

ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO

Blas Rojo Moreno-Arrones

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) ha dejado de ser considerado únicamente como una molécula contaminante ambiental para convertirse en un gas de una enorme importancia biológica. Hoy día se sabe que el NO es una molécula ubicua que participa en múltiples procesos biológicos. En la vía aérea, el NO está sintetizado por la isoforma inducible de la enzima NO sintetasa, presente en diversos tipos celulares que participan en el proceso inflamatorio e inducida por diferentes citocinas proinflamatorias y por productos bacterianos, lo que ha hecho que se considere el NO un marcador de inflamación.

En la actualidad, es posible medir la cantidad de NO presente en el aire exhalado proveniente de la vía aérea y del alveolo pulmonar o fracción exhalada de óxido nítrico (FENO), mediante diferentes técnicas. La *American Thoracic Society* y la *European Respiratory Society* publicaron en 2005 un documento conjunto con el objetivo de estandarizar este procedimiento.

El valor de la FENO puede estar influenciado por múltiples factores que habrá que tener en cuenta a la hora de su determinación (hábito tabáquico, flujo espiratorio, calibre de la vía aérea, medicamentos o alimentación, entre otros).

La FENO puede estar alterada en múltiples enfermedades respiratorias, pero en ninguna de forma tan determinante como en el asma. Debido a que orienta sobre el nivel de inflamación eosinófila de las vías aéreas, su determinación tiene diversas aplicaciones en asma.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el óxido nítrico (NO) ha dejado de ser considerado únicamente

como una molécula contaminante ambiental para convertirse en un gas de una enorme importancia biológica. Y es que la historia del NO es reciente, pero intensa. En 1980, Furchgott descubrió que la vasodilatación estaba necesariamente mediada por una molécula que fue denominada factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Años después se demostró que este factor era, en realidad, el NO⁽¹⁾ y se identificó el modo en el que las células lo sintetizaban. A partir de ese momento, el interés por el NO creció de forma exponencial. Hoy día se sabe que el NO es una molécula ubicua que participa en múltiples procesos biológicos como la hemostasis, la regulación del flujo sanguíneo, la neurotransmisión, la actividad antimicrobiana y la inflamación crónica. En las vías respiratorias participa, además, en la modulación de la función pulmonar y en la fisiopatología de múltiples enfermedades⁽²⁾.

El NO tiene una vida media muy corta (aproximadamente 5 segundos) y un electrón no apareado, lo que le convierte en un radical libre capaz de reaccionar con otras moléculas.

Se ha detectado NO en el aire exhalado, y se han desarrollado métodos para cuantificarlo. El NO exhalado se encuentra elevado en varias enfermedades inflamatorias como el asma.

PRINCIPIOS FISIOLÓGICOS

La síntesis de NO se lleva a cabo por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de L-arginina. La reacción produce L-citrulina y NO, y requiere la presencia de oxígeno y NADPH. Existen tres tipos de isoformas de esta enzima. Dos de ellas son las denominadas constitutivas (cNOS), que son

la neuronal (NOS1) y la endotelial (NOS3), las cuales sintetizan NO en condiciones normales. Existe, además, una forma denominada inducible (iNOS), que no se expresa, o lo hace en muy baja cantidad, en condiciones fisiológicas. Cuando está activada, la iNOS puede producir hasta mil veces más NO que las isoformas constitutivas. El hecho de que la iNOs esté presente en el epitelio de la vía respiratoria, en diversos tipos celulares que participan en el proceso inflamatorio (macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células endoteliales, etc.), y sea inducida por diferentes citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral alfa y beta, interferón gamma, interleucina 1 beta) y por productos bacterianos (endotoxinas), ha hecho que se considere el NO un marcador de inflamación. La inducción de iNOS requiere la activación de la transcripción génica, por lo que el aumento de la producción de NO requiere varias horas y se mantiene durante varios días. El NO es un gas altamente lipofílico que se difunde de forma rápida a través de membranas biológicas a favor del gradiente, lo que junto a su corta vida media (1 a 5 s) le permite actuar como mediador en diversos sistemas intracelulares y de transducción de señales. El hecho de poseer una inestabilidad intrínseca elimina la necesidad de receptores extracelulares o de sistemas dirigidos a su degradación⁽³⁾.

