

Marcadores de inflamación determinables por métodos no invasivos

J.I. Sierra Martínez

Unidad Integrada de Pediatría. Sección de Inmunoalergia. Hospital Clínico-Hospital Sant Joan de Déu. Universidad de Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN

Los conceptos etiopatogénicos en relación al asma han ido evolucionando rápidamente durante los últimos años, de manera que, en la actualidad, se considera que la inflamación bronquial es la alteración más relevante de la enfermedad. Este carácter inflamatorio del asma se ha acentuado en las diferentes guías y consensos tanto nacionales como extranjeros¹⁻⁴, pero estos documentos siguen considerando los estudios de función pulmonar (espirometría, determinaciones del flujo espiratorio máximo) como el patrón oro para el diagnóstico y control evolutivo de la enfermedad. Esta afirmación equivale a aceptar que los parámetros funcionales son suficientemente sensibles para identificar la presencia e intensidad de la inflamación bronquial.

Se ha detectado inflamación bronquial en los pacientes afectados de asma leve e, incluso, en una importante proporción de pacientes con rinitis alérgica sin evidencia clínica de asma⁵, a pesar de que en estos individuos, tanto las determinaciones espirométricas como la variabilidad del flujo espiratorio máximo (FEM)⁶ eran normales. Además, son muchos los estudios que han encontrado una débil correlación entre los marcadores de inflamación bronquial y las determinaciones espirométricas, lo que sugiere que los parámetros funcionales y los marcadores de inflamación aportan información acerca de aspectos de la enfermedad sólo parcialmente relacionados y que, en consecuencia, unos no pueden sustituir a los otros. Los datos que se conocen parecen indicar que los parámetros funcionales que se recomiendan para el diagnóstico y control del asma no son suficientemente sensibles para identificar la inflamación bronquial.

El estudio de la relación entre la respuesta inflamatoria y la respuesta funcional a determinados es-

tímulos proinflamatorios importantes en el asma, como los alérgenos, las infecciones víricas y determinados contaminantes ambientales, resulta especialmente demostrativa: en pacientes con asma alérgica, se ha demostrado que la inhalación del alérgeno en el laboratorio puede producir inflamación sin que se detecten alteraciones de los parámetros de función pulmonar.

Parece, por tanto, que los estímulos proinflamatorios más importantes en el asma pueden inducir inflamación bronquial que no necesariamente debe traducirse en deterioros del funcionalismo pulmonar.

Para el tratamiento del asma, excepto en las formas más leves, se recomiendan fármacos antiinflamatorios pero se plantean dudas razonables acerca de que los parámetros de función pulmonar sean los más adecuados para evaluar la eficacia del tratamiento.

En definitiva, las evidencias parecen indicar que inflamación bronquial y deterioro de función pulmonar no son términos equivalentes y que la identificación de la respuesta a estímulos proinflamatorios o a fármacos, mediante estudios de función pulmonar, puede conducir a interpretaciones erróneas y aportan una información poco precisa, y en ocasiones equívoca, acerca de la presencia y de la intensidad de la inflamación bronquial en el asma.

En la patogénesis del asma participan numerosas células que segregan una gran variedad de productos, habiéndose estudiado muchos de ellos como posibles marcadores de la inflamación; la importancia de cada uno como marcador dependerá del papel de la célula productora del mismo y del mediador en la cascada inflamatoria, su relación con la situación clínica de los pacientes y la facilidad de su extracción.

En el asma, la biopsia bronquial constituye el patrón estándar para valorar la inflamación de la pared de las vías aéreas, pero al ser un procedimiento agre-

sivo, no es adecuado para su utilización en la práctica clínica habitual. Por ello es deseable disponer de parámetros obtenidos mediante técnicas no invasivas cuya determinación guarde buena correlación con los marcadores evaluados en la luz o en la pared bronquial. Estos parámetros deberían, idealmente, cumplir las siguientes condiciones⁷:

Técnica de obtención de la muestra

- a) Sencilla y rápida.
- b) No invasiva.
- c) Equipamiento accesible bajo el punto de vista económico.
- d) Posibilidad de realizar determinaciones seriadas.
- e) Que el procedimiento no modifique el valor de la muestra.

Método de cuantificación

- a) Sencillo y asequible.
- b) Posibilidad de obtener resultados inmediatos.

