

ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE

Papel do Óxido Nítrico como marcador de inflamação em doenças respiratórias

Role of Nitric Oxide as a marker of inflammation in respiratory diseases

P. ARAÚJO GONÇALVES¹, P. LOPES DA MATA², N. NEUPARTH³, A. BENSABAT RENDAS⁴

Departamento Universitário de Fisiopatologia. Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Nova de Lisboa
Projecto PRAXIS/PSAU/P/SAU/92/96

RESUMO

Nos últimos 10 anos, o número de publicações sobre o óxido nítrico tem crescido de um modo exponencial, em várias áreas da Medicina.

O que torna esta molécula tão atractiva, no âmbito da Pneumologia e da Imunoalergologia, é a evidência crescente de que a sua medição no ar expirado possa traduzir, de um modo não invasivo, o grau de inflamação existente em várias doenças pulmonares.

ABSTRACT

In the last 10 years, the number of publications about nitric oxide has increased enormously, covering many fields of medicine.

What makes this molecule so attractive for pneumologists and immunoallergologists, is the growing evidence that exhaled nitric oxide measurements might reflect, in a non-invasive way, the status of inflammation in several respiratory diseases.

This paper draws the attention to the role of

¹ Monitor

² Assistente Convidado

³ Professor Auxiliar

⁴ Professor Catedrático

Recebido para publicação: 00.02.14

Aceite para publicação: 00.04.14

O presente artigo, pretende realçar a importância dada recentemente ao papel do óxido nítrico como marcador de inflamação em doenças respiratórias, incidindo especialmente sobre a asma, a doença pulmonar obstrutiva crónica, a fibrose quística, as bronquiectasias, as infeções respiratórias, a alveolite fibrosante e a sarcoidose.

REV PORT PNEUMOL 2000; VI (4): 309-318

Palavras-chave: NO; Asma; Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica; DPOC; Fibrose Quística; Bronquiectasias; Infeções respiratórias; Alveolite Fibrosante; Sarcoidose.

nitric oxide as a marker of inflammation in respiratory diseases, especially regarding asthma, chronic obstructive pulmonary disease, cystic fibrosis, bronchiectasis, respiratory infections, fibrosing alveolitis and sarcoidosis.

REV PORT PNEUMOL 2000; VI (4): 309-318

Key-words: NO; Asthma; Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD; Cystic Fibrosis; Bronchiectasis; Respiratory infections; Fibrosing alveolitis; Sarcoidosis.

"For what good science tries to eliminate, good art seeks to provoke: Mystery, which is lethal to the one, and vital to the other".

John Fowles

A descoberta em 1980 do factor de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (1) que mais tarde se identificou como **Óxido Nítrico (NO)** (2) veio abrir uma porta para a investigação, sobretudo nas áreas da fisiopatologia pulmonar e cardiovascular.

Um passo importante foi dado em 1991, com a detecção de NO no ar expirado com um analisador de quimioluminescência (3) e a constatação, pouco tempo depois, da existência de níveis elevados desta molécula em doentes com asma (4,5,6), patologia em que a inflamação das vias aéreas assume um papel central.

Importante foi também a confirmação de que os níveis de NO no ar expirado tinham origem nas vias aéreas baixas, visto serem comparáveis aos obtidos directamente por broncofibroscopia (7,8).

Desde então, o óxido nítrico tem sido imputado como marcador de inflamação das vias aéreas na **asma**, sendo vários os trabalhos que apontam neste sentido: Em primeiro lugar, as células epiteliais das vias aéreas dos asmáticos apresentam níveis elevados de uma sintetase do NO, diferente das constitutivas, e indutível por citocinas pró-inflamatórias, denominada

sintetase indutível do NO (iNOS) (9) (Quadro I). Em segundo lugar, demonstrou-se que os corticóides inalados, fármacos com reconhecida acção anti-inflamatória, conseguiam diminuir os níveis de NO no ar expirado de doentes asmáticos (10,11,12,13), inclusive de uma forma dose dependente (11). Por outro lado, sabe-se que os β_2 -agonistas inalados, de curta ou de longa acção, não alteram os níveis de NO expirado (14), o que está em concordância com estudos anteriores que demonstraram ausência de efeito anti-inflamatório destes fármacos na asma (15,16). Finalmente, o NO expirado parece correlacionar-se com outros marcadores de inflamação das vias aéreas nos asmáticos, nomeadamente com a inflamação eosinofílica e com a hiperreactividade brônquica (12,17). Resultados do nosso grupo confirmam este último ponto, tendo sido demonstrada por Neuparth *et al* uma correlação negativa entre os níveis de NO expirado e o $PD_{20}FEV_1$ de metacolina (18). A relação entre o NO e a inflamação asmática poderá ter como base uma inibição dos linfócitos Th1 exercida pelo NO, com um consequente desequilíbrio favorável aos linfócitos Th2, cujo perfil produtor de

