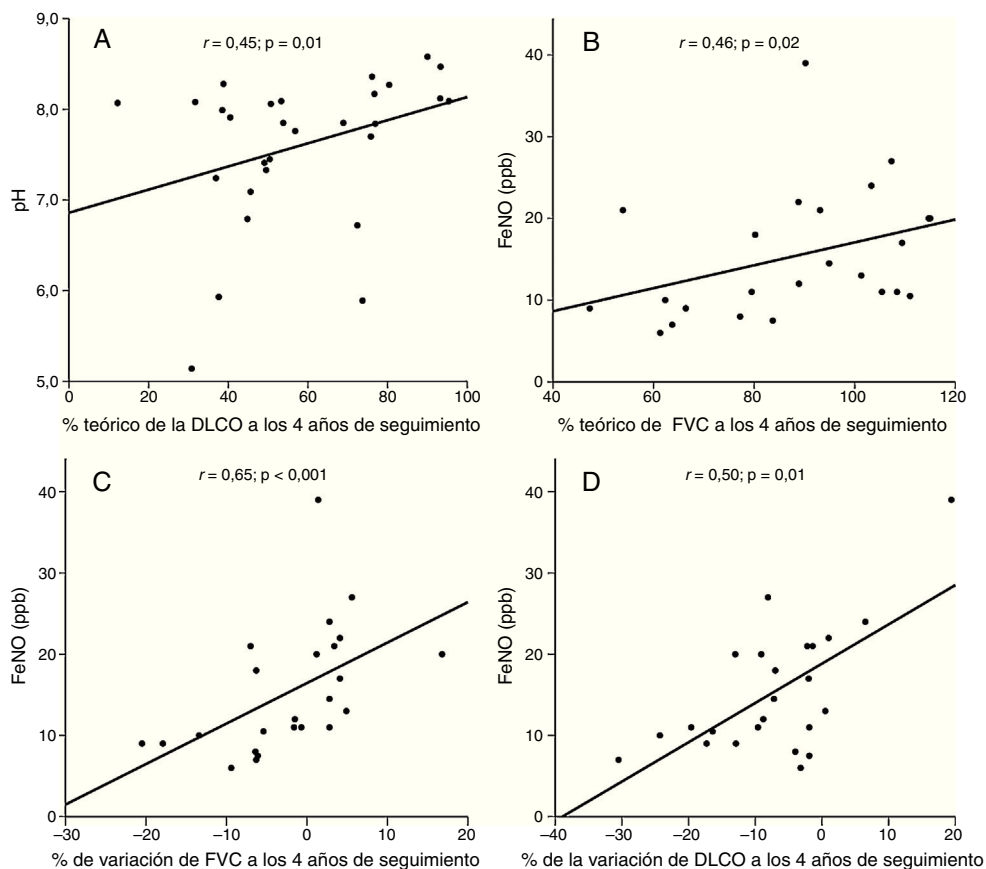
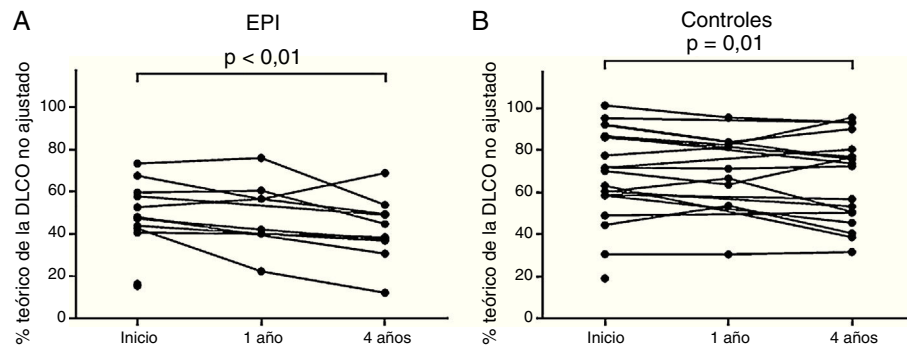


Figura 3. Correlación entre el pH del CAE y FeNO y las pruebas de función respiratoria. En la figura se representan las correlaciones que incluyen a todos los pacientes. Las variaciones en los porcentajes de FVC y de DLCO se calcularon en relación con los parámetros iniciales (PFR a los 4 años menos PFR iniciales). FeNO: fracción exhalada de NO.

