

Abordaje integral del paciente con asma por alergia al polen del olivo

Manuel Alcántara Villar (Coord.)





CAPÍTULO 10

Evaluación de la inflamación. Óxido nítrico en aire exhalado

Carmen Segura Sánchez

Servicio de Alergología.

Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.

1. Introducción

En la actualidad se acepta que la inflamación bronquial es la alteración fundamental en el asma¹ y, por este motivo, durante los últimos años se han realizado importantes esfuerzos para identificar marcadores de inflamación bronquial mediante métodos no invasivos. En este sentido, la determinación de estos marcadores en aire exhalado o en el condensado del aire exhalado resulta extremadamente atractiva.

El aire exhalado contiene mediadores volátiles como el óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), etano y pentano²⁻⁶ y sustancias no volátiles como el peróxido de hidrógeno^{7, 8}. Sin duda, la determinación de NO exhalado (FENO) ha recibido mayor atención que cualquiera de los otros mediadores enumerados, de manera que durante los últimos 7 años se han publicado cientos de investigaciones sobre este mediador en el asma.

2. Producción de óxido nítrico en las vías aéreas

El NO endógeno se produce a partir de la L-arginina, mediante la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS) (figura 1). Existen al menos tres isoformas de esta enzima, dos de las cuales se expresan constitutivamente e incluyen la NOS neuronal (NOS1 o nNOS), expresada predominantemente en las neuronas y la NOS endotelial (NOS3 o eNOS), que se expresa sobre todo en las células endoteliales.

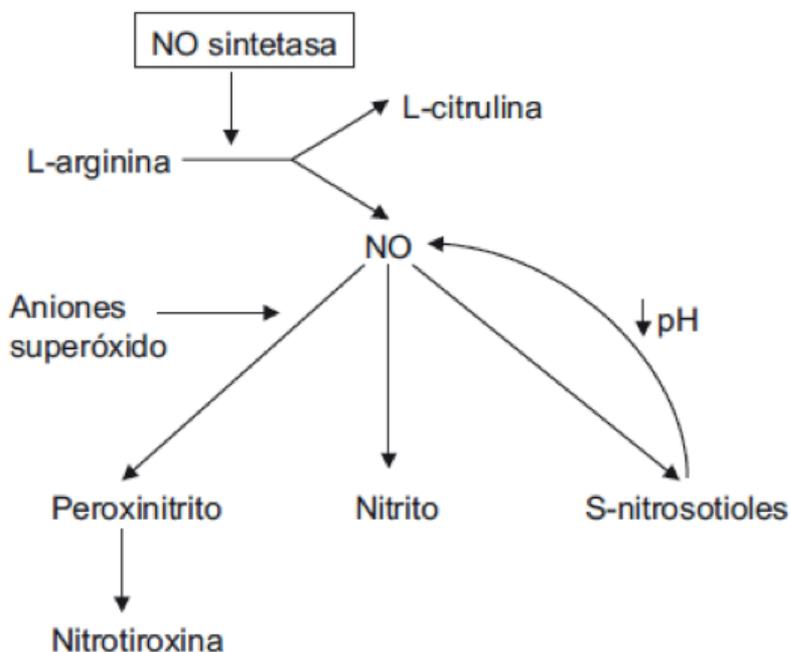
La tercera isoforma es la inducible (NOS2 o iNOS), que tiene una actividad mucho mayor que las anteriores y puede inducirse por citocinas inflamatorias, endotoxinas e infecciones víricas y cuya expresión se incrementa en las enfermedades inflamatorias⁹⁻¹⁵. No obstante, recientemente se ha demostrado que, en individuos con asma, tanto la inhalación de L-arginina como de D-argininase asociaba con aumentos significativos de las concentraciones de NO exhalado. Puesto que la D-arginina no es un sustrato para la NOS, estos resultados sugieren que el incremento de las concentraciones de NO exhalado en determinadas enfermedades respiratorias pudiera deberse, al menos en parte, a su generación a través de una vía no enzimática¹⁶.

