

Tesis doctoral

Inflamación de la vía aérea superior
inducida por estímulos mecánicos en la
apnea obstructiva del sueño

Memoria presentada por
Isaac Almendros López
para optar al grado de Doctor

Barcelona, Noviembre de 2007

Tesis dirigida por el Dr. Ramon Farré Ventura
Unitat de Biofísica i Bioenginyeria
Departament de Ciències Fisiològiques I
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

A Pili, a mis padres y a mi hermano
con todo el cariño

“Si consigo ver más lejos es porque he conseguido
auparme a hombros de gigantes”.

Isaac Newton (1643-1727)

AGRADECIMIENTOS

Poder llegar a escribir estas líneas ha significado tres años y medio de mucho trabajo, pero que sin duda alguna no hubiera sido posible sin la ayuda y apoyo de muchas personas que han estado junto a mí tanto en el ámbito personal como laboral. Por todo ello, me gustaría agradecer a todos ellos su amistad, cariño y apoyo.

En especial quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a Ramon Farré, director de la presente tesis, por todo el conocimiento que me ha transmitido a lo largo de estos años y sobre todo, por la ayuda y confianza que ha depositado en mí desde el primer día. También quisiera agradecer a Daniel Navajas por haber confiado en mí y ofrecerme una magnífica oportunidad para entrar en el mundo científico. Además, agradezco el apoyo y los buenos consejos de Domènec Ros y Mar Rotger.

También me gustaría agradecer a Joaquím Gea y Esther Barreiro el gran apoyo mostrado cuando casi no me quedaban esperanzas de lograr un lugar en la investigación. Y dar las gracias a Josep María Montserrat por la confianza depositada en mí.

En el ámbito laboral tengo que agradecer todo el trabajo y colaboración ofrecida por parte de mis compañeros de grupo. Sobre todo a Miguel Ángel, que con su enorme talento ha contribuido a desarrollar los sistemas experimentales utilizados en la presente tesis. A Ferranda, por ser una excelente “maestra” durante mi primer año y por todo el apoyo moral prestado durante estos últimos años. También quisiera expresar mi agradecimiento a Raimon que ha conseguido que vea la biofísica desde una perspectiva completamente distinta. A Pere, por su ayuda y colaboración a la hora de utilizar las técnicas más “frikis” del laboratorio. A él y a Félix, agradezco que me sumergieran durante los dos primeros años en el mundo de la AFM. A Irene, por todo su cariño y simpatía que cada día aporta al laboratorio; y cómo no, a Alba, simplemente por la alegría y aire fresco que sin duda ha traído al grupo. No quisiera dejar de mencionar a otros compañeros que han convivido y también han sido importantes durante la realización de este trabajo. Muchas gracias a Núria, Xavi, Puy, Jordi.

Además, me gustaría agradecer a María Nácher, Daniel Closa y Ana Serrano por ayudarme en mis inicios en la experimentación animal y por todo el apoyo que me han brindado durante los años de doctorado.

A nivel personal, quisiera mostrar mi mayor gratitud a Pili, por su ayuda moral y sobre todo por la comprensión mostrada cuando más lo necesitaba. Muchas gracias por ser mi apoyo y por ocupar un lugar tan importante en mi vida.

Finalmente agradecer todo el apoyo y cariño que me han dado mis padres y mi hermano que, a pesar de tenerlos muy lejos, han conseguido que los sienta muy cerca en todo momento. Muchísimas gracias por todo: sois sin duda la mejor familia.

Contenidos

Capítulo 1: Introducción	1
1.1 El síndrome de la apnea hipopnea del sueño.....	1
1.2 Vía aérea superior en el SAHS.....	3
1.2.1 Anatomía de la vía aérea superior.....	3
1.2.2 Oclusión de la vía aérea superior.....	6
1.2.3 Grados de colapsabilidad.....	11
1.3 Lesión en la vía aérea superior asociada al SAHS.....	14
1.3.1 Inflamación, edema y estrés oxidativo.....	14
1.3.2 Miopatía y neuropatía asociada al SAHS.....	18
1.3.3 El ronquido en la evolución del SAHS.....	19
1.4 Tratamiento del SAHS.....	22
1.4.1 Presión positiva continua a la vía aérea superior (CPAP).....	22
1.4.2 La rinitis como efecto secundario de la CPAP.....	24
Capítulo 2: Objetivos de la tesis	29

Capítulo 3: Efectos inflamatorios de la vibración en la vía aérea superior en un modelo animal de ronquido.....33

3.1 Resumen.....33

3.2 Introducción.....35

3.3 Material y métodos.....36

3.3.1 Sistema experimental.....36

3.3.2 Extracción de muestras.....39

3.3.3 Cuantificación del edema en la vía aérea superior.....40

3.3.4 Expresión génica de los marcadores MIP-2 y TNF- α40

3.3.5 Análisis estadístico.....41

3.4 Resultados.....41

3.5 Discusión.....43

Capítulo 4: La presión intratraqueal negativa induce inflamación en la vía aérea superior en la apnea obstructiva.....47

4.1 Resumen.....47

4.2 Introducción.....49

4.3 Material y métodos.....50

4.3.1	Animales.....	50
4.3.2	Sistema experimental.....	50
4.3.3	Extracción de muestras.....	53
4.3.4	Cuantificación de la expresión génica.....	54
4.3.5	Análisis histopatológico.....	55
4.3.6	Análisis estadístico.....	56
4.4	Resultados.....	56
4.5	Discusión.....	58

Capítulo 5: La aplicación de presión continua positiva a la vía aérea superior (CPAP) induce inflamación nasal.....63

5.1	Resumen.....	63
5.2	Introducción.....	65
5.3	Material y métodos.....	66
5.3.1	Animales.....	66
5.3.2	Sistema experimental de CPAP.....	67
5.3.3	Protocolo para la aplicación de CPAP y extracción de muestras.....	68
5.3.4	Cuantificación neutrofílica en el raspado nasal.....	70
5.3.5	Análisis de la expresión génica en la pared nasal.....	70
5.3.6	Análisis estadístico.....	71
5.4	Resultados.....	71
5.5	Discusión.....	74

Capítulo 6: Conclusiones de la tesis.....	79
--	-----------

Capítulo 7: Referencias.....	83
-------------------------------------	-----------

Anexo A: Protocolo para la cuantificación de la expresión génica.....	107
--	------------

A.1 Introducción.....	107
-----------------------	-----

A.2 Aislamiento de RNA a partir de tejido.....	108
--	-----

A.2.1 Obtención y almacenaje del tejido.....	108
--	-----

A.2.2 Homogeneización del tejido.....	108
---------------------------------------	-----

A.2.3 Prefiltrado.....	109
------------------------	-----

A.2.4 Purificación de RNA.....	111
--------------------------------	-----

A.3 Reacción de transcripción reversa (RT).....	114
---	-----

A.4 PCR en tiempo real.....	114
-----------------------------	-----

A.5 Método comparativo.....	117
-----------------------------	-----

Anexo B: Publicaciones y conferencias.....	121
---	------------

B.1 Publicaciones.....	121
------------------------	-----

B.2 Conferencias y congresos.....	121
-----------------------------------	-----

Capítulo 1

Introducción

1.1 El síndrome de la apnea hipopnea del sueño

El síndrome de la apnea/hipopnea del sueño (SAHS) es una enfermedad muy prevalente que se caracteriza por el colapso repetitivo de forma total o parcial de la vía aérea superior durante las horas del sueño (Figura 1.1). Este fenómeno, que se ha descrito en el 4% y el 2% de la población adulta masculina y femenina respectivamente (Young et al 1993), es considerado como un grave problema de salud pública (Phillipson 1993).

Los pacientes con SAHS padecen de forma repetida y frecuente una serie de trastornos durante el sueño entre los que se encuentran una reducción en la ventilación, un mayor esfuerzo respiratorio, desaturación de oxígeno en sangre (hipoxemia

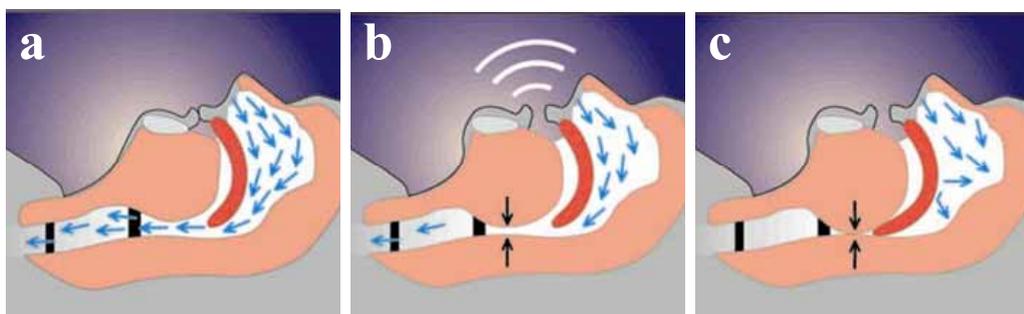


Figura 1.1. Oclusión de la vía aérea superior en el SAHS. En individuos sanos durante el sueño la vía aérea superior permite el paso del aire desde el exterior hasta los pulmones sin ejercer resistencia al aire (a). En pacientes con SAHS puede ocurrir una oclusión parcial debida a una mayor resistencia al flujo de aire que en muchos de los casos puede llegar a generar ronquido (b) o una oclusión total, en cuyo caso el flujo de aire hacia los pulmones es nulo (c).

intermitente) y el padecimiento de despertares frecuentes (Remmers et al 1978). Estas anomalías que ocurren durante el sueño, habitualmente se manifiestan durante el día con problemas de somnolencia (Punjabi et al 1999, Punjabi et al 2002) que es la principal causante de la alta tasa de accidentes laborales y de conducción observada en los pacientes con apnea obstructiva del sueño (Teculescu 2007).

Estos pacientes presentan un deterioro notable de la calidad de vida debido al elevado número de consecuencias graves asociadas a esta enfermedad (Figura 1.2). El padecimiento crónico del SAHS provoca la aparición de alteraciones neurocognitivas (Kales et al 1985, Greenberg et al 1987, Kheirandish y Gozal 2006), una mayor resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Ip et al 2002, Punjabi et al 2004). Además, el SAHS está relacionado con un incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares tales como hipertensión sistémica, infarto miocárdico, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, fibrilación auricular y embolias cerebrales (Nieto et al 2000, Yaggi et al 2005, McNicholas et al 2007). Por

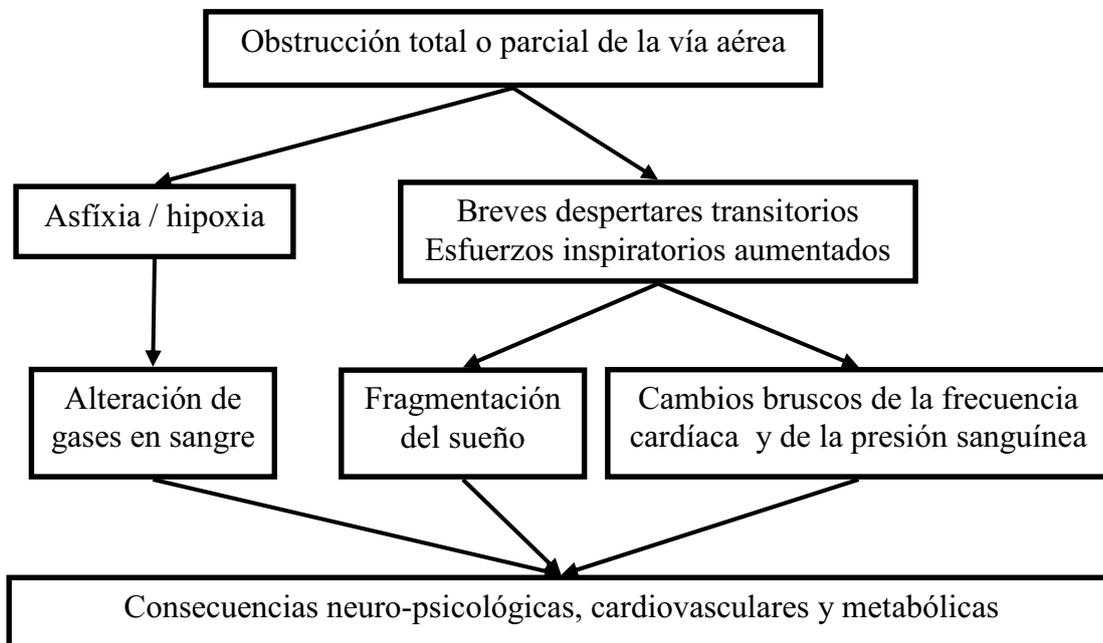


Figura 1.2. Cuadro resumen de los trastornos durante el sueño y las consecuencias clínicas observadas en pacientes con SAHS.

lo tanto, dada la alta prevalencia en la población y el alto número de consecuencias graves asociadas al SAHS, es importante estudiar su fisiopatología para poder entender mejor su origen y evolución.

Como ya se ha indicado, esta enfermedad está directamente relacionada con un incremento en la colapsabilidad de la vía aérea superior. Por esta razón las fuerzas mecánicas que participan tanto en el colapso como en la apertura de la vía aérea juegan un papel fundamental en el desarrollo y evolución del SAHS. De hecho, los síntomas y consecuencias asociados a esta alteración respiratoria desaparecen mediante la simple aplicación de presión positiva al lumen de la vía aérea, lo que pone claramente de manifiesto que la mecánica de la vía aérea superior es crucial en la fisiopatología del SAHS.

1.2 Vía aérea superior en el SAHS

1.2.1 Anatomía de la vía aérea superior

La vía aérea superior es el primer conducto aéreo que lleva el aire desde el exterior hasta los pulmones. El origen del SAHS tiene lugar en esta región del sistema respiratorio, y más concretamente en la faringe cuya estructura se divide comúnmente en 4 segmentos (Ryan y Bradley 2005, Ayappa y Rapoport 2003) (Figura 1.3):

- La nasofaringe; es el primer conducto que se extiende desde las turbinas nasales hasta la parte superior del paladar blando.
- La velofaringe o faringe retropalatal; esta zona de la faringe está localizada entre el paladar duro y el paladar blando.
- La orofaringe o segmento retroglotal; que va desde el margen caudal del paladar blando hasta la punta de la epiglótis.
- La hipofaringe; es la región que se extiende desde la base de la lengua hasta la laringe.

A la faringe retropalatal y retroglotal normalmente se les denomina conjuntamente segmento orofaríngeo y a la zona de unión de ambas partes también se le conoce como velo.

La vía aérea superior no sólo permite el paso del aire hasta los pulmones sino que además posee numerosas funciones entre las que se pueden incluir el sentido del olfato, la fonación, la glutación, la humidificación y calentamiento del aire inhalado y la filtración de agentes y partículas nocivas del exterior. Por lo tanto, las propiedades de la vía aérea superior deben de ser un compromiso entre todas las funciones que desempeña. De esta forma, mientras que durante la respiración la musculatura dilatadora permite la apertura de la vía aérea superior, durante la deglución debe de producir el cierre por su capacidad contráctil. En la vía aérea superior coexisten más de 20 músculos diferentes que son los últimos responsables de su propiedad dilatadora y contráctil (Strohl y Fouke 1985, Fouke et al 1986). Estos músculos se clasifican en 4 grupos según su zona de

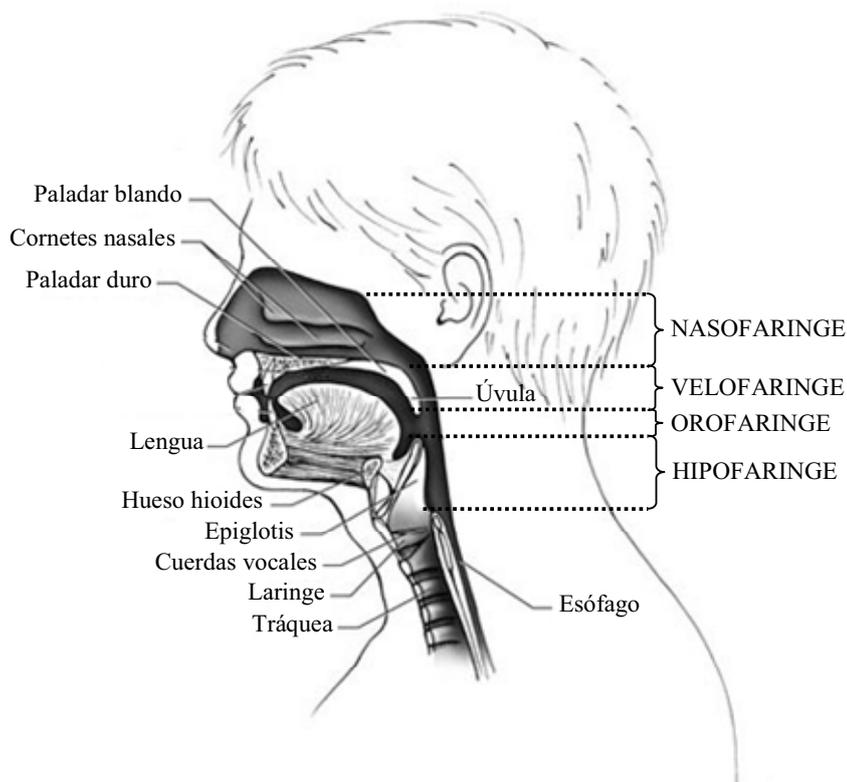


Figura 1.3. Anatomía de la vía aérea superior. La faringe se divide en nasofaringe, velofaringe, orofaringe e hipofaringe (modificado de www.ems.ceu.com. Ilustración de McAlexander JM).

acción (Tabla 1.1) (Ayappa y Rapoport 2003): los que regulan la posición del paladar blando, de la lengua, del aparato hioides y de las paredes de la faringe posterolateral. Además, los tejidos que forman la faringe también se pueden clasificar según su dureza, distinguiéndose entre tejidos blandos y duros (Ryan y Bradley 2005). Las paredes de la vía aérea superior están recubiertas en toda su longitud de tejidos blandos entre los que se incluyen pilares amigdalinos, paladar blando, úvula, lengua y pared faríngea lateral (Schwab et al 1995). Los tejidos duros formados por estructuras óseas proporcionan una superficie suficientemente amplia para la sujeción de los músculos y del tejido blando. Las estructuras óseas más importantes en la determinación del tamaño de la vía aérea superior son la mandíbula (Rivlin et al 1984) y el hueso hioides (Lyberg et al 1989). Acompañando a estas dos estructuras óseas también están presentes las turbinas nasales localizadas en la nasofaringe y las vértebras cervicales.

Zona de acción	Músculos
Paladar blando	- Alai Nasi - Tensor del velo palatino - Elevador del velo palatino
Lengua	- Geniogloso - Genihioideo - Hiogloso - Estilogloso
Aparato hioide	- Hiogloso - Geniogloso - Digástrico - Genihioideo - Esternohioide
Pared faríngea posterolateral	- Palatogloso - Constrictores faríngeales

Tabla 1.1. Zona de acción de los músculos más importantes que proporcionan la capacidad dilatadora de la vía aérea superior (modificado de Ayappa y Rapoport 2003).

En el tejido muscular, úvula y paladar blando, existe un tejido glandular que permite mantener la faringe húmeda y bien lubricada (Back et al 2004). La mucosa, que es la primera barrera al exterior que encontramos en la vía aérea, está formada por tres diferentes capas: epitelio, lámina propia y músculo liso. Finalmente, la vía aérea superior es capaz de detectar los cambios experimentados en la presión intraluminal a

través de terminales nerviosas que son esenciales para mantener la vía aérea superior abierta mediante la activación o incremento en el tono de los músculos dilatadores (Tsubone 1990).

1.2.2 Oclusión de la vía aérea superior

El SAHS se caracteriza por la oclusión repetida de forma parcial o total de la vía aérea superior. La faringe humana se puede considerar como un tubo colapsable formado por tejidos blandos y estructuras óseas cuya configuración puede predisponer la faringe al colapso. Durante el proceso inspiratorio se genera presión negativa en el espacio intraluminal de la faringe. Esta presión negativa es detectada por mecanorreceptores localizados en la pared aérea induciendo una mayor respuesta muscular dilatadora (Amis et al 1999).

La musculatura dilatadora es la encargada de mantener la vía aérea superior abierta gracias a la previa actuación del reflejo del sistema nervioso central y de la propia faringe. De hecho, aunque se ha propuesto al nervio laringeal superior como la vía aferente más importante en el reflejo a la presión negativa (Mathew et al 1982, Mathew et al 1984, Hwang et al 1984), existen otras vías aferentes como los nervios glossofaríngeo y trigeminal que podrían también tener un papel importante en la respuesta a dicha presión (Mathew et al 1982, Hwang et al 1984, Horner et al 1991, Curran et al 1997). La existencia de este tipo de reflejos y fuerzas dilatadoras sugiere que el incremento en la colapsabilidad de la faringe puede estar determinado no sólo por simples factores anatómicos, sino además por una disfunción en el reflejo y/o tono muscular a la obstrucción de la vía aérea superior durante el sueño (Patil et al 2007a). Por otro lado, hay que considerar que durante la fase NREM (No Movimiento Rápido del Ojo) del sueño tanto la respiración central como el tono muscular dilatador de la vía aérea se encuentran reducidos. Este hecho, que provoca una disminución del área transversal y un incremento en la resistencia de la vía aérea superior, hace a la faringe más susceptible al colapso. Además, en la transición de la fase NREM a la fase REM (Movimiento Rápido del Ojo) del sueño la reducción en el tono dilatador se produce de

forma más acentuada y es cuando más frecuentemente se presenta la apnea obstructiva del sueño (Charbonneau et al 1994).

Por lo tanto, en la vía aérea superior, y más concretamente en la faringe, existen fuerzas que favorecen el colapso que son contrarrestadas por fuerzas dilatadoras ejercidas por la musculatura que envuelve la propia vía aérea superior (Figura 1.4) (Remmers et al 1978, Isono et al 1997). Entre las fuerzas mecánicas oclusivas se encuentran las relacionadas con el esfuerzo inspiratorio (presión negativa), el flujo aéreo (efecto de Bernoulli) o la posición supina (efecto de la gravedad). Durante el SAHS

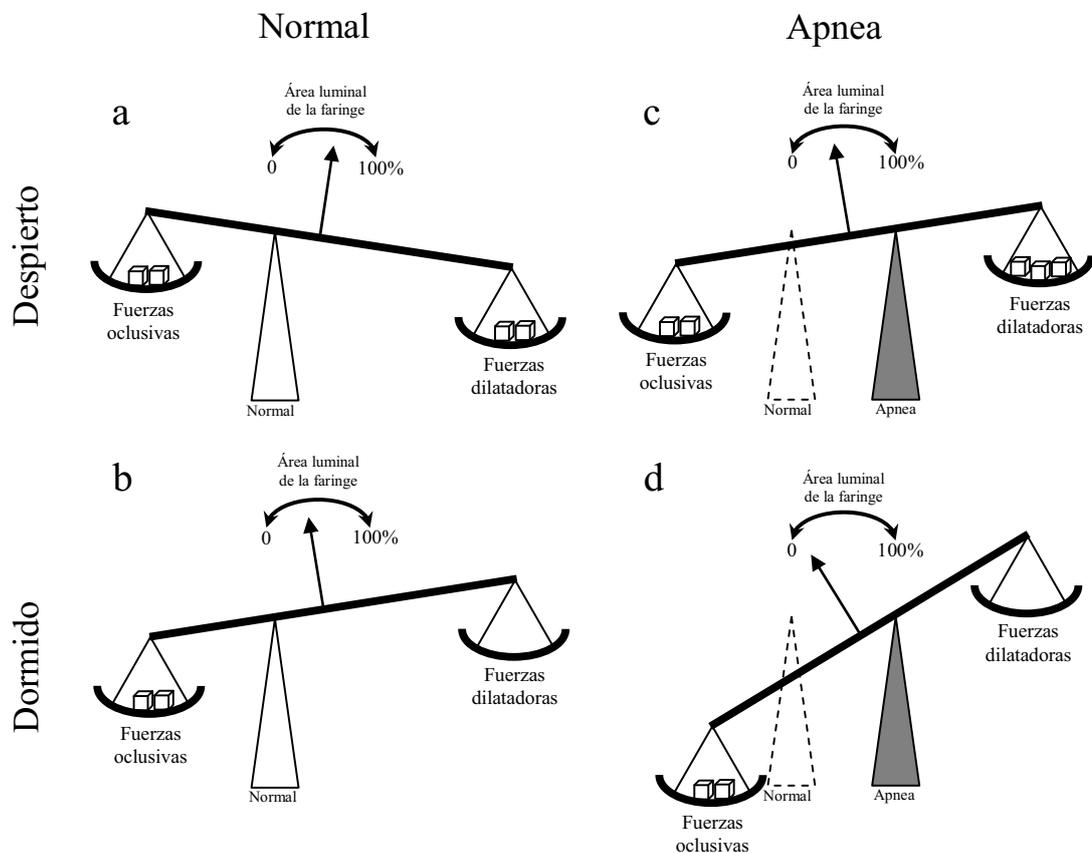


Figura 1.4. Balance de fuerzas en la vía aérea superior. Las fuerzas oclusivas ejercidas sobre la faringe dependen en gran medida de las propiedades intrínsecas de la vía aérea superior (cuña en el gráfico). Para compensar estas fuerzas de colapso, la faringe dispone de mecanismos dilatadores que permiten compensar el balance de fuerzas (a). En cambio, durante la fase REM las fuerzas dilatadoras se relajan disminuyendo sustancialmente el lumen de la faringe (b). En pacientes con SAHS tanto los factores anatómicos como los neuromusculares cambian drásticamente las propiedades intrínsecas de la vía aérea superior, lo que requiere mayor fuerza dilatadora para inducir su apertura (c), que al relajarse durante la fase REM provoca la oclusión de la vía aérea superior (d) (modificado de Isono et al 1997).

existe una descompensación de estas fuerzas que afecta a la colapsabilidad de la vía aérea. Este desequilibrio provoca que el tejido de la vía aérea superior durante fenómenos como el ronquido o el SAHS se encuentre sometido a una serie de estímulos mecánicos que no están presentes en condiciones fisiológicas normales. De hecho, durante el SAHS la vía aérea superior esta sometida a una presión negativa inspiratoria incrementada que puede conducir a procesos recurrentes de colapso y reapertura, y que además, suelen verse acompañados o precedidos de otros estímulos mecánicos como la vibración generada por el ronquido (fenómeno que suele preceder al SAHS) o con la compresión asociada a la presión continua positiva aplicada para su tratamiento. Además, diversos estudios sugieren que estas nuevas condiciones podrían provocar una respuesta biológica en la vía aérea superior (Sekosan et al 1996, Friberg 1999, Bergeron et al 2005). Por lo tanto, es de vital importancia determinar cual es el efecto de cada uno de estos estímulos en la vía aérea y estudiar su relación con la fisiopatología y tratamiento del SAHS.