El origen del NO en el aire exhalado proviene principalmente del epitelio de los senos paranasales y otras zonas de las vías aéreas superiores (óxido nítrico nasal), de la pared de las vías aéreas, donde difunde por diferencia de concentración, y del alveolo. Estos dos últimos compondrían la denominada fracción exhalada de óxido nítrico (FENO).

La forma en la que el componente alveolar y el componente bronquial contribuyen en la FENO se explica por el llamado modelo bicompartmental⁽⁴⁾. Según este modelo, el pulmón estaría formado por dos compartimentos unidos entre sí. El primero sería el compartimento alveolar y el segundo el compartimento bronquial (que comprendería la vía aérea de

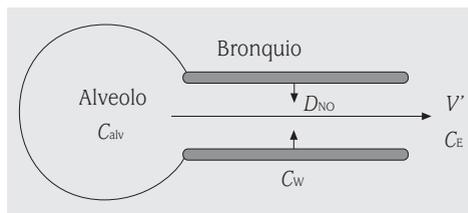


FIGURA 1. Modelo bicompartmental para el análisis de óxido nítrico (NO) exhalado. Calv: concentración alveolar de óxido nítrico; V': flujo; Cw: concentración de óxido nítrico en la pared de las vías aéreas; CE: concentración de óxido nítrico en aire exhalado; DNO: capacidad de difusión de óxido nítrico (tomado de Jörres RA).

conducción esquematizada como un conducto único) (Fig. 1). El aire proveniente de los alveolos sería impulsado hacia la vía aérea durante la espiración y sería enriquecido por el NO de la vía aérea a su paso. La liberación de NO en cada punto de la vía aérea sería proporcional a la diferencia de concentración del gas entre la pared y luz bronquial, siguiendo la ley de Fick. 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. 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, mientras que a flujos bajos ocurriría lo contrario. Existen métodos para diferenciar la aportación alveolar de la bronquial en el NO del aire exhalado por un individuo; aunque potencialmente pueden tener utilidad clínica, actualmente sólo se utilizan a nivel de investigación.

FUNDAMENTOS TÉCNICOS Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

La *European Respiratory Society* (ERS)⁽⁵⁾ en 1997 y la *American Thoracic Society* (ATS)⁽⁶⁾ en 1999 establecieron los fundamentos teóricos, las características técnicas que deberían reunir los equipos y la metodología para los diferentes procedimientos de detección del NO en sendas normativas. Existían, sin embargo, importantes diferencias entre ellas. Una de las más importantes radicaba en que la ERS recomendaba utilizar un flujo espiratorio de 10-15 L/minuto (es decir, 167-250 ml/s), mientras que la ATS recomendaba utilizar un flujo de 45-50 ml/s. Esta diferencia era fundamental, ya que la FENO presenta una fuerte dependencia del flujo espiratorio al que se realiza la determinación⁽⁷⁾. En consecuencia, los estudios que utilizaban flujos elevados detectaban concentraciones de NO más bajas que aquellos que empleaban flujos bajos, lo que dificultaba la comparación de los resultados entre los diferentes autores. Para terminar con ésta y otras discrepancias, la ATS y la ERS publicaron en 2005 un documento conjunto⁽⁸⁾ con el objetivo de estandarizar el procedimiento.

Para la determinación del NO exhalado puede utilizarse un método de registro *online* (la concentración de NO se determina por el paso directo del aire exhalado al trazador) o un método *offline* (el aire exhalado se almacena en balones apropiados y la determinación de NO en la muestra se realiza con posterioridad).