QUADRO I
Diferentes tipos de sintetases do NO

	nNOS (NOS tipo I)	iNOS (NOS tipo II)	eNOS (NOS tipo III)
Expressão	Constitutiva neuronal	Indutível (por citocinas e endotoxinas)	Constitutiva endotelial
Substrato	L-arginina	L-arginina	L-arginina
Quant. de NO produzida	Pequena	Grande	Pequena
Cromossoma	12	17	7
Localização pulmonar preferencial	S.Nerv. NANC (não adren., não colin.) Epitélio das vias aéreas	Macrófagos, eosinófilos Epitélio das vias aéreas Epitélio alveolar	Endotélio vascular brônquico Epitélio das vias aéreas
Funções principais	Neurotransmissor (broncodilatação)	Inflamação Defesa contra infecções Secreção do muco	Vasodilatação

(adaptado de ref. 64)

citocinas, nomeadamente de interleucina 4 e 5, favorece a inflamação alérgica (Fig.1) (19). Por outro lado, o NO tem também um efeito citotóxico no epitélio das vias aéreas, implicado na patogénese da asma. No entanto, este efeito citotóxico do NO pode ser um componente importante na defesa do organismo contra microrganismos infecciosos e células tumorais (Fig.2) (20).

Embora aceite como marcador inflamatório das vias aéreas na asma, a generalização do NO a outras patologias não foi linear pois constatou-se que este não estava aumentado no ar expirado noutras doenças com inegável componente inflamatório tais como a DPOC (21,22,23,24), as bronquiectasias (25) e a fibrose quística (25,26,27,28,29).

Coloca-se aqui uma questão: será que estas patologias, com perfis inflamatórios diferentes do asmático, não cursam com um aumento de NO ou, pelo contrário, o obstáculo imposto pelas abundantes secreções impede-o de se difundir e, sendo metabolizado, obtêm-se assim valores baixos no ar expirado, apesar de poder existir um aumento de produção ?

No que diz respeito à **fibrose quística**, artigos recentes espelham bem estas duas hipóteses. Ho *et al* encontraram valores elevados de nitritos no condensado da respiração, resultantes da metabolização do NO

"preso" nas secreções, impedido de se difundir para o lúmen das vias aéreas (30).

Por outro lado, Meng *et al* demonstraram ausência de iNOS no epitélio brônquico, apontando para uma verdadeira diminuição da produção (31).

Outro aspecto interessante na relação entre o NO e a fibrose quística reside na possibilidade da diminuição do marcador estar na origem da maior susceptibilidade às infecções, típica destes doentes. No caso da fibrose quística, particular atenção vai para a infecção a *Pseudomonas*, bactéria oportunista que coloniza as vias aéreas destes doentes sendo difícil de erradicar o responsável por grande parte das exacerbações. Um tipo particular, a *Burkholderia cepacia* (ex-*Pseudomonas cepacia*), parece associar-se a uma deterioração pulmonar rápida conferindo um mau prognóstico a estes doentes (32). Recentemente, Smith *et al* demonstraram que o NO, em combinação com radicais livres de oxigénio, era essencial para a destruição *in vitro* de várias estirpes diferentes de *B. cepacia* (33), sugerindo um papel protector do NO contra esta bactéria. No entanto, resultados obtidos *in vitro* por Dowling *et al*, sugerem que a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* leva a um aumento de metabolitos do NO e que este pode ser o mediador da destruição epitelial, já que a incubação com um