Mediante la realización de imágenes de resonancia magnética volumétrica de la vía aérea superior se han logrado localizar las zonas anatómicas con mayor riesgo de colapso (Schwab et al 2003). En el trabajo de Schwab RJ et al se ha demostrado que la región con mayor predisposición a la oclusión se encuentra en el segmento retropalatal de la faringe. De hecho, se ha descrito que esta zona se corresponde con la región anatómica de la vía aérea superior que presenta la menor área transversal y volumen tanto en pacientes con SAHS como en sujetos sanos (Figura 1.5A). Además, es en este segmento retropalatal donde se ha podido encontrar la mayor reducción en el volumen aéreo entre pacientes con apnea obstructiva del sueño respecto a voluntarios sanos (Figura 1.5B). Resultados similares se han observado a partir de imágenes de resonancia magnética de la vía aérea superior de niños con SAHS (Arens et al 2003). Por otro lado, se ha visto que el colapso de la faringe puede ocurrir tanto al final del evento espiratorio como al inicio de la inspiración (Suratt et al 1983, Morrell et al 1998). Aunque este colapso comienza en la región orofaríngea (retropalatal y retroglotal) en más del 56-70% de los pacientes con SAHS (Shepard y Thawley 1989, Katsantonis et al 1993) le puede seguir una extensión caudal hasta alcanzar la base de la lengua en el 25-44% de los pacientes (Shepard y Thawley 1989, Katsantonis et al 1993) y/o hasta la región

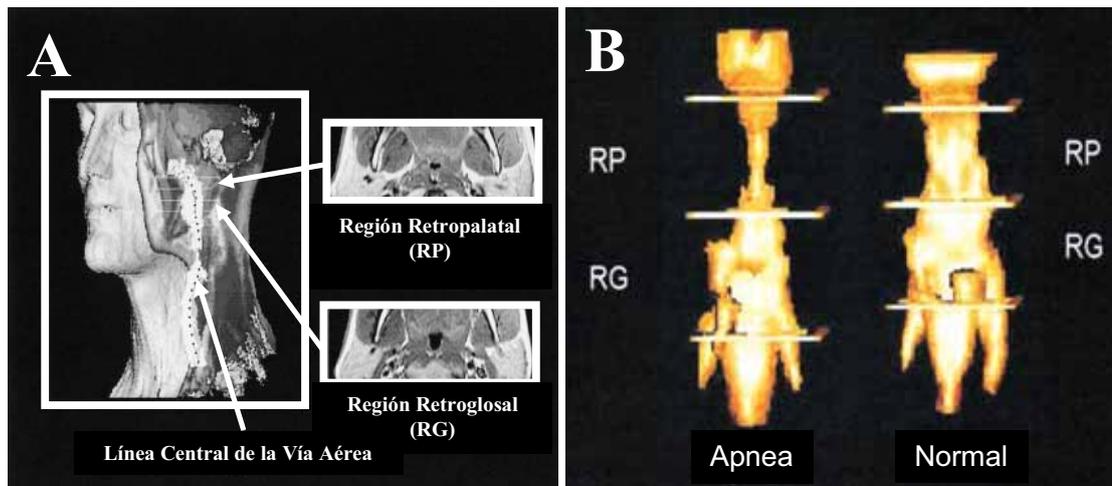


Figura 1.5. Localización de la oclusión en pacientes con SAHS. A) Representación tridimensional del volumen de la cabeza en el que se representa la vía aérea superior (zona blanca) que sigue la dirección de la línea central tridimensional (representada por puntos negros). En esta figura también se pueden apreciar unos cortes perpendiculares a la vía aérea que se corresponden con la región retropalatal (RP) y la región retroglotal (RG). B) Volumen de la vía aérea superior en pacientes con apnea (izquierda) y sanos (derecha). Se puede apreciar una mayor reducción del volumen aéreo en la región retropalatal (RP) que en la región retroglotal (RG) de pacientes con apnea obstructiva del sueño (modificado de Schwab et al 2003).

hipofaríngea en el 0-33% (Suratt et al 1983, Shepard y Thawley 1989, Jager et al 1998, Bhattachryya et al 2000). También es importante considerar que el colapso se encuentra en su forma más extendida durante la fase REM del sueño (Shepard y Thawley 1990), que como se ha indicado anteriormente, es la fase en la que prevalece la apnea obstructiva del sueño (Charbonneau et al 1994). Finalmente, se ha descrito un incremento significativo en el volumen o grosor de los tejidos blandos que recubren la faringe de los pacientes con apnea obstructiva del sueño (Schwab et al 1993, Schwab et al 2003), lo que sugiere que las propiedades intrínsecas de la vía aérea superior pueden jugar un papel importante en el desarrollo y evolución del SAHS.

Existen diversos factores determinantes que pueden incrementar el grado de colapsabilidad de la vía aérea superior. Estos factores, que pueden distinguirse entre anatómicos y neuromusculares, provocan un aumento de la presión que ejercen los tejidos que envuelven la vía aérea superior sobre el espacio intraluminal de la faringe y una reducción en el tono muscular dilatador, respectivamente (Ryan y Bradley 2005).

Entre los factores anatómicos se encuentran tanto los que son provocados por anomalías de las estructuras esqueléticas o tejidos duros de la vía aérea superior como aquellos provocados por el incremento de volumen de las estructuras blandas. Entre las anomalías esqueléticas se incluyen el retrodesplazamiento maxilar o mandibular (Watanabe et al 2002) (Figura 1.6) y la reducción anómala en la longitud de la mandíbula (Miles et al 1996). Por otro lado, las anomalías en las estructuras blandas que



Figura 1.6. Retrodesplazamiento maxilar. Esta anomalía anatómica se caracteriza por un desplazamiento de la mandíbula inferior que provoca una mayor presión sobre la vía aérea superior (flecha).

forman parte de la faringe también pueden ocasionar una reducción importante en el lumen de la vía aérea superior. Entre las más habituales en pacientes con SAHS se incluyen hipertrofia (Greenfeld et al 2003), inflamación y edema (Anastassov y Trieger 1998). De hecho, el engrosamiento de la pared de la faringe es el factor más predominantemente observado en los pacientes con SAHS (Schellenberg et al 2000). Este engrosamiento de los tejidos blandos se ha localizado en zonas específicas de la vía aérea superior como en el paladar blando (Bradley et al 1985, Ingman et al 2004), en la úvula (Stauffer et al 1989) y en la lengua (Bradley et al 1985).

Otras importantes causas o factores que están asociados a la enfermedad del SAHS son la obesidad, la edad, el género, la presencia de ronquido severo, la obstrucción nasal, una disminución en la tensión superficial, el volumen pulmonar y otros motivos hereditarios craneofaciales. De entre estas causas, la obesidad es con diferencia el mayor factor de predisposición al SAHS (Young y McDonald 2004). Aunque las personas obesas disponen de grasa depositada en diferentes regiones del organismo de forma más o menos homogénea, la deposición en el cuello es la que genera una mayor reducción en el lumen aéreo de la faringe (Mortimore et al 1998) (Figura 1.7). También se ha demostrado que las personas de edad avanzada, independientemente de otros factores, presentan un incremento en la colapsabilidad y resistencia de la faringe (Eikermann et al 2007). Respecto al género, se conoce que el

SAHS es más prevalente en hombres (4%) que en mujeres (2%) y este hecho parece deberse a la existencia de un mayor tono muscular en mujeres (Martins et al 2007) y/o a un posible efecto hormonal (Bixler et al 2001). Por otro lado, el ronquido severo está habitualmente asociado al SAHS como una fase inicial de la enfermedad (Friberg 1999). Además se ha demostrado que el hecho de disponer de un volumen pulmonar reducido aumenta la colapsabilidad en pacientes con apnea obstructiva del sueño (Bradley et al 1986, Rubinstein et al 1989). Finalmente, se sugiere que la obstrucción nasal puede ser también causa de colapso de la vía aérea superior al promover un incremento de la presión negativa generada en la faringe durante la inspiración (Ryan y Bradley 2005).

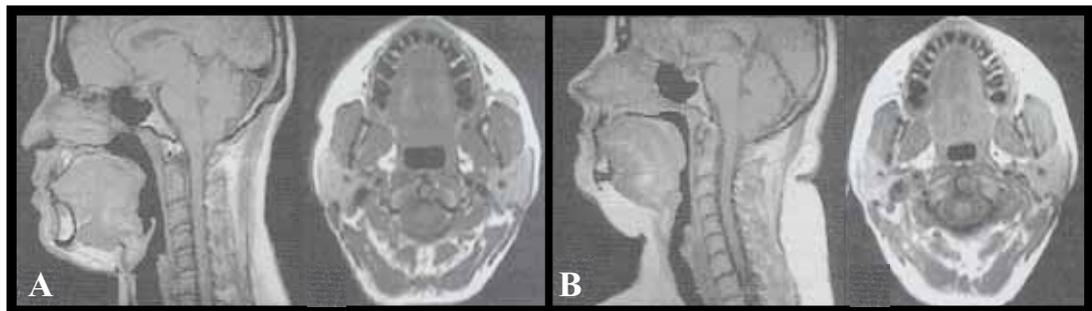


Figura 1.7. Cortes sagital y transversal de la cabeza mediante resonancia magnética. Se observa claramente una reducción en el volumen aéreo del paciente obeso (B) respecto al sano (A) (modificado de Schwab 1998).

1.2.3 Grados de colapsabilidad

Las características de la dinámica del flujo de aire que pasa por la vía aérea superior durante diferentes grados de colapso se corresponden con el modelo de resistencia de Starling (Pride et al 1967). Este modelo permite estimar la presión crítica inspiratoria, que se define como la presión a la que se produce el colapso en la vía aérea superior, basándose en el análisis de la relación presión/flujo en el segmento de la faringe (Smith et al 1988). Esta presión crítica depende de las propiedades intrínsecas de la vía aérea superior y sirve como referencia de la colapsabilidad (Figura 1.8) aumentando su valor negativo en la siguiente dirección: sanos < roncadorees < síndrome de resistencia de la vía aérea superior < hipopnea < apnea (Schwartz et al 1988, Gleadhill et al 1991, Patil et al 2007a). De hecho, se ha observado una variación en la presión crítica que va desde los -15 cmH₂O en individuos sanos, hasta valores que

pueden llegar a ser positivos como los 5 cmH₂O que se han descrito en los pacientes con SAHS. El resto de estadios intermedios, que se corresponden con una obstrucción parcial de la vía aérea superior, tienen una presión crítica con unos valores que están comprendidos entre los obtenidos en individuos sanos y los que padecen SAHS. Así pues, en el SAHS se producen colapsos estáticos (apnea) o dinámicos (hipopnea) (Farré et al 2003a).

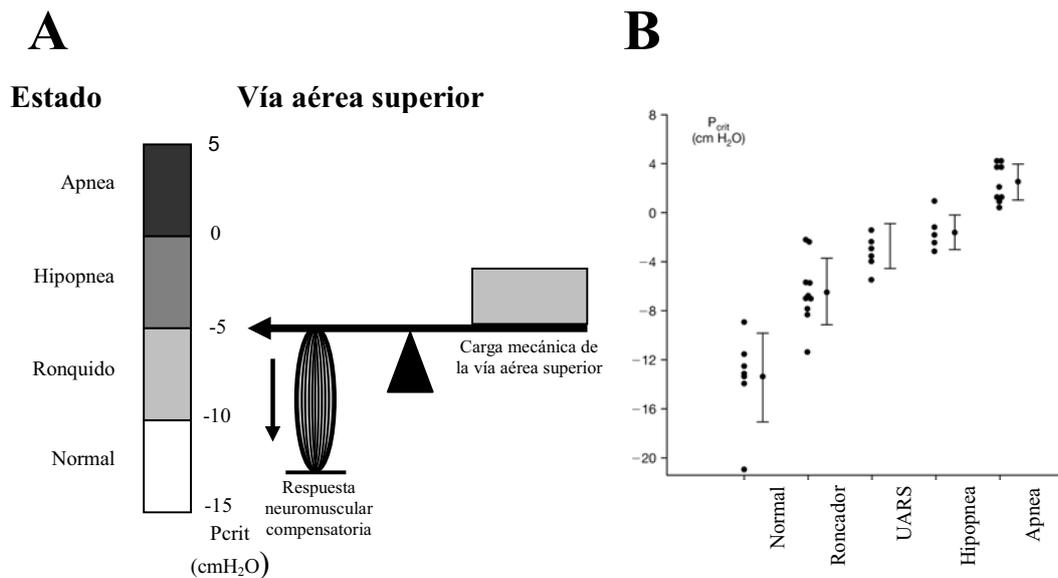


Figura 1.8. Presión crítica y colapsabilidad de la vía aérea superior. A) Papel de las propiedades anatómicas oclusivas y musculares dilatadoras de la faringe en la presión crítica de colapso y por tanto, en el desarrollo y evolución del SAHS (modificado de Patil et al 2007b). B) Presión crítica calculada experimentalmente en pacientes con diferente grado de colapsabilidad (modificado de Schwartz et al 1988 y Gleadhill et al 1991).

El grado de oclusión de la vía aérea superior puede cuantificarse mediante un estudio polisomnográfico a nivel clínico, lo que permite conocer el estado de severidad de la enfermedad en los pacientes con SAHS (Figura 1.9). Con esta herramienta se pueden medir variables como el flujo aéreo nasal, la desaturación de oxígeno, la presión intraesofágica (esfuerzo respiratorio) y los movimientos torácicos. Además, en los estudios clínicos se suele también cuantificar el número de microdespertares mediante el uso del electroencefalograma (EEG) y del electromiograma en el mentón (SmEMG) (Figura 1.10). El grado de severidad del SAHS se evalúa a partir del índice de apnea-hipopnea (AHI) que es definido como el número de apneas e hipopneas que tienen lugar durante una hora. También se utilizan habitualmente otros valores de referencia como el

índice de alteración del sueño (RDI), el índice de desaturación de oxígeno (ODI) y el número de despertares por hora.

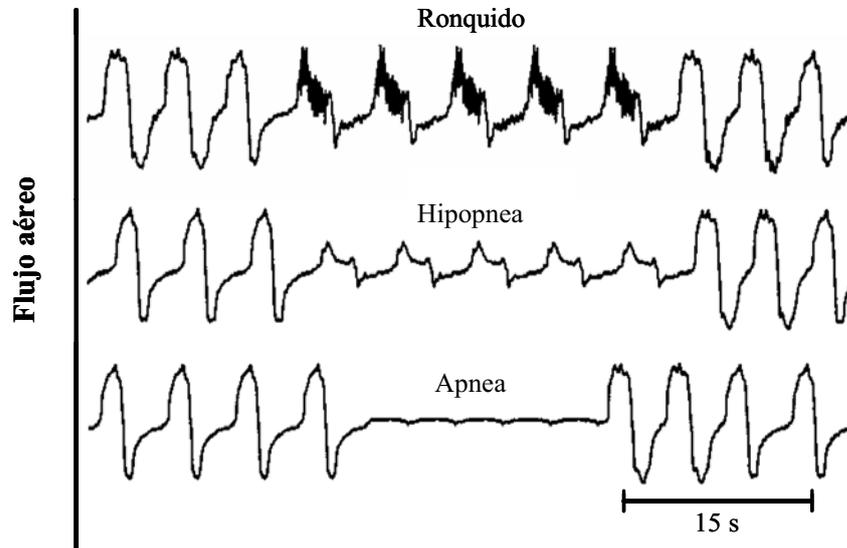


Figura 1.9. Típicos patrones observados clínicamente en el flujo aéreo de individuos roncadores y pacientes con apnea/hipopnea del sueño. Se puede apreciar una progresiva resistencia al paso del aire hasta llegar al colapso total durante la apnea (modificado de Farré et al 2002).

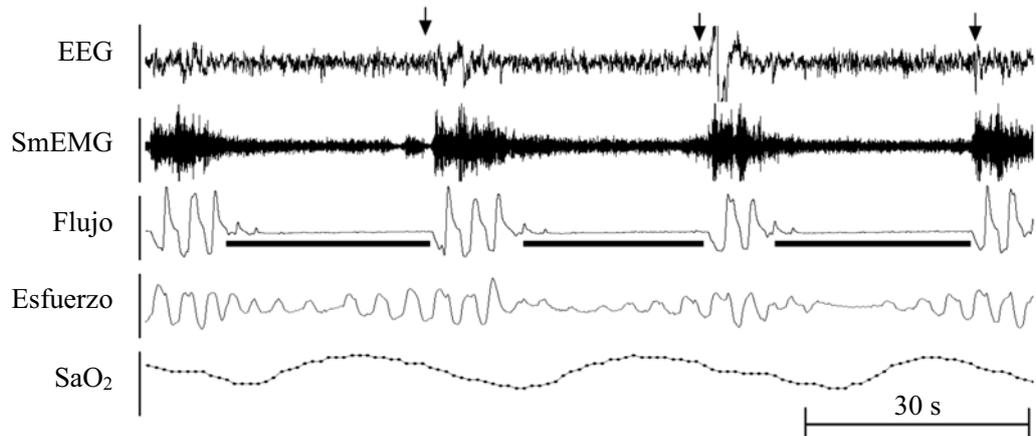


Figura 1.10. Estudio polisomnográfico de un paciente con apnea obstructiva del sueño severa (AHI, 84/h). Se puede observar cómo al cesar completamente el flujo aéreo durante el sueño se incrementa el esfuerzo respiratorio hasta provocar un microdespertar (señalizado mediante una flecha), que se refleja en el electroencefalograma (EEG) y en el electromiograma en el mentón (SmEMG). Además se aprecia que tras cada episodio de colapso, la saturación de oxígeno en sangre (SaO_2) disminuye hasta alcanzar valores inferiores del 70% (modificado de Patil et al 2007a).

1.3 Lesión en la vía aérea superior asociada al SAHS.

1.3.1 Inflamación, edema y estrés oxidativo.

Los pacientes con SAHS presentan inflamación tanto a nivel sistémico como en la vía aérea superior. De hecho, existen numerosos estudios que han observado la presencia de células leucocitarias en diferentes regiones de la vía aérea superior como por ejemplo en la mucosa de la úvula (Figura 1.11) (Sekosan et al 1996, Paulsen et al 2002), en el paladar blando y en el tejido muscular adyacente (Boyd et al 2004). También se ha descrito un incremento de células leucocitarias a partir de lavado nasal (Rubinstein 1995) y de interleuquina 8 (IL-8) en esputo, que además se correlaciona con el índice de apnea-hipopnea del paciente (Figura 1.12) (Devouassoux et al 2007). Por otro lado, asociado a la apnea obstructiva del sueño se ha observado un incremento del marcador de estrés oxidativo 8 isoprostano y de la citoquina inflamatoria interleuquina 6 (IL-6) a partir del condensado de aire exhalado, que aunque también presentaba

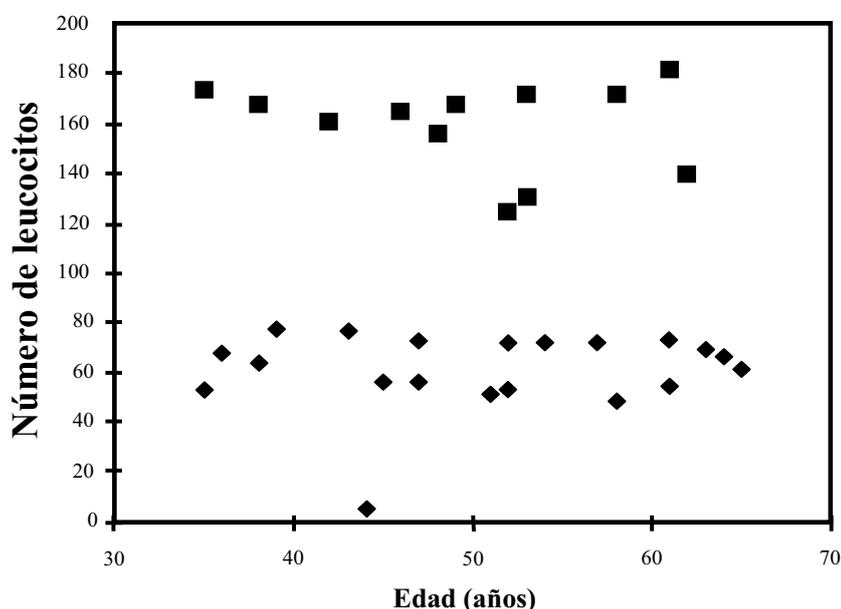


Figura 1.11. Número de leucocitos presentes en la lámina propia de la mucosa uvular de pacientes con apnea obstructiva del sueño (cuadrados) y sanos (rombos). Se puede apreciar un incremento de leucocitos asociado a la enfermedad y que además, es independiente a la edad (modificado de Paulsen et al 2002).

niveles mas altos en simples pacientes obesos, su incremento fue mucho menor que en pacientes con apnea obstructiva del sueño (Figura 1.13) (Carpagnano et al 2002). Además, el 8-isoprotano (Carpagnano et al 2003) como el oxido nítrico y el pentano (Olopade et al 1997) pueden experimentar un incremento significativo en su concentración en el aire exhalado de pacientes con SAHS después de las horas del sueño. La mayoría de estos estudios sugieren que el proceso inflamatorio observado puede ser generado, en parte, por el estrés mecánico al que se somete la vía aérea superior durante el ronquido y el SAHS.

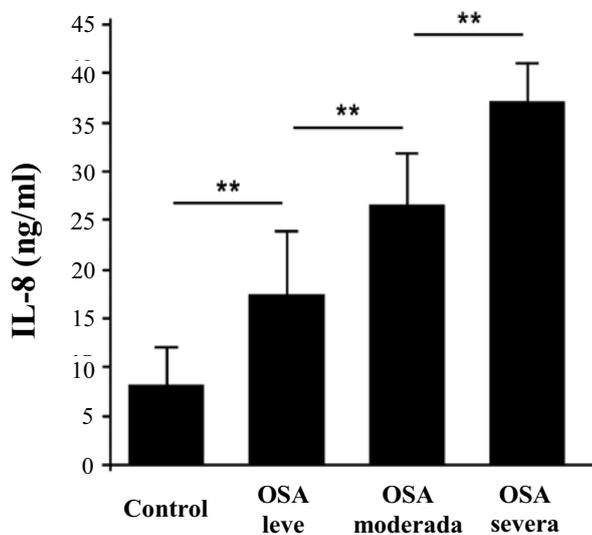


Figura 1.12. Concentración de IL-8 en el esputo inducido de controles y pacientes con apnea obstructiva del sueño de diferente grado de severidad (modificado de Devouassoux et al 2007).

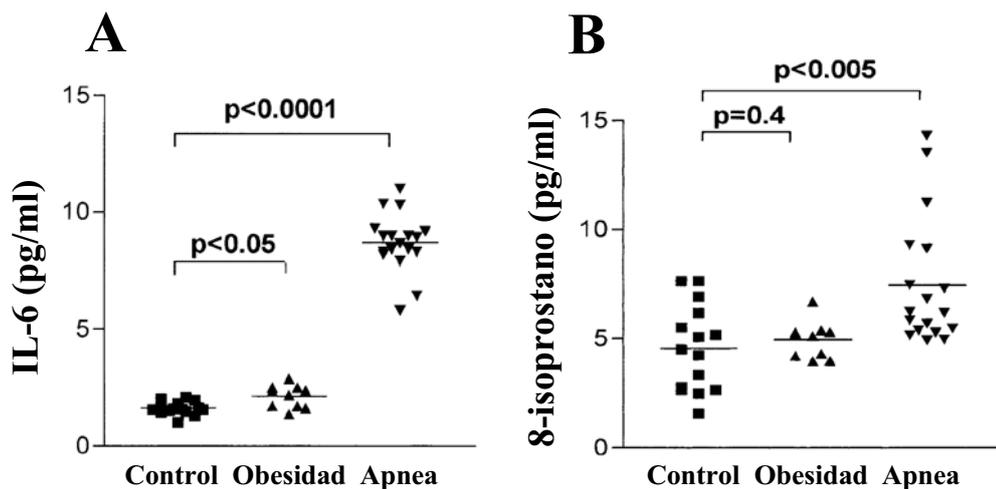


Figura 1.13. Concentrado exhalado del marcador inflamatorio IL-6 (A) y del marcador de estrés oxidativo 8-isoprostano (B) en individuos sanos, obesos y pacientes con apnea obstructiva del sueño (modificado de Carpagnano et al 2002).

Además existen cambios morfológicos en la vía aérea superior asociados al SAHS como por ejemplo la presencia de edema en la lamina propia y dilatación vascular (Woodson et al 1991) que pueden llegar a incrementar el grosor del tejido blando en pacientes con apnea obstructiva del sueño aumentando la resistencia al flujo aéreo (Schwab 1996, Anastassov y Trieger 1998) y, por tanto, agravando la enfermedad. Este edema puede deberse a varias causas: por una distensión o incremento de presión en las venas que rodean la vía aérea, por inflamación asociada al trauma ocasionado por el ronquido o por hipertensión pulmonar (Bradley et al 1985). Otros cambios morfológicos como una disminución del tejido conectivo (Paulsen FP et al 2002), un incremento en la presencia de tejido muscular y graso (Stauffer et al 1989), hipertrofia glandular mucosa y metaplasma escamoso focal (Woodson et al 1991) se han observado en la úvula de pacientes con apnea obstructiva del sueño.

Como se ha descrito anteriormente, la vía aérea superior de pacientes con ronquido y SAHS está sometida constantemente a estímulos mecánicos que difieren notablemente de las condiciones fisiológicas normales. La mayoría de los estudios en los que se ha observado lesión en la vía aérea superior de pacientes roncadores y con SAHS sugieren que el propio estrés mecánico generado por los diferentes estímulos asociados a la patología del SAHS es el causante del daño tisular e inflamación observada en estos pacientes. A pesar de la dificultad en el aislamiento de los efectos inflamatorios asociados al estrés mecánico, existen evidencias de su posible papel como agente lesivo. Por ejemplo, en un reciente estudio se ha demostrado que la aplicación de un estímulo vibratorio con características similares al ronquido humano es capaz de inducir, a través de la vía de las proteínas activadas por mitógenos (MAPKs), una respuesta inflamatoria en células epiteliales bronquiales mediante la síntesis y secreción de la citoquina IL-8 (Figura 1.14) (Puig et al 2005). Este estudio es importante para comprender mejor la evolución de la apnea obstructiva del sueño ya que la inflamación inducida por un primer estímulo vibratorio podría aumentar el grosor de la pared de la faringe, incrementando su colapsabilidad y generando cada vez estímulos más severos (Bergeron et al 2005), mientras que los mediadores inflamatorios podrían explicar la disfunción neuromuscular observada en los pacientes con apnea obstructiva del sueño (Boyd et al 2004). De hecho, se ha observado que el empleo prolongado de

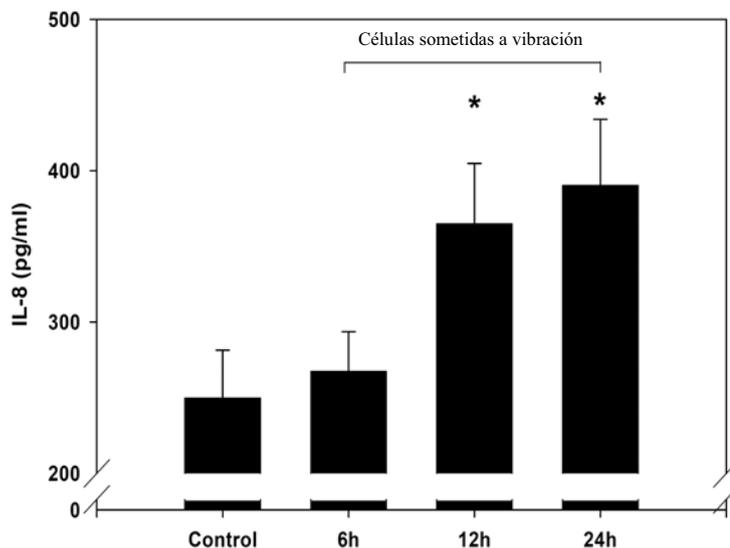


Figura 1.14. Efecto de la vibración sobre células epiteliales bronquiales humanas. Tras 12 h de aplicación de un estímulo vibratorio similar al ronquido humano se observó un aumento significativo en los niveles de IL-8 en el medio de cultivo (modificado de Puig et al 2005).

instrumentación vibratoria puede causar disfunción sensorial en las manos (Takeushi et al 1986).

Además, hay que considerar que los pacientes con SAHS, al disponer de un lumen aéreo reducido, tienen que respirar durante el sueño con una mayor resistencia lo que provoca un incremento en la presión negativa intraluminal promoviendo el colapso de la vía aérea superior (Gleadhill et al 1991). Ambos estímulos mecánicos (presión negativa y colapso/reapertura) podrían ser, junto al ronquido, diferentes agentes lesivos para la vía aérea superior en el SAHS. De hecho, en el tejido bronquial de pacientes con apnea obstructiva del sueño se ha observado inflamación en las vías aéreas más inferiores que podría ser provocada por este incremento en la presión negativa intraluminal ocasionada por el colapso de la vía aérea superior (Salerno et al 2004, Devouassoux et al 2007).

