

# Estudio de la reproducibilidad de la técnica de medición de óxido nítrico en aire exhalado en sujetos sanos

C. Sánchez Gutiérrez, B. Romero Romero, R. Jiménez Solís y J. Castillo Gómez

Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

El óxido nítrico exhalado (NOe) ha quedado establecido como el primer marcador no invasivo de inflamación en las vías aéreas. Las cifras de NOe publicadas ponen de manifiesto una gran variabilidad, y en ocasiones estas diferencias son debidas a la técnica de medición empleada.

**OBJETIVO:** Determinar la reproducibilidad de la técnica utilizada por nuestro grupo y si la concentración de NOe obtenida está sometida a variaciones dependientes de características antropométricas y dieta.

**MÉTODO:** Estudiamos a 20 sujetos sanos (10 varones y 10 mujeres) con una edad media de 28,21 años. A todos se les realizaron mediciones seriadas de NOe en ayunas (N1), 30 min tras la ingestión de verduras (N2) y 30 min tras la ingesta de carne/pescado (N3). Cada valor (N1, N2, N3) era la media aritmética de tres mediciones consecutivas separadas 10 min entre sí. Medimos el NOe por método directo de quimioluminiscencia con flujo controlado descartando el aire del espacio muerto y con generación de presión en cavidad oral suficiente para cerrar el paladar blando (analizador Eco Physics CLD 77AM).

**RESULTADOS:** Obtuvimos una concentración media  $\pm$  desviación estándar (DE) para N1 de  $3,40 \pm 1,30$  ppb; para N2 de  $4,03 \pm 1,00$  ppb y para N3 de  $3,71 \pm 1,05$  ppb. Las diferencias observadas entre estas tres determinaciones no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Las mediciones seriadas (separadas 10 min) realizadas tampoco evidenciaron cambios significativos entre las mismas. Al estudiar la influencia del sexo sobre el NOe, encontramos que en ayunas la concentración media  $\pm$  DE en las mujeres era de  $3,13 \pm 0,41$  ppb y en los varones  $3,72 \pm 0,31$  ppb sin que estas diferencias fueran significativas. Por último, estudiamos la influencia del índice de masa corporal (IMC) en el NOe, sin encontrar diferencias significativas entre los sujetos con  $IMC \leq 25$  ( $n = 15$ ) y aquellos con  $IMC > 25$  ( $n = 5$ ).

**CONCLUSIONES:** La técnica empleada por nuestro grupo es reproducible y las concentraciones obtenidas de NOe son independientes de la dieta, sexo e IMC.

**Palabras clave:** Óxido nítrico exhalado. Reproducibilidad. Medición.

(*Arch Bronconeumol* 2001; 37: 371-374)

## Reproducibility of a technique for measuring nitric oxide in exhaled air in healthy subjects

Exhaled nitric oxide (NO) has become established as the principal non-invasive marker of airway inflammation. Exhaled NO levels reported in the literature vary greatly, with differences sometimes attributable to measurement technique.

**OBJECTIVE:** To determine the reproducibility of the technique used by our department to measure exhaled NO and to know whether results vary with diet and patient characteristics.

**METHOD:** We studied 20 healthy subjects (10 men and 10 women; mean age 28.21 years). Exhaled NO was measured when the patient was fasting (N1), 30 minutes after intake of vegetables (N2) and 30 minutes after intake of meat/fish (N3). For each measure N1, N2 and N3 we took the average of three consecutive measurements separated by 10 minutes. Exhaled NO was assessed by controlled-flow chemoluminescence after adjusting for trapped air and after generating pressure in the oral cavity that was sufficient to close the soft palate (Eco Physics CLD 77AM analyzer).

**RESULTS:** The mean concentration was  $3.40 \pm 1.30$  ppb for N1,  $4.03 \pm 1.00$  ppb for N2 and  $3.71 \pm 1.05$  ppb for N3. The differences between measurements were not statistically significant ( $p > 0.05$ ). Nor were differences between the sets of three measurements significant. The mean concentration was  $3.13 \pm 0.41$  ppb for women and  $3.72 \pm 0.31$  ppb for men (ns). No significant differences were related to body mass index  $\leq 25$  ( $n = 15$ ) or  $> 25$  ( $n = 5$ ).