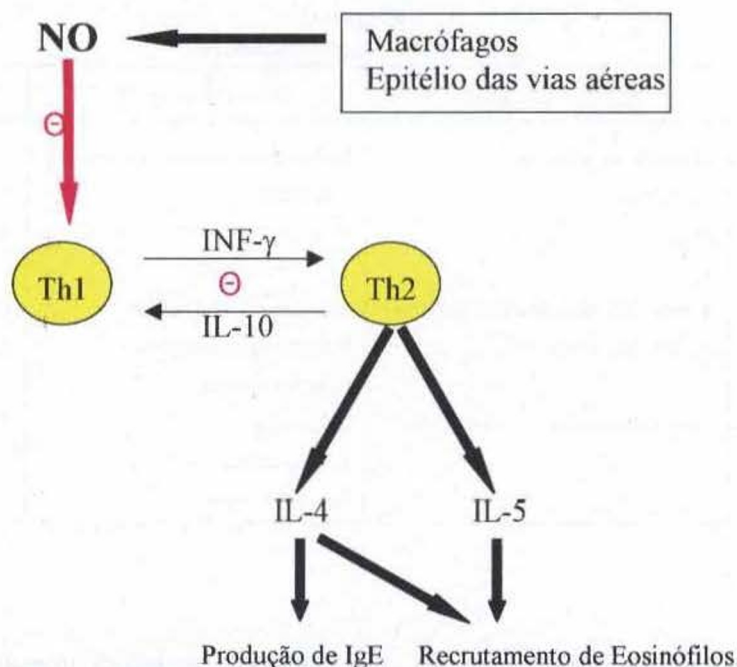


Fig. 1 – Óxido nítrico e inflamação asmática: ONO produzido pelos macrófagos e pelo epitélio respiratório, exercendo um efeito inibitório nos linfócitos Th1, leva a um desequilíbrio favorável aos linfócitos Th2, habitualmente inibidos pelo INF- γ . O resultado é um aumento de produção de IL-4 e IL-5, que levam à síntese de IgE e ao recrutamento e activação dos eosinófilos

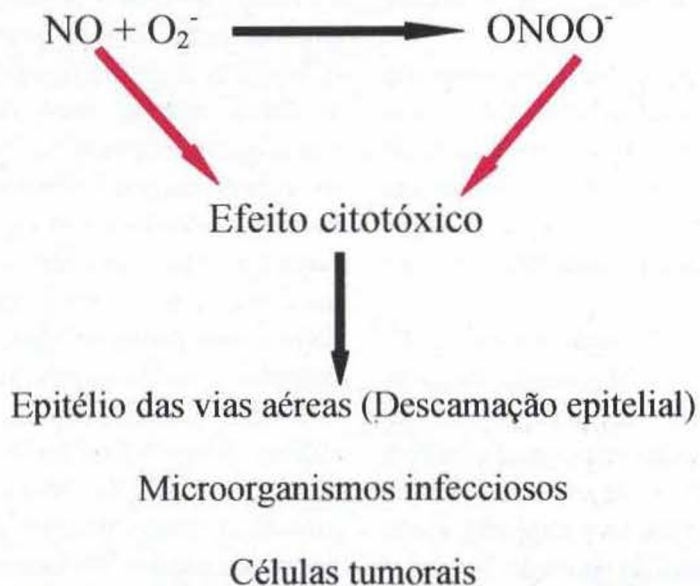


Fig. 2 – Efeito citotóxico do NO e do peroxinitrito: O efeito citotóxico do NO pode ser directo, ou indirecto através do peroxinitrito (ONOO⁻), resultante da reacção deste com o superóxido (O₂⁻). Se por um lado, pode ser prejudicial no contexto da inflamação asmática, por outro lado, este mesmo mecanismo poderá ter um papel importante na defesa do organismo

inibidor da iNOS protege o epitélio da destruição induzida por este microrganismo (34). Estes resultados apontam para um efeito deletério do NO no contexto de infecção por este agente.

Igualmente interessantes são os resultados de estudos em que se correlacionaram parâmetros de função respiratória com os níveis de NO no ar expirado ou de nitritos na expectoração, em doentes com fibrose quística. Grasemann *et al* encontraram uma correlação positiva entre os níveis de NO no ar expirado e a capacidade vital forçada (FVC) (29), e entre metabolitos do NO na expectoração e o volume expiratório forçado no 1º segundo (FEV 1) e a CVF (35). Ho *et al* demonstraram também uma correlação positiva entre os níveis de NO expirado e o FEV1 (25). Estes dados apontam para uma melhor função respiratória nos doentes com níveis mais elevados de NO. A acção broncodilatadora do NO poderá ter aqui um papel determinante (Quadro I).