Marcador inflamatorio

- a) Función conocida y relevante en la enfermedad.
- b) Modificación de los valores paralela a la situación clínica de la enfermedad.
- c) Correlación con otros marcadores de inflamación, funcionales, clínicos y cuestionarios de calidad de vida.
- d) Que el aumento del marcador se produzca antes y no después de una exacerbación.
- e) No debería liberarse en otras enfermedades distintas del asma.

Con esta finalidad se han estudiado marcadores en diversos fluidos biológicos: sangre, orina, esputo, aire exhalado y condensado del aire espirado; a estas dos últimas exploraciones dedicaremos la exposición.

ANÁLISIS DE LOS GASES EXHALADOS

Óxido nítrico

El óxido nítrico se sintetiza a partir de la L-arginina por una enzima, la óxido-nítrico-sintetasa (ONS) que tiene isoformas constitutivas (ONS-c) e inducibles por lipopolisacáridos o citocinas (ONS-i)⁸.

En condiciones normales el NO se produce en pequeñas cantidades por las ONS-c, es un neurotransmisor no adrenérgico/no colinérgico que regula el tono de las vías aéreas y es un inhibidor de componentes de la cascada inflamatoria, incluyendo la activación leucocitaria, su movilidad y adhesión; junto con estas acciones positivas, tiene acciones potencialmente nocivas cuando se sintetiza bruscamente mediante la inducción de las ONS-i, produciendo:

- Aumento del riego sanguíneo bronquial.
- Efectos citotóxicos directos sobre las células del epitelio respiratorio.
- Aumento de la exudación plasmática de las vías aéreas.
- Alteración del balance Th_1/Th_2 , suprimiendo la función T-helper.

Las ONS-i se encuentran en una amplia variedad de células del tracto respiratorio, incluyendo macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales; su expresión es inducible por endotoxinas y citocinas proinflamatorias, como la $IL-1\beta$ y el $TNF-\alpha$.

La presencia de NO endógeno en el aire espirado fue observada por primera vez en 1991 por Gustafsson et al⁹; en 1993, Alving et al¹⁰ determinaron que el NO espirado aumentaba en los pacientes asmáticos y desde entonces la medición de la fracción exhalada del óxido nítrico (FE_{NO}) se ha validado como forma de cuantificar la inflamación de las vías aéreas y la respuesta al tratamiento antiinflamatorio.

CÓMO MEDIR LA FE_{NO} EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Las concentraciones de NO se miden en ppb (partes por billón) y puede calcularse en el aire exhalado por quimioluminiscencia (se hace reaccionar el NO con ozono en una cámara de reacción en frío, convirtiéndose el NO en NO_2 ; la emisión de luz en la gama infrarroja permite su detección por un tubo fotomultiplicador y su registro) y, más recientemente, se ha desarrollado un método electroquímico, portátil, que ofrece la ventaja de no precisar calibración adicional y que tiene una excelente correlación con el método tradicional.

Las diferencias en las cifras de referencia (que varían según publicaciones) se deben a la existencia de varias técnicas de obtención de las muestras: 1) exhalación lenta desde la capacidad pulmonar total con un flujo constante (habitualmente de 50 ml/s) y contra una resistencia de 5-10 cmH_2O (que evita la contaminación de NO de origen nasal), 2) espiración única y profunda en un globo inerte para el NO y su análisis posterior y, 3) respiración lenta a volumen co-

riente durante dos minutos¹¹. Parece que la técnica más adecuada y utilizada es la primera. En cualquier caso, es fundamental registrar y reflejar el flujo espiratorio al que ha sido realizada la determinación¹².

LA FE_{NO} EN LA VALORACIÓN DEL ASMA

En general, en pacientes adultos, un punto de corte de FE_{NO} de 16 ppb tiene una especificidad elevada para el diagnóstico de asma (90 %) pero una baja sensibilidad (69 %); en cuanto a la edad pediátrica, con un punto de corte de 9,7 ppb la especificidad para el diagnóstico de asma es del 92 % con una sensibilidad del 86 %¹³.

Como herramienta diagnóstica, la determinación de la FE_{NO} permite discriminar entre asmáticos y no asmáticos en pacientes afectados de tos crónica; igualmente, informa sobre la respuesta al tratamiento antiinflamatorio y permite ajustar las dosis de los mismos; idealmente, podría identificar incumplimientos del tratamiento.