**CONCLUSIONS:** The technique our department uses for measuring exhaled NO is reproducible and differences are unrelated to food intake, sex or body mass index.

**Key words:** Exhaled nitric oxide. Reproducibility. Measurement.

## Introducción

En el pasado, el óxido nítrico (NO) era considerado exclusivamente como un contaminante ambiental. El descubrimiento a finales de los años ochenta de que el

Correspondencia: Dra. C. Sánchez Gutiérrez.  
Castillo de Aroche, 1, pta. 124. 41013 Sevilla.  
Correo electrónico: mari1959@separ.es

Recibido: 9-1-01; aceptado para su publicación: 26-6-01.

TABLA I  
Características de la población

	Media $\pm$ DE
Talla (cm)	170,84 $\pm$ 8,19
Peso (kg)	69,37 $\pm$ 15,05
Edad (años)	28,21 $\pm$ 2,18

Resultados expresados en media  $\pm$  desviación estándar.

vasodilatador endógeno arterial dependiente de la presencia del endotelio (*endothelium derived relaxant factor*, o EDRF) y el NO eran en realidad la misma molécula indujo una explosión de investigaciones acerca de este gas. Como resultado de dichos estudios quedó demostrado que, debido a sus características químicas, pequeño tamaño, gran reactividad y difusibilidad, el NO participa como molécula mensajera en gran número de procesos tanto fisiológicos como patológicos en el organismo<sup>1</sup>. Es en el campo de la neumología donde podemos encontrar mayor evidencia de la importancia creciente de este gas. Estudios previos han demostrado valores aumentados de NO exhalado (NOe) en pacientes con asma<sup>2-5</sup> y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)<sup>6</sup>. De esta forma ha quedado establecido el NOe como el primer marcador no invasivo de inflamación en las vías aéreas<sup>7</sup>. Los valores de NOe publicados ponen de manifiesto gran variabilidad, y en ocasiones estas diferencias son debidas a la técnica de medición empleada<sup>8-11</sup>. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue determinar la reproducibilidad de la técnica utilizada por nuestro grupo y si la concentración de NOe obtenida está sometida a variaciones dependientes de características antropométricas y de la dieta.

## Material y método

### Población

Estudiamos a 20 sujetos (10 varones y 10 mujeres) con edades comprendidas entre los 25 y los 35 años. Las características antropométricas del grupo se describen en la tabla I.

Los criterios de inclusión fueron:

- Adultos sanos no fumadores.
- Historia clínica y exploración física sin datos de enfermedad crónica significativa ni embarazo.
- Asintomáticos desde el punto de vista respiratorio, sin evidencia de proceso inflamatorio en vías aéreas en el mes previo.
- Tests cutáneos negativos a los neuroalergenos habituales (*Dermatophagoides*, pólenes, hongos y epitelio de animales) como método para descartar atopia.

### Técnica de medición de óxido nítrico exhalado

El analizador utilizado fue el Eco Physics CLD77 AM, que, mediante quimioluminiscencia, calcula concentraciones de NOe (*fractional exhaled NO concentration* o FE<sub>NO</sub>) en partes por billón (ppb). Dicho analizador demuestra en tiempo real (tiempo de respuesta menor de 2 s), tanto la FE<sub>NO</sub> como el flujo en cada ciclo respiratorio. El sistema era calibrado semanalmente requiriéndose para ello aire libre de NO por un lado, y un gas con NO en N<sub>2</sub> a una concentración conocida de 30 ppm. Ambos gases eran suministrados al analizador a una presión absoluta de 3-9 bar. La calibración era realizada en un tiempo comprendido entre 60 y 250 s. Previamente a cada medición, y con el objetivo de que ésta fuese lo más exacta posible, establecíamos el punto cero del analizador. Con el fin de evitar la contaminación del resultado con NO nasal empleamos una boquilla cilíndrica con un diámetro de 2 cm. Ha quedado demostrado en trabajos previos<sup>7-9,11-13</sup> que este tipo de dispositivo crea una resistencia que consigue una presión en la cavidad oral durante la espiración de 15-20 cmH<sub>2</sub>O. Ésta desplaza el paladar blando aislando de esta forma la rinofaringe de la orofaringe.