No caso das **bronquiectasias**, embora resultados iniciais de Karitonov *et al* apontassem para níveis elevados de NO no ar expirado (36), Ho *et al* demonstram posteriormente, com uma metodologia mais apurada, que este se encontrava diminuído (25). Esta diferença de metodologia residiu essencialmente no modo como foi controlado o débito expiratório, essencial para a medição correcta do NO no ar expirado (37,38). Mais estudos são claramente necessários nesta área, para esclarecer esta discrepância.

As primeiras medições de NO em doentes com DPOC (21,22,23,24) demonstraram a existência de níveis, no ar expirado, semelhantes aos dos controlos saudáveis. Estes resultados foram recentemente confirmados por Rutgers *et al*, não só em relação ao NO expirado, mas também aos nitritos na expectoração e à iNOS nos macrófagos, não se encontrando diferenças entre os dois grupos (39).

Torna-se assim pouco provável a hipótese, colocada anteriormente, de que as secreções constituam uma barreira à difusão do NO para o lúmen das vias aéreas. Se assim fosse, pelo menos os níveis dos nitritos na expectoração teriam que estar aumentados.

Por outro lado, o tabagismo, factor causal primor-

dial nesta patologia, leva, por si só, a uma diminuição dos níveis de NO, podendo estar a mascarar uma tendência para elevação dos valores de NO na DPOC.

Recentemente, Conadi *et al* encontraram níveis elevados de NO expirado em doentes com DPOC ex-fumadores e clinicamente estáveis (40). Será que, uma vez afastado o tabagismo, o NO se torna um marcador de inflamação na DPOC?

Interessante é igualmente a correlação positiva entre o FEV1 e os níveis de NO expirado, encontrada por alguns destes autores (23,40), pondo em evidência a acção broncodilatadora benéfica do NO. Estes dados remetem-nos para a questão, bastante debatida, do uso de corticoides inalados na DPOC. Uma vez que inibem a acção da iNOS, seriam prejudiciais neste contexto.

Finalmente, e ainda a propósito do artigo de Rutgers *et al*, embora os níveis de NO encontrados nos doentes com DPOC fossem semelhantes aos de controlos saudáveis, este autor encontrou uma correlação positiva entre estes e a percentagem de eosinófilos na expectoração (39). Será o NO capaz de identificar um subtipo específico de doentes com DPOC e, neste caso, serão estes que beneficiarão claramente da terapêutica com corticóides? Assim o sugerem Sterk *et al*, numa revisão recente deste tema (41).

Também nos **fumadores**, a inflamação das vias aéreas não se acompanha de um aumento, mas sim de uma diminuição dos níveis de NO no ar expirado (6,42), inclusive proporcional ao número de cigarros fumados, como demonstraram Karitonov *et al* (42). Além disso, a interrupção do tabagismo acompanha-se de um aumento do NO expirado (43). Tendo já sido demonstrada a inibição da sintetase do NO por um mecanismo de "feedback" negativo (44), admite-se como provável que o NO presente no fumo do tabaco possa ser o responsável por esta situação, com base em mecanismos semelhantes. Por outro lado, e uma vez que o NO parece ser importante na regulação dos movimentos ciliares (45), a inibição da produção de NO nas vias aéreas poderá ser responsável pela redução da clearance muco-ciliar típica dos fumadores.

Finalmente, para além dos efeitos anteriormente

descritos para indivíduos saudáveis, se assim podemos chamar aos fumadores, também nos asmáticos (24) e nos doentes com DPOC (40), o tabagismo parece ser responsável por uma diminuição dos níveis de NO expirado. No caso da DPOC, e como já foi dito anteriormente, esta poderá ser a causa da ausência de níveis elevados de NO no ar expirado.

O papel do NO como marcador de inflamação ultrapassa o âmbito das doenças das vias aéreas, tendo este sido avaliado também noutras patologias pulmonares. Nas infecções respiratórias, nomeadamente na tuberculose (46) e nas infecções virais (47,48), e na alveolite fibrosante (49), os níveis de NO no ar expirado estão aumentados, traduzindo a inflamação subjacente. Por outro lado, nos doentes infectados pelo HIV (50) e na sarcoidose pulmonar (51) os níveis de NO expirado são baixos.