Un aspecto técnico importante es la necesidad de evitar que el aire procedente de las vías aéreas bajas se contamine por aire de vías aéreas superiores. Las concentraciones de NO en el aire exhalado nasal son mucho más altas que las encontradas en el aire exhalado oral⁽⁹⁾. Por tanto, es importante evitar que el aire procedente de cada uno de estos compartimentos se mezcle y esto se logra con la introducción de una resistencia espiratoria. De esta manera, se consigue una presión en la boca entre 5 y 20 cmH₂O, que induce una elevación del velo del paladar, con lo que se cierra la comunicación

con la nasofaringe. De esta manera se consigue eliminar la contaminación del aire exhalado con NO nasal⁽⁷⁾, de forma que las concentraciones detectadas reflejan con bastante exactitud las concentraciones de NO en el aire que procede de las vías aéreas inferiores⁽¹⁰⁾.

Aunque los estudios que han determinado la influencia del NO ambiental sobre las concentraciones de FENO han aportado resultados contradictorios, se recomienda que los aparatos cuenten con sistemas que prevengan de la contaminación de las muestras biológicas con gas ambiental. Asimismo, se recomienda que todos los dispositivos vengan equipados con la capacidad de medir la concentración ambiental de NO.

Existen, además, otros factores que pueden influir en el valor final de la FENO y que conviene conocer:

- *Edad y sexo*: en adultos, no parece existir una relación consistente entre los niveles de FENO y la edad. Por el contrario, en niños, sí se ha descrito un incremento en las cifras de NO exhalado con la edad. Se han publicado algunos estudios contradictorios en cuanto a la influencia del sexo, el ciclo menstrual o el embarazo en el resultado final de la prueba.
- *Maniobras respiratorias*: la espirometría ha demostrado reducir transitoriamente los niveles de FENO⁽¹¹⁾; por tanto, se recomienda realizar el análisis del NO antes que la espirometría. Lo mismo se aplica a otras maniobras respiratorias, a menos de éstas hayan demostrado no influir en la determinación. La maniobra de la FENO en sí misma y la pletismografía no parecen afectar al resultado de la prueba.
- *Calibre de la vía aérea*: las cifras de NO exhalado pueden variar dependiendo del grado de obstrucción de la vía aérea o tras la administración de un broncodilatador⁽¹²⁾, quizás debido a un efecto mecánico sobre la salida de NO.
- *Comidas y bebidas*: se ha observado un aumento en los niveles de FENO tras la ingesta de alimentos ricos en nitratos,

como, por ejemplo, la lechuga (con un efecto máximo dos horas tras la ingesta). La ingesta de agua o de cafeína⁽¹³⁾ puede disminuir las cifras de NO. Tomar alcohol reduce la FENO en sujetos sanos y en pacientes con asma⁽¹⁴⁾.

- *Fumar*: el hábito tabáquico crónico reduce significativamente los niveles de FENO, así como, aunque de forma transitoria, el consumo de un único cigarrillo antes de la prueba⁽¹⁵⁾. Se recomienda que el paciente no fume una hora antes de la determinación.
- *Infecciones*: las infecciones víricas del tracto respiratorio superior o inferior se acompañan de un aumento de la FENO en asmáticos. La infección VIH se asocia a una reducción del NO exhalado.
- *Ejercicio físico*: aunque los estudios son contradictorios, parece que las cifras de FENO se reducen tras el ejercicio. Por tanto, se recomienda no realizar esfuerzos extenuantes al menos una hora antes de la prueba.
- *Medicamentos*: los corticoides inhalados o sistémicos reducen los niveles de FENO en pacientes con asma, por interferir con la vía de señalización intracelular que produce la isoforma inducible de la NO sintasa⁽¹⁶⁾. Por el contrario, los medicamentos que contienen L-arginina elevan la FENO. Existen medicamentos, que, aunque no alteran la producción de NO, sí pueden afectar a la FENO registrada, como aquellos que varían el calibre de la luz de la vía aérea.

Medición *online*

El método *online* es aquel en el que el aire exhalado es analizado de forma continua por el aparato de medición. De esta manera, se obtiene un perfil de NO a lo largo del tiempo de espiración, que puede ser presentado en un monitor junto con el resto de las variables de la exhalación (como, por ejemplo, el flujo espiratorio). Así es posible diferenciar las maniobras adecuadas de las que no lo son.