Para una correcta medición de NO exhalado cada sujeto realizaba varios ciclos respiratorios a volumen corriente conectado al analizador mediante la boquilla descrita durante un minuto. La boquilla se conecta a una válvula bidireccional (válvula de Rudolph), que asegura la inspiración de aire libre de NO proporcionado por nuestro sistema. Con estas maniobras evitábamos la contaminación por NO nasal y ambiental. Tras este tiempo el sujeto realizaba una maniobra de inspiración forzada seguida de una espiración a un flujo de 0,05 l/s durante 7-10 s contra la resistencia proporcionada por la boquilla<sup>11</sup>. El resultado era expresado en una curva que presenta un pico inicial y finaliza en una meseta (fig. 1). Es en el cuarto final de esta meseta donde se medía la FE<sub>NO</sub>, despreciando de esta forma el NO procedente del espacio muerto.

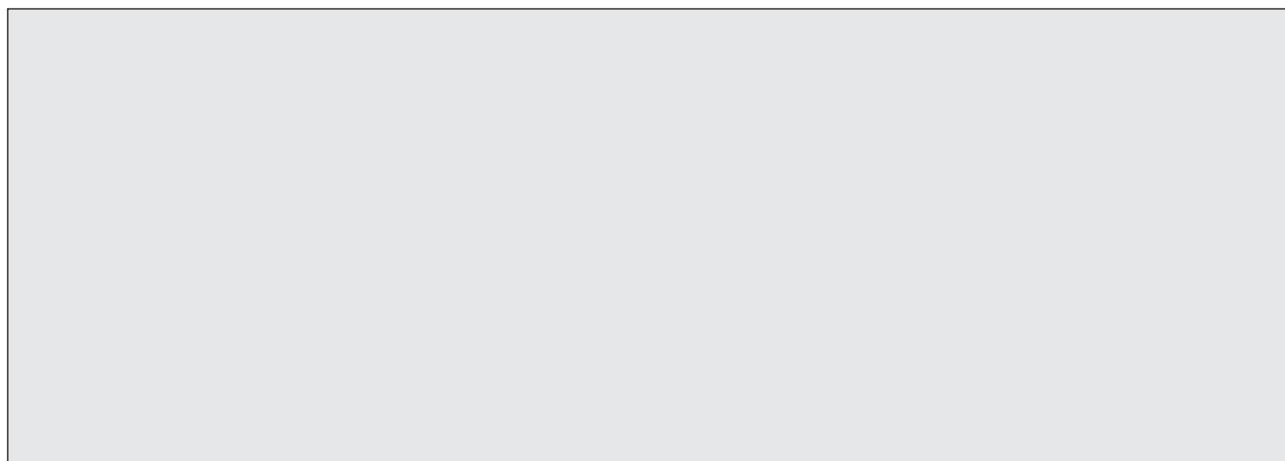


Fig. 1. Curva de óxido nítrico en un sujeto varón sano no fumador. ppb: parte por billón.

TABLA II  
FE<sub>NO</sub> media para cada dieta

Dieta	NOe (ppb)
Ayunas	3,40 ± 1,30
Verduras	4,03 ± 1,00
Carne/pescado	3,71 ± 1,05

Resultado expresado en media ± desviación estándar.

TABLA III  
Diferencias de NOe según las dietas

	Incremento	p
N1-N2	0,63	NS
N2-N3	-0,32	NS
N1-N3	0,31	NS

N1: determinación de NOe realizada en ayunas; N2: determinación de NOe realizada tras la ingesta de verduras de hoja verde; N3: determinación de NOe realizada tras la ingesta de carne/pescado; NS: no significativo.