No se han identificado con precisión las células del aparato respiratorio que producen NO, aunque parece probable que, en gran medida, este mediador proceda de las células del epitelio bronquial. Existen evidencias de que los pacientes asmáticos muestran un incremento de la expresión de NOS2 en las células epiteliales bronquiales^{9, 15}. Además, las infecciones víricas se asocian con aumentos transitorios de las concentraciones de FENO y se ha demostrado que la infección por rinovirus o por virus respiratorio sincitial induce la expresión de NOS2 por las células epiteliales

de los pacientes con asma, probablemente como consecuencia de un aumento de la transcripción a través de determinados factores de transcripción como el STAT-1 y el factor nuclear kB (NFkB)^{17,18}. La NOS2 puede expresarse también en otros tipos de células como los macrófagos alveolares, eosinófilos y otras células inflamatorias¹⁹, pero la contribución de cada célula a las concentraciones de FENO es desconocida.

El NO puede generarse también a través de mecanismos independientes de la NOS. En una importante proporción, el NO se libera a partir de los s-nitrosotioles (figura 1) y también a partir de la protonación del nitrito para formar nitroso, que libera NO a pH ácido. Se ha demostrado que esta vía de generación de NO pH-dependiente es importante durante los episodios agudos de asma, en los que ocurre un descenso del pH en las vías aéreas²⁰.

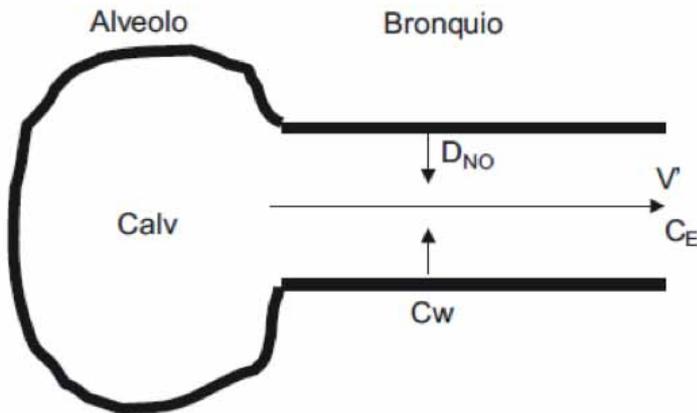
Figura 1. Síntesis de óxido nítrico (NO) en las vías aéreas



La producción de NO en las vías aéreas y los efectos de los diferentes factores que pueden influir sobre su determinación en el aire exhalado puede explicarse utilizando un modelo bicompartimental²¹. El primer compartimento es el alveolar y el segundo el bronquial (figura 2).

Durante la espiración, el aire del alveolo es transportado a través de las vías aéreas y enriquecido por el NO que difunde desde la pared de las mismas. De acuerdo con la ley de Fick, la liberación de NO hacia la luz bronquial es proporcional a la diferencia de concentraciones entre la pared bronquial y la luz. Por tanto, en cada punto de la luz bronquial existen dos factores que determinan la concentración de NO en el aire en tránsito. El primero es el flujo de aire desde la parte distal de la luz bronquial hasta el punto en cuestión. El segundo factor es la capacidad de difusión del NO desde la pared bronquial hacia la luz. De acuerdo con esto, la concentración al final del tubo bronquial, es decir, el nivel de FENO, es el resultado acumulativo del transporte longitudinal más la difusión lateral de NO a lo largo del tubo bronquial completo. El valor inicial para este proceso viene determinado por la concentración de NO en el aire alveolar (fig. 2).

Figura 2. Modelo bicompartimental para el análisis de óxido nítrico (NO) exhalado. C_{alv} = concentración alveolar de óxido nítrico; V' = flujo; C_w = concentración de óxido nítrico en la pared de las vías aéreas; C_E = concentración de óxido nítrico en aire exhalado; D_{NO} = capacidad de difusión de óxido nítrico.