Datos del seguimiento

Un paciente del grupo control con un valor de pH de 8,09 en el CAE y de una FeNO de 14,5 ppb al inicio del estudio presentó durante el seguimiento una EPI leve, diagnosticada mediante TACAR, y FVC superior al 70% a los 45 meses de seguimiento, y posteriormente HP-EPI identificada mediante CCD a los 47 meses. Durante el seguimiento fallecieron 4 pacientes, 2 del grupo de EPI y 2 del grupo de control, uno por HAP y otro por un ictus.

En las figuras 1 y 2 se muestran los valores de FVC y DLCO, respectivamente, de los 2 grupos del estudio durante el periodo de seguimiento.

Las correlaciones entre los biomarcadores del CAE y las PFR se muestran en la figura 3. En el conjunto de todos los pacientes, los valores disminuidos de pH se correlacionaron con valores disminuidos de DLCO al final del seguimiento de 4 años (fig. 3A). Asimismo, los valores disminuidos de FeNO se asociaron con menor FVC al final del seguimiento (fig. 3B). Los valores disminuidos de FeNO al inicio del estudio se asociaron con descensos de la FVC y la DLCO a los 4 años de seguimiento (fig. 3C y D). En los pacientes con EPI se observó una correlación negativa entre los valores elevados de CO_e y los valores más disminuidos de FVC al final del seguimiento ($r = -0,66$; $p = 0,03$). Además, se observó una tendencia hacia una correlación entre altas concentraciones de IL-6 y los valores más

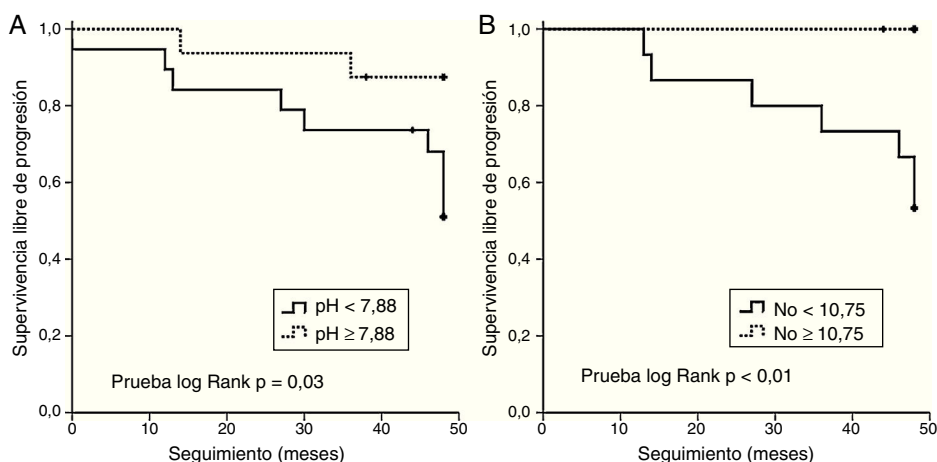


Figura 4. Gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de progresión desde la recogida del CAE. El objetivo primario fue el siguiente: la disminución de la FVC inicial de al menos un 10% o la disminución de la DLCO del 15% o muerte durante el seguimiento. A) En el gráfico de supervivencia se muestra mejor supervivencia libre de progresión en los pacientes con valores de pH en el CAE iguales o superiores a 7,88. B) En el gráfico de supervivencia se muestra mayor supervivencia libre de progresión en los pacientes con valores de FeNO iguales o superiores a 10,75 ppb.

disminuidos de DLCO al final del estudio en los pacientes con EPI ($r = -0,53$; $p = 0,10$). En el resto de los biomarcadores del CAE no hubo asociaciones significativas.