1.3.2 Miopatía y neuropatía asociada al SAHS

La vía aérea superior dispone de mecanismos dilatadores para responder al colapso y a la presión negativa que se genera en el lumen de la faringe durante la inspiración. La disfunción de estos mecanismos neuromusculares puede afectar a la funcionalidad de la vía aérea superior incrementando su colapsabilidad y promoviendo el desarrollo del SAHS.

Se ha observado atrofia e hipertrofia en el tejido muscular del paladar blando y úvula de pacientes con apnea obstructiva del sueño (Woodson et al 1991, Edström et al 1992) y con ronquido severo (Woodson et al 1991). Por otro lado, la infiltración de células inflamatorias en el músculo esquelético (Figura 1.15) puede causar una disfunción muscular debido a la interferencia de los mediadores inflamatorios con el sistema nervioso y muscular, llegando incluso a

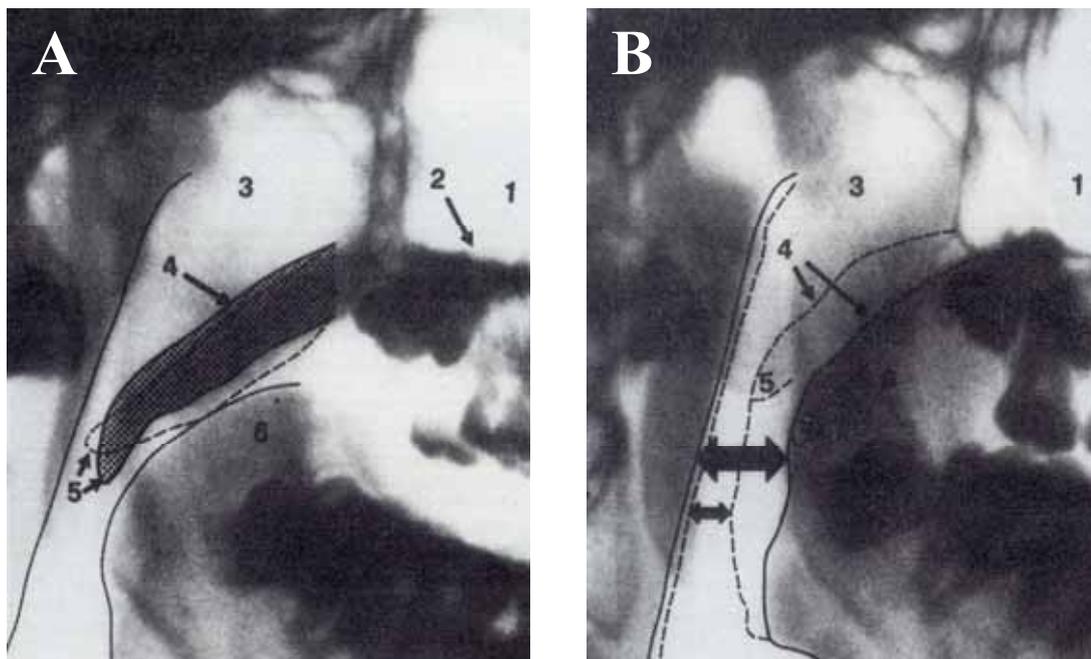


Figura 1.15. Tejido muscular de la vía aérea superior teñido para el marcador CD4 (Linfocito T colaborador) de un paciente con apnea obstructiva del sueño (modificado de Boyd et al 2004).

inhibir la funcionalidad de los músculos de forma directa (Boyd et al 2004). Además, se ha demostrado que la inflamación en la vía aérea superior puede tener un efecto tóxico sobre las fibras nerviosas provocando denervación (Boyd et al 2004). El SAHS también está asociado a una pérdida en la sensibilidad de la vía aérea superior. De hecho, se ha detectado una pérdida de sensación a una serie de estímulos como temperatura (Larsson et al 1992), vibración (Kimoff et al 2001), presión (Nguyen et al 2005) e, incluso, una reducción en la discriminación entre dos puntos (Kimoff et al 2001, Guilleminault et al 2002).

1.3.3 El ronquido en la evolución del SAHS

El fenómeno del ronquido, caracterizado por la vibración de las estructuras blandas de la vía aérea superior durante la inspiración, ocurre en al menos el 20-40% de la población general (Norton y Dunn 1985, Peter et al 1989, Racionero Casero et al 1999). Aunque la prevalencia del ronquido es mucho mayor a la de la apnea obstructiva del sueño, este fenómeno vibratorio es comúnmente considerado como una de las más claras manifestaciones del SAHS (Ersu et al 2004). De hecho, durante el ronquido existe obstrucción al paso del aire en la vía aérea superior (Farré et al 2002). Mediante radiografías de la faringe se han podido estudiar las características del estímulo vibratorio que es generado durante el ronquido, observándose diferencias en el comportamiento del paladar blando entre el ronquido nasal y el bucal (Figura 1.16) (Liistro et al 1991). Durante el ronquido nasal, el paladar blando se sitúa cercano a la base de la lengua y la úvula oscila con pequeña amplitud y alta frecuencia (80 Hz),



Ronquido bucal
 $28.2 \pm 7.5 \text{ Hz}^1$

Ronquido nasal
 $77.8 \pm 36.7 \text{ Hz}^1$

Figura 1.16. Vista lateral de radiografías realizadas sobre la vía aérea superior durante el ronquido bucal (A) y el ronquido nasal (B). En la imagen se pueden apreciar: 1. Seno maxilar; 2. Paladar duro; 3. Nasofaringe; 4. Paladar blando; 5. Úvula; 6. Lengua (modificado de Liistro et al 1991).

mientras que en el ronquido bucal, es la estructura completa del paladar blando la que oscila con una mayor amplitud y menor frecuencia (30 Hz). Además en este mismo estudio se observó una reducción en el lumen de la faringe relacionada con el ronquido.

A principios de los años 1980 se concibió por primera vez el término “enfermedad del roncador severo” como la progresión desde el ronquido severo a la apnea obstructiva del sueño (Lugaresi et al 1983). Estos autores encontraron que los pacientes con apnea obstructiva del sueño tenían unos antecedentes muy similares (en su mayoría habían sido roncadores severos desde jóvenes y en su mediana edad aparecieron los primeros síntomas del SAHS). Otros estudios posteriores demuestran la progresión del SAHS mediante el seguimiento de pacientes durante varios años con la realización de medidas objetivas relacionadas con la enfermedad (Lindberg et al 1999, Peppard et al 2000).

Ya a finales de los años 1990, Friberg postuló el término “el círculo vicioso del ronquido” en el que describen el papel del ronquido y la obesidad en el desarrollo y agravamiento del SAHS (Figura 1.17) (Friberg 1999). Para el desarrollo de este modelo, la autora utilizó la información disponible en observaciones clínicas y en los estudios que habían demostrado la disfunción muscular y nerviosa asociada al SAHS (Larsson et al 1992, Edström et al 1992, Friberg et al 1997, Friberg et al 1998a, Friberg et al 1998b). En este nuevo modelo, además de la neuropatía y miopatía asociada al trauma mecánico ocasionado por el ronquido, se consideró el posible papel de las fuerzas mecánicas que participan en el colapso y apertura de la vía aérea superior en el desarrollo del SAHS. Esta hipótesis se ha visto reforzada posteriormente con estudios realizados sobre la disfunción sensorial y muscular debida al ronquido. Por ejemplo, se ha demostrado que en simples roncadores ya existe una menor sensibilización de la vía aérea superior en respuesta a una serie de estímulos como vibración (Figura 1.18) (Kimoff et al 2001), temperatura (Larsson et al 1992) y presión (Nguyen et al 2005), presentándose de forma más acentuada en los estadios más avanzados del SAHS.

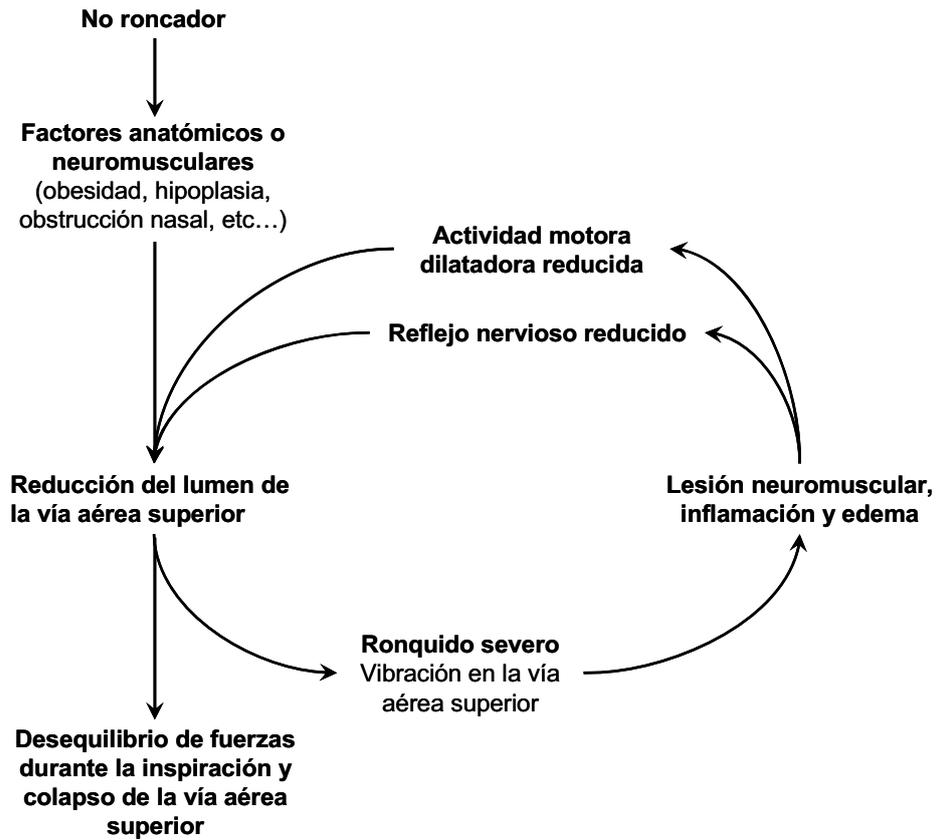


Figura 1.17. Modelo del círculo vicioso del ronquido. Según este modelo el ronquido jugaría un papel fundamental en el desarrollo y en la evolución del SAHS (modificado de Friberg 1999).

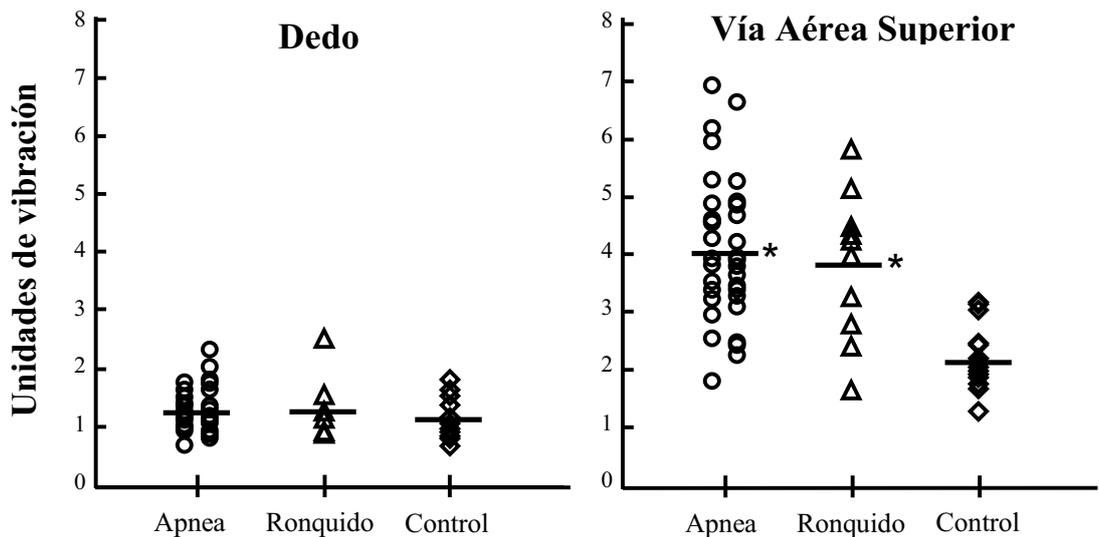


Figura 1.18. Sensibilización de una superficie control (izquierda) y sobre la vía aérea superior (derecha) a un estímulo vibratorio. Se representan los valores umbrales para controles, roncadores no apneicos y pacientes con apnea obstructiva del sueño (modificado de Kimoff et al 2001).

1.4 Tratamiento del SAHS

1.4.1 Presión positiva continua en la vía aérea superior (CPAP)

El tratamiento más extendido para evitar el colapso de la vía aérea superior en el SAHS es la aplicación de presión positiva continua a la vía aérea superior (CPAP) (Figura 1.19). Esta terapia clínica, que se describió por primera vez en el año 1981 (Sullivan et al 1981), está basada en contrarrestar las fuerzas de oclusión que son predominantes en pacientes con SAHS mediante la aplicación de presión positiva continua al lumen aéreo a través de una mascarilla nasal. El nivel de presión necesario para la apertura de la vía aérea es determinado clínicamente a partir de un estudio polisomnográfico. De esta forma, para un problema cuyo origen se ha visto que es mecánico, su tratamiento con la aplicación de presión positiva, también lo es.

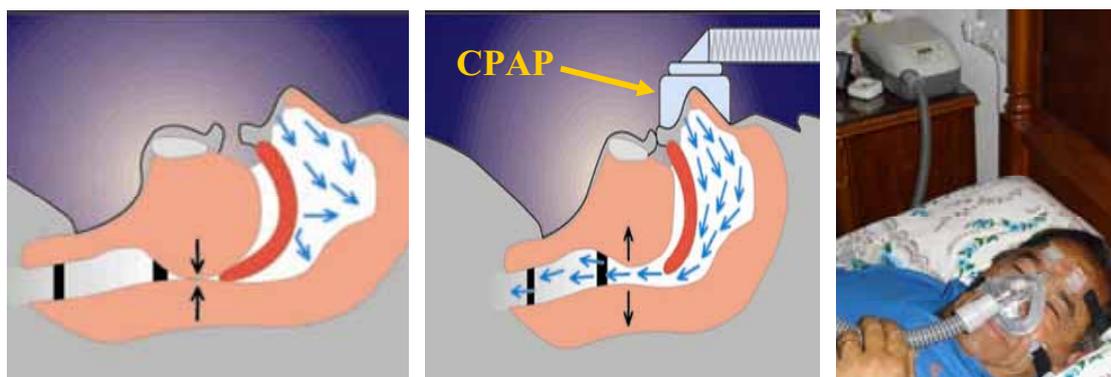


Figura 1.19. Aplicación de CPAP nasal en el tratamiento del SAHS. Esta técnica terapéutica mediante la aplicación de presión positiva en el lumen de la vía aérea superior consigue contrarrestar las fuerzas oclusivas de la vía aérea superior facilitando su apertura durante las horas del sueño.

Esta técnica se ha estandarizado en el tratamiento del SAHS gracias a su gran efectividad en la reversión de los diferentes trastornos que padecen los pacientes durante el sueño. De hecho, la aplicación de CPAP nasal consigue provocar la apertura de la vía aérea superior (Sullivan et al 1981, Strohl y Redline 1986, Sanders y Kern 1990), lo que resulta en la eliminación de los trastornos más frecuentes observados en el SAHS durante el sueño (Figuras 1.20 y 1.21). De esta forma, se consigue normalizar los valores en la presión arterial (Pepperell et al 2002, Bazzano et al 2007) y en la

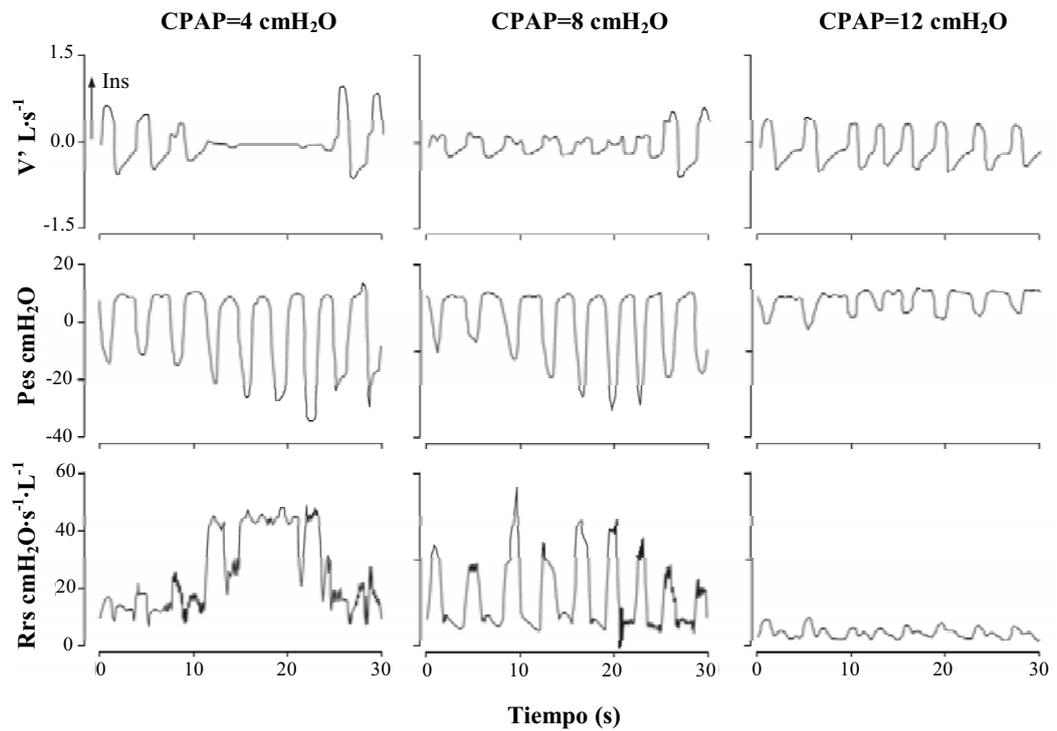


Figura 1.20. Medidas en el flujo aéreo (V'), presión esofágica (Pes) y resistencia respiratoria (Rrs) en un paciente con apnea obstructiva del sueño tratado con diferentes presiones de CPAP. Se puede observar que a medida que se aumenta la presión positiva en la vía aérea se consigue una progresiva reversión de los trastornos asociados al SAHS hasta lograr la normalización con 12 cmH_2O (modificado de Navajas et al 1998).

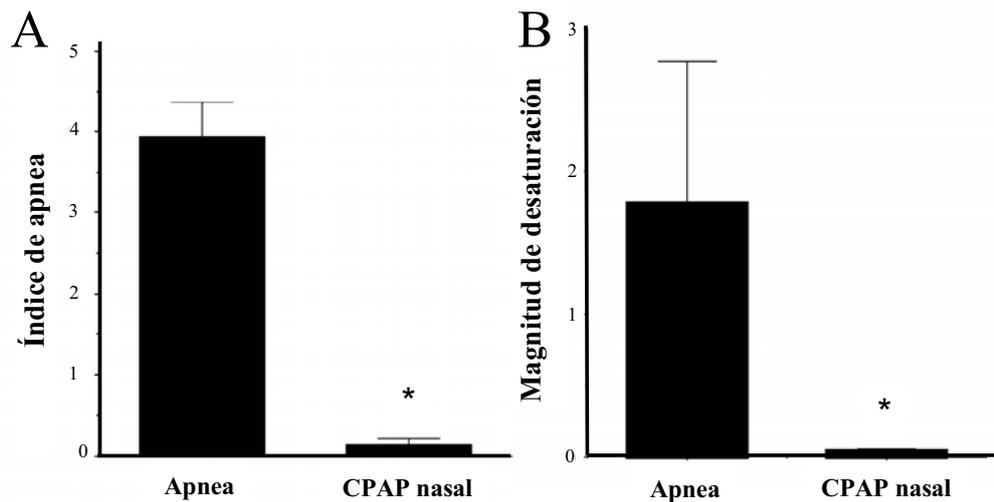


Figura 1.21. Reducción en el número de apneas por hora (índice de apnea) (A) y en la desaturación de oxígeno (B) tras la aplicación de CPAP en pacientes con apnea obstructiva del sueño. Magnitud de desaturación = $\Sigma (90 - SaO_2)t$ (SaO_2 = desaturación de oxígeno < 90%; t = duración de la desaturación en horas) (modificado de Ohga et al 2003)

saturación de oxígeno en sangre (Ohga et al 2003). Por otro lado, se ha descrito que la CPAP promueve la eliminación de los despertares abruptos (Younes 2004) y la reducción del estrés oxidativo en plasma (Hernández et al 2006). Respecto a los problemas asociados al padecimiento crónico del SAHS, el uso continuado de este tratamiento está asociado a una importante reducción en el riesgo cardiovascular (> 64 %) (Marin et al 2005, Buchner et al 2007), a una menor resistencia a la insulina (Harsch et al 2004, Babu et al 2005), a una reducción del estrés oxidativo (Carpagnano et al 2003) y a una reducción a nivel sistémico de citoquinas inflamatorias y otras moléculas como el factor de crecimiento endotelial vascular (Lavie et al 2002, Ryan S et al 2005) y proteína C reactiva (Steiroopoulos et al 2007), todas ellas íntimamente relacionadas con la fisiopatología del SAHS.

1.4.2 La rinitis como efecto secundario de la CPAP.

A pesar de que la CPAP nasal es un tratamiento muy efectivo, un 20-30% de los pacientes tienen que abandonarlo entre las 2-4 primeras semanas de uso (Guilleminault et al 1993) e, incluso, existen casos en los que se deja el tratamiento durante la primera noche (Krieger 1992). Con estas tasas de rechazo hoy día el cumplimiento de la CPAP es el mayor reto clínico. Aunque existen numerosas causas de rechazo y no cumplimiento del tratamiento de CPAP, el motivo más frecuente es la aparición de síntomas nasales adversos como congestión nasal y rinorrea (Pepin et al 1995, Brander et al 1999, Lojander et al 1999). Además, los pacientes con apnea obstructiva del sueño presentan una alta prevalencia de síntomas riníticos y obstrucción nasal antes de ser tratados con CPAP nasal (Young et al 1997, Lofaso et al 2000, Canova et al 2004), por lo que el tratamiento podría agravar los síntomas iniciales provocando finalmente el rechazo. Aunque se sugiere que el paso continuo de aire frío y seco a través de la boca podría potenciar los síntomas nasales (Richards et al 1996, Bachour y Maasilta 2004, Cruz et al 2006), hasta la fecha no se conoce si el propio estrés mecánico, ejercido por la compresión generada por la CPAP nasal, puede ser un factor determinante en el desarrollo de los síntomas secundarios.

La rinitis es una constelación de síntomas nasales entre los que se incluyen congestión nasal, rinorrea, picor y escozor. Estos procesos, regulados por el sistema nervioso, pueden ser activados mediante un proceso patológico que normalmente es de naturaleza inflamatoria o mecanorreceptora. La liberación de neuropéptidos por las terminales nerviosas sensoriales induce una serie de respuestas entre las que se incluyen, vasodilatación (Lundblad et al 1982), permeabilidad vascular (McDonald et al 1988), secreción glandular (Baraniuk y Kaliner 1990), reclutamiento leucocitario (Umeno et al 1990) y activación de varios tipos leucocitarios (O'Connor et al 2004). Estas respuestas mediadas por neuropéptidos explican la aparición de síntomas nasales como congestión nasal y rinorrea. En este proceso, conocido comúnmente como inflamación neurogénica, es importante el papel de la sustancia P y la neuroquinina A. Estos neuropéptidos producidos en el cuerpo celular de las fibras C son transportados en estructuras granulares por el citoplasma hasta las terminales nerviosas donde son secretados. Para que la sustancia P pueda provocar la aparición de síntomas nasales en la mucosa nasal ésta debe reconocer y activar su receptor específico (TACR1), que se ha identificado en el epitelio nasal y en las glándulas nasales humanas (Shirasaki et al 1998). Por otro lado, la activación del sistema inmune, que conlleva la síntesis y secreción de mediadores inflamatorios como citoquinas y neurotrofinas, puede interferir con el sistema nervioso activando las terminales sensoriales (Sarin S et al 2006). Además, se ha descrito que la síntesis del mRNA de TACR1 es incrementada en presencia de enfermedades inflamatorias de la vía aérea (Bai et al 1995), lo que provoca una mayor sensibilización de la zona a la exposición de sustancia P. Por otro lado, el factor de crecimiento nervioso (NGF), que es una neurotrofina que interacciona con las fibras sensoriales nociceptoras, es sintetizada por numerosos tipos celulares neuronales y no neuronales como células leucocitarias (Santambrogio et al 1994, Kobayashi et al 2002), células musculares (Creedon y Tuttle 1991) y células epiteliales (Fox et al 2001, Wu et al 2006) (Hahn et al 2006). Esta neurotrofina, que es secretada durante un proceso inflamatorio (Bonini et al 1996, Sanico et al 2000, Kobayashi et al 2002, Hahn et al 2006), promueve un incremento en la actividad de las fibras, en la producción y contenido de neuropéptidos y en la ramificación de las terminales sensoriales, fenómenos que favorecen la hipersensibilización de la vía aérea (Levi-Montalcini 1987, Lewin y Barde 1996, Braun et al 2001). Además, se ha demostrado que el NGF puede incrementar

directamente la expresión génica de neuropéptidos en las fibras sensoriales nerviosas (Hunter et al 2000) y activar el receptor específico de la sustancia P (De Vries et al 1999).

Durante el tratamiento con CPAP nasal las fuerzas mecánicas ejercidas sobre la pared nasal podrían jugar un papel determinante en el desarrollo de los síntomas riniticos. De hecho, la pared de la vía aérea está sometida a un constante estímulo de compresión que podría provocar una respuesta inflamatoria (Figura 1.22). En estudios recientes se ha observado que en diferentes tejidos (Kobayashi et al 2005, Kasahara et al 2006, Dudic et al 2006, Tan et al 2006) como en la vía aérea (Lim y Wagner 2003,

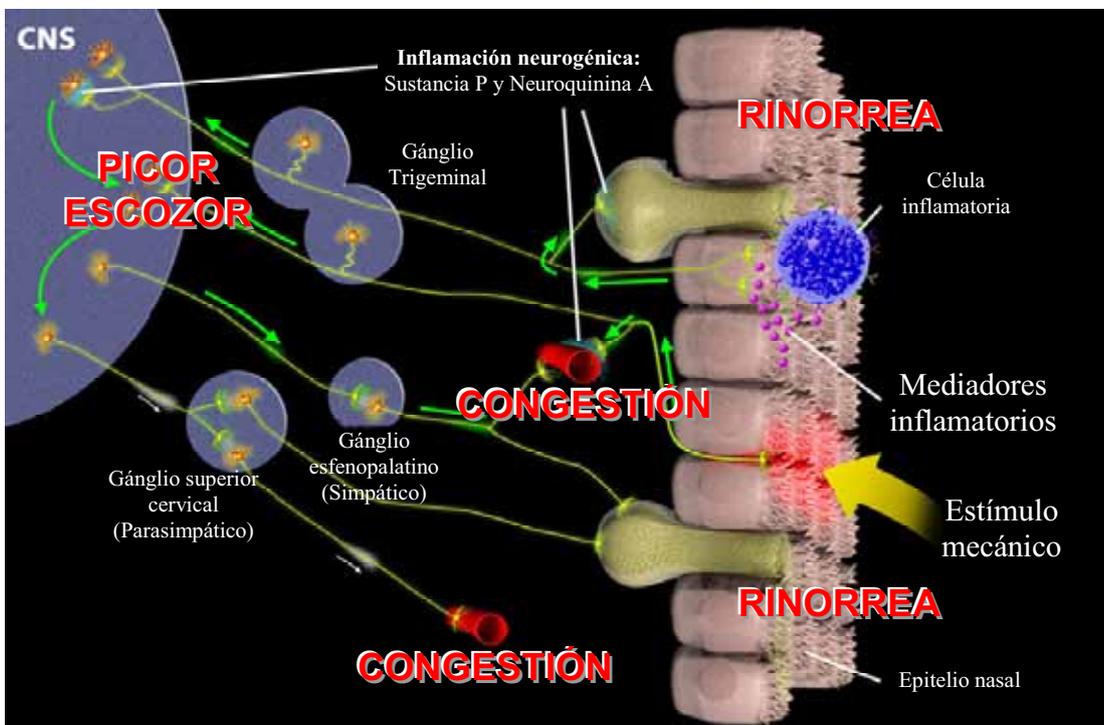


Figura 1.22. Vías de señalización del sistema nervioso en el desarrollo de los diferentes síntomas riniticos. Un estímulo mecánico como la compresión ejercida mediante CPAP nasal puede activar mecanorreceptores localizados en el epitelio de la mucosa nasal. Por otro lado, los mediadores inflamatorios que son liberados por las células leucocitarias cuando existe daño tisular podrían activar las fibras C nociceptoras promoviendo la liberación de neuropéptidos en el proceso denominado inflamación neurogénica. Las señales son transmitidas al sistema nervioso central, donde disparan las sensaciones de picor y escozor. Los potenciales de acción pueden transmitirse mediante el sistema nervioso parasimpático provocando secreción glandular, vasodilatación y rinorrea. Además, la supresión ejercida sobre el sistema simpático provoca vasodilatación y congestión nasal. CNS = Sistema Nervioso Central (modificado de Sarin et al 2006).