La difusión de NO hacia la luz bronquial viene determinada por la concentración de NO en la pared bronquial (C_w). Esta concentración es el resultado de un equilibrio entre su producción y su eliminación, que incluye la pérdida por difusión hacia la luz bronquial. Además, el flujo espiratorio es un factor que tiene una influencia decisiva sobre la concentración de NO en el aire exhalado (al final del tubo). A flujos altos, el tiempo para que el NO difunda hacia la columna de aire disminuye. Finalmente, la capacidad de difusión de NO (D_{NO}) debe disminuir cuando la pared bronquial este engrosada y debe aumentar cuando la superficie de difusión se incremente.

Parece razonable esperar que la superficie de difusión disminuya durante la broncoconstricción, lo que estaría en concordancia con las reducciones de la concentración de NO exhalado que se han observado tras la broncoconstricción con histamina o con agonistas indirectos^{22,23}. Por otra parte, la superficie del área implicada en la producción de NO pudiera estar incrementada en los pacientes con asma, comparado con los individuos sanos, como consecuencia de que el proceso inflamatorio (generador de NO) se extiende hasta las vías aéreas más pequeñas. En gran parte, este modelo es teórico, pero permite comprender muchos de los hallazgos experimentales que se indicaran posteriormente.

3. Maniobra y dispositivos de medición del óxido nítrico en el aire exhalado

El FENO se puede medir mediante procedimiento on line (la muestra se analiza directamente en el dispositivo, en tiempo real) y off line (el aire exhalado se almacena en balones apropiados y la cuantificación del gas se hace con posterioridad); los primeros son los más utilizados en la práctica clínica habitual. Los niveles de FENO son inversamente proporcionales al flujo espiratorio. Por esta dependencia del flujo, las normativas internacionales recomiendan medir el FENO a un flujo de 50 mL/s. Por otra parte, la espiración contra una presión espiratoria positiva origina el cierre del velo del paladar e impide que el NO de las vías aéreas superiores origine un valor falsamente elevado de FENO. De hecho, las concentraciones de NO nasal son muy altas en comparación con las de las vías aéreas bajas, especialmente de los senos para nasales.

El procedimiento on line más habitual para determinar el FENO es la técnica de la respiración única, en la que el sujeto inhala gas libre de NO hasta capacidad pulmonar total para espirar a 50 mL/s durante unos 6 s aproximadamente, tiempo requerido para que el FENO alcance una meseta. La maniobra se ha de repetir tres veces para garantizar su reproducibilidad.

La medición del FENO es fácil de llevar a cabo, altamente reproducible y responde a cambios en el estado subyacente de la enfermedad. Además, esta estandarizada a raíz de la publicación conjunta de una normativa por la European Respiratory Society (ERS) y la American Thoracic Society (ATS), pero uno de los principales problemas que plantea la aplicación clínica de la medición es que se realiza mediante diferentes dispositivos, obteniendo resultados dispares para un mismo paciente. Un grupo español encontró que el dispositivo electroquímico NIOX-MINO[®] que medía valores de FENO más altos que el aparato de quimioluminiscencia N-6008[®] en una población de individuos sanos y no fumadores²⁵.

4. Factores que influyen en la medición

El FENO puede verse afectado por el tipo de dispositivo utilizado para su medición, como hemos señalado antes, por la técnica, el flujo utilizado, la contaminación nasal, la edad, el sexo, la altura, el hábito tabáquico, el tratamiento utilizado (especialmente corticoides inhalados y antileucotrienos) y por la coexistencia de una infección respiratoria o de un fenotipo atópico.

Se sabe, sin sombra de duda, que el hábito tabáquico disminuye los niveles de FENO, lo que supone una limitación de la técnica, ya que los asmáticos fumadores son un subgrupo con peor respuesta al tratamiento.

Comúnmente se recomienda que la medición de FENO se realice antes de las maniobras espirométricas y del test de broncodilatador, en la creencia de que estas podrían influir en los resultados. Sin embargo, un estudio de Garriga et al demostró que los valores de FENO no se afectan aunque estas pruebas se realicen inmediatamente antes²⁶.