Para cuantificar la precisión de las predicciones de deterioro funcional o muerte según los valores iniciales de cada biomarcador se utilizaron curvas ROC. El área bajo la curva (AUC) del pH del CAE fue de 0,65 (IC 95%: 0,41 a 0,89; $p = 0,23$) y el valor umbral de 7,88 fue establecido por el método del índice de Youden, con una sensibilidad de 0,71 y una especificidad de 0,58. El AUC de la FeNO fue de 0,81 (IC 95%: 0,65 a 0,96; $p = 0,01$) y se determinó un valor umbral de 10,75 ppb, con una sensibilidad y una especificidad de 0,85 y 0,77, respectivamente. Las curvas de Kaplan-Meier ilustran la SLP en función de los anteriores valores de corte de pH y FeNO (fig. 4). Un valor de pH en el CAE inferior a 7,88 se asoció a una disminución de los parámetros de función pulmonar o a muerte durante el seguimiento (log Rank: $p = 0,03$). Un valor de FeNO inferior a 10,75 ppb se relacionó con peor SLP (log Rank: $p < 0,01$). No se observaron diferencias estadísticas en la supervivencia en relación con los valores iniciales de COe.

En el subestudio en el que fueron excluidos los pacientes que recibían tratamiento inmunosupresor, el AUC para el pH del CAE fue de 0,66 (IC 95%: 0,44 a 0,88; $p = 0,18$) al utilizar el mismo valor umbral de 7,88, pero no hubo diferencias estadísticas en cuanto a la SLP (log Rank: $p = 0,09$). Respecto al FeNO, se obtuvo un AUC de 0,88 (IC 95%: 0,74 a 1,0; $p = 0,18$), con un valor umbral de 10,25 ppb, con una sensibilidad de 0,80 y una especificidad de 0,84. Además, se identificó peor SLP en los pacientes cuyos valores de FeNO eran inferiores a 10,25 ppb (log Rank: $p < 0,01$).

Discusión

En los pacientes con ES estudiados, los valores bajos de pH en el CAE o de FeNO se asociaron a peor SLP a lo largo de los 4 años de seguimiento. En los pacientes con EPI-ES, los valores altos de COe se asociaron con un valor de FVC inicial menor, y también tras 4 años de seguimiento, aunque no se ha demostrado un valor pronóstico.

En nuestro estudio, un único paciente del grupo de control, que al inicio del estudio presentaba valores de pH en el CAE y de FeNO elevados, desarrolló EPI tras 45 meses de seguimiento. Esto es indicativo de que los biomarcadores del CAE no predicen el desarrollo de EPI-ES a largo plazo, pero desafortunadamente carecemos de datos a corto plazo que nos permitan verificar estos resultados.

En algunos estudios anteriores se ha observado que los valores de pH en el CAE pueden disminuir en el asma no controlada, en

las infecciones respiratorias en pacientes con bronquiectasias, en la EPOC o en la fibrosis quística²⁴. Sin embargo, en enfermedades pulmonares intersticiales se ha observado que los valores aumentan en la fibrosis pulmonar²⁵ y disminuyen en la asbestosis²⁶. No existen estudios al respecto en ES, sea como marcador de la enfermedad o del pronóstico. En este trabajo hemos observado que los pacientes con opacidades en vidrio esmerilado en la TACAR muestran valores bajos de pH en el CAE, lo que respalda la hipótesis de que los biomarcadores del CAE podrían estar influenciados por el tipo de inflamación presente en el pulmón. El papel pronóstico del pH en el CAE no se pudo confirmar al examinar únicamente a aquellos pacientes que no recibían tratamiento inmunosupresor, lo cual se podría explicar por la exclusión de los pacientes con EPI más grave y por el pequeño tamaño de la población analizada. Los procesos inflamatorios activan diversos mecanismos que acidifican las vías aéreas proximales, como consecuencia de un posible mecanismo de defensa innato²⁷. Estos mecanismos consisten en: una producción y excreción de iones superóxido y protones por las células epiteliales respiratorias, así como una inhibición de la actividad glutaminasa en dichas células y, finalmente, el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, cuya lisis incrementa la acidez del entorno²⁸. A pesar de que en la esclerodermia es característica la presencia de una infiltración linfocitaria en los alvéolos, se ha demostrado también una inflamación de tipo neutrofílico en los bronquios, de manera más notable en los pacientes que presentan fibrosis pulmonar¹³. De hecho, la acidificación producida por el reclutamiento de neutrófilos podría explicar este componente inflamatorio.