FE_{NO} EN LA VALORACIÓN DE OTRAS ENFERMEDADES

La tabla I aporta una relación de procesos que pueden mostrar alteraciones del FE_{NO}; la mayoría de ellos contribuyen a fomentar la evidencia de que la FE_{NO} puede ser considerada como un marcador de inflamación eosinofílica; menos clara es la relación entre los niveles de FE_{NO} y la inflamación pulmonar de origen neutrofílico¹⁴: la mayoría de estudios realizados en enfermedades que se caracterizan por una neutrofilia intensa (fibrosis quística, síndrome de Kartagener, bronquiectasias...) pueden tener cifras por debajo de los controles sanos, posiblemente por la conversión del NO en peroxidonitrito y nitrato por superóxidos generados por los neutrófilos; coherente con este hecho es el dato de que pacientes con síntomas respiratorios debidos a reflujo gastroesofágico (con inflamación neutrofílica de las vías aéreas) tienen cifras normales o bajas de FE_{NO}. Por otro lado, las infecciones virales de vías respiratorias altas, con predominio de linfocitos, se asocian a una elevación del marcador, igual sucede tras la vacunación antigripal¹⁵.

FACTORES QUE PUEDEN MODIFICAR LAS CIFRAS DE FE_{NO}

Además de los niveles ambientales de NO (que pueden variar en relación con el tráfico y estación del año) hay que tener en cuenta un cúmulo de va-

Tabla I

FE_{NO} en diferentes condiciones

Aumento de FE _{NO}	Disminución de FE _{NO}
Asma	Ingestión de alcohol
Rinitis alérgica	Hipertensión sistémica
Atopia	Hipertensión pulmonar
Exposición a alérgenos	Fibrosis quística
Infección de vías respiratorias	
Bronquiectasias	
Cirrosis hepática	
Cáncer de pulmón	
Sepsis	
Gripe	
Lupus eritematoso	
EPOC	
Tuberculosis pulmonar activa	

Tomada de Silvestri M, Sabatini F, Defilippi A. "A marker of asthma inflammation: orally exhaled nitric oxide". *Aci International*. 2003;15:37-43.

riables: ritmo circadiano, ciclo menstrual, maniobras espirométricas previas, uso de broncodilatadores, ejercicio previo, ciertos alimentos, alcohol, tabaco, infecciones; se discuten ciertas diferencias por edad y sexo (tabla II).

MONÓXIDO DE CARBONO

El monóxido de carbono (CO) es un gas que produce el organismo y que también es mensurable en el aire exhalado; El CO se origina principalmente por: 1) la degradación enzimática del hem, 2) por la liberación no relacionada con el hem (peroxidación lipídica, fundamentalmente) y, 3) por el aporte exógeno. La mayor parte del CO endógeno proviene de la degradación del hem por la hem oxigenasa (que forma parte de los mecanismos protectores contra el estrés oxidativo) de la que, al igual que en el caso del NO, existen dos formas: una forma constitucional (HO-2), localizada fundamentalmente en hígado y cerebro, y una forma inducible (HO-1), presente en múltiples tipos celulares (epiteliales, fibroblastos, macrófagos...) ¹⁶, que se activa por citocinas proinflamatorias, endotoxinas y oxidantes.

La técnica de medición (electroquímica) del CO es parecida a la empleada en el NO, aunque más sencilla y barata, empleada desde hace tiempo en estudios sobre tabaquismo¹⁷.

El papel del CO exhalado en el asma no está bien definido; en particular, existen trabajos que sugieren que las diferencias halladas entre controles y pacientes asmáticos pudieran reflejar, al menos en parte,

Tabla II
Factores del paciente que influyen en la medición de FE_{NO}

Factores	Efecto	Recomendaciones
Edad/sexo	Algún estudio ha informado de diferencias etarias; también de cambios coincidentes con el ciclo menstrual	
Ritmo circadiano	En estudio	
Maniobras respiratorias	Espirometrías repetidas pueden disminuir las cifras de FE _{NO}	Las determinaciones de la FE _{NO} deben hacerse antes que las espirometrías
Calibre de la vía aérea	Los niveles pueden variar tras la broncodilatación	Valorar la hora de la última dosis de β_2
Ejercicio físico	Disminución	Evitar esfuerzos intensos una hora antes de la exploración
Alimentos	Aumenta tras la ingesta de alimentos ricos en nitritos (lechuga), hasta dos horas después	Aconsejable el cepillado de dientes previo a la exploración
Alcohol	Reduce las cifras de FE _{NO} en pacientes asmáticos	Evitar el alcohol cuatro horas antes
Tabaco	El tabaquismo crónico disminuye la FE _{NO} ; aumenta tras fumar un cigarrillo	Evitar fumar una hora antes; valorar tabaquismo pasivo
Infecciones	Suele aumentar tanto en infecciones de vías altas como de vías bajas	No llevar a cabo la determinación hasta al menos un mes después (también en el caso de vacuna antigripal)
Fármacos	En pacientes asmáticos disminuye tras el tratamiento con corticoides, antileucotrienos, teofilina	Anotar tratamientos y hora de administración