Un estudio llevado a cabo en una muestra de la población general formada por 1250 adultos de mediana edad demostró que el tabaco disminuía en un 21% los valores de FENO, que incrementos de 10 años en la edad los aumentaban en un 15% y sumar 10 cm sobre la talla acrecentaba un 10% la medición²⁷. Una infección concurrente y el estado de atopia elevaron los valores del FENO en un 9% y un 11% respectivamente. La coexistencia de rinitis también puede empeorar la utilidad diagnóstica y pronóstica del test, probablemente porque algunos pacientes pueden presentar deterioro clínico de los síntomas nasales (esto amentaría los valores del FENO) sin que ello conlleve un peor control del asma²⁸.

Se ha comunicado que el NO presenta valores elevados en la insuficiencia renal crónica, en la cirrosis hepática y en el síndrome hepatopulmonar, en el síndrome de sjögren, en el lupus eritematoso sistémico y en la esclerosis sistémica con hipertensión pulmonar. La ingesta aguda de alcohol puede disminuir el NO en los asmáticos, pero no en los controles sanos. En la insuficiencia cardiaca moderada y grave los niveles de NO están disminuidos. Algunas enfermedades respiratorias como la EPOC, la alveolitis fibrosante, el cáncer, la sarcoidosis, la tuberculosis activa o las bronquiectasias pueden elevar los valores de FENO.

5. Aplicaciones de la determinación de óxido nítrico en aire exhalado

La medición de FENO no se debe usar de forma aislada, debe formar parte de una evaluación global en conjunción con la clínica, función pulmonar, valoración del cumplimiento, estudio de comorbilidades, etc... No debe usarse como un dato aislado para la toma de decisiones porque puede llevar a errores. La guía de la ATS establece una serie de recomendaciones sobre las aplicaciones clínicas de la medición del FENO, catalogadas según el grado de recomendación y el nivel de evidencia existente²⁹. Estas recomendaciones se detallan en la siguiente tabla.

Aplicación	Grados de recomendación	Nivel de evidencia
Diagnóstico de inflamación eosinofílica	Fuerte	Moderado
Estimación de la probabilidad de respuesta a esteroides en pacientes con síntomas respiratorios crónicos	Fuerte	Bajo
Soporte objetivo del diagnóstico de asma	Débil	Moderado
Valores bajos de FENO predicen ausencia de eosinofilia y respuesta a corticoides	Fuerte	Moderado
Valores altos de FENO predicen eosinofilia y respuesta a corticoides	Fuerte	Bajo
Se recomienda monitorizar el FENO en asmáticos	Fuerte	Bajo
Se considera un aumento significativo del FENO el 20% en pacientes con valores altos (>50 ppb) y el 10% en pacientes con valores bajos (<50 ppb)	Débil	Bajo
Se considera un descenso significativo del FENO el 20% en pacientes con valores altos (>50 ppb) y el 10% en pacientes con valores bajos (<50 ppb) y se interpreta como respuesta al tratamiento	Débil	Bajo
Recomendaciones de la American Thoracic Society para el uso clínico de la medición de la fracción de óxido nítrico en aire exhalado (FENO)		

Recomendaciones de la American Thoracic Society para el uso clínico de la medición de la fracción de óxido nítrico en aire exhalado (FENO)

Se han publicado muchos estudios que analizan la utilidad de la medición de FENO como test diagnóstico de asma, pero las poblaciones que incluyen estos estudios son heterogéneas, el número de participantes es variable y los dispositivos empleados son diferentes. En estas condiciones, no es de extrañar que los resultados en cuanto a sensibilidad, especificidad y área bajo la curva ROC sean muy dispares³⁰⁻³⁴.