Tshumperlin y Drazen 2006) este estímulo puede promover una respuesta biológica que está mediada en la mayoría de los casos por la participación de células leucocitarias y citoquinas inflamatorias. Además, en un estudio realizado *in vitro* sobre células bronquiales se ha demostrado que la compresión es capaz de activar la vía de las MAPKs de manera dependiente de la magnitud del estímulo (Tschumperlin et al 2002). Por otro lado, también se ha observado que esta vía tiene un papel fundamental en la regulación de la síntesis y secreción de citoquinas inflamatorias (Puig et al 2005). Otro factor importante a tener en cuenta es el estado preconditionado de los pacientes con SAHS. Existen estudios que revelan un incremento en la respuesta de la mucosa nasal de los individuos que padecen rinitis alérgica respecto a sujetos que no presentan síntomas nasales previos (Nathan et al 2005). De hecho, en un estudio llevado a cabo en cerdos, la sensibilidad de los nervios sensoriales en respuesta a un estímulo mecánico se cuadruplicó tras una reacción alérgica (Riccio et al 1996). Si consideramos que los pacientes con apnea obstructiva del sueño presentan en su mayoría rinitis perenne (Canova et al 2004), sería lógico pensar que estos individuos tienen una mayor sensibilización nerviosa al estímulo de compresión asociado a la CPAP nasal. Por otro lado, la variabilidad basal existente podría explicar el diferente comportamiento de los pacientes con apnea obstructiva del sueño al tratamiento.

Por lo tanto, la información disponible a partir de estos estudios previos sugiere que la CPAP nasal podría ser para la vía aérea superior, y más concretamente a la mucosa nasal, un estímulo mecánico suficiente como para desencadenar un proceso inflamatorio que explicaría la aparición o agravamiento de los síntomas rinítics en los pacientes tratados con CPAP nasal (Figura 1.22).

Capítulo 2

Objetivos de la tesis

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto inflamatorio de los diferentes estímulos mecánicos que experimenta la vía aérea superior durante la apnea obstructiva del sueño (vibración y presión negativa/colapso) y su tratamiento (presión positiva).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Efecto de la vibración en la vía aérea superior de rata:

1. Desarrollar un modelo animal que permita la aplicación de un estímulo vibratorio que simule el ronquido humano sobre la vía aérea superior de rata.
2. Estudiar los efectos inflamatorios locales inducidos por el estímulo vibratorio aplicado a la vía aérea superior.

Efecto de la presión negativa y colapso en la vía aérea superior de rata:

3. Implementar un modelo en rata para la aplicación de presión negativa intermitente inspiratoria capaz de inducir el colapso y reapertura recurrentes de la vía aérea superior.
4. Determinar la presión crítica o presión de colapso de la vía aérea superior a partir del modelo desarrollado.
5. Estudiar si una presión negativa recurrente similar a la padecida durante la inspiración incrementada en pacientes con apnea obstructiva del sueño es capaz de iniciar una respuesta inflamatoria en la vía aérea superior de rata.

Efecto de la compresión sobre la pared nasal de rata:

6. Diseñar un modelo animal para la aplicación no invasiva de CPAP nasal y placebo en rata.
7. Determinar si el estímulo de compresión durante el tratamiento con CPAP mediante una máscara nasal puede inducir un efecto inflamatorio temprano en la mucosa nasal.

8. Estudiar si esta compresión puede provocar un incremento en la expresión génica de la neurotrofina factor de crecimiento nervioso (NGF) y del receptor de la sustancia P (TACR1).

Capítulo 3

Efectos inflamatorios de la vibración en la vía aérea superior en un modelo animal de ronquido

Este capítulo se corresponde con el siguiente artículo:

Almendros I, Acerbi I, Puig F, Montserrat JM, Navajas D, Farre R.

“Upper-airway inflammation triggered by vibration in a rat model of snoring”. SLEEP. 2007; 30: 225-227.

Factor de impacto; 5.126

Revista nº 12/146

3.1 Resumen

Introducción: El ronquido es un fenómeno muy prevalente que está comúnmente asociado a la fisiopatología del síndrome de la apnea hipopnea del sueño (SAHS). De hecho, a partir de los estudios previos realizados en pacientes y en modelos celulares se ha sugerido que el ronquido es un posible origen inflamatorio para la vía aérea superior.

Objetivos: Determinar si el estímulo mecánico vibratorio asociado al ronquido induce inflamación en la vía aérea superior en un modelo en rata *in vivo*.

Material y métodos: Se utilizaron 24 ratas macho sanas de la cepa Sprague-Dawley (250-300 g). La vía aérea superior de 12 ratas se canuló a nivel traqueal y se sometió a vibración (60 Hz; \pm 10 cmH₂O) durante 3 h con un patrón temporal consistente en 1 s

de vibración seguido de 3 s sin vibración. Una segunda canulación, dirigida hacia los pulmones, permitió al animal respirar espontáneamente durante todo el experimento. En un grupo placebo (n=12) los animales se instrumentaron del mismo modo con la única diferencia de que no se aplicó vibración a la vía aérea superior. El efecto inflamatorio de la vibración se evaluó a partir del incremento en la expresión génica de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la quemoquina proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2) observado mediante PCR en tiempo real en el tejido de paladar blando.

Resultados: Se observó un incremento significativo en la expresión de ambos mediadores proinflamatorios tras la aplicación de vibración: TNF- α : 6.01 ± 2.47 veces ($p = 0.005$) y MIP-2: 2.38 ± 0.54 veces ($p = 0.021$) respecto al grupo control (media \pm SE).

Conclusión: La aplicación durante 3 h de un estímulo mecánico vibratorio con las características típicas del ronquido es capaz de inducir un proceso local proinflamatorio en la vía aérea superior.

3.2 Introducción

El ronquido es un fenómeno generado por la vibración de las estructuras blandas que forman parte de la vía aérea superior. Esta perturbación respiratoria, que aparece durante las horas del sueño, es muy prevalente en un rango de la población que va desde simples roncadores hasta pacientes que presentan el síndrome de la apnea/hipopnea del sueño (SAHS). Estudios previos realizados en pacientes sugieren que el ronquido puede actuar como agente lesivo para la vía aérea superior capaz de inducir inflamación, pérdida de sensibilidad, neuropatía sensorial y disfunción neuromuscular (Guilleminault et al 2002, Boyd et al 2004, Dematteis et al 2005, Nguyen et al 2005). Estas alteraciones inducidas por la vibración en la vía aérea superior podrían incrementar la severidad del SAHS, reduciendo la capacidad de respuesta de la pared de la vía aérea superior a la presión negativa generada durante la inspiración y llegando a resultar finalmente en colapso (Guilleminault et al 2002, Nguyen et al 2005). De hecho, según la interpretación del círculo vicioso del ronquido (Friberg 1999), éste podría tener un papel fundamental en la primera etapa de la evolución natural del SAHS.

A pesar de que el estímulo mecánico vibratorio durante el ronquido ha sido propuesto como una de las posibles causas de lesión en la vía aérea superior, los mecanismos involucrados en el proceso inflamatorio inducido en el tejido sometido a vibración no son conocidos con exactitud. En un reciente estudio *in vitro* se ha observado que la aplicación de una vibración con amplitud y frecuencia típicas del ronquido (Liistro et al 1991) puede activar la cascada proinflamatoria de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en células epiteliales bronquiales (Puig et al 2005). Sin embargo, no existen modelos *in vivo* en los que se hayan estudiado los efectos inflamatorios específicos de la vibración en el tejido de la vía aérea superior.

En este trabajo se ha implementado un modelo en rata que ha permitido aislar y someter la vía aérea superior de estos animales a un estímulo vibratorio con las características típicas del ronquido en humanos. Para asegurar que el estímulo aplicado en el presente estudio fuese de una magnitud razonable, evitando un daño mecánico excesivo, se cuantificó el posible edema inducido en el paladar blando de un primer

grupo de ratas. Finalmente, para demostrar que la vibración induce inflamación, se analizó la expresión génica de los marcadores inflamatorios MIP-2 y TNF- α en el paladar blando mediante PCR en tiempo real.

3.3 Material y métodos

3.3.1 Sistema experimental

Este estudio, aprobado por el Comité Ético de Investigación Animal de la Universidad de Barcelona, se llevó a cabo en 24 ratas macho de la cepa Sprague Dawley con un peso comprendido entre 250-300 g que fueron distribuidas en 2 grupos. El modelo experimental diseñado para este trabajo permitió la aplicación selectiva y controlada de un estímulo vibratorio a la vía aérea superior de 12 ratas durante 3 h. Los animales, anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de 85 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina, fueron sometidos a una doble intubación a nivel de la tráquea que permitió la separación física de la vía aérea inferior de la superior (Figura 3.1). Para permitir la respiración espontánea del animal, una primera cánula (16 GA, Adsyte ProTM, Beckton Dickinson, Madrid, España) se insertó a nivel de la tráquea inferior y fue dirigida hacia los pulmones manteniendo su extremo permanentemente abierto. Seguidamente, una segunda cánula dirigida hacia la vía aérea superior e insertada en la tráquea superior se utilizó para transmitir el estímulo mecánico que simuló un proceso de ronquido típico (Figura 3.1).

El estímulo vibratorio al que se sometió la vía aérea superior fue generado por un altavoz de 10 pulgadas sellado a una caja hermética de 2 litros. La presión generada por el altavoz fue controlada mediante un generador de funciones analógico y un amplificador. Este sistema permitió la aplicación de un estímulo vibratorio de características similares al ronquido, con una frecuencia y amplitud de 60 Hz, \pm 10 cmH₂O y un patrón temporal de 1 s de vibración seguido por 3 s sin vibración. Además, esta misma cánula dirigida hacia la vía aérea superior se conectó a un dispositivo convencional de presión continua positiva (CPAP) (BiPAP®, Respironics, Murrysville, Penn). Este sistema de CPAP, mediante la aplicación de 0.5 cmH₂O de presión,

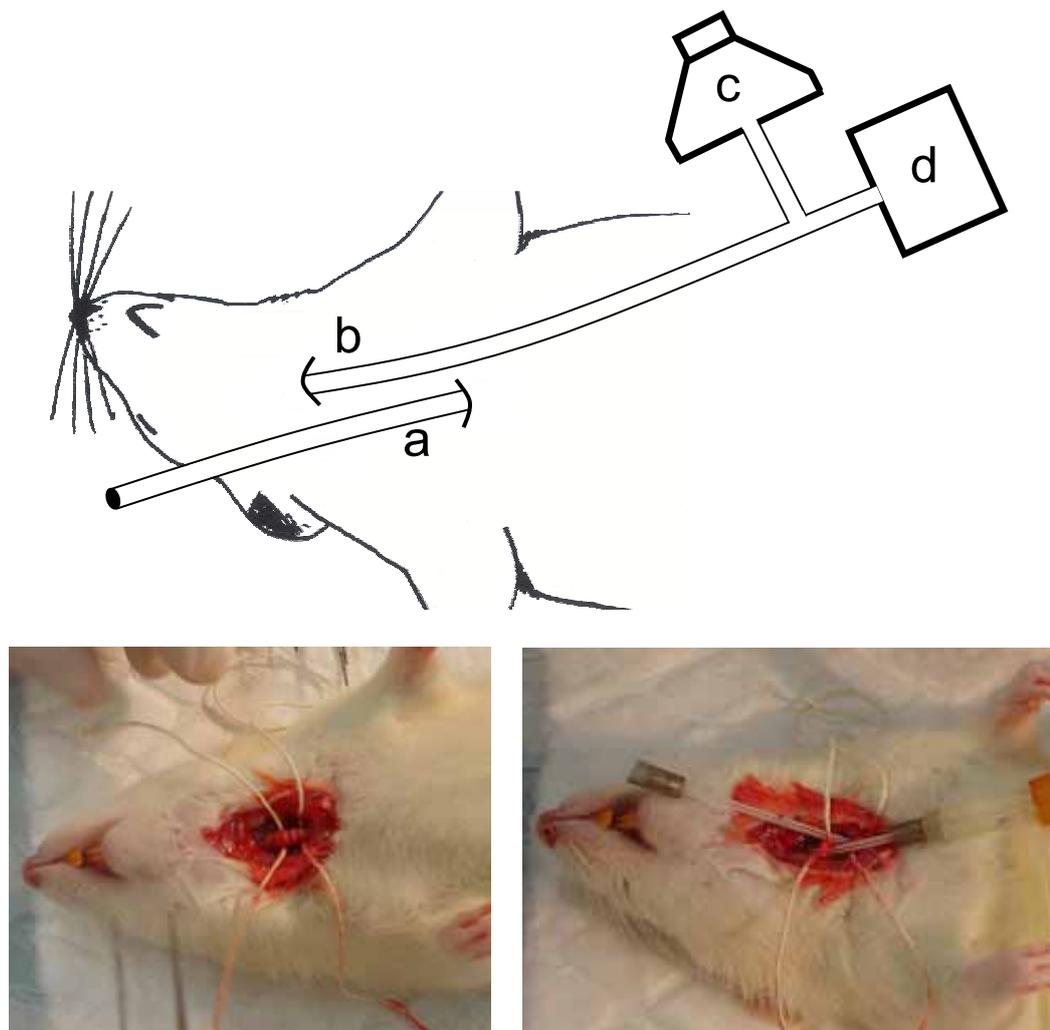


Figura 3.1. Arriba: Canulación y aplicación del estímulo vibratorio al animal. La tráquea inferior se canuló (a) para permitir la respiración espontánea al animal. Mediante una segunda cánula se canuló la tráquea superior (b) y se conectó a un altavoz (c) para la aplicación de vibración a la vía aérea superior y a una fuente de presión de 0.5 cmH₂O (d) para mantener la vía aérea abierta. Abajo: Imágenes del proceso de canulación. Aislamiento y preparación de la tráquea (izquierda) y tráquea con la doble canulación para la aplicación de vibración a la vía aérea superior (derecha).

generó un pequeño flujo de aire continuo suficiente para mantener la vía aérea abierta, facilitando la transmisión del estímulo vibratorio originado por el altavoz. Este pequeño flujo de aire fue previamente humidificado y calentado a 37 °C para mantener unas condiciones fisiológicas óptimas. La presión generada por el estímulo vibratorio y el flujo aéreo por la unidad de CPAP se monitorizaron durante todo el experimento mediante el uso de un transductor de presión y de un neumotacógrafo, ambos conectados al tubo de entrada de la vía aérea superior. Finalmente, para asegurar que los

cambios observados fueron debidos exclusivamente al estímulo vibratorio aplicado, se realizó un grupo placebo de 12 ratas sometidas al mismo procedimiento experimental con la única excepción de que no se les aplicó vibración (Figura 3.2).

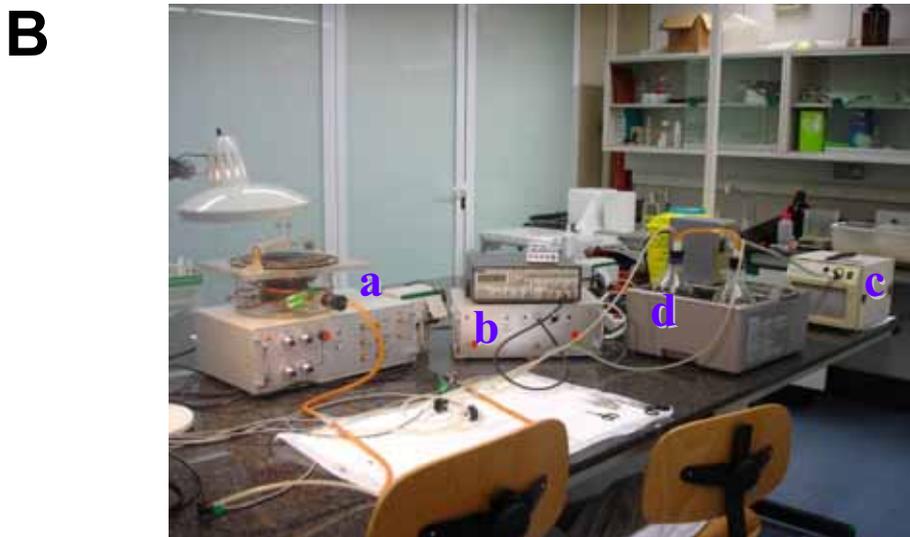
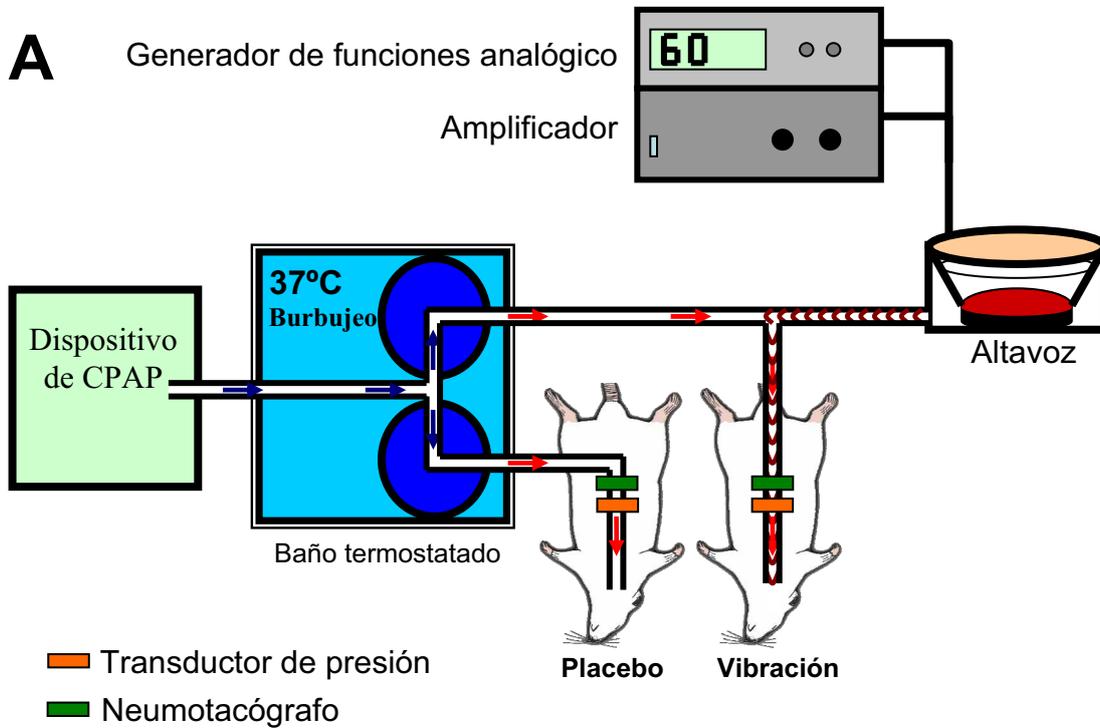


Figura 3.2. A: Esquema general del sistema experimental. B: La vibración fue generada por un altavoz (a) controlado mediante un generador de función analógico y un amplificador (b). Un dispositivo convencional de CPAP (c) permitió la aplicación de un pequeño flujo de aire humidificado y termostático a 37 °C (d) favoreciendo la transmisión del estímulo vibratorio y evitando la reseca de la vía aérea durante las 3 horas del experimento.

3.3.2 Extracción de las muestras

Los animales se sacrificaron por exsanguinación a través de la aorta abdominal tras 3 horas de aplicación de vibración o placebo. A continuación se separaron las partes derecha e izquierda de la mandíbula inferior mediante el corte de la sínfisis mandibular, lo que proporcionó acceso a la vía aérea superior (Figura 3.3). Finalmente, se extrajeron y almacenaron muestras de paladar blando a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior cuantificación de edema y el análisis de la expresión génica.

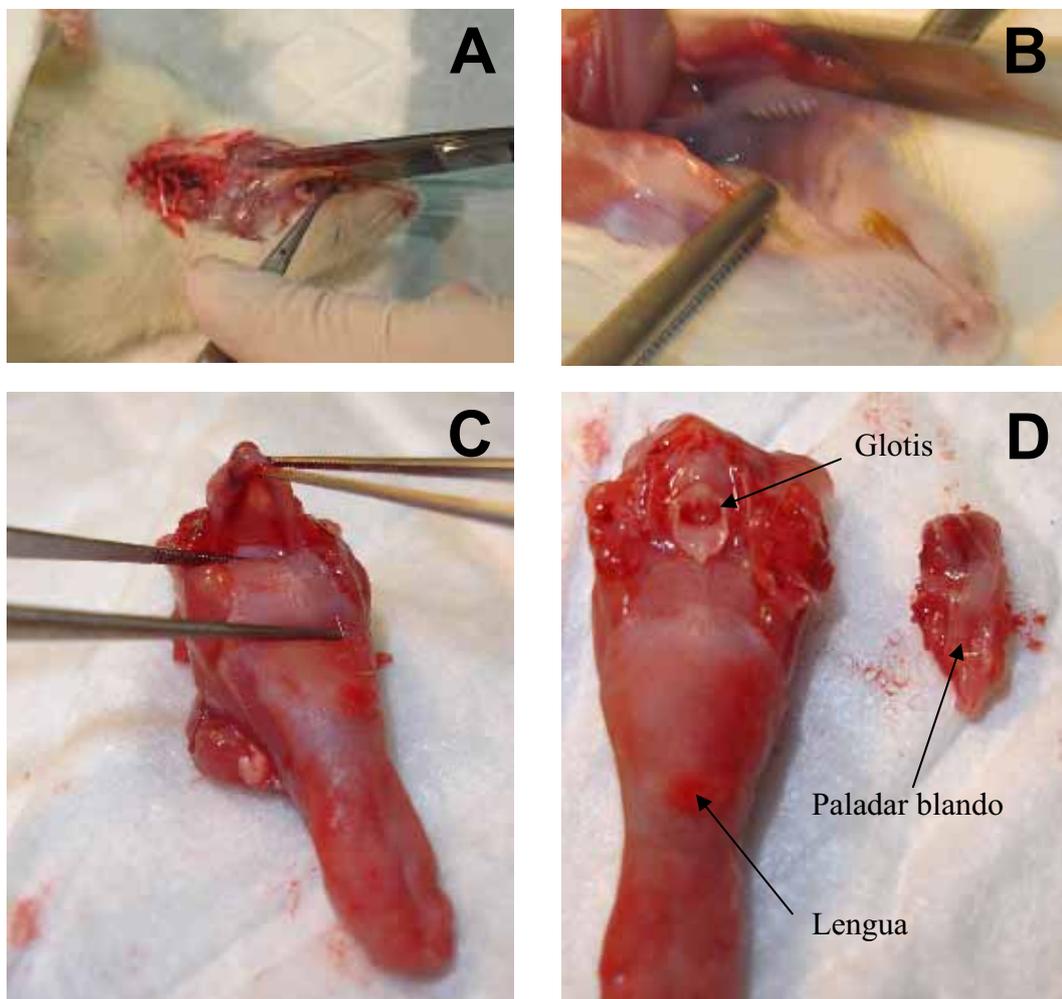


Figura 3.3 Extracción de la muestra de paladar blando. El corte de la sínfisis mandibular (A) permitió la separación de la mandíbula inferior izquierda y derecha (B) y la extracción de la vía aérea superior (C). Finalmente se realizó el aislamiento y almacenaje del tejido de paladar blando (D).

3.3.3 Cuantificación del edema en la vía aérea superior

Una primera serie de 8 ratas fue sometida a vibración y placebo para cuantificar el edema presente en tejido de paladar blando mediante el cálculo del peso fresco y del peso seco de cada una de las muestras obtenidas. Para la obtención del peso fresco, las muestras se mantuvieron durante 4 min a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, se colocaron en tubos Eppendorf de 0,5 ml independientes y se tomaron sus pesos mediante una balanza de alta precisión. Para eliminar todo su contenido en agua y obtener el peso seco, estos mismos tubos con sus correspondientes muestras se mantuvieron en una estufa a 60 °C durante 48 h. Finalmente, el edema se cuantificó mediante la relación peso fresco/peso seco de cada una de las muestras de paladar blando.

3.3.4 Expresión génica de los marcadores MIP-2 y TNF- α

En una segunda serie de 16 animales, el tejido del paladar blando fue disgregado mediante un homogeneizador Polytron 2100 (Kinematica, Luzern, Switzerland) y se aisló su contenido en RNA usando el sistema 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, Calif). A continuación se cuantificó la expresión génica de los marcadores TNF- α y MIP-2 mediante PCR en tiempo real. La transcripción reversa se realizó con cebadores aleatorios proporcionados por el kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems). Se utilizaron la TaqMan Universal PCR Master Mix y los ensayos de expresión génica (Assays on DemandTM, Applied Biosystems) de TNF- α y MIP-2 de rata (Rn00562055_m1 y Rn00586403_m1, respectivamente) para la amplificación de estos marcadores. La expresión génica del marcador GAPD (Rn99999916_s1) se usó como control endógeno para la normalización de las expresiones génicas de TNF- α y MIP-2. Las medidas se realizaron mediante el sistema 7300 RT-PCR (Applied Biosystems) en triplicado. Finalmente, para el cálculo de la expresión génica relativa entre ambos grupos se utilizó el método estandarizado $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen 2001). (Ver Apéndice A para un mayor detalle del protocolo de PCR en tiempo real y análisis de los datos)

3.3.5 Análisis estadístico

La comparación entre ambos grupos (vibración y placebo) se realizó mediante t-student o el test de Mann-Whitney (para distribuciones normales o no normales, respectivamente) asumiendo significación estadística para $p < 0.05$.

3.4 Resultados

En la primera serie de animales no se observó desarrollo de edema en el tejido del paladar blando (Figura 3.4). La razón entre el peso fresco y peso seco de las muestras de paladar blando en los animales sometidos a vibración (4.62 ± 0.07 , media \pm SE) ($n=4$) fue similar a la que se obtuvo en los animales sometidos a placebo (4.58 ± 0.17). De esta manera se garantizó que la magnitud del estímulo mecánico aplicado no era excesiva para estos animales.