Vejamos, sucintamente, a relação entre o NO e estas várias patologias:

A relação entre NO e infecções respiratórias é interessante, pela sua hipotética participação nos mecanismos de defesa contra as infecções. Karitonov *et al* demonstraram um aumento do NO expirado nas infecções respiratórias altas de indivíduos saudáveis (47), tendo de Gouw *et al* obtido resultados semelhantes após infecção experimental com Rinovirus em doentes asmáticos (48). De facto, o NO parece ter um papel benéfico, tendo as suas propriedades anti-virais sido recentemente revistas (52,53).

No que diz respeito à **tuberculose pulmonar**, Wang *et al* demonstraram não só a existência de níveis elevados de NO no ar expirado, mas também de iNOS nos macrófagos alveolares, em doentes com tuberculose pulmonar activa (46). Num trabalho publicado recentemente por este mesmo grupo, atribui-se ao NO um papel importante na modulação da síntese, pelos macrófagos alveolares, de IL-1 β e TNF- α , importantes na defesa do organismo contra as infecções micobacterianas (54).

Para além da tuberculose, começam já a aparecer algumas pistas que sugerem um papel importante do NO nas infecções a *Streptococcus pneumoniae* (55) e a *Klebsiella pneumoniae* (56).

Loveless *et al*, demonstraram recentemente a existência de níveis baixos de NO expirado em **doentes infectados pelo HIV** (50). Admitindo-se que o NO tem um papel importante na defesa do organismo contra infecções, a sua diminuição no ar expirado poderá estar implicada na reconhecida predisposição para infecções respiratórias, característica deste grupo.

A relação entre NO e infecções respiratórias continuará certamente a ser investigada por outros grupos.

Estudando doentes com **sarcoidose pulmonar** activa, e partindo do pressuposto de que as citocinas INF- γ e TNF- α , indutoras da iNOS, estão implicadas na alveolite da sarcoidose, e de que os macrófagos alveolares, presentes em grande quantidade nesta situação, são uma fonte de iNOS, O'Donnel *et al* esperavam encontrar uma produção aumentada de NO. No entanto, os seus resultados indicaram a presença de níveis baixos de NO expirado, bem como de nitritos no lavado bronco-alveolar nesta patologia (51). Deste modo, a alveolite da sarcoidose não se parece acompanhar de uma produção aumentada de NO, embora mais estudos sejam importantes para confirmar estes resultados.

Recentemente, em trabalhos de Paredi *et al*, ficou demonstrada a existência de níveis elevados de NO expirado, em doentes com **alveolite fibrosante**, criptogénica ou associada a esclerose sistémica, inclusive correlacionados com a actividade da doença, avaliada pelo lavado bronco-alveolar (49). Já em trabalhos anteriores de Saleh *et al*, tinha sido demonstrada uma indução da iNOS e a presença de níveis elevados de peroxinitrito em doentes com fibrose pulmonar idiopática em fase inicial e intermediária (fase activa) (57). Assim, e ao contrário da alveolite da sarcoidose, esta parece acompanhar-se de uma produção aumentada de NO. Alarga-se assim novamente o espectro de doenças em que o NO se apresenta como um potencial marcador de inflamação.

Recentemente, Fisher *et al*, medindo o NO expirado em doentes submetidos a transplante pulmonar, encontraram níveis elevados nos doentes que apresen-

tavam infecções ou alterações patológicas que potencialmente poderiam conduzir à rejeição do transplante (58). Surge assim uma potencial aplicação do NO à cirurgia cardio-torácica, pela possibilidade de que a sua medição, traduzindo o processo inflamatório subjacente, possa prever a instalação da rejeição. Por outro lado, Meyer *et al*, sugerem que a administração de NO inalado, sobretudo pela sua acção benéfica na função pulmonar e vasodilatadora pulmonar, tem um potencial terapêutico nos doentes submetidos a um transplante pulmonar (59).

CONCLUSÃO

Justificando o título de molécula do ano, atribuído em 1992 pela revista "Science" (60), nos últimos 10 anos o nível de conhecimentos acerca do NO tem crescido de um modo exponencial, existindo já mais de 17000 artigos fazendo referência ao NO no seu título. A descoberta de valores elevados desta molécula no ar expirado em doentes com asma, área bastante produtiva em investigação, foi sem dúvida determinante.