En cuanto a la IL-6, en un estudio transversal previo los valores de esta citocina en el CAE se correlacionaron negativamente con la TLC, DLCO y KCO en el momento de la evaluación de la EPI⁹. En la EPI-ES se han observado altas concentraciones de IL-6 en el lavado broncoalveolar²⁹. Recientemente, las concentraciones séricas elevadas de IL-6 se han relacionado con una reducción en los valores espirométricos o muerte durante el primer año en pacientes con EPI más leve⁵. En este sentido, nosotros observamos una tendencia hacia una asociación entre concentraciones elevadas de IL-6 en el CAE al inicio del estudio y las DLCO más bajas al final del seguimiento.

En el presente trabajo, los valores bajos de NO al inicio se correlacionaron con la FVC inicial y con disminuciones de FVC y DLCO al cabo de 4 años de seguimiento. Este estudio es el primero que demuestra el valor pronóstico de la FeNO en la EPI-ES, al observarse una relación entre los valores iniciales inferiores a 10,75 ppb

y peor SLP. La FeNO representa la cantidad de NO exhalado, correspondiente a la mezcla de la concentración alveolar de NO exhalada (CaNO) y del NO difundido a partir de la pared de la vía aérea (JawNO)³⁰. Con flujos superiores a 50 ml/s, a diferencia del estudio actual, la concentración alveolar de NO predomina respecto a la fracción total, pero los flujos más lentos representan la difusión en la vía aérea³¹. Moodley y Lalloo³² describieron valores más altos de NO en pacientes con ES sin fibrosis pulmonar al comparar con pacientes con EPI-ES o sujetos control. Malerba et al.³³ también encontraron que los valores de FeNO eran más bajos en pacientes con EPI-ES que en los que no presentaban EPI. Otros autores han comparado la FeNO en la ES y no han observado diferencias estadísticas entre pacientes con y sin EPI, e incluso al compararlos frente a sujetos sanos³⁴. De hecho, a pesar de no haber encontrado diferencias estadísticas, nuestro trabajo y todos los estudios anteriores han descrito que los valores de FeNO son más bajos en pacientes con ES y EPI que en los que no presentan esta complicación pulmonar^{34,35}.

Pese a ello, en trabajos centrados en el análisis de la CaNO se han observado incrementos de este parámetro en pacientes con ES, en comparación con sujetos sanos³⁶, y particularmente en pacientes con ES y EPI^{12,35}. Los valores elevados de CaNO se han asociado con una reducción en la función pulmonar o la muerte, con una especificidad del 90%¹².

En nuestro estudio, el flujo seleccionado podría haber afectado a los resultados debido a la baja representación del espacio alveolar. Asimismo, no determinamos la CaNO, lo que impide la exploración de resultados divergentes en comparación con la FeNO. Los valores reducidos de FeNO se podrían explicar por una restricción en la producción de NO por parte de la NO sintetasa en las vías aéreas proximales, como consecuencia de su inhibición por los altos valores de CaNO, secundarios a la inflamación pulmonar con incremento de la producción alveolar por parte de la NO sintetasa inducible. Sin embargo, estos datos demuestran que los pacientes con ES y valores bajos de FeNO presentaron peores resultados durante el seguimiento, lo que podría indicar la presencia de una EPI más agresiva. Debido a que la FeNO y la CaNO representan diferentes componentes de la respiración, son necesarios otros estudios que puedan dilucidar el papel fisiopatológico del NO en la EPI asociada a ES.

Un resultado novedoso de este estudio es la correlación entre los valores más altos de COe y la menor FVC al inicio del estudio y tras 4 años de seguimiento en pacientes con ES-EPI, a pesar de que este hallazgo no ha demostrado ser un factor pronóstico. Es bien sabido que muchas enfermedades pulmonares inflamatorias cursan con niveles elevados de COe³⁷. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existe ningún estudio en la esclerodermia, aunque algunos autores han apoyado la posibilidad de que patologías que cursan con alteraciones microcirculatorias podrían incrementar los niveles endógenos de CO^{13,38}. El hecho de que únicamente uno de los pacientes con EPI fuese fumador activo y que se le recomendase no fumar permitiría descartar que el tabaco fuera el responsable de esta relación.