Modificada de Silvestri M, Sabatini F, Defilippi A. "A marker of asthma inflammation: orally exhaled nitric oxide". *Aci International*. 2003;15:37-43.

deficiencias técnicas por el uso de equipos relativamente poco sensibles; también existe una mayor superposición de valores entre controles y enfermos y la diferencia entre estos grupos es menor que en el caso del NO. A pesar de que hay diferencias en las cifras de CO entre pacientes afectados de asma persistente cuando se comparan con controles sanos y los de asma episódica infrecuente, no se han visto diferencias significativas entre estos dos últimos grupos.

También como en el caso del NO, los valores de CO aumentan en pacientes afectados de rinitis alérgica (aunque podrían ser de origen bronquial¹⁸), en las infecciones respiratorias de etiología vírica, se ven afectados por el tabaquismo y otras enfermedades respiratorias (fibrosis quística) y por la terapia antiinflamatoria.

CONDENSADO DEL AIRE EXHALADO

El uso del condensado del aire exhalado como fuente de una amplia variedad de marcadores y me-

diadores de inflamación se basa en la hipótesis de que las partículas aerosolizadas en la respiración reflejan la composición del revestimiento fluido broncoalveolar; una gran variedad de sustancias (antioxidantes, citocinas...) constituyen la primera línea de defensa contra oxidantes ambientales (humo de tabaco, ozono), alérgenos y agentes infecciosos. El enfriamiento y condensación del aire permite obtener una matriz líquida en la que cuantificar trazas de biomarcadores no volátiles como proteínas, lípidos, nucleótidos y productos de la oxidación, al tiempo que permite valorar los efectos de los diversos tratamientos realizados.

Se han descrito varios métodos de obtención del condensado: el más común sólo requiere la respiración a volumen corriente durante un tiempo aproximado de 15 minutos en un sistema dotado de una válvula en T de doble paso, que separa el aire espirado del inspirado; durante la espiración el aire es dirigido a un circuito refrigerado, obteniéndose una muestra de 1-3 ml. Esta cantidad es dependiente del volumen minuto (es decir, la concentración de bio-

marcadores es flujo dependiente, como sucede en el caso del NO, lo que condiciona en buena medida la valoración de la muestra¹⁹), de la temperatura del aire exhalado y de la humedad. Otro factor que puede distorsionar los resultados es la contaminación por saliva (puede cuantificarse mediante la medición de amilasa)²⁰.

La colaboración es esperable en niños mayores de cuatro años aunque la duración del estudio en este caso (15-20 min) es una dificultad añadida; en pacientes menores de dicha edad es también factible con sedación previa y el uso de dispositivos que permitan la obtención de la muestra²⁴.

Mediante este procedimiento se han encontrado, en pacientes asmáticos, concentraciones elevadas de productos del estrés oxidativo²¹ (tabla III): peróxido de hidrógeno, prostanoídes (isoprostanos y leucotrienos), productos de la peroxidación lipídica, nitritos y nitratos, acetilcolina, serotonina, histamina, citocinas (IL-1b, IL-6, TNF- α ...), pH de la muestra^{22,23}, entre otros.

El análisis del condensado del aire exhalado permitiría (una vez solucionadas algunas de las cuestiones discutibles como la optimización del sistema de obtención, la estandarización de las diluciones de las muestras, la sensibilidad de los ensayos, la obtención de valores de referencia, sobre todo en la edad pediátrica, la validación y correlación de los marcadores versus muestras obtenidas por biopsia, valor predictivo para el diagnóstico precoz de la enfermedad...) evaluar de forma no invasiva y relativamente sencilla el grado de inflamación de las vías aéreas; sin embargo, no parece probable que haya un marcador que informe de la globalidad del proceso, sino diferentes marcadores que permitan explorar diferentes etapas y vías fisiopatológicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. National Heart, Lung and Blood Institute. Global initiative for asthma. National Institute of Health. Publicación número: 2003.
2. British Thoracic Society. British Guideline on the Management of Asthma; revised edition 2004.
3. Warner JO, Naspitz CK, Third International Pediatric Consensus Statement on the management of Childhood Asthma. *Pediatric Pulmonol.* 1998;25:1-17.
4. Sociedad Española de Inmunología Clínica y Alergología Pediátrica. Guía para la atención del Niño Asmático; Monográfico 1, 2000.
5. Prieto L, Morales C "La rinitis alérgica y el asma como probables manifestaciones clínicas de un mismo proceso" *Arch Bronconeumol.* 1998;34:277-80.
6. Prieto L, Gutierrez V, Morales C, Perpiñan J, Inchaurrea I. Variability of peak flow rate in allergic rhinitis and mild asthma: relationship to maximal airway narrowing. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998;80:151-8.