A pesar de ello se ha decidido incorporar el FENO al algoritmo diagnóstico de asma, situando el punto de corte en 30 ppb, lo que resulta controvertido si se tienen en consideración los resultados de trabajos anteriores³⁵. No parece que un paciente sintomático con valores claramente elevados plantee muchas dudas sobre el diagnóstico de asma, pero valores normales no descartan la enfermedad; además valores que se sitúan en la zona gris (30-50 ppb) son de difícil interpretación y se debe tener en cuenta el dispositivo utilizado y las circunstancias concretas de cada caso.

6. Relación entre las concentraciones de óxido nítrico exhalado y los marcadores de inflamación bronquial

Un total de 8 estudios han determinado la relación entre el FENO y la proporción de eosinófilos en muestras de esputo inducido. Siete encontraron correlación estadísticamente significativa³⁶⁻⁴². En muestras de biopsia bronquial, los resultados han sido más discordantes, pues dos estudios encontraron correlación significativa^{43,44}, mientras que otro no pudo detectarla⁴⁵. Finalmente, todos los estudios publicados hasta la actualidad han encontrado correlación entre la eosinofilia en sangre^{46,47} o en el lavado broncoalveolar⁴⁸ y las concentraciones de FENO.

No obstante, en los estudios que identificaron correlación significativa entre el grado de inflamación eosinofílica y las concentraciones de FENO, esta fue bastante débil, lo que parece indicar que los niveles elevados de FENO traducen algunos, pero no todos, de los aspectos de la inflamación bronquial en el asma. Son necesarios estudios que determinen la relación entre las concentraciones de FENO y marcadores de inflamación diferentes de los relacionados con la presencia o activación de los eosinófilos. Además, puesto que la relación entre las concentraciones de FENO y el grado de inflamación eosinofílica desaparece en los pacientes tratados con corticoides inhalados^{38,41,42}, parece que la información proporcionada por cada parámetro, para determinar la respuesta al tratamiento, no es intercambiable. Indudablemente, esto debe determinarse en estudios prospectivos.

7. Utilidad de la determinación de óxido nítrico exhalado para el control evolutivo del asma

Han sido muchos los estudios que han demostrado que los parámetros de función pulmonar habitualmente recomendados para el control evolutivo del asma no son suficientemente sensibles ni específicos para determinar la presencia e intensidad de la inflamación bronquial⁴⁹⁻⁵¹ o sus modificaciones como consecuencia del tratamiento antiinflamatorio^{52,53}. En consecuencia, parecen necesarios marcadores no invasivos, que aporten información acerca de la intensidad de la inflamación bronquial. Durante los últimos años, algunos autores han investigado la utilidad de la determinación de FENO para el control evolutivo del asma.

Horvath et al³⁹ concluyeron que la determinación de peróxido de hidrogeno en el condensado del aire exhalado parecía más útil que el NO para evaluar el grado de inflamación en los pacientes con asma. Sin embargo, estos autores no aportan datos prospectivos y fundamentan su conclusión en el grado de correlación de cada uno de los mediadores con los parámetros de función pulmonar.

Parece evidente que muchos pacientes asmáticos controlados con una dosis moderadamente elevada de corticoides inhalados, se mantienen estables tras reducir drásticamente la dosis de estos fármacos. Sin embargo, algunos otros se agudizan tras reducir las dosis del corticoide. La determinación de FENO pudiera ayudar a identificar estas dos poblaciones, proporcionando una información extremadamente útil desde un punto de vista clínico y evitando el sobre tratamiento con corticoides inhalados. Este ha sido el objetivo de algunos estudios recientes.

Jatakanon et al⁵⁴ seleccionaron un grupo de pacientes con asma que permanecían en situación estable utilizando dosis altas de corticoides inhalados. Se redujeron drásticamente las dosis de estos fármacos y se observó la evolución de la enfermedad y su relación con las modificaciones de las concentraciones de FENO. Estos autores encontraron que las concentraciones de FENO, antes de reducirla dosis de corticoides inhalados, eran similares en los pacientes que se deterioraban y en aquellos que permanecían adecuadamente controlados.