TABLA IV  
Diferencias en NOe en función del sexo

Sexo	N1 (ppb)
Varones	3,13 ± 0,41*
Mujeres	3,72 ± 0,31*

Resultados expresados en partes por billón (ppb).

N1: determinación de NOe realizada en ayunas; \*Diferencias no significativas.

TABLA V  
Diferencias en NOe en función del índice de masa corporal (IMC)

NOe	IMC ≥ 25 (n = 15)	IMC < 25 (n = 5)
N1	3,40	3,10
N2	3,78	3,72
N3	3,25	3,40

Resultados expresados en partes por billón (ppb).

N1: determinación de NOe realizada en ayunas; N2: determinación de NOe realizada tras la ingesta de verduras de hoja verde; N3: determinación de NOe realizada tras la ingesta de carne/pescado. Diferencias no significativas.

El pico inicial representa, por un lado, el NO procedente de rinofaringe al inicio de la inspiración, cuando el velo del paladar se está cerrando, y por otro, al NO que existe en la cavidad oral<sup>8, 9,11,13,14</sup>.

#### Protocolo de estudio

A todos los sujetos seleccionados se les realizaron mediciones seriadas de NO exhalado mediante el analizador Eco Physics CLD77 AM en ayunas (N1), 30 min tras la ingesta de verduras de hoja verde (N2) y 30 min tras la ingesta de carne/pescado (N3), con objeto de ver la influencia de la dieta en la determinación de FE<sub>NO</sub>. Esta maniobra se repitió tres veces en intervalos de 10 min en cada una de las situaciones (ayunas, postingesta de carne, postingesta de verduras) para, así, poder estudiar la reproducibilidad de la técnica en un mismo paciente.

También estudiamos la variabilidad en las cifras de NOe en función del sexo y de las características antropométricas de los individuos.

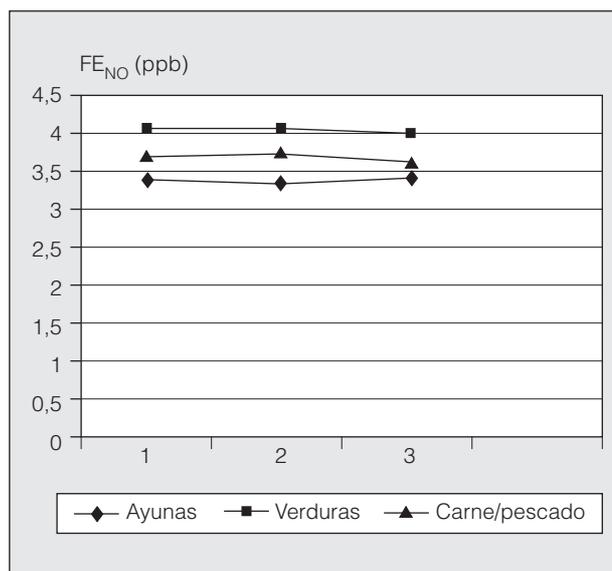


Fig. 2. Reproducibilidad en las mediciones consecutivas de óxido nítrico exhalado (NOe). 1) Media de la medición basal de NOe; 2) media de la segunda medición separada 10 min de la primera; 3) media de la tercera medición separada 20 min de la primera.

#### Estudio estadístico

Los resultados de nuestro estudio fueron analizados mediante el programa SPSS para Windows. Para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los distintos valores de NOe utilizamos el test de Friedman para variables no paramétricas.

#### Resultados

Al estudiar las cifras de NOe obtenidas de forma consecutiva (tres determinaciones separadas por 10 min) en un mismo sujeto, no observamos diferencias significativas entre ellas (fig. 2).