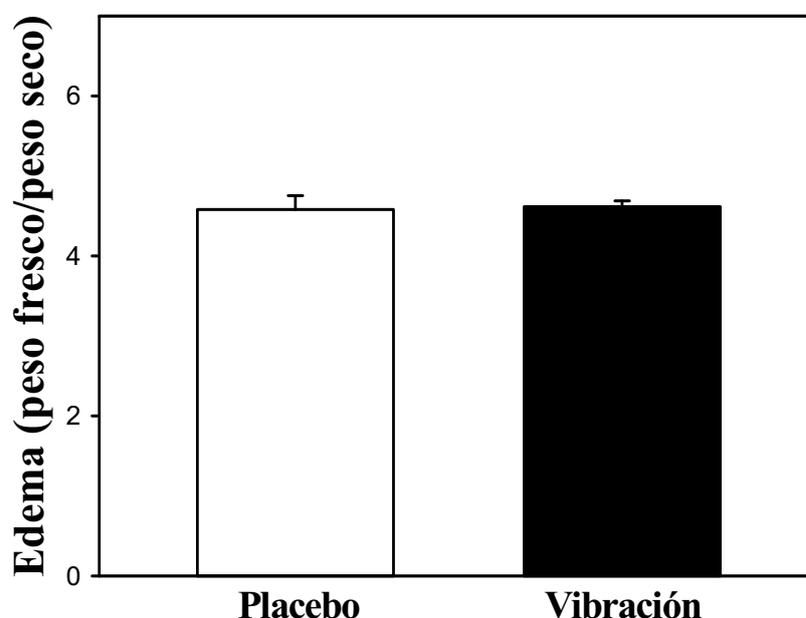


Figura 3.4. Cuantificación de edema en las muestras de paladar blando. No se encontraron diferencias significativas en la relación peso fresco/peso seco entre el grupo sometido a vibración y el grupo placebo (media \pm SE) ($n=4$).

La aplicación durante 3 h de un estímulo vibratorio similar al ronquido indujo la sobreexpresión de los marcadores inflamatorios investigados (TNF- α y MIP-2) en el paladar blando (Figura 3.5). La expresión génica de la citoquina TNF- α se incrementó significativamente ($p = 0.005$) desde 1.00 ± 0.21 , media \pm SE (rango: 0.31-2.14) en el grupo control hasta 6.01 ± 2.47 (rango: 0.97-20.27) en los animales sometidos a vibración. La expresión de la quemoquina MIP-2 también se incrementó 2.38 ± 0.54 veces (rango: 0.96-5.42) de manera significativa ($p = 0.021$) en el paladar blando sometido al estímulo mecánico vibratorio respecto a la expresión observada en controles (1.00 ± 0.07 ; rango: 0.71-1.32). Las expresiones génicas de TNF- α y MIP-2 en las ratas sometidas a vibración exhibieron un incremento paralelo (correlación lineal: $r^2 = 0.98$) (Figura 3.6).

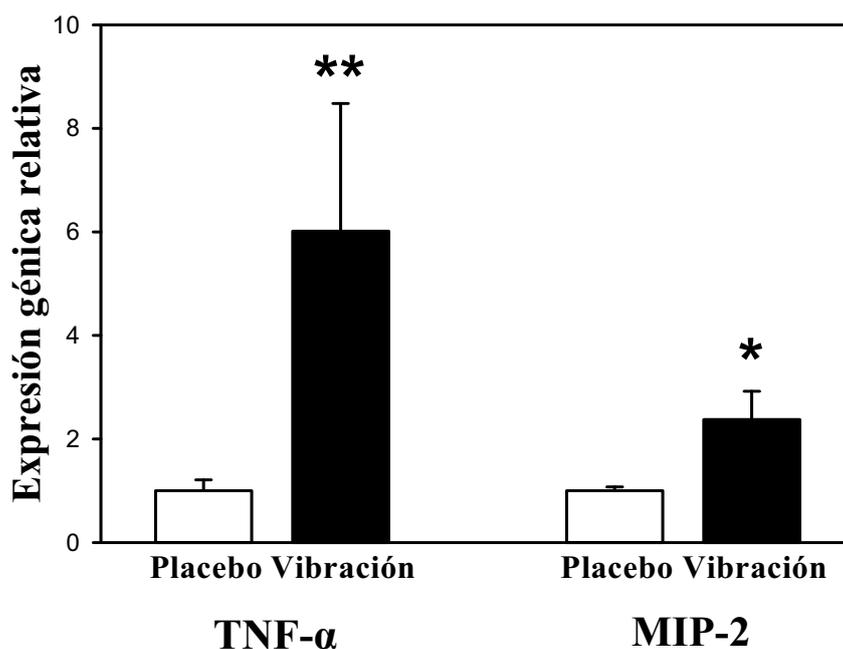


Figura 3.5. Expresión génica relativa de TNF- α y MIP-2 en el paladar blando de animales sometidos a placebo y a vibración (media \pm SE; n=8). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

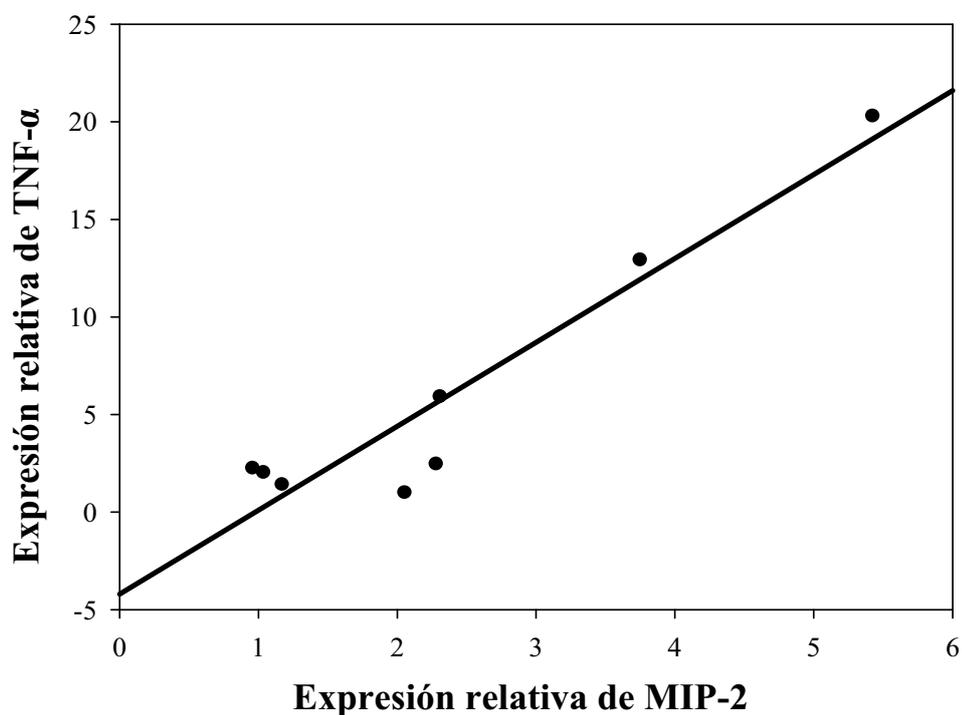


Figura 3.6. Correlación de los valores obtenidos tras 3 h de vibración en la expresión génica relativa de MIP-2 y TNF- α en cada uno de los casos y representación de la regresión lineal.

3.5 Discusión

Los resultados obtenidos en este modelo *in vivo* demuestran que un estímulo vibratorio similar al ronquido puede iniciar por si mismo una respuesta inflamatoria local en la vía aérea superior. Este estudio se enfocó específicamente en la expresión de dos de los marcadores inflamatorios más relevantes (TNF- α y MIP-2). La citoquina TNF- α juega un papel central en la iniciación del proceso inflamatorio temprano a través de una cascada de respuestas (expresión de moléculas de adhesión, producción de otras moléculas inflamatorias y de especies reactivas de oxígeno) que contribuyen al reclutamiento y activación de células inflamatorias (Mukhopadhyay et al 2006). La quemoquina murina MIP-2, que es equivalente a la interleuquina 8 humana, es una

molécula clave en el proceso inflamatorio debido a su alto poder quimiotáctico y activador neutrofílico, promoviendo la infiltración leucocitaria desde los capilares sanguíneos hacia el tejido dañado y/o inflamado (Kobayashi 2006).

En el presente estudio se logró implementar un modelo animal que, mediante la separación de la vía aérea superior de la inferior a nivel de la tráquea, permitió estudiar *in vivo* los efectos de la vibración sobre la vía aérea superior. Además, el diseño experimental utilizado permitió aplicar de manera controlada y selectiva un estímulo vibratorio similar al ronquido típico humano a la vía aérea superior de la rata. En un estudio previo, Liistro et al. observaron que la frecuencia vibratoria durante el ronquido puede variar entre los 30 Hz (ronquido bucal) y los 80 Hz (ronquido nasal) (Liistro et al 1991). Para nuestro estudio se seleccionó una frecuencia de 60 Hz que se corresponde con un valor intermedio de la vibración típica experimentada en roncadores. Dado que la vibración es debida a procesos repetidos de colapso y reapertura de las partes blandas de la vía aérea superior, se seleccionó una amplitud de vibración de ± 10 cmH₂O que es una magnitud similar a la presión típica de colapso de la vía aérea superior en pacientes con SAHS. El patrón temporal de vibración/no vibración aplicado simuló un proceso de ronquido típico inspiratorio (1 s de duración con una frecuencia de 15 respiraciones/min). Una primera canulación dirigida hacia los pulmones aseguró la apertura de la vía aérea inferior durante todo el experimento, lo que permitió la ventilación espontánea del animal y evitó la propagación del estímulo vibratorio hacia los pulmones. En la segunda canulación dirigida hacia la vía aérea superior se aplicó el estímulo vibratorio acompañado de una presión constante de 0.5 cmH₂O, que facilitó la propagación del estímulo a través de la vía aérea superior mediante la generación de un pequeño flujo de aire. Según los resultados obtenidos en la cuantificación de edema, el estímulo mecánico aplicado fue de una magnitud razonable. En efecto, el hecho de que no se observaran cambios en la relación peso fresco/peso seco entre ambos grupos (vibración y placebo) indica que la vibración aplicada no ocasionó lesión tisular.

El mecanismo que se utilizó para aislar la vía aérea superior de los pulmones había sido previamente empleado en otros estudios para demostrar la respuesta motora de la vía aérea superior sometida a oscilaciones de presión en perros (Plowman et al

1990) o sometida a presión negativa en ratas (Ryan et al 2003). Un modelo animal alternativo de ronquido podría estar basado en la obstrucción externa de la vía aérea como ha sido recientemente propuesto en un estudio llevado a cabo en conejos sobre la transmisión de la energía vibratoria (Amatoury et al 2006). Aunque el mecanismo descrito por Amatoury et al. es mínimamente invasivo y permite la aplicación de vibración de una forma más natural, este modelo tiene el inconveniente de no poder controlar las características del estímulo en el propio tejido debido a la alta variabilidad inherente a este diseño experimental (Amatoury et al 2006). Además, otras posibles fuentes de inflamación como las derivadas de la obstrucción de la vía aérea superior (incremento en el esfuerzo de corte, aumento del estímulo ventilatorio o hipoxia) podrían introducir variables de confusión. Aunque el estudio presentado en nuestro trabajo es invasivo, el modelo experimental desarrollado permite aplicar un estímulo vibratorio de manera más controlada a la vía aérea superior. Por otro lado, el uso de un grupo placebo sometido al mismo procedimiento experimental sin la aplicación de vibración aseguró que la sobreexpresión observada en los mediadores inflamatorios estudiados (Figura 3.5) es debida exclusivamente al estímulo mecánico aplicado.

Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que consigue determinar específicamente que la vibración es causa directa de inflamación en la vía aérea superior. De hecho, no es fácil determinar cual es el papel exacto de la vibración en el proceso inflamatorio inducido en la vía aérea superior debido a la compleja naturaleza y la simplicidad de estudios previos basados sobre pacientes (Guilleminault et al 2002, Boyd et al 2004, Dematteis et al 2005, Nguyen et al 2005) y sobre modelos celulares (Puig et al 2005), respectivamente. Por un lado, el estudio de las vías de mecanotransducción, que disparan un proceso inflamatorio en la vía aérea superior, es muy difícil y complejo de realizar a partir de los datos obtenidos en estudios clínicos, dada la concurrencia de otros estímulos potencialmente proinflamatorios como pueden ser una mayor resistencia de la vía aérea superior, hipoxia recurrente, disrupción en el sueño u obesidad. Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de estudios basados en modelos celulares están sujetos a unas condiciones fisiológicas que difieren claramente de las experimentadas en la vía aérea superior *in situ*. La información obtenida en el presente estudio animal confirma la hipótesis derivada de los resultados ya obtenidos sobre pacientes

(Guillemínault et al 2002, Boyd et al 2004, Dematteis et al 2005, Nguyen et al 2005) y sobre células (Puig et al 2005) que sugieren que la vibración en la vía aérea superior es capaz de iniciar un proceso inflamatorio local. Además, el modelo empleado en el presente trabajo podría ser útil posteriormente para estudiar con mayor profundidad cómo es el progreso del proceso inflamatorio iniciado por la vibración, tanto a nivel sistémico como a nivel de expresión de moléculas de adhesión, edema o infiltración neutrofílica en los diferentes tejidos que forman parte de la vía aérea superior. Por otro lado, este modelo también podría usarse para modificar las variables del estímulo vibratorio (patrón temporal, frecuencia y amplitud del estímulo) o para superponer otros estímulos tales como hipoxia recurrente, pretratamiento inflamatorio a nivel local o sistémico y para la aplicación de diferentes drogas que actúen sobre diferentes pasos de la cascada inflamatoria. Finalmente, mediante la realización de una traqueotomía permanente se podría permitir la aplicación de un estímulo vibratorio en un modelo crónico para determinar si el daño ocasionado a la vía aérea superior es capaz de producir daño neuromuscular (Guillemínault et al 2002, Boyd et al 2004, Dematteis et al 2005, Nguyen et al 2005) o disfunción endotelial, promoviendo el desarrollo y evolución de la enfermedad del SAHS a largo plazo (Friberg 1999).

Capítulo 4

La presión intratraqueal negativa induce inflamación en la vía aérea superior en la apnea obstructiva

4.1 Resumen

Introducción: La vía aérea superior de pacientes con apnea obstructiva del sueño está sometida a fenómenos repetidos de presión negativa, colapso y reapertura. Aunque no existe evidencia directa, se ha propuesto que este estrés mecánico podría explicar la inflamación observada en la vía aérea superior de los pacientes con esta enfermedad.

Objetivos: Desarrollar un modelo en rata que permita la aplicación intratraqueal de presión negativa intermitente capaz de inducir el colapso y reapertura de la vía aérea superior. Determinar si el estímulo mecánico induce inflamación local en la vía aérea superior.

Material y métodos: La vía aérea superior de 14 ratas fue sometida a un patrón temporal de 1 s de presión negativa inspiratoria (-40 cmH₂O) seguida de 2 s de presión positiva espiratoria (5 cmH₂O) durante 5 h. En un grupo control de 14 ratas, los animales fueron instrumentados similarmente pero no se aplicó estímulo mecánico. Para demostrar que el estímulo mecánico aplicado induce inflamación en la vía aérea superior, se cuantificó la expresión génica de los marcadores inflamatorios MIP-2, TNF- α , IL-1 β y P-selectina

en el tejido de paladar blando y laringe mediante PCR en tiempo real en un total de 16 ratas sometidas a estímulo (n=8) o control (n=8). Por otro lado, en una segunda serie de 12 animales (6 con estímulo y 6 control) se realizaron cortes histológicos de la vía aérea superior para estudiar si el estímulo aplicado es capaz de provocar extravasación leucocitaria a las 5 h.

Resultados: El modelo desarrollado consiguió simular el estímulo de colapso y reapertura que ocurre en la vía aérea superior de pacientes con apnea obstructiva del sueño. Después de 5 h de aplicación de presión negativa intratraqueal intermitente, el tejido de la laringe presentó un notable incremento de la expresión génica de los marcadores MIP-2, TNF- α , IL-1 β y P-selectina (~ 40, 24, 47 y 7 veces, respectivamente) respecto al grupo control. Incrementos similares se observaron en la expresión génica del tejido de paladar blando.

Conclusión: La aplicación de una presión negativa intermitente junto al estímulo inducido de colapso y reapertura sobre la vía aérea superior con características similares a las experimentadas en la apnea obstructiva del sueño fue capaz de iniciar un notable proceso inflamatorio. Estos resultados podrían explicar la inflamación observada en la vía aérea superior de los pacientes con apnea obstructiva del sueño.

4.2 Introducción

El síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS) es una afección muy prevalente que está caracterizada por el colapso repetitivo de la vía aérea superior durante el sueño (Patil et al 2007a). Para mantener una ventilación adecuada durante los eventos en que la vía aérea superior inicia una obstrucción inspiratoria, los pacientes con SAHS deben incrementar la magnitud de presión alveolar negativa generada por la musculatura inspiratoria a valores superiores a los normales. Por tanto, durante la inspiración el conjunto de la vía aérea de estos pacientes, desde el pulmón hasta la región donde sucede el colapso, está sometida a valores de presión inspiratoria más negativos que en individuos con resistencia respiratoria normal (Krieger et al 1997). Los elevados valores negativos de presión inspiratoria en una vía aérea superior con mayor colapsabilidad incrementan, a su vez, el colapso y conducen a una obstrucción total de la vía aérea superior que se manifiesta por la ausencia de flujo inspiratorio (apnea obstructiva) (Farré et al 2003b). La apnea obstructiva durante el sueño se resuelve mediante la activación de la musculatura dilatadora de la vía aérea superior asociada a un despertar transitorio del paciente al final del evento apneico (Patil et al 2007a). En consecuencia, la vía aérea superior de los pacientes con SAHS está sometida a un estrés mecánico recurrente consistente en la secuencia: presión intraluminal negativa de magnitud decreciente, colapso y reapertura.

Diversos autores han sugerido que el estrés mecánico asociado a estos eventos repetitivos pueden inducir las lesiones características de la vía superior de pacientes con SAHS: inflamación, edema en la lámina propia de mucosa, paladar blando y músculo (Woodson et al 1991, Sekosan et al 1996, Anastassov y Triegger 1998, Boyd et al 2004, Devouassoux et al 2007), y disfunción sensorial a estímulos externos como temperatura (Larsson et al 1992), presión (Nguyen et al 2005) y vibración (Kimoff et al 2001). Sin embargo, mas allá de estas observaciones documentadas en la vía aérea superior de pacientes con SAHS, en los que coexisten diversos estímulos proinflamatorios (hipoxia intermitente, síndrome metabólico, obesidad, etc), no hay evidencias directas disponibles de que el estrés mecánico de presión negativa, colapso y reapertura

experimentado por la vía aérea superior durante el SAHS sea una causa *per se* de inflamación local.

Conocer con detalle cuales son los mecanismos que contribuyen a la lesión de la vía aérea superior es fundamental considerando que se ha comprobado que la inflamación de las estructuras blandas de la faringe puede provocar directamente una reducción en su lumen por engrosamiento de la pared faríngea (Ryan y Bradley 2005). Esta inflamación puede desencadenar una disfunción neuromuscular que reduciría el tono dilatador (Boyd et al 2004), con la consecuente reducción de la respuesta a la presión negativa inspiratoria, agravando la enfermedad. Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido analizar en un modelo en rata si un estímulo mecánico consistente en eventos repetitivos de presión intraluminal negativa, colapso y reapertura similares a los experimentados por los pacientes con SAHS es capaz de iniciar una cascada inflamatoria en el tejido de la vía aérea superior.

4.3 Material y métodos

4.3.1 Animales

El presente estudio, aprobado por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona, se llevó a cabo en 28 ratas macho (250-300 g) de la cepa Sprague-Dawley que fueron anestesiadas mediante uretano (1 g/Kg) al 10%.

4.3.2 Sistema experimental

En este trabajo se desarrolló un dispositivo experimental que permitió la aplicación de un estímulo de presión negativa capaz de provocar el colapso en la vía aérea superior, y mediante un posterior flujo de aire espiratorio, se consiguió inducir su reapertura. Mediante una traqueotomía con doble intubación se consiguió aislar la vía aérea superior, lo que facilitó la aplicación selectiva del estímulo mecánico a ésta.



Figura 4.1. Preparación del animal. Mientras que una cánula dirigida hacia los pulmones permitió la respiración espontánea del animal, una segunda cánula aplicó el estímulo mecánico a la vía aérea superior. Una mascarilla nasal fijada a los orificios nasales del animal permitió estimar la presión crítica o presión a la que se induce el colapso de la vía aérea.

En este modelo se permitió la respiración espontánea del animal a partir de una cánula insertada a nivel de la tráquea inferior y dirigida hacia los pulmones. Una segunda cánula, esta vez insertada a nivel de la tráquea superior y dirigida hacia la vía aérea superior, permitió la aplicación intratraqueal del estímulo de presión negativa con colapso/reapertura (Figura 4.1).

La vía aérea superior de 14 ratas se sometió durante 5 h a un patrón temporal de 1 s de presión negativa inspiratoria decreciente, seguida de 2 s de presión positiva espiratoria que simuló el proceso característico del SAHS de inspiraciones recurrentes con una vía aérea de resistencia incrementada. Para la aplicación de presión negativa, la cánula dirigida hacia la vía aérea superior se conectó a una bomba de vacío que generó en la vía aérea superior una presión inspiratoria de $-40 \text{ cmH}_2\text{O}$ mediante cierre de una electroválvula colocada en una mascarilla nasal, lo que provocó su colapso (Figura 4.2A). Seguidamente, se promovió la reapertura de la vía aérea superior mediante la aplicación de una pequeña presión positiva de $5 \text{ cmH}_2\text{O}$, suficiente para generar un pequeño flujo de aire gracias a la apertura sincronizada de la electroválvula posicionada en el tubo de salida de la mascarilla nasal (Figura 4.2B). El aire aplicado durante la

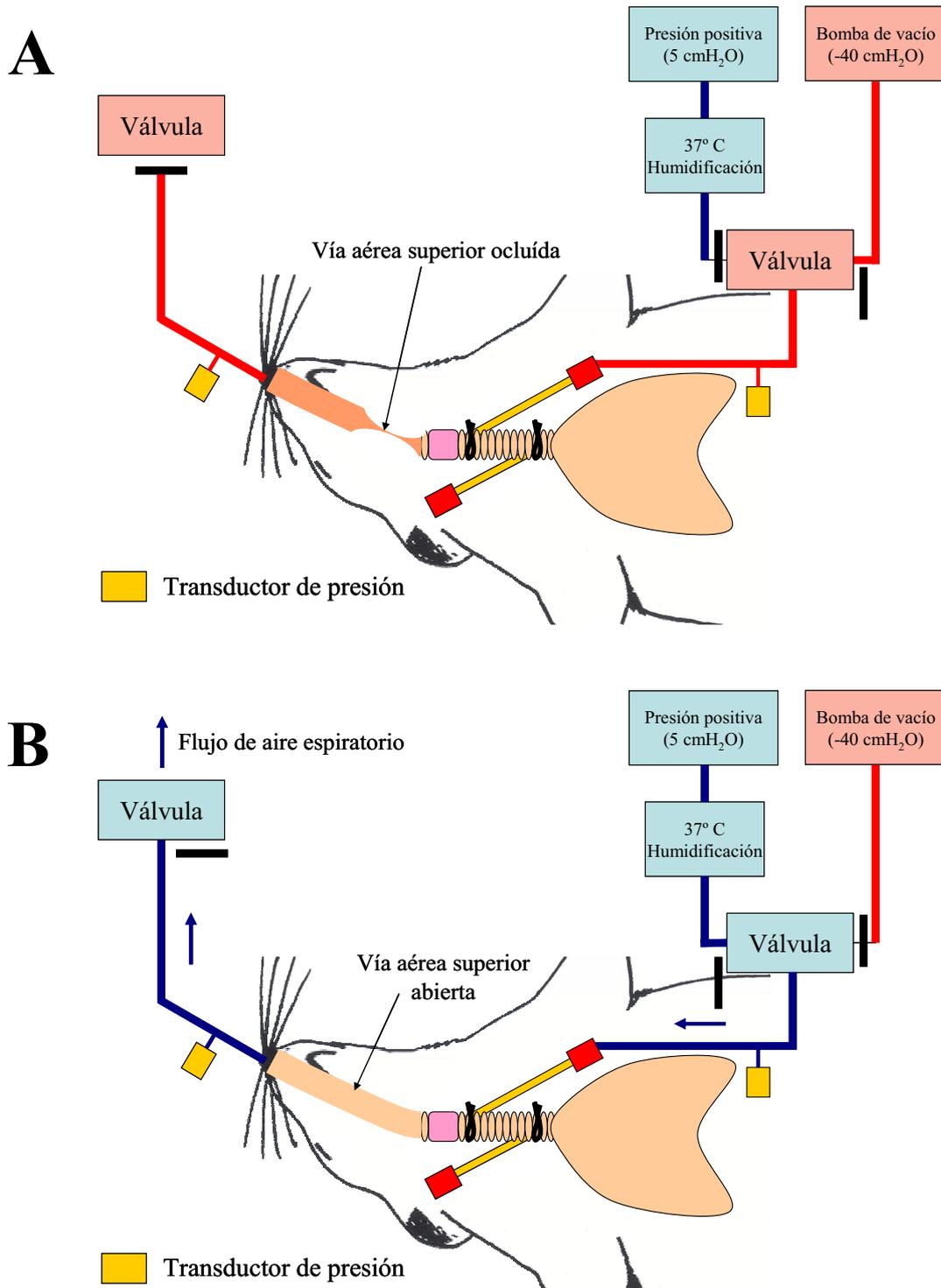


Figura 4.2. Estímulo de cierre y reapertura inducido en la vía aérea superior mediante presión negativa intermitente. La aplicación intratraqueal de una presión negativa inspiratoria de $-40\text{ cmH}_2\text{O}$ (línea roja) indujo la oclusión de la vía aérea superior (A), mientras que con la aplicación de una pequeña presión positiva espiratoria de $5\text{ cmH}_2\text{O}$ (línea azul) se promovió su reapertura (B). Tanto la presión aplicada como la presión en la mascarilla nasal, se monitorizaron mediante transductores de presión colocados a la entrada de la vía aérea superior y en el tubo de salida de la mascarilla nasal, respectivamente.

presión espiratoria fue previamente humidificado y temperado a 37 °C. Además, se monitorizó tanto la presión aplicada sobre la vía aérea superior como la presión en la mascarilla nasal mediante transductores de presión piezoresistivos (Microwitch 176PC28HD2, Honeywell ± 70 hPa; Scarborough, Ontario, Canada). Para calcular la presión crítica o presión negativa en la que se induce el colapso de la vía aérea superior, se calculó el valor medio de la presión en la mascarilla nasal durante la aplicación de presión negativa inspiratoria en 6 animales tanto al inicio como al final del experimento. Un grupo control 14 ratas fueron instrumentadas de manera similar con la única excepción de que los animales no fueron sometidos al estímulo mecánico.

4.3.3 Extracción de muestras

En una primera serie de 16 ratas, tras 5 h de aplicación de estímulo mecánico de presión negativa con colapso/reapertura (n=8) o control (n=8), los animales fueron sacrificados por exsanguinación a través de la aorta abdominal, lo que facilitó la extracción de muestras de tejido de paladar blando y laringe para su posterior análisis con PCR en tiempo real (Figura 4.3). Las muestras se congelaron y almacenaron inmediatamente a -80 °C.

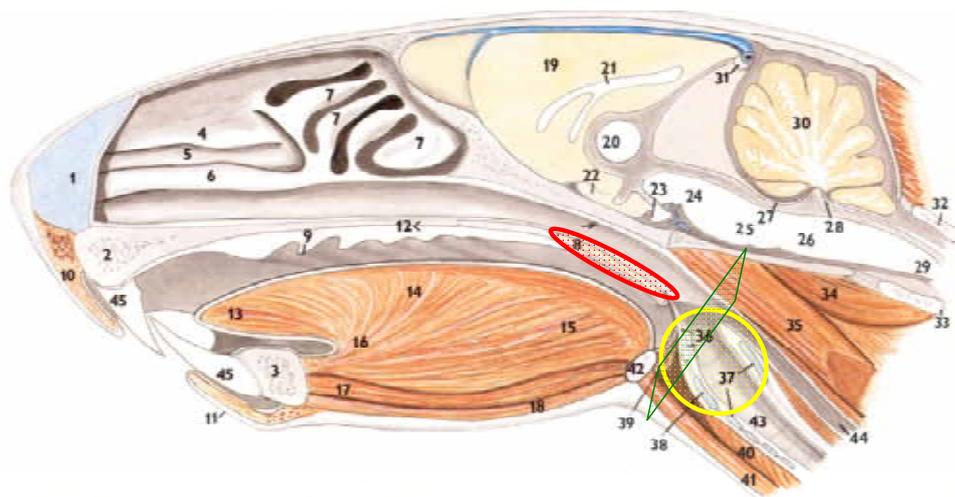


Figura 4.3. Esquema anatómico de la vía aérea superior de ratona. Los tejidos utilizados para el análisis de la expresión génica fueron la laringe (círculo amarillo) y el paladar blando (elipse roja). Para el estudio en la presencia de edema e infiltración leucocitaria se realizaron cortes histológicos a nivel de la hipofaringe (región verde) (modificado de P.Popesko. "A colour atlas of anatomy of small laboratory animals". Ed. Wolfe 1992).