La principal limitación del estudio fue el reducido tamaño muestral, lo que no permitió efectuar un análisis multivariante. La duración de la afectación pulmonar no fue homogénea, por lo cual algunos biomarcadores inflamatorios se podrían haber infraestimado debido a la inclusión de pacientes con enfermedad en estadios muy avanzados, en los que el estado de inflamación pulmonar es menor. Siete pacientes recibían tratamiento inmunosupresor, lo que podría haber afectado a las concentraciones iniciales de biomarcadores. No obstante, en el subestudio en el que se excluyó a estos pacientes no se observaron diferencias sustanciales, con la excepción del rol pronóstico del pH en el CAE, que no pudo demostrarse. La falta de mediciones estandarizadas de estos biomarcadores podría constituir una limitación, al igual que la no repetitividad de las muestras de CAE en los estudios que incluyeron

a pacientes con EPI-ES. Finalmente, no se pudo conseguir la correlación entre los valores de FeNO y de CaNO por la falta de datos de CaNO en los pacientes con ES.

La EPI es una de las primeras causas de muerte en la ES, lo que explica los esfuerzos realizados para hallar herramientas de pronóstico indispensables para dilucidar el curso de esta enfermedad. Este estudio es el primero que ha establecido el rol del pH en el CAE, la FeNO y el análisis del COe como factores de pronóstico en la EPI asociada a ES. Son necesarios más estudios que permitan confirmar nuestros resultados y aclarar la correlación existente entre los valores de FeNO y de CaNO en pacientes con esclerodermia. En este sentido, los biomarcadores del AE o del CAE podrían ser relevantes tanto para el seguimiento como para la identificación de los pacientes con EPI en la ES, con la ayuda de pruebas no invasivas. Esto conducirá a la identificación de los pacientes con mayor riesgo de deterioro y que precisan una estrecha supervisión.

Financiación

A. Guillén-del Castillo ha recibido una beca Contratos Predoctorales de Formación en Investigación (PFIS) del Instituto de Salud Carlos III [F114/00643]. M.J. Cruz ha recibido financiación del programa Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III [CP12/03101].

Conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses directa o indirectamente relacionado con el contenido del manuscrito.

Bibliografía

- Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med*. 2009;360:1989-2003.
- Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:940-4.
- Solomon JJ, Olson AL, Fischer A, Bull T, Brown KK, Raghu G. Scleroderma lung disease. *Eur Respir Rev*. 2013;22:6-19.
- Goh NS, Desai SR, Veeraghavan S, Hansell DM, Copley SJ, Maher TM, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: A simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:1248-54.
- De Laetis A, Sestini P, Pantelidis P, Hoyles R, Hansell DM, Goh NS, et al. Serum interleukin 6 is predictive of early functional decline and mortality in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2013;40:435-46.
- Antoniou KM, Wells AU. Scleroderma lung disease: Evolving understanding in light of newer studies. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20:686-91.
- Silver RM, Wells AU. Histopathology and bronchoalveolar lavage. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47 Suppl 5:62-4.
- Goh NS, Veeraghavan S, Desai SR, Cramer D, Hansell DM, Denton CP, et al. Bronchoalveolar lavage cellular profiles in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease are not predictive of disease progression. *Arthritis Rheum*. 2007;56:2005-12.
- Edme JL, Tellart AS, Launay D, Neviere R, Grutzmacher C, Boulenguez C, et al. Cytokine concentrations in exhaled breath condensates in systemic sclerosis. *Inflamm Res*. 2008;57:151-6.
- Tufvesson E, Bozovic G, Hesselstrand R, Bjermer L, Scheja A, Wuttge DM. Increased cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate from systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:2322-6.
- Wuttge DM, Bozovic G, Hesselstrand R, Aronsson D, Bjermer L, Scheja A, et al. Increased alveolar nitric oxide in early systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28:S5-9.
- Tiev KP, Hua-Huy T, Kettaneh A, Allanore Y, le-Dong NN, Duong-Quy S, et al. Alveolar concentration of nitric oxide predicts pulmonary function deterioration in scleroderma. *Thorax*. 2012;67:157-63.
- Sanchez-Vidaurre S, Simeon CP, Cruz MJ, Fonollosa V, Vilardell M, Morell F, et al. Latent pulmonary inflammation in patients with systemic sclerosis. *Arch Bronconeumol*. 2012;48:8-13.
- Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2013;65:2737-47.
- Kowal-Bielecka O, Landewe R, Avouac J, Chwiesko S, Miniati I, Czirkaj L, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: A report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis*. 2009;68:620-8.