Para realizar la maniobra, se pedirá al paciente que vacíe de aire los pulmones y, posteriormente, que realice una inspiración profunda hasta la capacidad pulmonar total (TLC), o casi TLC (si supone una gran dificultad para el paciente) a través de la boquilla. El aire inhalado a través de la boquilla deberá estar limpio de NO (< 5 ppb), por lo que el analizador estará equipado con lo necesario para conseguirlo. Tras la inspiración se procederá a la espiración de forma inmediata, ya que contener la respiración podría afectar al resultado final. Durante la exhalación, hay dos factores fundamentales a tener en cuenta. Primero, se debe asegurar la exclusión del NO nasal en la muestra. Para ello, el dispositivo debe asegurar una espiración contra presión positiva (de entre 5-20 cm H₂O), lo que elevará el velo del paladar y aislará las fosas nasales del resto de la vía aérea. Segundo, el paciente debe conseguir un flujo espiratorio constante. Actualmente se recomienda conseguir un flujo continuo de 50 ml/s, ya que se considera, además de cómodo para el paciente, bastante reproducible⁽⁷⁾. La mejor manera de conseguir un flujo constante es mostrar al paciente en el monitor algún tipo de indicador visual que represente dicho flujo, y unos límites, superior e inferior ($\pm 10\%$), dentro de los cuales el paciente se tendrá que mantener.

Una vez conseguida una maniobra adecuada, se obtiene una gráfica de los niveles de NO a lo largo del tiempo de exhalación. Esta gráfica consta de una primera fase de lavado, seguida de una fase de meseta, que normalmente es reproducible y plana, pero a veces tiene cierta pendiente ascendente o descendente. A veces, se observa un pico de NO entre la fase de lavado y la de meseta. Esto ocurre cuando el paciente inhala por la nariz, cuando el velo del paladar está abierto al inicio de la espiración o cuando el sujeto hace una pausa cuando se encuentra en TLC. Estos picos se ignoran y sólo se interpreta la fase de meseta. La fase de meseta debe tener una duración de al menos 3 segundos (150 ml), y la diferencia entre el punto inicial y el punto final no podrá

ser mayor del 10%. El valor final de la FENO se obtendrá de la media de las cifras de NO en el periodo de meseta. Para todo ello, se requiere un tiempo de exhalación suficiente, que será como mínimo de 6 segundos en adultos, aunque normalmente los equipos solicitan una espiración de 10 segundos para poder conseguir una medición de garantía. Los analizadores vienen equipados con sistemas para identificar las maniobras correctas e incorrectas de forma automática.

El método más ampliamente empleado para la medición de la FENO es el de la quimioluminiscencia. Este método consiste en la detección fotométrica de la reacción entre el NO y el ozono, estando ambos en fase gaseosa. La luz generada por la reacción pasa a través de un fotomultiplicador y es analizada por los sistemas electrónicos asociados. El propio analizador genera el ozono necesario para la reacción a partir del suministro continuo de aire seco y limpio, y no se requiere fuente externa ni gas auxiliar para la obtención de este gas.

Se deberán realizar varias maniobras para conseguir al menos dos reproducibles, con una diferencia entre ellas no mayor del 10%. El valor final de la FENO se obtendrá de la media de sendas maniobras. Entre exhalación y exhalación se deberá permitir un tiempo mínimo de descanso de 30 segundos, en el que se solicitará que el paciente respire a volumen corriente fuera del sistema.

Medición *offline*

La medición de NO se puede realizar de una muestra de aire exhalado recogida previamente en un reservorio adecuado (por ejemplo, una bolsa de Mylar) y, posteriormente, trasladada al analizador. Los resultados obtenidos mediante esta técnica son bastante equiparables a los registrados con el método *online* cuando se utilizan los mismos flujos espiratorios⁽¹⁷⁾. La principal ventaja de esta técnica es que permite tomar muestras en lugares alejados de un analizador. Sin embargo, también presenta inconvenientes, algunos

derivados de la contaminación en el almacenamiento y transporte, y otros debidos a la mayor dificultad para asegurar una correcta maniobra por parte del paciente durante la recogida de la muestra, ya que no se suele contar con sistemas para controlar el flujo espiratorio del paciente.