Por otro lado, en una segunda serie de 12 ratas (6 sometidas a estímulo y 6 controles), los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia facilitando la extracción completa e intacta de la vía aérea superior (no exsanguinada) (Figura 4.3). Las muestras se embebieron inmediatamente en OCT (Optimal Cutting Temperature compound) y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis histopatológico.

El procedimiento quirúrgico de apertura de la vía aérea superior para la extracción de las muestras utilizado tanto para el análisis de la expresión génica como para el estudio histopatológico, se realizó mediante el mismo protocolo previamente descrito en el apartado 3.3.2.

4.3.4 Cuantificación de la expresión génica.

Los tejidos de paladar blando y de laringe se descongelaron y disgregaron mediante un homogeneizador (Polytron 2100, Kinematica, Luzern, Switzerland). Su contenido de RNA se aisló mediante el sistema 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA). A continuación mediante transcripción reversa se pasó el RNA a cDNA con la utilización de cebadores aleatorios proporcionados en el kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems). La amplificación del cDNA se realizó en triplicado mediante PCR en tiempo real (7300 RT-PCR, Applied Biosystems). Para ello se utilizaron los ensayos de expresión génica (Assays on Demand™, Applied Biosystems) específicos para rata de los marcadores inflamatorios proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina 1 β (IL-1 β) y P-selectina (Rn00586403_m1, Rn00562055_m1, Rn00580432_m1 y Rn00565416_m1, respectivamente) junto a los reactivos necesarios para la polimerización del cDNA incluidos en la TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Además se utilizó el marcador GAPD (Rn99999916_s1) como marcador endógeno de referencia. Finalmente se cuantificó la expresión génica relativa mediante el sistema comparativo convencional $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen 2001). (Ver Apéndice A para un mayor detalle del protocolo de PCR en tiempo real y análisis de los datos)

4.3.5 Análisis histopatológico.

La muestra de vía aérea superior previamente embebida en OCT y congelada se utilizó para la realización de cortes histológicos de la vía aérea superior. Primeramente se realizaron secciones seriadas del material congelado. Los anillos consecutivos obtenidos se fijaron en formaldehído al 4% por un tiempo medio de 48 horas. Se realizaron secciones macroscópicas adaptadas a los recipientes utilizados para el proceso de inclusión en parafina. La inclusión de parafina utilizó un sistema automático en el que el tejido pasó por alcoholes de concentración progresivamente superior. Posteriormente el material se pasó a xileno y a parafina líquida, a una temperatura media de 62 °C. El tiempo total del citado proceso automático fue de 18 horas. Se realizaron bloques de parafina, uno por cada anillo seccionado. Los bloques de parafina se seccionaron a 5 micras, tiñéndose dicha sección mediante el procedimiento rutinario de Hematoxilina/Eosina (Figura 4.4). Las secciones teñidas se cubrieron con un cristal fino al efecto, utilizando un pegamento transparente (DPX), que hace que la preparación sea definitiva, sin requerir ulteriores tratamientos.

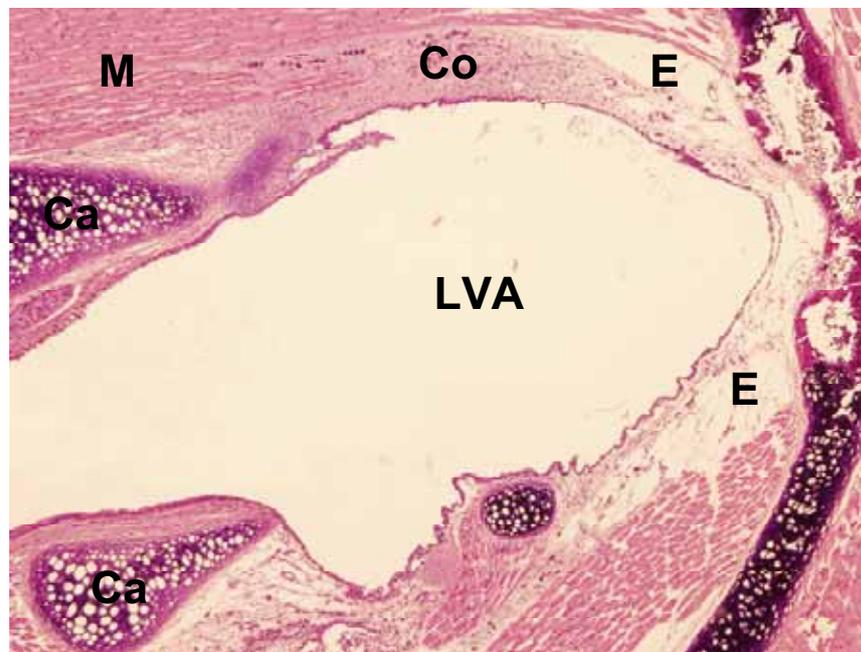


Figura 4.4. Tinción eosina-hematoxilina de un corte histológico de la hipofaringe. LVA, lumen de la vía aérea superior; E, Edema; Ca, Cartílago; Co, Tejido conectivo; M, Músculo.

En un primer análisis se definieron 5 niveles de edema y presencia de células inflamatorias. A partir de las muestras obtenidas, dos observadores (modo ciego) determinaron individualmente los valores de cada una de ellas.

4.3.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el presente estudio se representan como media \pm error estándar, y el análisis estadístico utilizado para la comparación entre grupos fue el t-student o el test de Mann-Whitney (para distribuciones normales o no normales, respectivamente) asumiendo significación estadística para $p < 0.05$.

4.4 Resultados

La aplicación de una presión negativa intratraqueal de $-40 \text{ cmH}_2\text{O}$, resultó en el colapso de la vía aérea superior cuya presión crítica estimada fue de $-19.43 \pm 1.58 \text{ (m} \pm \text{SE)}$ cmH_2O (Figura 4.5). No se encontraron cambios significativos respecto a la presión crítica observada a las 5 h de experimento (-15.74 ± 2.31).

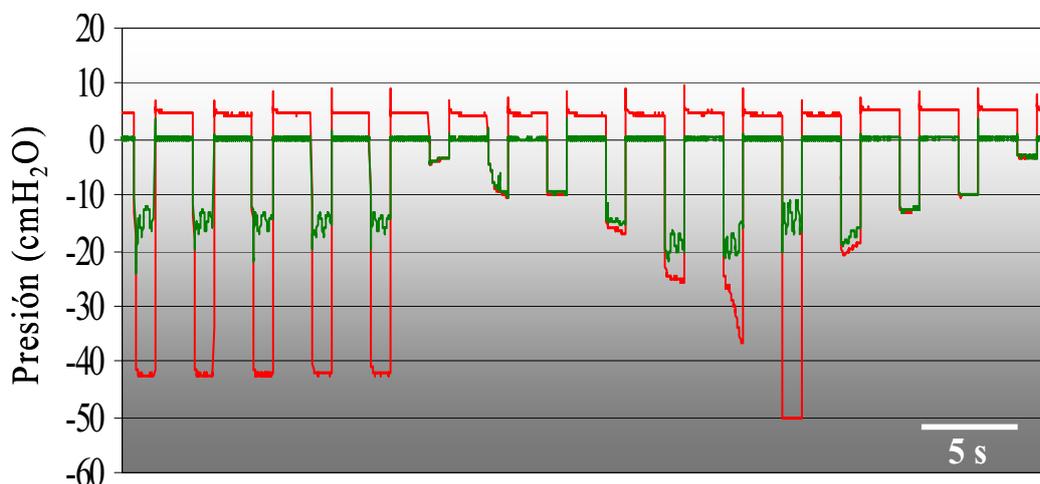


Figura 4.5. Estimación de la presión crítica para la cual la vía aérea superior se colapsa. En el gráfico se puede observar como la presión aplicada (línea roja) coincide con la presión en la mascarilla nasal (línea verde) hasta que la presión aplicada provoca la oclusión de la vía aérea. A partir de este momento la aplicación de una mayor presión negativa en la tráquea no modifica la presión nasal.

La aplicación recurrente de este estímulo mecánico durante 5 h fue capaz de inducir un aumento considerable en la expresión génica de los marcadores inflamatorios estudiados. En las muestras de laringe se observó un incremento importante en la expresión de los marcadores inflamatorios MIP-2, TNF- α , IL-1 β y P-selectina de ~40, 24, 47 y 7 veces respectivamente, respecto al grupo control (Figura 4.6). Resultados similares se encontraron en el tejido de paladar blando, donde se observó un incremento de ~14, 7, 35 y 11 veces la expresión génica de MIP-2, TNF- α , IL-1 β y P-selectina, respectivamente, respecto al grupo control (Figura 4.7).

El proceso inflamatorio iniciado a nivel de expresión génica en los diferentes mediadores inflamatorios no se manifestó a las 5 h en un incremento de edema ni de infiltración leucocitaria en la vía aérea superior (datos no mostrados).

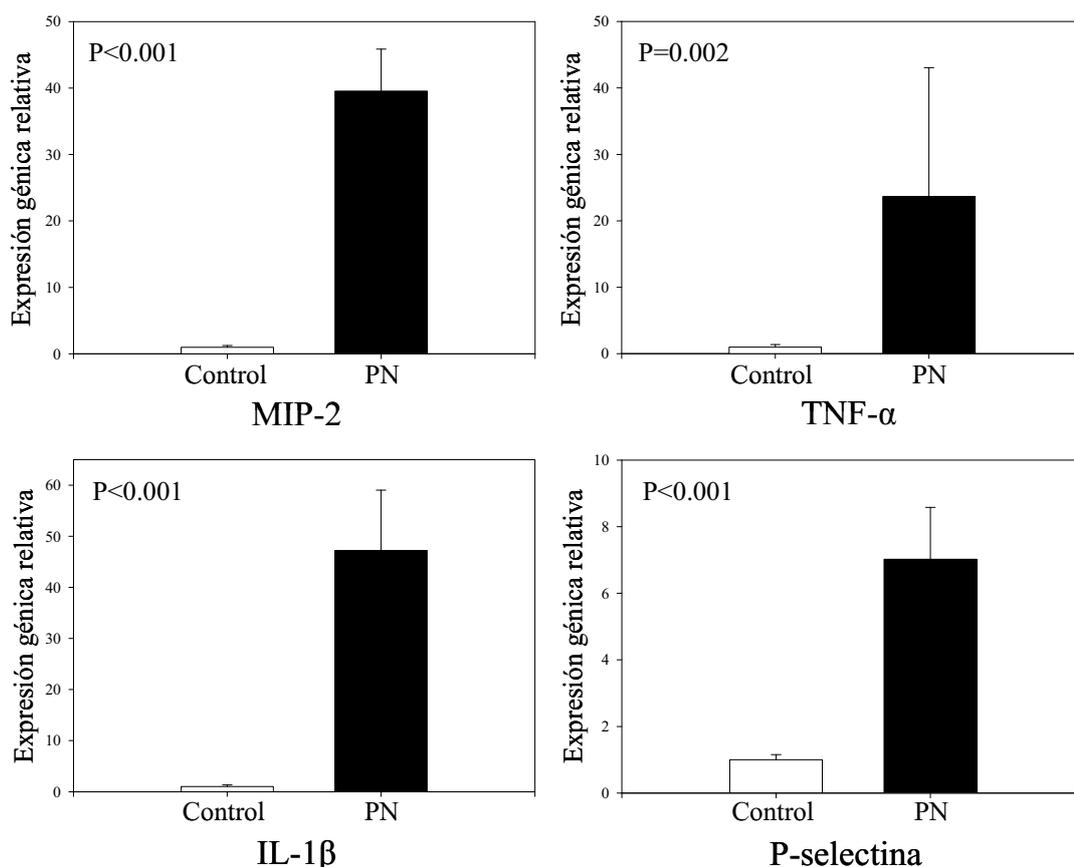


Figura 4.6. Expresión génica relativa de los marcadores inflamatorios estudiados en la laringe ($m \pm SE$). PN=Presión Negativa.

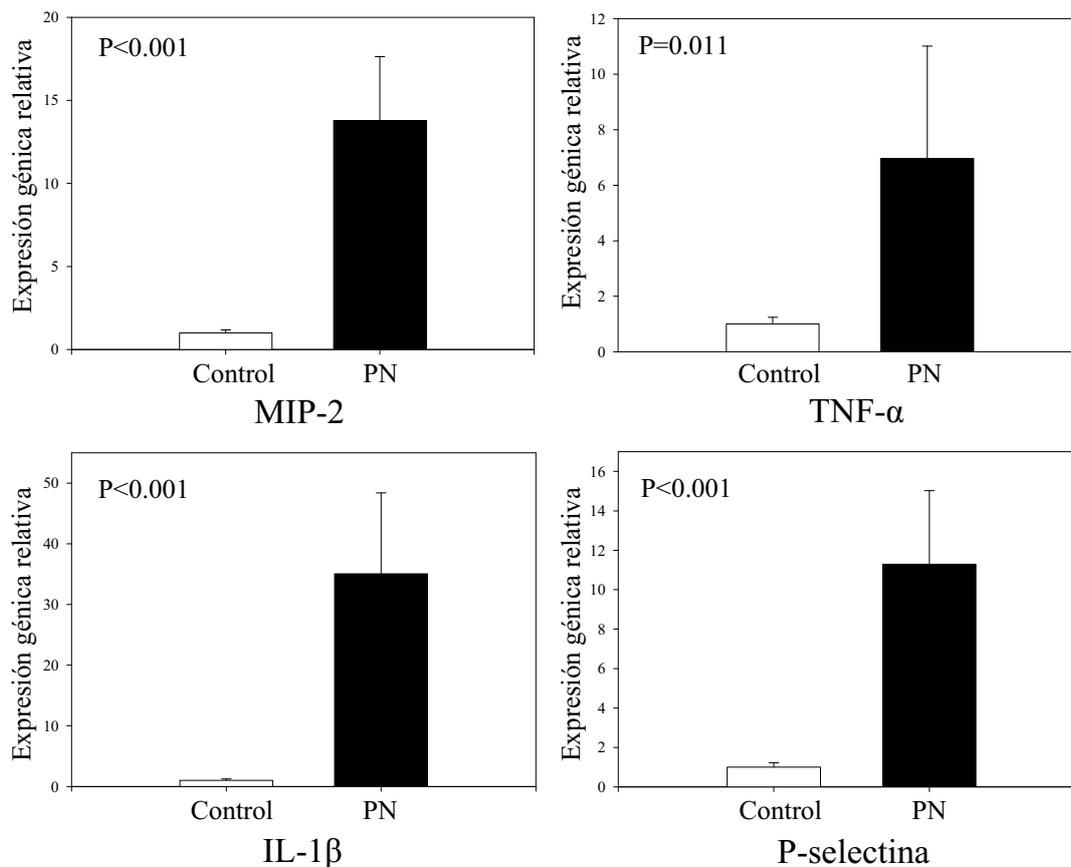


Figura 4.7. Expresión génica relativa de los marcadores inflamatorios estudiados en el paladar blando (m \pm SE). PN=Presión Negativa.

4.5 Discusión

En el presente estudio se ha demostrado que un estrés mecánico de presión negativa con colapso/reapertura similar al experimentado por la vía aérea superior durante la apnea obstructiva del sueño es capaz de iniciar una notable respuesta inflamatoria local en la vía aérea superior, puesta de manifiesto por una temprana sobreexpresión génica de los mediadores inflamatorios estudiados.

La pared de la vía aérea superior fue sometida a un estrés mecánico recurrente que consistió en la aplicación de una presión negativa similar a la que se genera durante la fase inspiratoria de los pacientes con SAHS. En primer lugar, el estímulo aplicado

ocasionó el colapso de la vía aérea superior y a continuación, mediante la aplicación de una pequeña presión positiva espiratoria, se indujo nuevamente su reapertura. Para ello se diseñó un modelo que permitió aplicar intratraquealmente una presión negativa intermitente de manera selectiva a la vía aérea superior. Modelos similares de aislamiento de la vía aérea superior han sido descritos en trabajos previos cuya finalidad fue el estudio de la respuesta motora de la vía aérea superior a cambios de presión intraluminal (Rowley et al 1997, Fuller et al 1999, Ryan et al 2003, Van Zutphen et al 2007). No obstante, en estos estudios no se analizó la respuesta inflamatoria. En los trabajos de Rowley et al y Fuller et al. se mantuvo la vía aérea del animal permanentemente abierta y mediante la aplicación de diferentes presiones negativas se consiguió una reducción progresiva del flujo inspiratorio (limitación de flujo) sin alcanzar el colapso (Rowley et al 1997, Fuller et al 1999). Van Zutphen et al con un modelo muy similar al descrito por los autores mencionados anteriormente estudiaron mediante imágenes de resonancia magnética los cambios de volumen intraluminal en respuesta a presiones negativas y positivas que tampoco alcanzaron a provocar el colapso. Además, el uso de esta técnica requirió la aplicación continua de presión positiva o negativa durante un periodo de tiempo prolongado para la adquisición de la imagen (Van Zutphen et al 2007). Ryan et al utilizaron un modelo que aplicó presión positiva o negativa de una forma que no simuló la dinámica en pacientes con SAHS ya que la presión negativa se aplicó simultáneamente a ambos extremos de la vía aérea superior (tráquea y nariz) (Ryan et al 2003). El modelo utilizado en el presente estudio se diseñó para poder aplicar un estímulo mecánico de presión negativa progresivo conducente al colapso y posterior reapertura de forma similar al experimentado por pacientes con SAHS. En efecto, a diferencia de los modelos mencionados, en los que la presión negativa se aplicaba de forma quasi-estática, en el presente trabajo la secuencia de eventos mecánicos se indujeron con un patrón temporal de inspiración/espiración que simuló la respiración. Dado el carácter dinámico del modelo se utilizó aire en condiciones fisiológicas de temperatura y humedad para evitar la posible resecaación del tejido de la pared aérea durante las 5 h de estímulo.

La presión negativa aplicada en este trabajo, al contrario que en los modelos disponibles en los estudios previamente mencionados, logró el colapso total de la vía

aérea gracias al acoplamiento de una mascarilla nasal en el animal. Este colapso se facilitó mediante el cierre sincronizado de una electroválvula colocada en el tubo de salida de la mascarilla nasal (Figura 4.2). El colapso se monitorizó mediante un transductor de presión acoplado a la mascarilla nasal que permitió cuantificar la presión crítica real de la vía aérea superior, siendo determinada como la presión remanente en la mascarilla nasal cuando la presión aplicada intratraquealmente era de mayor magnitud y por consiguiente, representando aquella presión a la cual se produce el colapso (Figura 4.5). Este modelo, por tanto, tiene una clara ventaja sobre los modelos presentados anteriormente en los que la presión crítica se estimó indirectamente por la extrapolación de la reducción del volumen intraluminal (Van Zutphen et al 2007) o del flujo inspiratorio utilizando el modelo de Starling (Rowley et al 1997, Fuller et al 1999) en respuesta a diferentes presiones negativas. Además, en el presente trabajo se evitó cualquier interferencia que se pudiera ocasionar mediante la inserción de catéteres de transductores en la vía aérea superior para la estimación de la presión crítica de colapso. El valor real obtenido de la presión crítica de la vía aérea superior (-19.43 cmH₂O) fue aproximado al estimado por los modelos previamente descritos (Rowley et al 1997, Fuller et al 1999, Ryan et al 2003, Van Zutphen et al 2007). La presión negativa intermitente aplicada de -40 cmH₂O fue de una magnitud similar a la observada en pacientes con SAHS durante los eventos obstructivos (Calero et al 2006). De hecho, la magnitud del estímulo fue lo suficientemente pequeña como para no causar efectos estructurales ni funcionales aparentes en la vía aérea superior, como sugieren la ausencia de diferencias histológicas entre las ratas sometidas al estímulo y las controles y la ausencia de cambio de la presión crítica entre el inicio y el final de las 5 h de estímulo aplicado.

Recientemente, se ha descrito que diferentes tipos de estrés mecánico asociado al SAHS pueden inducir inflamación temprana en tejidos de la vía aérea superior. Por una parte, la aplicación de una vibración con características similares al ronquido indujo el inicio de una cascada pro-inflamatoria tanto en células epiteliales de la vía aérea (Puig et al 2005) como en el paladar blando de rata (Almendros et al 2007, Capítulo 3). Por otra parte, también se ha demostrado que el estímulo de compresión asociado a la aplicación de CPAP promueve un proceso inflamatorio en la mucosa nasal de ratas

(Capítulo 5). Sin embargo, hasta el momento no existían evidencias que pusiesen de manifiesto que el estímulo de presión negativa con colapso/reapertura sea una causa específica de inflamación de la vía aérea superior. De hecho, los únicos antecedentes indirectos disponibles hacen referencia al tejido pulmonar y bronquial. En particular, estudios realizados en modelos animales de ventilación mecánica (Cheng et al 2002) y en cultivos de células epiteliales alveolares (Bilek et al 2003) mostraron que el estímulo de colapso/reapertura es capaz de inducir inflamación y daño celular, respectivamente. Además, existen también indicios indirectos de que la presión negativa en el lumen bronquial podría ser un estímulo inflamatorio. En efecto, en un estudio reciente realizado en pacientes con SAHS se demostró que existe una correlación directa entre la concentración de interleuquina-8 en esputo y el índice de apnea/hipopnea (AHI) (Devouassoux et al 2007). La inflamación bronquial observada en estos pacientes podría deberse, en parte, a las presiones negativas incrementadas que se ejercen sobre el árbol bronquial durante las inspiraciones recurrentes con una vía aérea de resistencia incrementada.

En el presente trabajo se ha confirmado la hipótesis de que el estrés mecánico ejercido por la presión negativa con colapso/reapertura también puede inducir una cascada pro-inflamatoria en la vía aérea superior. En concreto, tanto en la laringe como en el paladar blando se ha observado una notable sobreexpresión génica de marcadores (MIP-2, TNF- α , IL-1 β y P-selectina) que juegan un importante papel en las etapas tempranas de la cascada inflamatoria (Figuras 4.6 y 4.7). La citoquina TNF- α promueve disfunción endotelial (Gao et al 2007) y regula la expresión de especies reactivas de oxígeno y moléculas de adhesión (Mukhopadhyay et al 2006), mientras que la citoquina IL-1 β puede inducir la expresión de otras moléculas inflamatorias como el factor quimiotáctico MIP-2 que favorece el reclutamiento leucocitario (Xu et al 1995). Además, se estudió la expresión génica de la molécula de adhesión P-selectina, que se expresa en el endotelio y juega un papel primordial en la extravasación leucocitaria a través de la barrera endotelial (Luscinskas et al 1995). Dada la alta complejidad y redundancia de las rutas de expresión de los mediadores inflamatorios, se debe tener cautela al interpretar los cambios de expresión génica individuales de cada marcador (Elias et al 1990). Sin embargo, la importante sobreexpresión experimentada por todos

los marcadores analizados (Figuras 4.6 y 4.7) demuestra claramente que el estímulo aplicado induce un proceso inflamatorio local temprano.

La inflamación de la vía aérea superior como consecuencia del estímulo mecánico aplicado podría derivar tanto en un engrosamiento de la pared faríngea como en miopatía y neuropatía locales. En efecto, existen estudios en los que se ha demostrado que la presencia de citoquinas como TNF- α (Shindow et al 1995, Reid et al 2002) e IL-1 β (Salomonsson y Lundberg 2006) provocan debilidad y disfunción contráctil de las fibras musculares. Además, TNF- α podría provocar una pérdida de sensibilización de la vía aérea superior ya que se ha descrito que induce neuropatía (Créange et al 1998, Spies et al 1995) y neurotoxicidad (Nguyen et al 2007). En conclusión, el presente trabajo muestra que el estrés mecánico recurrente asociado a la presión negativa con colapso/reapertura puede jugar un papel importante en la evolución del SAHS ya que induce una inflamación local que puede ser causa de las lesiones estructurales y funcionales que padece la vía aérea superior en estos pacientes.

Capítulo 5

La aplicación de presión continua positiva a la vía aérea superior (CPAP) induce inflamación nasal

Este capítulo se corresponde con el siguiente artículo:

Almendros I, Acerbi I, Vilaseca I, Montserrat JM, Navajas D, Farré R. “*Continuous positive airway pressure (CPAP) induces early nasal inflammation*”. SLEEP. Artículo en prensa.

Factor de impacto; 5.126

Revista nº 12/146

5.1 Resumen

Introducción: La rinitis es el efecto secundario que se manifiesta más frecuentemente en el tratamiento clínico de la apnea obstructiva del sueño mediante la aplicación nasal de presión continua positiva (CPAP). Sin embargo, aún se desconoce si el propio estímulo mecánico puede ser un factor esencial en el desarrollo de los síntomas riníticos.

Objetivos: Demostrar si la aplicación no invasiva de CPAP nasal es un estímulo mecánico suficiente para inducir una respuesta inflamatoria local.

Material y métodos: 32 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (250-300 g) anestesiadas y distribuidas en 4 grupos fueron sometidas a CPAP nasal (10 cmH₂O) y placebo durante 3 h y 5 h. Para demostrar que la compresión asociada a la CPAP induce una respuesta inflamatoria local, se efectuó raspado nasal y se calculó el porcentaje de neutrófilos presentes en la mucosa. Además, se extrajeron muestras de tabique nasal y cornete ventral para el posterior estudio mediante PCR en tiempo real de las expresiones génicas de los mediadores inflamatorios proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y de otras moléculas que pueden incrementar la sensibilidad de la mucosa nasal a estímulos externos, como la neurotrofina factor de crecimiento nervioso (NGF) y el receptor específico de la sustancia P (TACR1).

Resultados: Tras la aplicación de CPAP nasal durante 5 h se observó un incremento significativo ($p=0.006$) en el porcentaje de neutrófilos presente en la mucosa nasal ($3.51 \pm 0.73\%$; media \pm SE) respecto al grupo placebo ($1.12 \pm 0.39\%$). Por otro lado, la expresión génica de la quemoquina MIP-2 se incrementó (2.28 ± 0.43 veces; $p=0.034$) tras 3h de aplicación de CPAP nasal respecto al grupo placebo y (5.56 ± 1.88 veces; $p=0.002$) tras 5h. Además, también se observó un incremento en la expresión génica de TNF- α a las 5 h de estímulo aunque de forma no significativa. En cambio, no se encontraron cambios significativos en las expresiones génicas de la neurotrofina NGF ni del receptor TACR1.

Conclusiones: La compresión asociada a la CPAP nasal es un estímulo mecánico capaz de inducir un proceso inflamatorio en la vía aérea superior que resulta en la extravasación neutrofílica en la mucosa nasal. La inflamación generada tras la aplicación de CPAP nasal podría explicar la aparición y/o agravamiento de los síntomas riniticos observados en los pacientes tratados con esta técnica terapéutica.