A medição do NO noutras patologias que cursam com uma inflamação das vias aéreas e, mais recentemente, com inflamação alveolar e intersticial, veio

alargar o espectro de doenças em que este se apresenta como um marcador inflamatório.

Em 1997, reuniu-se uma "task-force" da Sociedade Respiratória Europeia (ERS) com o objectivo de padronizar as medições do NO (61), na qual Portugal esteve representado por um elemento do nosso grupo. Desde então, tornou-se mais fácil a comparação de resultados entre investigadores. Aguarda-se ainda o aparecimento de novos analisadores de NO, mais pequenos e sobretudo mais baratos, essencial para a sua implementação na prática clínica.

Em 1998, foi realizado um *workshop* subordinado ao tema "Exhaled markers in airway disease", publicado num dos últimos números do *European Respiratory Review* (62), tendo o NO como principal protagonista, e cuja leitura se recomenda a quem quiser aprofundar mais este tema.

O potencial do NO é enorme, sobretudo pelo facto de a sua medição no ar expirado, sendo rápida, imediata e não invasiva, poder traduzir o estado de inflamação subjacente, dando o seu contributo para uma monitorização mais apurada da resposta à terapêutica e para a avaliação da eficácia de novos fármacos.

Do anteriormente exposto se depreende a expectativa que envolve esta molécula, partilhada por Barnes e Kharitonov, quando se referem ao NO no ar expirado como um novo teste de função respiratória (63).

BIBLIOGRAFIA

1. FURCHGOTT RF, ZAWADSKI N. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
2. PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
3. GUSTAFSSON LE, LEONE A, PERSSON M, WIKLUND N, MONCADA S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 852-857.
4. ALVING K, WEIMBERG E, LUNDBERG JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; 6: 1368-1370.
5. KHARITONOV SA, YATES D, ROBBINS RA, LOGAN-SINCLAIR R, SHINEBOURNE EA, BARNES PJ. Increased NO in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133-135.
6. PERSON MG, ZETTERSTROM O, ARGENIUS V, IHRE E, GUSTAFSSON LE. Single-breath oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994; 343: 146-147.