En los últimos años, la popularización de los analizadores, tanto de mesa como portátiles, han conseguido acercar la medición *online* a casi toda la población diana. Esto hace que el método *offline* de medición esté, actualmente, poco extendido.

VALORES DE REFERENCIA Y PUNTOS DE CORTE

A lo largo de los últimos años, múltiples estudios han propuesto diferentes valores de referencia para la FENO⁽¹⁸⁻²²⁾. Existen importantes diferencias metodológicas entre ellos, tanto en el volumen de población estudiada como en las variables incluidas y excluidas en el análisis. Según la última guía de práctica clínica de la ATS⁽²³⁾, en función de los conocimientos con los que contamos actualmente, los múltiples factores de confusión y el solapamiento de los niveles de FENO entre las poblaciones sanas y las poblaciones con asma impide la aplicación rutinaria de valores de referencia en la práctica clínica diaria. Esta misma guía propone identificar puntos de corte clínicamente significativos e interpretar los valores de FENO de cada individuo en función del contexto en el que han sido obtenidos. Así, realiza las siguientes recomendaciones:

- FENO bajo (< 25 ppb [< 20 ppb en niños]). Hace poco probable la presencia de inflamación eosinófila y la respuesta a corticoides.
- FENO alto (> 50 ppb [> 35 ppb en niños]). Es muy probable la presencia de inflamación eosinófila de las vías aéreas y una buena respuesta a corticoides.
- FENO entre 25-50 ppb [$20-35$ ppb en niños]). Valores en este rango han de ser interpretados con cautela en función del contexto clínico.

TABLA 1. Interpretación de valores de FENO en pacientes con tos, sibilancias y/o disnea

	FENO < 25 ppb	FENO 25-50 ppb	FENO > 50 ppb
	Diagnóstico		
Síntomas presentes durante las últimas 6 semanas	Inflamación eosinófila improbable Otro diagnóstico Improbable beneficio con CI	Cautela Valorar en el contexto clínico Monitorizar cambios de FENO en el tiempo	Inflamación eosinófila presente Probable beneficio con CI
Síntomas presentes	Monitorización (en pacientes con diagnóstico de asma) Valorar otros diagnósticos Poco beneficio de incrementar CI	Presencia de alérgenos Dosis de CI inadecuada Falta de adherencia Resistencia a corticoides	Presencia de alérgenos Dosis de CI inadecuada Falta de adherencia Resistencia a corticoides Riesgo de exacerbación
Ausencia de síntomas	Dosis adecuada de CI Buena adherencia Bajar CI	Dosis adecuada Buena adherencia Monitorizar cambios en FENO	La retirada o bajada de CI podría provocar recaída Mala adherencia o mala técnica

CI: corticoides inhalados.

NO EXHALADO EN LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

Las aplicaciones clínicas del NO todavía son limitadas, pero ya se dispone de información que le atribuye un papel relevante en diversos trastornos.

FENO en asma

Clásicamente, la evaluación de los pacientes con enfermedades pulmonares obstructivas se ha centrado en el estudio de la función pulmonar. Sin embargo, especialmente en estadios leves de enfermedad, la espirometría puede ser normal. Un parámetro como la FENO aporta una perspectiva alternativa, ya que es un marcador que refleja la actividad inflamatoria subyacente. Además, su medida es precisa, reproducible e inmediata.

De forma simplificada, la FENO se considera un reflejo de la inflamación eosinofílica de la vía aérea. Sin embargo, su correlación con los niveles de eosinófilos en esputo es

modesta⁽²⁴⁾. Como es sabido, la inflamación eosinófila de la vía aérea es característicamente sensible a corticoides⁽²⁵⁾. Así, en la mayoría de los pacientes, una FENO alta (> 45-50 ppb) puede ser considerada como un marcador de respuesta a corticoides⁽²⁶⁾. Por otra parte, una FENO baja (< 25 ppb) tiene un alto valor predictivo para la ausencia de inflamación eosinófila (85%)⁽²⁷⁾ y, por tanto, para una pobre respuesta a esteroides (Tabla 1).