5.2 Introducción

El síndrome de la apnea/hipopnea del sueño (SAHS) es una enfermedad muy común caracterizada por la oclusión repetida de forma total o parcial de la vía aérea superior. Este hecho generalmente está relacionado con una pérdida progresiva en la respuesta de la vía aérea superior a las fuerzas negativas generadas durante la inspiración. La aplicación nocturna de presión continua positiva (CPAP) a través de una máscara nasal es el tratamiento más extendido para evitar la obstrucción de la vía aérea superior y, por tanto, para prevenir sus consecuencias a largo plazo (Sullivan et al 1981). El funcionamiento de la CPAP nasal consiste básicamente en la aplicación de presión positiva en el lumen de la vía aérea superior de los pacientes con SAHS, consiguiendo contrarrestar la anormal colapsabilidad de la vía aérea superior y por tanto, promoviendo su apertura mecánica. A pesar de que este tratamiento es extremadamente efectivo para la normalización de la respiración durante las horas del sueño, en un alto número de estos pacientes se han observado síntomas riniticos como congestión nasal y rinorrea asociados a esta técnica terapéutica (Pepin et al 1995, Brander et al 1999). En consecuencia, un alto porcentaje de los pacientes con apnea obstructiva del sueño no pueden beneficiarse de este tratamiento (Janson et al 2000).

La pared nasal se encuentra sometida a un estímulo continuo de compresión durante el tratamiento con CPAP nasal. En estudios previos se ha demostrado que este estímulo mecánico es suficiente para iniciar una serie de respuestas biológicas en diferentes tipos celulares y tisulares (Kobayashi et al 2005, Dudic et al 2006, Kasahara et al 2006, Tan et al 2006) e incluso, en la propia vía aérea (Lim y Wagner 2003, Tshumperlin y Drazen 2006). Recientemente se ha llegado a asociar la aplicación de CPAP nasal con un incremento en la sensibilización de los pacientes con apnea obstructiva del sueño (Devouassoux et al 2007), lo que ha proporcionado un mayor apoyo a la hipótesis de que la compresión mecánica puede inducir una respuesta inflamatoria local en la pared nasal. Por consiguiente, los datos disponibles a partir de células y tejidos no nasales sugieren que esta terapia podría ser un estímulo mecánico suficiente para desencadenar un proceso inflamatorio que podría explicar la aparición o

agravamiento de los síntomas riníticos que se manifiestan en los pacientes con apnea obstructiva del sueño tras el tratamiento.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de los posibles efectos inflamatorios inducidos en la pared nasal asociados al tratamiento de CPAP. Para la realización del presente estudio se diseñó un novedoso sistema experimental que permitió la aplicación no invasiva y controlada de CPAP nasal y placebo a la vía aérea superior de ratas. La respuesta inflamatoria inducida por la CPAP nasal se detectó *in situ* observando la extravasación neutrofílica en la mucosa nasal. Por otro lado, mediante el análisis en la expresión génica de diferentes mediadores en el tejido de la pared nasal se investigaron los posibles mecanismos involucrados en la aparición o agravamiento de los síntomas riníticos tras el tratamiento. En este estudio, además de estudiar los típicos marcadores inflamatorios como la proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), se cuantificaron las expresiones génicas de otros marcadores como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el receptor específico de la sustancia P (TACR1). Un incremento en la presencia de NGF y TACR1 en el tejido nasal puede provocar una mayor sensibilización y respuesta a nivel del sistema nervioso a un estímulo externo, ya sea de naturaleza inflamatoria o mecánica (Bai et al 1995, Sarin et al 2006). Los resultados obtenidos mostraron claramente que la compresión asociada al tratamiento mediante CPAP nasal fue capaz de inducir un progresivo proceso inflamatorio local que a las 5 h llegó a manifestarse con la extravasación neutrofílica en la mucosa nasal.

5.3 Material y métodos

5.3.1 Animales

En este estudio, que fue aprobado por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona, se utilizaron 32 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso comprendido entre 250 y 300 g. Los animales fueron

previamente anestesiados por vía intraperitoneal con una solución de uretano (1 g/Kg) (Sigma, St. Louis, MO) diluida en suero fisiológico al 10%.

5.3.2 Sistema experimental de CPAP

Para el estudio de los efectos inflamatorios inducidos en la vía aérea superior a causa del tratamiento con CPAP se diseñó un novedoso modelo animal capaz de aplicar simultáneamente CPAP nasal y placebo de manera no invasiva y controlada. El modelo animal desarrollado está basado en un enfoque previamente descrito para la aplicación de CPAP y placebo en humanos (Farré et al 1999) y consiste en un sistema de CPAP convencional conectado a dos cámaras de aire independientes a través de un mismo tubo bifurcado (Figura 5.1). Ambas cámaras disponían de dos tubos cilíndricos cortos (1.5 cm de longitud y 2 cm de diámetro), donde uno de ellos se utilizó como máscara facial para el animal y el otro permaneció abierto a la atmósfera. En cada una de las cámaras de aire se colocó una resistencia al paso del aire (R) que consistía en un pequeño orificio de 1 mm de diámetro. La posición de esta resistencia (a la entrada o salida de la cámara) determinó la presión que fue ejercida al animal conectado a dicha cámara de aire. Para la aplicación de CPAP, la resistencia se colocó en el tubo de salida permitiendo la presurización de la cámara que fue determinada por el dispositivo de CPAP. La cámara se presurizó a 10 cmH₂O (CPAP) con una renovación de aire de 25 ml/s. En cambio, en una segunda cámara idéntica y conectada al mismo dispositivo de CPAP, se colocó la misma resistencia (R) a la entrada de la cámara manteniendo el tubo cilíndrico de salida totalmente abierto a la atmósfera, lo que permitió la aplicación de placebo o presión nula. El hecho de que el sistema disponga de dos resistencias idénticas colocadas en paralelo permitió la aplicación de diferente presión en ambas cámaras (10 cmH₂O para el grupo CPAP y nula para el grupo placebo) en las mismas condiciones de humedad y temperatura. Además, el flujo de aire que pasó a través de ambas cámaras también fue el mismo (25 mL/s) favoreciendo la renovación del aire exhalado por los animales. Finalmente, se monitorizó la presión de cada una de las cámaras para asegurar de la inexistencia de fugas de aire a través de las máscaras durante todo el experimento.

5.3.3 Protocolo para la aplicación de CPAP y extracción de muestras

Para este estudio se utilizaron 4 grupos (n=8) que se dividieron en animales sometidos a CPAP nasal durante 3 h o 5 h con su grupo placebo respectivo. Los animales fueron anestesiados y se colocaron en posición supina con el hocico insertado en la máscara facial correspondiente (Figura 5.2A). Tanto los orificios nasales como la boca del animal se mantuvieron dentro de la mascarilla facial mediante pasta lubricante y cinta adhesiva, lo que facilitó el sellado del animal con la máscara. Este procedimiento inicial fue esencial para evitar la aparición de fugas de aire que pudieran disminuir la presión de la cámara. Una vez colocados y preparados los animales se conectó el dispositivo de CPAP de manera progresiva para alcanzar los 10 cmH₂O a los 15 minutos del comienzo. Tras pasar 3 h o 5 h, se obtuvo una muestra de raspado nasal mediante la inserción de unas pinzas finas esterilizadas, manteniendo la superficie dentellada dirigida hacia los cornetes nasales del orificio nasal izquierdo del animal

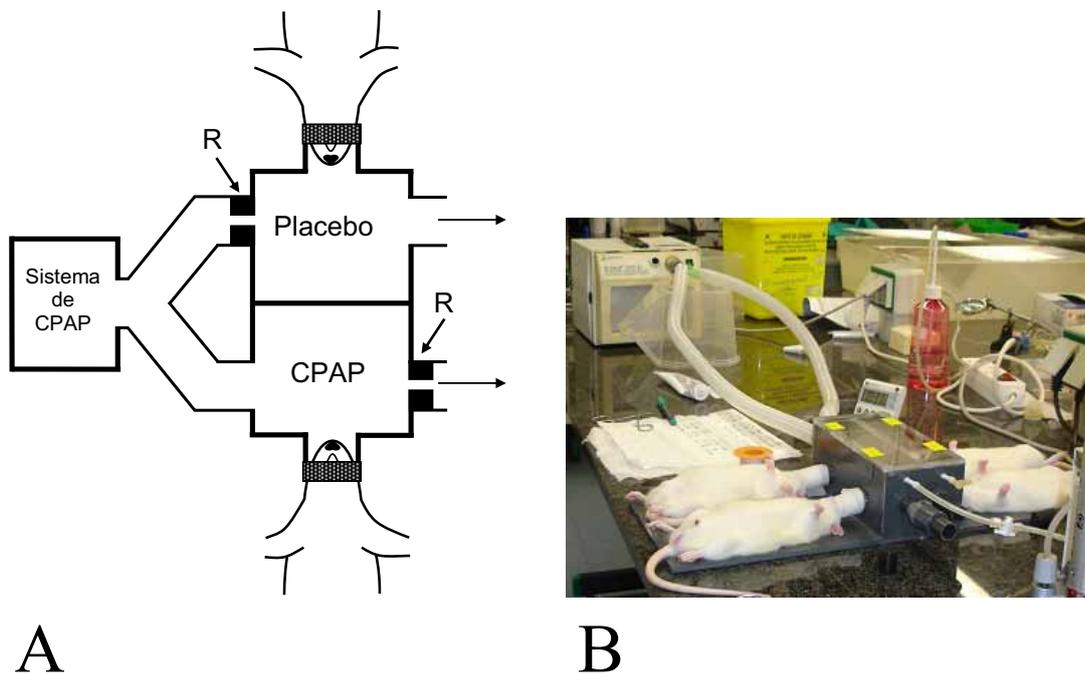


Figura 5.1. A: Diagrama del sistema experimental para la aplicación de CPAP nasal no invasiva y placebo en ratas anestesiadas. R son resistencias al paso del flujo aéreo induciendo presión positiva en la cámara de CPAP y presión nula en la cámara de placebo. B: Fotografía del sistema experimental donde se puede observar que este modelo permitió el estudio de 2 animales de cada grupo (CPAP y placebo) simultáneamente.

(Figura 5.2B). La muestra de raspado se suspendió en 1 mL de solución salina (0.9% NaCl) y se conservó en hielo para su posterior fijación y tinción.

Una vez finalizado el raspado nasal, los animales fueron sacrificados mediante exsanguinación a través de la aorta abdominal. Para la extracción de las muestras de tejido, primeramente se expuso la vía aérea superior con el corte de la sínfisis mandibular y la posterior separación de la mandíbula inferior izquierda y derecha (Figura 5.2C). A continuación, con la ayuda de unas tijeras se realizó un corte sagital medio siguiendo el orificio nasal izquierdo (usado previamente para el raspado nasal) lo que permitió exponer y obtener las estructuras nasales intactas del orificio nasal derecho (Figura 5.2D). Finalmente se extrajeron y guardaron muestras de tabique nasal y de cornete ventral congeladas a -80°C para su posterior análisis en PCR.

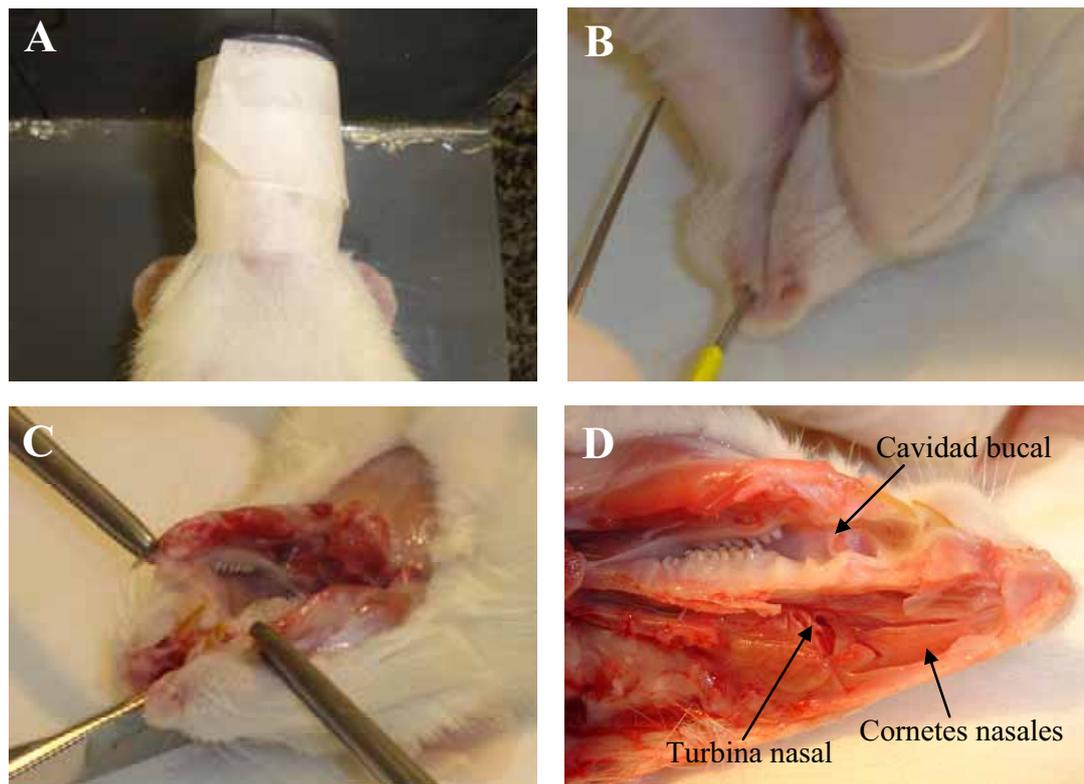


Figura 5.2. Procedimiento experimental animal. Los animales colocados en posición supina eran conectados al sistema de CPAP/placebo mediante una máscara facial (A). Tras 3 h o 5 h de la aplicación del estímulo se procedió al raspado nasal mediante unas pinzas finas (B) y finalmente, tras la exposición y apertura siguiendo el orificio nasal izquierdo (C), se expusieron las estructuras nasales intactas del orificio nasal derecho (D).

5.3.4 Cuantificación neutrofílica en el raspado nasal

Cada muestra de raspado nasal se estampó en un portaobjetos mediante citocentrifugación (Cytospin IV, Shandon Scientific, UK) a 500 r.p.m. durante 5 min. A continuación, se realizó una fijación en metanol al 70% seguida de una tinción de Wright (Figura 5.3). Para la clasificación de los diferentes tipos celulares se realizó un escaneo aleatorio de cada una de las muestras hasta contabilizar un total de 200 células (campo brillante, 40X, Eclipse TE2000, Nikon, Japan). Finalmente, se calculó el porcentaje de neutrófilos en cada una de las muestras.

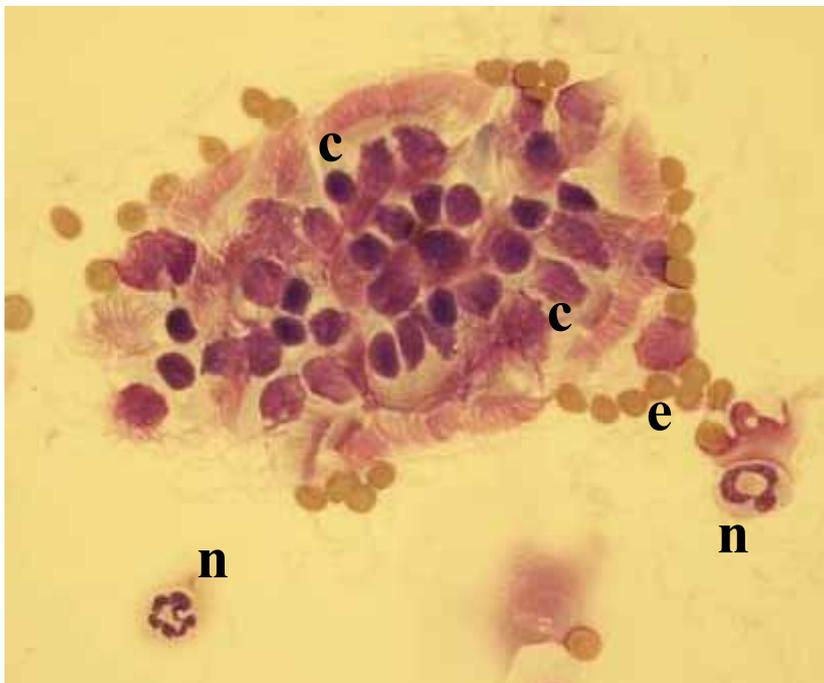


Figura 5.3. Tinción de Wright del raspado nasal. En la imagen se pueden observar las diferentes células epiteliales y leucocitarias presentes en la mucosa nasal, como células epiteliales ciliadas (c), neutrófilos (n) y eritrocitos (e). (Objetivo 40X Campo brillante).

5.3.5 Análisis de la expresión génica en la pared nasal

Las muestras de tabique nasal y cornete ventral nasal se disgregaron mediante un homogeneizador (Polytron 2100, Kinematica, Switzerland). El contenido de RNA en el

homogeneizado se aisló usando el sistema 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, Calif) y se cuantificaron las expresiones génicas de los marcadores MIP-2, TNF- α , NGF y TACR1 en triplicado mediante PCR en tiempo real (7300 Real Time PCR-RT, Applied Biosystems, CA), tomando como control endógeno la expresión de GAPD (ver Apéndice A para mayor detalle). Los ensayos de expresión génica utilizados para la amplificación de los diferentes marcadores anteriormente mencionados se obtuvieron de la casa comercial Applied Biosystems (Rn00586403_m1, Rn00562055_m1, Rn00824646_m1, Rn00562004_m1, Rn01430567_m1, Rn01410145_m1, Rn00562002_m1 y Rn99999916_s1, respectivamente). Finalmente, se calculó para cada gen la expresión génica relativa del grupo CPAP respecto al grupo placebo usando el método convencional C_t comparativo (Livak y Schmittgen 2001) implementado en el sistema de PCR.

5.3.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron representados como valor medio \pm SE. Las comparaciones realizadas entre los diferentes grupos se llevaron a cabo mediante el test estadístico t-student o el test Mann-Whitney Rank Sum (para distribuciones normales o no normales respectivamente). Se asumió significación estadística para $p < 0.05$.

5.4 Resultados

La aplicación de 5 h de CPAP nasal causó un incremento significativo en el número de neutrófilos observados en la mucosa nasal. El porcentaje de neutrófilos respecto al número total de células epiteliales en el raspado nasal fue de 3.51 ± 0.73 % (valor medio \pm SE) en el grupo CPAP y 1.12 ± 0.39 % en el grupo placebo (Figura 5.4).

Este incremento en la extravasación neutrofílica a las 5h fue consistente con un incremento significativo en las expresiones génicas de los marcadores inflamatorios en la pared nasal. La síntesis de mRNA de la quemoquina pro-inflamatoria MIP-2 aumentó

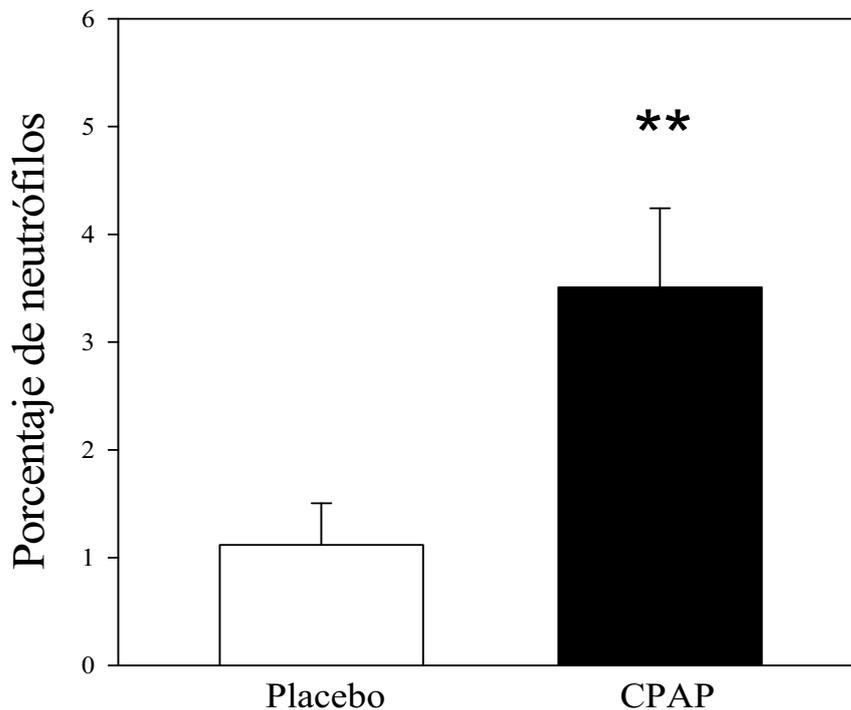


Figura 5.4. Porcentaje de neutrófilos respecto al número total de células nucleadas en el raspado nasal obtenido en ratas sometidas durante 5 h a CPAP nasal o placebo (valor medio ± SE; N=8). ** p < 0.01.

5.56 ± 1.89 veces en el grupo sometido a CPAP respecto al grupo placebo 1.00 ± 0.14 (Figura 5.5). Además, se observó una tendencia de incremento de la expresión génica de la citoquina TNF-α en el grupo CPAP de 2.78 ± 1.19 veces respecto al grupo control: 1.00 ± 0.21. Cuando se analizaron los efectos de la CPAP nasal a 3h, la única diferencia observada entre los grupos CPAP y placebo fue una sobreexpresión de MIP-2: 2.28 ± 0.43 vs 1.00 ± 0.33 en placebo (p=0.034) (Figura 5.5).

Por otro lado, no se encontraron cambios a las 3 h y 5 h de aplicación de CPAP cuando se compararon las expresiones génicas de los marcadores NGF y TACR1 entre ambos grupos (CPAP y placebo) (Figura 5.6).

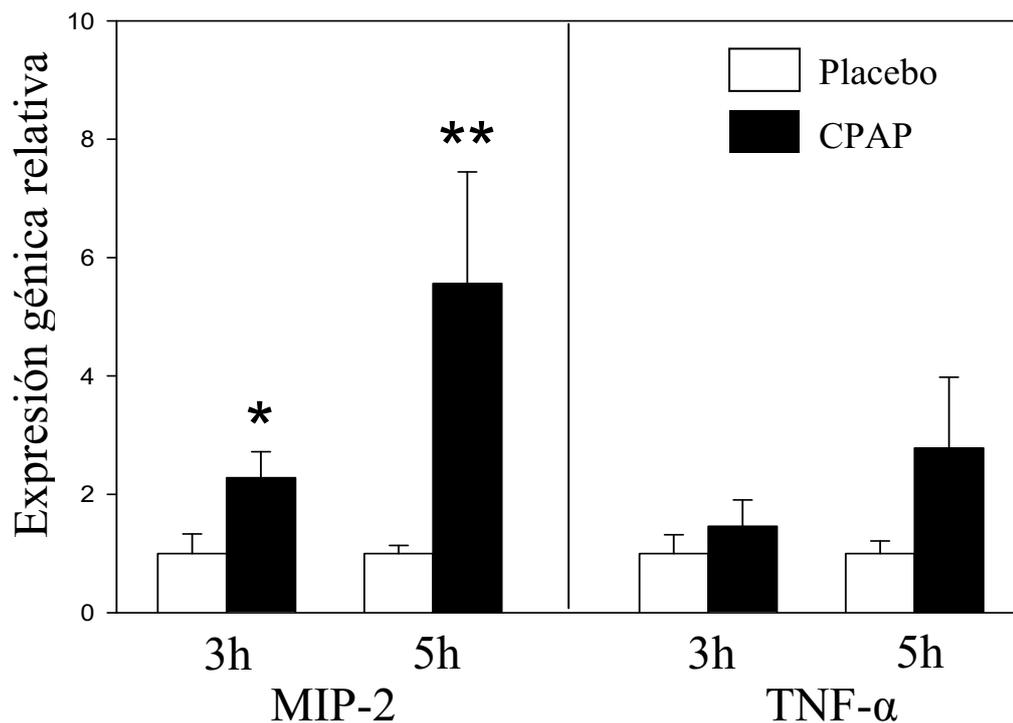


Figura 5.5. Expresión génica relativa de MIP-2 y TNF- α en el tejido de la pared nasal de ratas sometidas a CPAP = 10 cmH₂O o placebo durante 3 h y 5 h. (valor medio \pm SE; N=8). *p < 0.05 ** p < 0.01.

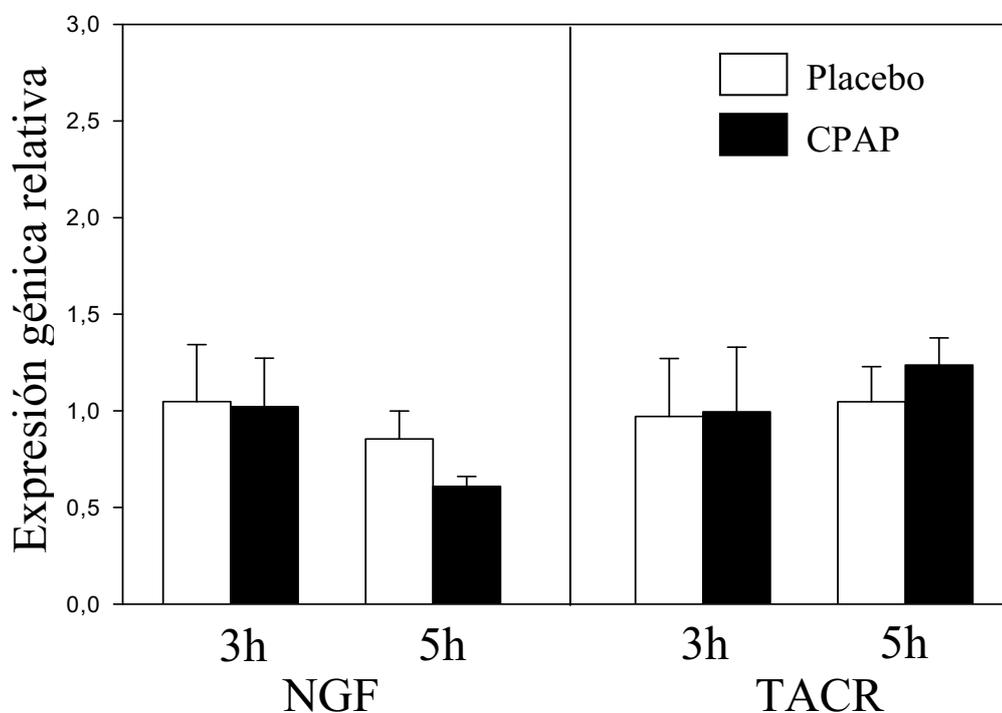


Figura 5.6. Expresión génica relativa de NGF y TACR1 en animales tratados con CPAP nasal (10 cmH₂O) y placebo. No se encontraron diferencias significativas en ambos marcadores tras 5 h de aplicación de CPAP nasal.

5.5 Discusión

En el presente trabajo se ha demostrado que la compresión ejercida en la vía aérea superior por la CPAP nasal es un estímulo mecánico suficiente para iniciar por sí mismo un proceso inflamatorio local. La aplicación durante 5 h de CPAP nasal con una presión de 10 cmH₂O, que es el valor típico aplicado durante el tratamiento de pacientes con apnea obstructiva del sueño, resultó en una extravasación neutrofilica en la mucosa nasal.