En consecuencia, concluyeron que la determinación de FENO no parecía útil para indicar una reducción de las dosis de corticoides en los asmáticos estables. Sin embargo, cuando se analizaron las modificaciones de las concentraciones de FENO tras reducir las dosis de corticoides inhalados, se observó que estas eran mayores en los pacientes que se agudizaron que en aquellos que permanecieron estables. Estos datos sugieren que las modificaciones de las concentraciones de FENO pueden identificar precozmente a los pacientes asmáticos que se descompensaran tras reducir la dosis de corticoides inhalados. Esto parece razonable, si se tiene en

cuenta que las concentraciones de FENO se relacionan bien con los síntomas de asma durante los días previos⁵⁵.

Más recientemente, Leuppi et al⁵⁶ han estudiado la relación entre las modificaciones de FENO y de los parámetros clásicos de control del asma, tras reducir las dosis de corticoides inhalados, en un grupo de 50 pacientes. Las dosis del corticoide inhalado se redujeron a la mitad cada 8 semanas y, si los pacientes continuaban estables con dosis de 200 µg al día de budesonida o de 125 µg al día de fluticasona, se suspendieron estos fármacos. Estos autores encontraron que la determinación de FENO no resultaba útil para identificar a los pacientes que se agudizaban tras reducir las dosis de corticoides inhalados ni para identificar precozmente estas agudizaciones.

Por otra parte, Jones et al⁵⁷ han encontrado que, en pacientes asmáticos estabilizados con corticoides inhalados, la determinación de las modificaciones de FENO, durante un periodo de observación de 8 semanas, resultaba útil para identificar a los pacientes que se agudizaban tras la retirada de estos fármacos.

A la vista de los resultados de los estudios anteriores, es evidente que la información acerca de la utilidad de la determinación de FENO para el control evolutivo del asma es escasa y contradictoria, por lo que determinadas opiniones recientes parecen precipitadas⁵⁸. Puede ayudar a detectar la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias, determinando la probabilidad de respuesta al tratamiento con corticosteroides, monitorizando el control de la inflamación para ajustar la dosis de corticosteroides necesaria, y permitiendo descubrir la falta de adherencia al tratamiento en pacientes poco cumplidores. Es importante recalcar que dicha determinación no debe usarse de forma aislada, ya que puede estar elevada en otras enfermedades. Sin embargo, la medición de FENO puede resultar de utilidad en la práctica clínica en un grupo de pacientes con asma leve y función respiratoria normal, ya que es el reflejo de la actividad inflamatoria subyacente.

8. Bibliografía

- 1) NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE. (1997). «Guidelines for the diagnosis and management of asthma», NIH Publication 9, pp.4051,
- 2) GUSTAFFSON, L.E. (1991). «Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans», *Brioché Biopsy's Res Common* 181, pp. 852-857.
- 3) ZAYASI, K. (1997). «Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients», *Am J Respir Crit Care Med* 156, pp. 1140-1143.