Teniendo en cuenta las diferentes dietas seguidas por nuestro grupo observamos que la FE<sub>NO</sub> media en ayunas (N1) fue de 3,40 ± 1,30 ppb, que tras la ingesta de verduras de hoja verde (N2) fue 4,03 ± 1,00 ppb y después de una comida compuesta por carnes/pescados (N3) la FE<sub>NO</sub> media obtenida fue 3,71 ± 1,05 ppb. No encontramos variaciones apreciables entre estos resultados (tabla II). Al comparar los incrementos en la FE<sub>NO</sub>, en relación con las distintas dietas, observamos que la FE<sub>NO</sub> en ayunas (N1) era inferior a la obtenida tras cualquier tipo de dieta, sin que estos cambios fuesen significativos. También comprobamos que tras una dieta compuesta por verduras de hoja verde (N2) se obtenían cifras de NOe superiores al resto de las determinaciones (ayunas, postingesta de carne/pescado) sin que estas variaciones fuesen estadísticamente significativas (tabla III).

También estudiamos la influencia del sexo sobre el NOe. La población estudiada se repartió en 10 varones y 10 mujeres. En ayunas (N1), la FE<sub>NO</sub> determinada en las mujeres era de 3,13 ± 0,41 ppb y en los varones, 3,72 ± 0,31 ppb. No encontramos diferencias valorables entre estas dos cifras (tabla IV).

Por último, estudiamos la influencia del índice de masa corporal (IMC) en la  $FE_{NO}$ , observando que no existen diferencias estadísticamente significativas en la eliminación de NO a través del aire exhalado entre aquellas personas con un  $IMC \leq 25$  ( $n = 15$ ) y aquellas personas con un  $IMC > 25$  ( $n = 5$ ), tal como se recoge en la tabla V.

## Discusión

El principal objetivo de este estudio fue comprobar si la técnica de medición de NOe empleada por nuestro grupo (método directo con flujo controlado, descartando el aire del espacio muerto y con generación de presión en cavidad oral suficiente para cerrar el paladar blando) era reproducible tal y como queda reflejado en trabajos previos de otros grupos<sup>8-11</sup>. Para ello realizamos mediciones consecutivas de NOe en cada sujeto sin obtener diferencias significativas entre ellas. De esta forma, llegamos a la conclusión de que la medición repetida de NOe no modifica en sí la concentración exhalada de este gas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Silkoff et al<sup>12</sup> en su estudio sobre la reproducibilidad de la técnica y la influencia de la repetición de la misma en la  $FE_{NO}$  medida, aunque su población era más reducida. Borland et al<sup>15</sup> utilizaron la misma técnica empleada por nosotros para medir el NOe. La población estudiada en su trabajo estaba compuesta por 8 sujetos sanos (6 mujeres) con edades comprendidas entre los 28 y los 58 años. Los valores de NOe conseguidos oscilaban entre 3 y 12,3 ppb. Tanto la edad como las concentraciones de NOe en el estudio de Borland et al eran superiores a las del nuestro. Hasta el momento sólo existe un estudio en niños asmáticos en el que se demuestra que el NOe aumenta con los años<sup>16</sup>. No existe evidencia en adultos de esta influencia<sup>17</sup>, por lo que podemos atribuir las diferencias observadas al reducido tamaño muestral más que a la edad superior de los sujetos.

Otro de los objetivos de nuestro estudio fue comprobar si la dieta, el sexo y el IMC influyen en las  $FE_{NO}$ . En cuanto a la dieta, sabemos que en ciertas verduras de hoja verde, como las lechugas y las espinacas, se han encontrado grandes cantidades de nitratos capaces de incrementar la concentración de nitratos y nitritos en la saliva, aumentando de esta forma el NOe<sup>18</sup>. Tan sólo disponemos de un estudio en el que se evidencia un aumento significativo en el NOe tras la ingestión de lechuga, aunque esta contaminación puede evitarse con lavados orales antes de cada medición<sup>14</sup>. Por otro lado, en la actualidad, no hay datos suficientes en la bibliografía para determinar el tiempo en que los pacientes deberían de estar en ayunas previamente a la medición de NOe. En las recomendaciones de la American Thoracic Society<sup>11</sup> para la medición de NOe y NO nasal se aconseja, al menos hasta que sea un tema mejor conocido, que el paciente permanezca en ayunas durante la hora previa a la medición. Para estudiar la influencia de este tipo de verduras en los valores obtenidos de NOe realizamos tres mediciones a cada sujeto (en ayunas y tras distintos tipos de dieta) comprobando que tras la dieta, sobre todo si ésta está compuesta por verduras, la  $FE_{NO}$  es mayor, sin que estas diferencias sean estadísti-