7. MASSARO AF, MEHTA S, LILLY CM, KOBZIK L, REILL JJ, DRAZEN JM. Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1510-1514.
8. KHARITONOV SA, CHUNG KF, EVANS D, O'CONNOR BJ, BARNES PJ. Increased exhaled nitric oxide in asthma is mainly derived from the lower respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1773-1780.
9. ROBBINS RA, BARNES PJ, SPRINGAL DR et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 209-218.
10. KHARITONOV SA, YATES DA, CHUNG KF, BARNES PJ. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 454-457.
11. KHARITONOV SA, YATES DA, CHUNG KF, BARNES PJ. Changes in the dose of inhaled steroids affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur Respir J* 1996; 9: 196-201.
12. LIM S, JATAKANON A, JOHN M, GILBEY T, O'CONNOR BJ, CHUNG KF, BARNES PJ. Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 22-30.
13. VAN RENSEN ELJ, STRAATHOF KCM, VESELIC-CHARVAT MA, ZWINDERMAN AH, BEL EH, STERK PJ. Effect of inhaled steroids on airway hyperresponsiveness, sputum eosinophils and exhaled nitric oxide levels in patients with asthma. *Thorax* 1999; 54: 403-408.
14. YATES DA, KHARITONOV SA, BARNES PJ. Effect of short- and long-acting inhaled β_2 -agonists on exhaled nitric oxide in asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 10: 1483-1488.
15. LAITINEN LA, LAITINEN A, HAAHTELA T. A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and of a β_2 -agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 32-42.
16. GARDINER PV, WARD C, BOOTH H, ALLISON A, HENDRICK DJ, WALTERS EH. Effect of eight weeks of treatment with salmeterol on bronchoalveolar lavage inflammatory indices in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1006-1011.
17. JATAKANON A, LIM S, KHARITONOV SA, CHUNG KF, BARNES PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998; 53: 91-95.
18. N NEUPARTH, P ARAÚJO GONÇALVES, A BUGALHO DE ALMEIDA, P LOPES DA MATA, I CAIRES, T GAMBOA, H CARVALHO, JE ROSADO PINTO, AB RENDAS. A sensibilidade brônquica à metacolina é um marcador da inflamação das vias aéreas na asma. *Rev Por Pneumol* 1999; 5: C2.
19. BARNES PJ, LIEW FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995; 16: 128-130.
20. SANDERS PS. Nitric oxide in asthma. Pathogenic, Therapeutic, or diagnostic? *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 147-149.
21. ROBBINS RA, FLOREANI AA, VON ESSEN SC, SISSON JH, HILL GE, RUBINSTEIN I, TOWNLEY RG. Measurement of exhaled nitric oxide by three different techniques. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1631-1635.
22. RUTGERS SR, POSTMA DS, VAN DER MARK THW, KOËTER GH. Nitric oxide in exhaled air in COPD. *Eur Respir J* 1996; 9: 2537-2540.
23. MAZIAK W, LOUKIDES S, CULPITT S, SULLIVAN P, KHARITONOV SA, BARNES PJ. Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 998-1002.
24. RUTGERS SR, MEIJER RJ, KERSTJENS HAM, VAN DER MARK THW, KOËTER GH, POSTMA DS. Nitric oxide measured with single-breath and tidal-breathing methods in asthma and COPD. *Eur Respir J* 1998; 12: 816-819.
25. HO LP, INNES JA, GREENING AP. Exhaled nitric oxide is not elevated in the inflammatory airways diseases of cystic fibrosis and bronchiectasis. *Eur Respir J* 1998; 12: 1290-1294.
26. LUNDBERG JON, NORDVALL SL, WEITZBERG E, KOLLBERG H, ALVING K. Exhaled nitric oxide in paediatric asthma and cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996; 75: 323-326.
27. BALFOUR-LYNN IM, LAVARTY A, DINWIDDIE R. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996; 75: 319-322.
28. DÖTSCH J, DEMIRAKÇA S, TERBRACK HG, HÜLS G, RASCHER W, KÜHL PG. Airway nitric oxide in asthmatic children and patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1996; 9: 2537-2540.
29. GRASEMANN H, MICHLER E, WALLOT M, RATJEN F. Decreased concentration of exhaled nitric oxide in patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 1997; 24: 173-177.
30. HO LP, INNES JÁ, GREENING AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53: 680-684.
31. MENG QH, SPRINGALL DR, BISHOP AE, MORGAN K, EVANS TJ, HABIB S, GRUENERT DC, GYI KM, HODSON ME, YACOB MH, POLAK JM. Lack of inducible nitric oxide synthase in bronchial epithelium: a possible mechanism of susceptibility to infection in cystic fibrosis. *J Pathol* 1998; 184 (3): 323-331.