- 4) HORVATH, I. (1998). «Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker for oxidative stress», *Thorax* 53, pp. 668-672.
- 5) KNEEEPCKENS, C.M. (1992). «The hydrocarbon breath test in the study of lipid peroxidation: principles and practice», *Clin Invest Med* 15, pp.163-186.
- 6) SEABRA, L. (1991). «A system for the quantitative determination of hydrocarbons in human breath», *J Pharm Biomed Annal* 9, pp. 693-697.
- 7) NOWAK, D. (1996). «Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers», *Eur Respir J* 9, pp. 652-657.
- 8) DOHLMAN, A.W. (1993). «Expired breath hydrogen peroxides a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma», *Am Rev Respir Dis* 148, pp. 955-960.
- 9) HAMID, Q. (1993). «Induction of nitric oxide synthase in asthma», *Lancet* 342, pp. 1510-1513.
- 10) MARSHALL, H.E. (2000). «NO waiting to exhale in asthma», *Am J Respir Crit Care Med* 161, pp. 685-687.
- 11) TEN HACKEN, N.H.T. (2000). «Increased vascular expression of iNOS at day but not at night in asthmatic subjects with increased nocturnal airway obstruction», *Eur Respir J* 16, pp. 445-451.
- 12) SILKOFF, P.E. (2000). «Endogenous nitric oxide in allergic airway disease», *J Allergy Clin Immunol* 105, pp. 438-448.
- 13) SANDERS, P. (2001). «Rhinovirus infection induces expression of type 2 nitric oxide synthase in human respiratory epithelial cells in vitro and in vivo», *J Allergy Clin Immunol* 107, pp. 235-243.
- 14) KAO, Y.T. (2001). «Induction and regulation of nitric oxide synthase in airway epithelial cells by respiratory syncytial virus», *Am J Respir Crit Care Med* 163, pp. 532-539.
- 15) REDINGTON, A.E. (2001). «Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment», *Thorax* 56, pp. 351-357.
- 16) CHAMBERS, D.C. (2001). «Effect of nebulised L-arginine on exhaled nitric oxide in steroid naive asthma», *Thorax* 56, pp. 602-606.
- 17) GAO, F.H. (2000). «Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis», *J Immunol* 164 pp. 5970-5980.
- 18) XIE, Q. (1994). «Role of transcription factor NFkB/rel in induction of nitric oxide synthase», *J Biol Chem* 269, pp. 4705-4708.
- 19) TIJIMA, H. (2001) «Nitric oxide and protein nitration are eosinophil dependent in allergen-challenged mice», *Am J Respir Crit Care Med* 163, pp. 1233-1240.

- 20) HUNT, J.F. (2000). «Endogenous airway acidification: implications for asthma pathophysiology», *Am J Respir Crit Care Med* 161, pp. 694-699.
- 21) JÖRRES, R.A. (2000). «Modelling the production of nitric oxide within the human airways», *Eur Respir J* 16, pp. 555-560.
- 22) HO, L.P. (2000). «The current single exhalation method of measuring exhaled nitric oxide is affected by airway caliber», *Eur Respir J* 15, pp. 1009-1013.
- 23) DE GOUW, H.W.F.M. (1998). «Exhaled nitric oxide (NO) is reduced shortly after bronchoconstriction to direct and indirect stimuli in asthma», *Am J Respir Crit Care Med* 158, pp. 315-319.
- 24) ATS/ERS (2005). «Recomendaciones for standardized procedures for the on line and off line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide», *Am J Respir Crit Care Med* 171, pp. 912-30.
- 25) FORTUNA, A.M. (2007). «Determinación de óxido nítrico en aire expirado (FENO) mediante un equipo portátil (NIOX-MINO Aerocrine) en población sana», *Arch Bronconeumol* 43, pp. 176-9.
- 26) GARRIGA, T. (2012). «Spirometric maneuvers and inhaled salbutamol do not affect exhaled nitric oxide measurements among patients with allergic asthma», *Respiration* 83, pp. 239-44.
- 27) KARRASCH, S. (2011). «Exhaled nitric oxide and influencing factors in a random population sample», *Respir Med* 105, pp. 713-8.
- 28) PAPAIOANNOU, A.L. (2009). «Exhaled NO may predict loss of asthma control: the effect of concomitant allergic rhinitis», *Eur Respir J* 34, pp.1006-7.
- 29) DWEIK, R.A. (2011). «An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications», *Am J Respir Crit Care Med* 184, pp. 602-15.
- 30) FORTUNA, A.M. (2007). «Diagnostic utility of inflammatory biomarkers in asthma: exhaled nitric oxide and induced sputum eosinophil count», *Respir Med* 101, pp. 2416-21.
- 31) KOWAI, K. (2009). «Exhaled nitric oxide in evaluation of young adults with chronic cough», *J Asthma* 46, pp. 692-8.
- 32) PEDROSA, M. (2010). «Usefulness of exhaled nitric oxide for diagnosing asthma», *J Asthma* 47, pp. 817-21.
- 33) CORDEIRO, D. (2011). «Utility of nitric oxide for the diagnosis of asthma in an allergy clinic population», *Allergy Asthma Proc* 32, pp.119-26.
- 34) MATSUNAGA, K. (2011). «Exhaled nitric oxide cutoff values for asthma diagnosis according to rhinitis and smoking status in Japanese subjects», *Allergol Int* 60, pp. 331-7.
- 35) Guía española para el manejo del asma (GEMA 2009).
- 36) PAREDI, P. (1999). «Changes in exhaled carbon monoxide and nitric oxide levels