Es importante destacar que la relación entre la FENO y la inflamación de la vía aérea es independiente del diagnóstico de asma, por lo que su medida no puede ser considerada exclusivamente como una prueba diagnóstica de asma. Es posible hallar niveles elevados de NO en otras enfermedades, como la bronquitis eosinófila o la EPOC.

Aunque reducir los niveles de FENO hasta la normalidad en un paciente asmático podría parecer un objetivo deseable, muchas veces esto no es necesario para alcanzar un buen

control de la enfermedad. De hecho, en algunos pacientes, las cifras de FENO se mantienen persistentemente elevadas a pesar de conseguir mejoras espirométricas y un buen control de la enfermedad.

El NO exhalado aumenta durante las agudizaciones. Recientemente se han llevado a cabo varios ensayos clínicos^(28,29) destinados a evaluar si la FENO puede servir para monitorizar el tratamiento con corticosteroides inhalados en pacientes con asma persistente leve-moderada. Las conclusiones resultaron ambiguas en el mejor de los casos, lo que no quiere decir que la FENO no tenga papel alguno en el manejo del asma. Estos estudios pueden haber incurrido en algunos errores metodológicos que les hayan impedidos alcanzar conclusiones sólidas⁽³⁰⁾. Aunque es probable que la determinación rutinaria de la FENO pueda no estar indicada, sí resulta muy útil unida a otras herramientas más convencionales, especialmente en pacientes mal controlados⁽³¹⁾. Así, por ejemplo, en un paciente obeso, con ansiedad y síntomas de asma, una FENO alta hablaría a favor de inflamación eosinófila mal controlada, y podría ser útil optimizar el tratamiento corticoideo. En el mismo paciente, una FENO baja, junto con una espirometría normal o sin cambios, nos orientaría a que los síntomas estarían posiblemente más en relación a su obesidad o su ansiedad. Este es un ejemplo de cómo, cuando los síntomas y la inflamación son discordantes, la medición del NO exhalado aporta una información muy valiosa⁽³²⁾. Monitorizar los cambios en la FENO en pacientes individuales puede arrojar luz⁽³³⁾. Hay, además, evidencia de que puede haber relación entre el riesgo futuro de un mal control de la enfermedad y los niveles altos de FENO, especialmente cuando la espirometría no es normal⁽³⁴⁾.

En resumen, el NO exhalado es una prueba no invasiva que orienta sobre el nivel de inflamación eosinófila de las vías aéreas. Esto la convierte en una herramienta complementaria en la evaluación y el manejo del

paciente asmático, especialmente en casos complejos. El papel real del FENO en la mejora del control del asma y en la reducción de exacerbaciones está aún por determinar, para lo que se necesitan estudios rigurosamente diseñados.

FENO en otras enfermedades respiratorias ***Enfermedad pulmonar obstructiva crónica***

El papel de la FENO en la EPOC está mucho menos claro que en el asma. Sin embargo, algunos autores han encontrado que niveles altos de NO en estas pacientes podrían ser un signo de respuesta a corticoides^(35,36).

Hipertensión pulmonar primaria (HPP)

Los niveles de FENO en pacientes con HPP suelen estar disminuidos. Además, suelen mejorar tras una actuación terapéutica efectiva⁽³⁷⁾, lo que sugiere que su monitorización podría ser de utilidad. Se necesitan, no obstante, más estudios para determinar el papel de la FENO en el manejo de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-6.
2. Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*. 1993; 48: 1034-43.
3. Serrano C, Valero A, Picado C. Óxido nítrico nasal. *Arch Bronconeumol*. 2004; 40 (5): 222-30.
4. Jörres R. Modeling the production of nitric oxide within the human airways. *Eur Respir J*. 2000; 16: 555-60.
5. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. *Eur Respir J*. 1997; 10: 1683-93.
6. 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: 2104-17.
7. Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, Furlatt HG, Hoffstein E, Wakita S, et al. Marked flow-de-