32. LEWIN LO, BYARD PJ, DAVIES BD. Effect of *Pseudomonas cepacia* colonisation on survival and pulmonary function of cystic fibrosis patients. *J Clin Epidemiol* 1990; 43: 125-131.
33. SMITH AW, GREEN J, EDEN CE, WATSON ML. Nitric oxide-induced potentiation of the killing of *Burkholderia cepacia* by reactive oxygen species: implications for cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 1999; 48 (5): 419-423.
34. DOWLING RB, NEWTON R, ROBICHAUD A, COLE PJ, BARNES PJ, WILSON R. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on *Pseudomonas aeruginosa* infection of respiratory mucosa in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 950-958.
35. GRASEMANN H, IOANNIDIS I, TOMKIEWICZ RP, DE GROOT H, RUBIN BK, RATJEN F. Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Arch Dis Child* 1998; 78: 49-53.
36. KHARITONOV SA, WELLS AU, O'CONNOR BJ, HANSELL D, COLE PJ, BARNES PJ. Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1889-1893.
37. SILKOFF P, MACLEAN PA, SLUTSKY A, FURLOTT HG, HOFFSTEIN E, WAKITA S, CHAPMAN KR, SZALAI JP, ZAMEL N. 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.
38. CAIRES I, NEUPARTH N, RENDAS AB. Controle do débito expiratório na medição do óxido nítrico expirado. *Rev Por Pneumol* 1999; 5: C6.
39. RUTGERS SR, VAN DER MARK THW, COERS W, MOSHAGE H, TIMENS W, KAUFFMAN HF, KOETER GH, POSTMA DS. Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in COPD. *Thorax* 1999; 54: 576-580.
40. CORRADI M, MAJORI M, CACCIANI GC, CONSIGLI GF, DE'MUNARI E, PESCI A. Increased exhaled nitric oxide in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54: 572-575.
41. STERK PJ, DE GOUW FM, RICCIARDOLO FLM, RABE KF. Exhaled nitric oxide in COPD: glancing through a smoke screen. *Thorax* 1999; 54: 565-567.
42. KHARITONOV SA, ROBBINS RA, YATES DA, KEATINGES V, BARNES PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 609-612.
43. ROBBINS RA, MILLATMAL T, LASSI K, RENNARD S, DAUGHTON D. Smoking cessation is associated with an increase in exhaled nitric oxide. *Chest* 1997; 112 (2): 313-318.
44. ASSREUY J, CUNHA FQ, LIEEW FY, MONCADA S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 833-837.
45. JAIN B, LUBINSTEIN I, ROBBINS RA, LEISE KL, SISON JH. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 83-88.
46. WANG CH, LIU CY, LIN HC, YU CT, CHUNG KF, KUO HP. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1998; 11 (4): 809-815.
47. KHARITONOV SA, YATES DA, BARNES PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory infections. *Eur Respir J* 1995; 8: 295-297.
48. DE GOUW HWFM, GRÜNBERG K, SCHOT R, DICK EC, STERK PJ. Exhaled nitric oxide (NO) increases following experimental rhinovirus 16 (RV16) infection in asthmatic subjects in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: A798.
49. PAREDI P, KHARITONOV AS, LOUKIDES S, PANTELIDIS P, DUBOIS RM, BARNES PJ. Exhaled nitric oxide: a marker for disease activity in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis. *Chest* 1999; 115: 1352-1356.
50. LOVELESS MO, PHILLIPS CR, GIRAUD GD, HOLDEN WE. Decreased exhaled nitric oxide in subjects with HIV infection. *Thorax* 1997; 52: 185-186.
51. O'DONNELL DM, MOYNIHAN J, FINLAY GA, KEATINGES VM, O'CONNOR CM, MCLOUGHLIN P, FITZGERALD MX. Exhaled nitric oxide and bronchoalveolar lavage nitrite/nitrate in active pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1892-1896.
52. REISS CS, KOMATSU T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *J Virol* 1998; 72: 1547-1551.
53. SANDERS SP. Asthma, viruses and nitric oxide. *Proc Soc Expt Biol Med* 1999; 220: 123-132.
54. KUO HP, WANG CH, HUANG KS, LIN HC, YU CT, LIU CY, LU LC. Nitric oxide modulates interleukin1 beta and tumor necrosis factor-alfa synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (1): 192-199.
55. BRAUN JS, NOVAK R, GAO G, MURRAY PJ, SHENEP JL. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. *Infect Immun* 1999; 67 (8): 3750-3756.
56. TSAI WC, STRIETER RM, ZISMAN DA, WILKOWSKI JM, BUCKNELL KA, CHEN GH, STANDIFORD TJ. Nitric oxide is required for effective innate immunity against *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 1997; 65 (5): 1870-1875.
57. SALEH D, BARNES PJ, GIAID A. Increased production of potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1763-1769.

58. FISHER AJ, GABBAY E, SMALL T, DOIG S, DARK JH, CORRIS PA. Cross sectional study of exhaled nitric oxide levels following lung transplantation. *Thorax* 1998; 53 (6): 454-458.
 59. MEYER KC, LOVE RB, ZIMMERMAN JJ. The therapeutic potential of nitric oxide in lung transplantation. *Chest* 1998; 113 (5): 1360-1371.
 60. CULOTTA E, KOSHLAND DE. NO news is good news. *Science* 1992; 258: 1862-1865.
 61. KHARITONOV SA, ALVING K, BARNES PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. *Eur Respir J* 1997; 10: 1683-1693.
 62. BARNES PJ, ALVING K, KHARITONOV AS, CHEESEMAN K. Exhaled markers in airway disease. *Eur Respir Rev* 1999; 9 (68).
 63. BARNES PJ, KHARITONOV SA. Exhaled nitric oxide: a new lung function test. *Thorax* 1996; 51: 233-237.
 64. BARNES PJ. Nitric oxide. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC eds. *Asthma: basic mechanisms and clinical management*, third ed. Academic press 1998. Pp 369-378.
-