- following allergen challenge in patients with asthma», *Eur Respir J* 13, pp. 48-52.
- 37) OBATA, H. (1999). «Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthmatic reaction in patients with western red cedar asthma», *Eur Respir J* 13, pp. 489-495.
 - 38) PIACENTINI, G.L. (1999). «Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children», *Eur Respir J* 13, pp. 1386-1390.
 - 39) HORVATH, I. (1998). «Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma», *Am J Respir Crit Care Med* 158, pp. 1042-1046.
 - 40) JATAKANON, A. (1999). «Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma», *Thorax* 53, pp. 91-95.
 - 41) BERLYNE, G.S. (2000). «A comparison of exhaled nitric oxide and induced sputum as markers of airway inflammation», *J Allergy Clin Immunol* 106, pp. 638-644.
 - 42) TSUJINO, I. (2000). «Exhaled nitric oxide. Is it really a good marker of airway inflammation? », *Respiration* 67, pp. 645-651.
 - 43) PAYNE, D.N.P. (2001). «Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone», *Am J Respir Crit Care Med* 164, pp. 1376-1381.
 - 44) VAN DEN TOORN, L.M. (2001). «Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma», *Am J Respir Crit Care Med* 164, pp. 2107-2113.
 - 45) LIM, S. (2000). «Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma», *Thorax* 55, pp. 184-188.
 - 46) SILVESTRI, M. (1999). «Orally exhaled nitric oxide levels are related to the degree of blood eosinophilia in atopic children with mild-intermittent asthma», *Eur Respir J* 13, pp. 321-326.
 - 47) CRATER, S.E. (1999). «Expired nitric oxide and airway obstruction in asthma patients with an acute exacerbation», *Am J Respir Crit Care Med* 159, pp. 806-811.
 - 48) LIM, S. (1999). «Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation. Assessment by various inflammatory markers in mild asthma», *Am J Respir Crit Care Med* 159, pp. 22-30.
 - 49) CRIMI, E. (1998). «Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma», *Am J Respir Crit Care Med* 157, pp.: 4-9.
 - 50) DJUKANOVIC, R. (1990). «Quantization of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry», *Am Rev Respir Dis* 142, pp.863-871.

- 51) ROSI, E. (1999). «Sputum analysis, bronchial hyperresponsiveness, and airway function in asthma: results of a factor analysis», *J Allergy Clin Immunol* 103, pp. 232-237.
- 52) PIZZICHINI, M.M.M. (1997). «Sputum in severe exacerbations of asthma. Kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment», *Am J Respir Crit Care Med* 155, pp. 1501-1508.
- 53) FAUL, J.L. (1998). «Fluticasone propionate induced alterations to lung function and the immunopathology of asthma over time», *Thorax* 53, pp. 753-761.
- 54) JATAKANON, A. (2000). «Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control», *Am J Respir Crit Care Med* 161, pp. 64-72.
- 55) SIPPEL, J.M. (2000). «Exhaled nitric oxide levels correlate with measures of disease control in asthma», *J Allergy Clin Immunol* 106, pp. 645-650.
- 56) LEUPPI, J.D. (2001). «Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids», *Am J Respir Crit Care Med* 163, pp. 406-412.
- 57) JONES, S.L. (2001). «The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control», *Am J Respir Crit Care Med* 164, pp. 738-743.
- 58) KHARITONOV, S.A. (2001). «Does exhaled nitric oxide reflect asthma control?. Yes, it does! », *Am J Respir Crit Care Med* 164, pp. 727-728.