camente significativas. Con estos resultados no creemos necesario realizar ninguna maniobra especial respecto a la dieta a la hora de medir el NOe.

Sobre la influencia del sexo en el NOe disponemos de un trabajo previo<sup>17</sup> en el que, al igual que nosotros, no se observan diferencias dependientes de este factor. No existen estudios previos sobre la influencia del IMC en el NOe. En nuestro trabajo hemos observado que los valores de NOe no están sometidos a ningún tipo de influencia en este sentido.

Por último, respecto al efecto del ritmo circadiano sobre el NOe aún no hay estudios concluyentes. Según Silkoff et al<sup>8</sup>, no existen diferencias en la  $FE_{NO}$  a lo largo del día, aun así, creímos prudente la realización de la medición siempre a la misma hora, con el fin de evitar posibles cambios por este motivo.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la técnica empleada por nuestro grupo para la medición de NOe es reproducible y que los valores obtenidos son independientes de la dieta, del sexo y del IMC.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Michael Hart CM. Nitric oxide in adult lung disease. *Chest* 1999; 115: 1407-1417.
2. Crater SE, Peters EJ, Martin ML. Expired nitric oxide and airway obstruction in asthma patients with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 806-811.
3. Gómez FP, Martínez Pallí G, Barbera JA et al. Measurement of exhaled nitric oxide in healthy subjects. *Med Clin (Barc)* 1998; 11: 1-5.
4. Giner Muñoz M. Exhaled nitric oxide. *Allergol Immunopathol* 2000; 28: 124-135.
5. Estela del Río Navarro B, Salgado Rabadán C. Exhaled nitric oxide as marker of inflammation in children with asthma. *Rev Alerg Mex* 1999; 46: 166-170.
6. Corradi M, Majori M, Cacciani GC. Increased exhaled nitric oxide in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54: 572-575.
7. Salome CM, Roberts AM, Brown NJ. Exhaled nitric oxide measurement in a population sample of young adults. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 911-916.
8. Silkoff PE, McLean PA, Slutsky AS. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 260-267.
9. Robbins RA, Floreani AA, Von Essen SG. Measurement of exhaled nitric oxide by three different techniques. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1631-1635.
10. Paredi P, Loukides S, Ward S, Cramer D. Exhalation flow and pressure controlled reservoir collection of exhaled nitric oxide for remote and delayed analysis. *Thorax* 1998; 53: 775-779.
11. American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children-1999. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 2104-2117.
12. Silkoff PE, Wakita S, Chatkin J. Exhaled nitric oxide after  $\beta$ -2 agonists inhalation and spirometry in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 940-944.
13. Kharitonov SA, Barnes PJ. Nasal contribution to exhaled nitric oxide during exhalation against resistance or during breath holding. *Thorax* 1997; 52: 540-544.
14. Zetterquist W, Pedroletti C, Lundberg JO. Salivary contribution to exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 1999; 13: 327-333.
15. Borland C, Cox Y, Higenbottam T. Measurement of exhaled nitric oxide in man. *Thorax* 1993; 48: 1160-1162.
16. Franklin PJ, Taplin R, Stick SM. A community study of exhaled nitric oxide in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 69-73.
17. Jilma B, Kastner J, Mensik C. Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. *Life Sci* 1996; 58: 469-476.
18. Alving K. Methodological aspects of exhaled nitric oxide measurements. *Eur Respir Rev* 1999; 9: 208-211.