Tabla III

Cuantificación del estrés oxidativo

Marcadores directos

1. Productos de la oxidación
 - a) Peróxido de hidrógeno
 - b) Productos del metabolismo del nitrógeno (ONE, nitrosamina, nitritos...)
 - c) Monóxido de carbono
2. De actividad antioxidante
 - a) enzimas: glutatión, peroxidasa, catalasa...
 - b) coenzimas: selenio, zinc
 - c) actividad antioxidante exógena: vitaminas C, E, A

Marcadores indirectos

1. pH
2. Índices de peroxidación lipídica
 - a) Isoprostanos
 - b) Aldehídos
 - c) Etano, pentano
 - d) Otros: temperatura

Tomada de Rosias P, et al.

7. Álvarez MJ, Olaguibel JM. "Evaluación de la inflamación en el asma: esputo inducido y condensado de aire exhalado" *Asma.* 2005;2:49-87.
8. Giner Muñoz, MT. "El óxido nítrico exhalado como marcador de inflamación en el niño" *Alergol et Immunopathol.* 2000;3: 110-35.
9. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wicklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res.* 1991;18:852-7.
10. Alving K, Weitzberg E, Lunberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J.* 1993;6:1368-70.
11. Kharatinov SA, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements and recommendations. The European Respiratory Task Force. *Eur Respir J.* 7. p. 1683-93.
12. Bruno C, Ferrer A, Gutiérrez V. Óxido nítrico en el aire exhalado. *Asma.* 2005;2:63-88.
13. Moreno Galdó A. Marcadores de la enfermedad asmática: de la función pulmonar al aire espirado. *An Pediatr, Monograf.* 2000;2(1):37-47.
14. Silkoff PE, Robbins RA, Gaston B, Lundberg JO, Townley R. Endogenous nitric oxide in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:438-48.
15. Silvestri M, Sabatini F, Defilippi AC, Baraldi E, Rossi GA. *ACI International.* 2003;15:37-43.
16. Uasuf CG, Janakaton A, James A, Kharitonov SA. Exhaled carbon monoxide in childhood asthma. *J Pediatrics.* 1999;135: 569-74.
17. Rosias P, Dompeling E, Dentener M, Pennings J, Hendriks H, Van Lerssen M, Jöbsis H. Childhood asthma: Exhaled Markers of Airway Inflammation, Asthma control Score and Lung Function Tests. *Pediatr Pulmonol.* 2004;38:107-14.
18. Monma M, Yamaya K, Ikeda K, Suzuki N, Kikuchi T, Takasaka T, Sasaki H. Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with seasonal allergic rhinitis. *Clinical Exp Allergy.* 29. p. 1537-41.
19. Montuschi P. Indirect monitoring of lung inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;110:238-42.

20. Rosias P, Dompeling E, Dentener M, Pennings J, Hendriks, Donckerwolcke MG, Jöbsis Q. Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004;15:4-19.
21. Álvarez MJ, Olaguibel JM. "Evaluación de la inflamación en el asma: esputo inducido y condensado de aire exhalado" *Asma.* 2005;2:49-87.
22. Van Iersel M, Rosias PPR, Jöbsis Q, Pennings HJ, Hendriks JJE, Dompeling E. The relationship between control of childhood asthma, NO and CO in exhaled air, acidity of and cytokines in exhaled breath condensate. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:98.
23. Lange T, Gessner C, Hammerschmidt S, Engelman L, Sachauer J, Wirtz H. Comparison of exhaled breath condensate pH with pH measured in situ in patients with ARDS/ALI. *Eur Respir J.* 2002;20:20-84.
24. Moeller A, Franklin P, Graham LH, Horak F, Wildhaber JH, Stick S. Measuring exhaled breath condensates in infants. *Pediatr Pulmonol.* 2006;41:184-7.