16. Coghlan JG, Denton CP, Grunig E, Bonderman D, Distler O, Khanna D, et al. Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: The DETECT study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:1340–9.
17. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPIC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J*. 2015;46:903–75.
18. Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Campillo-Grau M, Ramos-Casals M, et al. Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: Survival, prognostic factors, and causes of death. *Medicine*. 2015;94:e1728.
19. Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, et al. General considerations for lung function testing. *Eur Respir J*. 2005;26:153–61.
20. American Thoracic Society, European Respiratory Society. 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.
21. Menzies D, Nair A, Lipworth BJ. Portable exhaled nitric oxide measurement: Comparison with the gold standard technique. *Chest*. 2007;131:410–4.
22. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: Methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005;26:523–48.
23. Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA, et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:694–9.
24. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1364–70.
25. Chow S, Thomas PS, Malouf M, Yates DH. Exhaled breath condensate (EBC) biomarkers in pulmonary fibrosis. *J Breath Res*. 2012;6:016004.
26. Chow S, Campbell C, Sandrini A, Thomas PS, Johnson AR, Yates DH. Exhaled breath condensate biomarkers in asbestos-related lung disorders. *Respir Med*. 2009;103:1091–7.
27. Gaston B, Hunt JF. Measurement of exhaled breath condensate pH: Implications for pathophysiology and monitoring of inflammatory airway diseases. En: Montuschi P, editor. *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation: Analysis of Exhaled Breath Condensate*. Washington, DC: CRC Press; 2005. p. 73–84.
28. Montuschi P. Analysis of exhaled breath condensate: Methodological issues. En: Montuschi P, editor. *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation: Analysis of Exhaled Breath Condensate*. Washington, DC: CRC Press; 2005. p. 11–30.
29. Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, Witt C, Meisel C, Hanitsch LG, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:R111.
30. George SC, Hogman M, Permutt S, Silkoff PE. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. *J Appl Physiol*. 2004;96:831–9.
31. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol*. 1998;85:653–66.
32. Moodley YP, Laloo UG. Exhaled nitric oxide is elevated in patients with progressive systemic sclerosis without interstitial lung disease. *Chest*. 2001;119:1449–54.
33. Malerba M, Radaeli A, Ragnoli B, Airo P, Corradi M, Ponticello A, et al. Exhaled nitric oxide levels in systemic sclerosis with and without pulmonary involvement. *Chest*. 2007;132:575–80.
34. Tiev KP, Cabane J, Aubourg F, Kettaneh A, Ziani M, Mouthon L, et al. Severity of scleroderma lung disease is related to alveolar concentration of nitric oxide. *Eur Respir J*. 2007;30:26–30.
35. Girgis RE, Gughani MK, Abrams J, Mayes MD. Partitioning of alveolar and conducting airway nitric oxide in scleroderma lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1587–91.
36. Fajac I, Kahan A, Menkes CJ, Dessanges JF, dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT. Increased nitric oxide in exhaled air in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 1998;16:547–52.
37. Ryter SW, Choi AM. Carbon monoxide in exhaled breath testing and therapeutics. *J Breath Res*. 2013;7:017111.
38. Hughes JM. The single breath transfer factor (Tl,co) and the transfer coefficient (Kco): A window onto the pulmonary microcirculation. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2003;23:63–71.