- pendence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 260-7.
8. ATS/ERS Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171: 912-30.
 9. Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Anggaard A, et al. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nature Med.* 1995; 1: 370-5.
 10. Kharitonov SA, Barnes PJ. Nasal contribution to exhaled nitric oxide during exhalation against resistance or during breath holding. *Thorax.* 1997; 52: 540-4.
 11. Deykin A, Massaro AF, Coulston E, Drazen JM, Israel E. Exhaled nitric oxide following repeated spirometry or repeated plethysmography in healthy individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1237-40.
 12. Yates DH, Kharitonov SA, Barnes PJ. Effect of short- and long-acting inhaled beta2-agonists on exhaled nitric oxide in asthmatic patients. *Eur Respir J.* 1997; 10: 1483-8.
 13. Bruce C, Yates DH, Thomas PS. Caffeine decreases exhaled nitric oxide. *Thorax.* 2002; 57: 361-3.
 14. Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. The effect of alcohol ingestion on exhaled nitric oxide. *Eur Respir J.* 1996; 9: 1130-3.
 15. Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152: 609-12.
 16. Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153: 454-7.
 17. Deykin A, Massaro AF, Drazen JM, Israel E. Exhaled nitric oxide as a diagnostic test for asthma: online versus offline techniques and effect of flow rate. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 1597-601.
 18. Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, Meah S, Barnes PJ. Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J.* 2003; 21: 433-8.
 19. Buchvald F, Baraldi E, Carraro S, Gaston B, De Jongste J, Pijnenburg MW, et al. Measurements of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115: 1130-6.
 20. Olivieri M, Talamini G, Corradi M, Perbellini L, Mutti A, Tantucci C, et al. Reference values for exhaled nitric oxide (reveno) study. *Respir Res.* 2006; 7: 94.
 21. Travers J, Marsh S, Aldington S, Williams M, Shirtcliffe P, Pritchard A, et al. Reference ranges for exhaled nitric oxide derived from a random community survey of adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176: 238-42.
 22. Dressel H, de la Motte D, Reichert J, Ochmann U, Petru R, Angerer P, et al. Exhaled nitric oxide: independent effects of atopy, smoking, respiratory tract infection, gender and height. *Respir Med.* 2008; 102: 962-9.
 23. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184: 602-15.
 24. Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35 (9): 1175-9.
 25. Brown HM. Treatment of chronic asthma with prednisolone; significance of eosinophils in the sputum. *Lancet.* 1958; 2 (7059): 1245-7.
 26. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172 (4): 453-9.
 27. Shaw DE, Berry MA, Thomas M, et al. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176 (3): 231-7.
 28. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med.* 2005; 352 (21): 2163-73.
 29. Szefler SJ, Mitchell H, Sorkness CA, et al. Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guidelinebased treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2008; 372 (9643): 1065-72.
 30. Gibson PG. Using fractional exhaled nitric oxide to guide asthma therapy: design and methodological issues for ASThma Treatment ALgorithm studies. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39 (4): 478-90.

31. Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasmann H, et al. Exhaled Nitric Oxide in Pulmonary Diseases: a comprehensive review. *Chest*. 2010; 138; 682-92
32. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178 (3): 218-24
33. Michils A, Baldassarre S, Van Muylem A. Exhaled nitric oxide and asthma control: a longitudinal study in unselected patients. *Eur Respir J*. 2008; 31 (3): 539-46.
34. Gelb AF, Flynn Taylor C, Shinar CM, Gutiérrez C, Zamel N. Role of spirometry and exhaled nitric oxide to predict exacerbations in treated asthmatics. *Chest*. 2006; 129 (6): 1492-9.
35. Papi A, Romagnoli M, Baraldo S, et al. Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162 (5): 1773-7.
36. Kunisaki KM, Rice KL, Janoff EN, Rector TS, Niewoehner DE. Exhaled nitric oxide, systemic inflammation, and the spirometric response to inhaled fluticasone propionate in severe chronic obstructive pulmonary disease: a prospective study. *Thorax*. 2008; 63 (2): 55-64.
37. Ozkan M, Dweik RA, Laskowski D, Arroliga AC, Erzurum SC. High levels of nitric oxide in individuals with pulmonary hypertension receiving epoprostenol therapy. *Lung*. 2001; 179 (4): 233-43.