Según nuestro conocimiento, este estudio es novedoso en cuanto a la aplicación de CPAP en ratas de manera similar a como se realiza en pacientes a través de una máscara nasal. Por otro lado, el modelo diseñado nos permitió controlar de manera precisa las condiciones experimentales. Además, se evitaron posibles factores de confusión que normalmente están presentes en la mayoría de los pacientes con apnea obstructiva del sueño como presencia de inflamación sistémica (Ciftci et al 2004) o local de la vía aérea superior (Boyd et al 2004), o rinitis perenne (Brander et al 1999, Canova et al 2004). Por otro lado, también se evitaron otros posibles factores asociados a la aplicación de CPAP nasal que pueden interferir en la inflamación local inducida (Togias et al 1985, Bachour y Maasilta 2004). Con este fin se aseguró que no existiera ningún tipo de fugas de aire a consecuencia de un mal sellado de la máscara nasal o por la apertura bucal del animal. Además, el uso de ratas placebo en las mismas condiciones instrumentales/ambientales que las ratas sometidas a CPAP nasal, aseguró que el único factor que determinó los resultados observados fue la presión continua positiva. El modelo placebo que se usó en este estudio fue basado en un modelo previamente descrito para la aplicación de placebo en pacientes (Farré et al 1999). Como se muestra en la figura 5.1, ambas cámaras (CPAP y placebo) fueron conectadas en paralelo a una misma fuente de CPAP. Dado que las dos cámaras estaban conectadas en serie a una equivalente resistencia al flujo de aire, ambos circuitos abiertos a la atmósfera presentaron la misma resistencia a la fuente de presión, y consecuentemente el aire en ambas cámaras fue renovado por el paso del mismo flujo de aire. Conectando la resistencia a la salida o a la entrada de la cámara (Figura 5.1) se determinó si la presión

era positiva en una cámara (CPAP) o nula en la otra (placebo). La magnitud de la resistencia fue previamente seleccionada considerando la ventilación de la rata (Strohl et al 1997) y de esta forma se pudo asegurar un suficiente, pero no excesivo, flujo de aire para la renovación de oxígeno en cada una de las cámaras. A pesar de las ventajas de este modelo animal en el aislamiento de los efectos inflamatorios de la CPAP nasal, podría ser cuestionable trasladar los resultados obtenidos en rata a humanos. Esto no debería constituir un obstáculo en este estudio puesto que su objetivo fue determinar si la compresión *per se* era capaz de inducir un proceso inflamatorio en la pared nasal. De hecho, en otros estudios previos se ha asumido que los mecanismos de respuesta básicos observados a nivel celular y tisular son similares en todos los mamíferos (Fletcher 2001, Farré et al 2003b, Gozal et al 2003, Nacher et al 2007).

Los resultados obtenidos indican que la compresión es un estímulo pro-inflamatorio en la mucosa nasal. Además, son consistentes con los datos previamente observados para diferentes tipos celulares y tisulares sometidos a una compresión no fisiológica. Por otro lado, estudios previos han demostrado que un estímulo mecánico similar puede activar rutas de mecanotransducción dando lugar a inflamación neurogénica o no neurogénica. Por ejemplo, las fuerzas de compresión aplicadas sobre el periodonto durante los movimientos dentales ortodónticos puede inducir la secreción de citoquinas inflamatorias y sustancia P en el fluido crevicular gingival (Dudic et al 2006). Además, en respuesta a una fuerza de compresión se observó un incremento en la expresión de diversas citoquinas inflamatorias (Kobayashi et al 2005) y una sobreexpresión de la neurotrofina NGF (Kasahara et al 2006) en las fibras nerviosas y en la médula espinal, respectivamente. También se ha demostrado que la compresión es un estímulo inflamatorio en la vía aérea, particularmente en el tejido bronquial y en la tráquea. De hecho, las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son activadas en células epiteliales bronquiales sometidas a un estímulo de compresión continuo (Tschumperlin et al 2002). Además se ha observado en ratas que la aplicación de una constante presión positiva induce un reclutamiento leucocitario en la circulación traqueal (Lim y Wagner 2003).

Como era de esperar a partir de la información publicada referente a los efectos de diferentes estímulos mecánicos a nivel celular (Vlahakis et al 1999, Puig et al 2005), el proceso inflamatorio nasal inducido por la aplicación de CPAP que se observó en el presente estudio fue dependiente del tiempo de aplicación del estímulo. De hecho, a las 3 h de CPAP nasal el único cambio significativo detectado fue un incremento de 2.28 veces en la síntesis del marcador proinflamatorio MIP-2. Esta quemoquina murina, que es homóloga a la interleuquina 8 humana, es un potente quimiotáctico neutrofílico y una molécula clave en el proceso inicial inflamatorio que aparece en respuesta a estrés mecánico, tanto en células epiteliales bronquiales y alveolares (Puig et al 2005, Li et al 2003), como en la vía aérea superior (Almendros et al 2007, Capítulo 3). Aunque la aplicación de CPAP nasal durante 3 h no fue suficiente para producir extravasación neutrofílica, en la serie de animales sometidos durante 5 h a compresión se llegó a consolidar el proceso inflamatorio con un posterior incremento en la expresión génica de la quemoquina MIP-2 y una tendencia de incremento de TNF- α . Esta citoquina posee un papel importante en el proceso inflamatorio regulando la expresión de moléculas de adhesión, la producción de otros mediadores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno (Mukhopadhyay et al 2006). Además, después de 5 h con CPAP nasal fue posible detectar la presencia de un mayor número de neutrófilos en el raspado nasal indicando que este periodo de tiempo es suficiente para completar los eventos inflamatorios básicos.

La ausencia de una sobreexpresión a corto plazo de la neurotrofina NGF y el receptor TACR1 no excluye la posibilidad de que la compresión pueda dar lugar a una posterior inflamación neurogénica nasal. De hecho, los mediadores inflamatorios de respuesta temprana inducidos por la CPAP podrían estimular directamente las fibras sensoriales nasales (Belvisi 2003, Sarin et al 2006) induciendo la síntesis y secreción de neuropéptidos que regulan la aparición de los síntomas riníticos (Sarin et al 2006). Es posible que las citoquinas inflamatorias inducidas puedan provocar *a posteriori* un aumento en la expresión génica de NGF en la mucosa nasal, como se ha observado anteriormente en células epiteliales bronquiales (Hahn et al 2006) y en células musculares lisas (Freund et al 2002). Este posible incremento en la expresión del NGF podría, a su vez, activar a las fibras sensoriales nasales resultando en la aparición o

agravamiento de diversos síntomas riníticos (Sarin et al 2006). Además, como ha sido descrito previamente en células epiteliales de colon (Goode et al 2003) y en macrófagos del peritoneo (Marriott et al 2000), las citoquinas inflamatorias inducidas por la CPAP nasal podrían también sobreexpresar el receptor específico de la sustancia P (TACR1) en la mucosa nasal. Una mayor presencia del receptor de la sustancia P facilitaría la activación de las células diana para este neuropéptido que es esencial en la manifestación de síntomas riníticos como congestión nasal y rinorrea (Bai et al 1995, Sarin et al 2006).

En condiciones fisiológicas normales, el proceso inflamatorio inducido por la aplicación de CPAP nasal podría ser compensado posteriormente por mecanismos adaptativos anti-inflamatorios. Esto podría explicar por qué una parte de los pacientes tratados con CPAP nasal o en pacientes sometidos durante largos periodos de tiempo a ventilación mecánica no invasiva con presión positiva nasal (Criner et al 1999) los síntomas riníticos observados o no se han llegado a documentar o son tan leves que no afectan a la tolerancia y cumplimiento del tratamiento. Sin embargo, es posible que en un cierto número de pacientes los mecanismos adaptativos anti-inflamatorios no sean efectivos debido a un estado precondicionado. En tal caso, la compresión ejercida sobre la vía aérea podría actuar como un segundo agente lesivo sobre el tejido. Por ejemplo se ha descrito que la aplicación de CPAP nasal en los neonatos prematuros con insuficiencia respiratoria puede inducir una respuesta inflamatoria nasal (Yong et al 2005), mientras que en ratas puede ocasionar daño pulmonar agudo en presencia de endotoxinas en sangre (Tsuchida et al 2005). En el caso específico de pacientes con apnea obstructiva del sueño que presentan síntomas riníticos previos (Canova et al 2004), la inflamación ya presente en la vía aérea superior podría potenciar el estímulo inflamatorio de la compresión mecánica dando lugar a la intolerancia de esta terapia. Además, es posible que el flujo continuo de aire relativamente seco y frío (Cruz et al 2006) a través de la apertura de la boca pudiera potenciar los síntomas riníticos tras varias semanas de utilización de la CPAP nasal.

En conclusión, en este estudio se ha demostrado que la compresión ejercida por la CPAP nasal convencional sobre la vía aérea superior es capaz de inducir un proceso

inflamatorio. La respuesta a esta mecanotransducción desemboca en un proceso inflamatorio nasal que podría explicar la aparición o agravamiento de los síntomas riníticos asociados al tratamiento con CPAP nasal en pacientes con apnea obstructiva del sueño.

Capítulo 6

Conclusiones de la tesis

Efecto de la vibración en la vía aérea superior de rata:

1. Se ha desarrollado un nuevo modelo que permite la aplicación de un estímulo vibratorio a la vía aérea superior de ratas similar al ronquido típico humano con frecuencia, amplitud y patrón controlados (objetivo 1).
2. La aplicación de un estímulo vibratorio similar al ronquido puede inducir *per se* una respuesta inflamatoria local en la vía aérea mediada por MIP-2 y TNF- α (objetivo 2).
3. La información obtenida en el presente estudio animal confirma la hipótesis de que el ronquido severo podría tener un papel fundamental en la primera etapa de la evolución natural del SAHS.

Efecto de la presión negativa y colapso en la vía aérea superior de rata:

4. Se ha implementado un nuevo modelo animal que permite aplicar un estímulo mecánico de presión negativa progresivo conducente al colapso y posterior reapertura, de forma similar al experimentado por los pacientes con SAHS (objetivo 3).

5. El dispositivo diseñado para la aplicación de presión negativa intratraqueal intermitente proporcionó la información necesaria para poder calcular la presión crítica inspiratoria (-19.43 ± 1.58 cm H₂O (m \pm SE)) que induce el colapso de la vía aérea superior de rata (objetivo 4).

6. La presión negativa intermitente junto al estímulo inducido de colapso y reapertura con características similares a las experimentadas en la apnea obstructiva del sueño inició, a las 5 h, un proceso inflamatorio en la vía aérea superior manifestado mediante la sobreexpresión de los mediadores inflamatorios MIP-2, TNF- α , IL-1 β y P-selectina (objetivo 5).

7.- Por lo tanto, este estrés mecánico puede jugar un papel importante en la evolución del SAHS ya que induce una inflamación local que puede ser causa de las lesiones estructurales y funcionales que padece la vía aérea superior en estos pacientes.

Efecto de la compresión sobre la pared nasal de rata:

8. Se ha diseñado un nuevo sistema experimental para la aplicación de CPAP nasal a la vía aérea superior de rata que permite el aislamiento del estímulo mecánico aplicado para el posterior estudio de los efectos inflamatorios asociados al tratamiento (objetivo 6).

9. La compresión ejercida por la CPAP sobre la pared nasal durante 5 h es un estímulo mecánico suficiente para iniciar una respuesta inflamatoria que resulta en la extravasación neutrofílica en la mucosa nasal y en la sobreexpresión progresiva de MIP-2 en la pared nasal (objetivo 7).

10. No se observaron cambios en la expresión de la neurotrofina NGF o del receptor de la sustancia P (TACR1). Esto no excluye que el estímulo mecánico asociado a la CPAP nasal pueda resultar en inflamación neurogénica nasal al aumentar la duración del estímulo (objetivo 8).

11. El proceso inflamatorio local inducido por CPAP nasal puede explicar la aparición y agravamiento de los síntomas riníticos observados en pacientes con apnea obstructiva del sueño tratados con CPAP.

Conclusión general:

Mediante modelos animales *in vivo* se ha demostrado la hipótesis de que los estímulos mecánicos experimentados por la vía aérea superior en el SAHS (vibración, presión negativa con colapso y reapertura) inducen inflamación local. Asimismo, se ha demostrado que la compresión debida a la aplicación terapéutica de CPAP en la mucosa nasal es un estímulo mecánico proinflamatorio.

Capítulo 7

Referencias

1. Almendros I, Acerbi I, Puig F, Montserrat JM, Navajas D, Farre R. Upper-airway inflammation triggered by vibration in a rat model of snoring. *Sleep*. 2007;30:225-227.
2. Amatory J, Howitt L, Wheatley JR, Avolio AP, Amis TC. Snoring-related energy transmission to the carotid artery in rabbits. *J Appl Physiol* 2006;100:1547-1553.
3. Amis TC, O'Neill N, Wheatley JR, van der Touw T, di Somma E, Brancatisano A. Soft palate muscle responses to negative upper airway pressure. *J Appl Physiol*. 1999;86:523-530.
4. Anastassov GE, Trieger N. Edema in the upper airway in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;86:644-647.
5. Arens R, McDonough JM, Corbin AM, et al. Upper airway size analysis by magnetic resonance imaging of children with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:65-70.
6. Ayappa I, Rapoport DM. The upper airway in sleep: physiology of the pharynx. *Sleep Med Rev*. 2003;7:9-33.

7. Babu AR, Herdegen J, Fogelfeld L, Shott S, Mazzone T. Type 2 diabetes, glycemic control, and continuous positive airway pressure in obstructive sleep apnea. *Arch Intern Med.* 2005;165:447-452.
8. Bachour A, Maasilta P. Mouth breathing compromises adherence to nasal continuous positive airway pressure therapy. *Chest.* 2004;126:1248-1254.
9. Back GW, Nadig S, Uppal S, Coatesworth AP. Why do we have a uvula?: literature review and a new theory. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2004;29:689-693.
10. Bai TR, Zhou D, Weir T, et al. Substance P (NK1)- and neurokinin A (NK2)-receptor gene expression in inflammatory airway diseases. *Am J Physiol.* 1995;269:L309-L317.
11. Baraniuk JN, Kaliner MA. Neuropeptides and nasal secretion. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;86:620-627.
12. Bazzano LA, Khan Z, Reynolds K, He J. Effect of nocturnal nasal continuous positive airway pressure on blood pressure in obstructive sleep apnea. *Hypertension.* 2007;50:417-423.
13. Belvisi MG. Sensory nerves and airway inflammation: role of A delta and C-fibres. *Pulm Pharmacol Ther* 2003;16:1-7.
14. Bergeron C, Kimoff J, Hamid Q. Obstructive sleep apnea syndrome and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:1393-1396.
15. Bhattacharyya N, Blake SP, Fried MP. Assessment of the airway in obstructive sleep apnea syndrome with 3-dimensional airway computed tomography. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;123:444-449.

-
16. Bilek AM, Dee KC, Gaver DP 3rd. Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening. *J Appl Physiol.* 2003;94:770-783.
 17. Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, Ten Have T, Rein J, Vela-Bueno A, Kales A. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:608-613.
 18. Bonini S, Lambiase A, Bonini S, Angelucci F, Magrini L, Manni L, Aloe L. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:10955-10960.
 19. Boyd JH, Petrof BJ, Hamid Q, Fraser R, Kimoff RJ. Upper airway muscle inflammation and denervation changes in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:541-546.
 20. Bradley TD, Rutherford R, Grossman RF, Lue F, Zamel N, Moldofsky H, Phillipson EA. Role of daytime hypoxemia in the pathogenesis of right heart failure in the obstructive sleep apnea syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1985;131:835-839.
 21. Bradley TD, Brown IG, Grossman RF, Zamel N, Martinez D, Phillipson EA, Hoffstein V. Pharyngeal size in snorers, nonsnorers, and patients with obstructive sleep apnea. *N Engl J Med.* 1986;315:1327-1331.
 22. Brander PE, Soirinsuo M, Lohela P. Nasopharyngeal symptoms in patients with obstructive sleep apnea syndrome. Effect of nasal CPAP treatment. *Respiration.* 1999;66:128-135.
 23. Braun A, Quarcoo D, Schulte-Herbruggen O, Lommatzsch M, Hoyle G, Renz H. Nerve growth factor induces airway hyperresponsiveness in mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;124:205-207.

24. Buchner NJ, Sanner BM, Borgel J, Rump LC. CPAP Treatment of Mild to Moderate Obstructive Sleep Apnea Reduces Cardiovascular Risk. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;[Epub ahead of print]
25. Calero G, Farre R, Ballester E, Hernandez L, Daniel N, Montserrat Canal JM. Physiological consequences of prolonged periods of flow limitation in patients with sleep apnea hypopnea syndrome. *Respir Med.* 2006;100:813-817.
26. Canova CR, Downs SH, Knoblauch A, Andersson M, Tamm M, Leuppi JD. Increased prevalence of perennial allergic rhinitis in patients with obstructive sleep apnea. *Respiration.* 2004;71:138-143.
27. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest.* 2002;122:1162-1167.
28. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest.* 2003;124:1386-1392.
29. Charbonneau M, Marin JM, Olha A, Kimoff RJ, Levy RD, Cosio MG. Changes in obstructive sleep apnea characteristics through the night. *Chest.* 1994;106:1695-1701.
30. Cheng KC, Zhang H, Lin CY, Slutsky AS. Ventilation with negative airway pressure induces a cytokine response in isolated mouse lung. *Anesth Analg.* 2002;94:1577-1582.
31. Ciftci TU, Kokturk O, Bukan N, Bilgihan A. The relationship between serum cytokine levels with obesity and obstructive sleep apnea syndrome. *Cytokine* 2004;28:87-91.

-
32. Créange A, Lefaucheur JP, Authier FJ, Gherardi RK. Cytokines and peripheral neuropathies. *Rev Neurol (Paris)*. 1998;154:208-216.
 33. Creedon D, Tuttle JB. Nerve growth factor synthesis in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 1991;18:730-741.
 34. Criner GJ, Brennan K, Travaline JM, Kreimer D. Efficacy and compliance with noninvasive positive pressure ventilation in patients with chronic respiratory failure. *Chest* 1999;116:667-675.
 35. Cruz AA, Naclerio RM, Proud D, Togias A. Epithelial shedding is associated with nasal reactions to cold, dry air. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:1351-1358.
 36. Curran AK, Eastwood PR, Harms CA, Smith CA, Dempsey JA. Superior laryngeal nerve section alters responses to upper airway distortion in sleeping dogs. *J Appl Physiol*. 1997;83:768-775.
 37. Dematteis M, Levy P, Pepin JL. A simple procedure for measuring pharyngeal sensitivity: a contribution to the diagnosis of sleep apnoea. *Thorax* 2005;60:418-426.
 38. Devouassoux G, Levy P, Rossini E, et al. Sleep apnea is associated with bronchial inflammation and continuous positive airway pressure-induced airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:597-603.
 39. de Vries A, Dessing MC, Engels F, Henricks PA, Nijkamp FP. Nerve growth factor induces a neurokinin-1 receptor- mediated airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1541-1544.
 40. Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci* 2006;114:416-422.

41. Edström L, Larsson H, Larsson L. Neurogenic effects on the palatopharyngeal muscle in patients with obstructive sleep apnoea: a muscle biopsy study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55:916-920.
42. Eikermann M, Jordan AS, Chamberlin NL, et al. The influence of aging on pharyngeal collapsibility during sleep. *Chest*. 2007;131:1702-1709.
43. Elias JA, Freundlich B, Kern JA, Rosenbloom J. Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest*. 1990;97:1439-1445.
44. Ersu R, Arman AR, Save D, Karadag B, Karakoc F, Berkem M, Dagli E. Prevalence of snoring and symptoms of sleep-disordered breathing in primary school children in istanbul. *Chest*. 2004;126:19-24.
45. Farré R, Hernandez L, Montserrat JM, Rotger M, Ballester E, Navajas D. Sham continuous positive airway pressure for placebo-controlled studies in sleep apnoea. *Lancet* 1999;353:1154.
46. Farré R, Montserrat JM, Rigau J, Trepas X, Pinto P, Navajas D. Response of automatic continuous positive airway pressure devices to different sleep breathing patterns: a bench study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:469-473.
47. Farré R, Rigau J, Montserrat JM, Buscemi L, Ballester E, Navajas D. Static and dynamic upper airway obstruction in sleep apnea: role of the breathing gas properties. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003a;168:659-663.
48. Farre R, Rotger M, Montserrat JM, Calero G, Navajas D. Collapsible upper airway segment to study the obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 2003b;136:199-209.

-
49. Fletcher EC. Physiological and Genomic Consequences of Intermittent Hypoxia: Invited Review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 2001;90:1600-1605.
50. Fouke JM, Teeter JP, Strohl KP. Pressure-volume behavior of the upper airway. *J Appl Physiol*. 1986;61:912-918.
51. Fox AJ, Patel HJ, Barnes PJ, Belvisi MG. Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol*. 2001;424:159-162.
52. Freund V, Pons F, Joly V, Mathieu E, Martinet N, Frossard N. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J* 2002;20:458-463.
53. Friberg D, Gazelius B, Hokfelt T, Nordlander B. Abnormal afferent nerve endings in the soft palatal mucosa of sleep apnoics and habitual snorers. *Regul Pept*. 1997;71:29-36.
54. Friberg D, Ansved T, Borg K, Carlsson-Nordlander B, Larsson H, Svanborg E. Histological indications of a progressive snorers disease in an upper airway muscle. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998a;157:586-593.
55. Friberg D, Gazelius B, Lindblad LE, Nordlander B. Habitual snorers and sleep apnoics have abnormal vascular reactions of the soft palatal mucosa on afferent nerve stimulation. *Laryngoscope*. 1998b;108:431-436.
56. Friberg D. Heavy snorer's disease: a progressive local neuropathy. *Acta Otolaryngol*. 1999;119:925-933.

57. Fuller DD, Williams JS, Janssen PL, Fregosi RF. Effect of co-activation of tongue protruder and retractor muscles on tongue movements and pharyngeal airflow mechanics in the rat. *J Physiol*. 1999;519:601-613.
58. Gao X, Xu X, Belmadani S, et al. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1269-1275.
59. Gleadhill IC, Schwartz AR, Schubert N, Wise RA, Permutt S, Smith PL. Upper airway collapsibility in snorers and in patients with obstructive hypopnea and apnea. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143:1300-1303.
60. Goode T, O'Connor T, Hopkins A, et al. Neurokinin-1 receptor (NK-1R) expression is induced in human colonic epithelial cells by proinflammatory cytokines and mediates proliferation in response to substance P. *J Cell Physiol* 2003;197:30-41.
61. Gozal D, Reeves SR, Row BW, Neville JJ, Guo SZ, Lipton AJ. Respiratory Effects of Gestational Intermittent Hypoxia in the Developing Rat. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1540-1547.
62. Greenberg GD, Watson RK, Deptula D. Neuropsychological dysfunction in sleep apnea. *Sleep*. 1987;10:254-262.
63. Greenfeld M, Tauman R, DeRowe A, Sivan Y. Obstructive sleep apnea syndrome due to adenotonsillar hypertrophy in infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2003;67:1055-1060.
64. Guilleminault C, Stoohs R, Clerk A. Daytime somnolence: therapeutic approaches. *Neurophysiol Clin*. 1993;23:23-33.

-
65. Guilleminault C, Li K, Chen NH, Poyares D. Two-point palatal discrimination in patients with upper airway resistance syndrome, obstructive sleep apnea syndrome, and normal control subjects. *Chest*. 2002;122:866-870.
66. Hahn C, Islamian AP, Renz H, Nockher WA. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:787-794.
67. Harsch IA, Schahin SP, Bruckner K, et al. The effect of continuous positive airway pressure treatment on insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnoea syndrome and type 2 diabetes. *Respiration*. 2004;71:252-259.
68. Hernández C, Abreu J, Abreu P, Colino R, Jiménez A. Effects of nasal positive airway pressure treatment on oxidative stress in patients with sleep apnea-hypopnea syndrome. *Arch Bronconeumol*. 2006;42:125-129.
69. Horner RL, Innes JA, Holden HB, Guz A. Afferent pathway(s) for pharyngeal dilator reflex to negative pressure in man: a study using upper airway anaesthesia. *J Physiol*. 1991;436:31-44.
70. Hunter DD, Myers AC, Udem BJ. Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1985-1990.
71. Hwang JC, StJohn WM, Bartlett D Jr. Afferent pathways for hypoglossal and phrenic responses to changes in upper airway pressure. *Respir Physiol*. 1984;55:341-354.
72. Ingman T, Nieminen T, Hurmerinta K. Cephalometric comparison of pharyngeal changes in subjects with upper airway resistance syndrome or obstructive sleep apnoea in upright and supine positions. *Eur J Orthod*. 2004;26:321-326.

73. Ip MS, Lam B, Ng MM, Lam WK, Tsang KW, Lam KS. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:670-676.
74. Isono S, Remmers JE, Tanaka A, Sho Y, Sato J, Nishino T. Anatomy of pharynx in patients with obstructive sleep apnea and in normal subjects. *J Appl Physiol*. 1997;82:1319-1326.
75. Jager L, Gunther E, Gauger J, Reiser M. Fluoroscopic MR of the pharynx in patients with obstructive sleep apnea. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1998;19:1205-1214.
76. Janson C, Noges E, Svedberg-Brandt S, Lindberg E. What characterizes patients who are unable to tolerate continuous positive airway pressure (CPAP) treatment? *Respir Med* 2000;94:145-149.
77. Kales A, Caldwell AB, Cadieux RJ, Vela-Bueno A, Ruch LG, Mayes SD. Severe obstructive sleep apnea--II: Associated psychopathology and psychosocial consequences. *J Chronic Dis*. 1985;38:427-434.
78. Kasahara K, Nakagawa T, Kubota T. Neuronal loss and expression of neurotrophic factors in a model of rat chronic compressive spinal cord injury. *Spine* 2006;31:2059-2066.
79. Katsantonis GP, Moss K, Miyazaki S, Walsh J. Determining the site of airway collapse in obstructive sleep apnea with airway pressure monitoring. *Laryngoscope*. 1993;103:1126-1131.
80. Kheirandish L, Gozal D. Neurocognitive dysfunction in children with sleep disorders. *Dev Sci*. 2006;9:388-399.

-
81. Kimoff RJ, Sforza E, Champagne V, Ofiara L, Gendron D. Upper airway sensation in snoring and obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:250-255.
 82. Kobayashi H, Gleich GJ, Butterfield JH, Kita H. Human eosinophils produce neurotrophins and secrete nerve growth factor on immunologic stimuli. *Blood.* 2002;99:2214-2220.
 83. Kobayashi S, Baba H, Uchida K et al. Effect of mechanical compression on the lumbar nerve root: Localization and changes of intraradicular inflammatory cytokines, nitric oxide, and cyclooxygenase. *Spine* 2005;30:1699-1705.
 84. Kobayashi Y. Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev Immunol.* 2006;26:307-16.
 85. Krieger J. Long-term compliance with nasal continuous positive airway pressure (CPAP) in obstructive sleep apnea patients and nonapneic snorers. *Sleep.* 1992;15:S42-S46.
 86. Krieger J, Sforza E, Boudewijns A, Zamagni M, Petiau C. Respiratory effort during obstructive sleep apnea: role of age and sleep state. *Chest.* 1997;112:875-884.
 87. Larsson H, Carlsson-Nordlander B, Lindblad LE, Norbeck O, Svanborg E. Temperature thresholds in the oropharynx of patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146:1246-1249.
 88. Lavie L, Kraiczi H, Hefetz A, Ghandour H, Perelman A, Hedner J, Lavie P. Plasma vascular endothelial growth factor in sleep apnea syndrome: effects of nasal continuous positive air pressure treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1624-1628.

89. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 1987;237:1154-1162.
90. Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*. 1996;19:289-317.
91. Li LF, Ouyang B, Choukroun G, et al. Stretch-induced IL-8 depends on c-Jun NH2-terminal and nuclear factor-kappa B-inducing kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L464-L475.
92. Liistro G, Stanescu D, Veriter C. Pattern of simulated snoring is different through mouth and nose. *J Appl Physiol*. 1991;70:2736-2741.
93. Lim LH, Wagner EM. Airway distension promotes leukocyte recruitment in rat tracheal circulation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:1068-1074.
94. Lindberg E, Elmasry A, Gislason T, et al. Evolution of sleep apnea syndrome in sleepy snorers: a population-based prospective study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:2024-2027.
95. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001;25:402-408.
96. Lofaso F, Coste A, d'Ortho MP, Zerah-Lancner F, Delclaux C, Goldenberg F, Harf A. Nasal obstruction as a risk factor for sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J*. 2000;16:639-643.
97. Lojander J, Brander PE, Ammala K. Nasopharyngeal symptoms and nasal continuous positive airway pressure therapy in obstructive sleep apnoea syndrome. *Acta Otolaryngol*. 1999;119:497-502.

-
98. Lugaresi E, Mondini S, Zucconi M, Montagna P, Cirignotta F. Staging of heavy snorers' disease. A proposal. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1983;19:590-594.
 99. Lundblad L, Anggård A, Lundberg JM. Vasodilation in the nasal mucosa induced by antidromic trigeminal nerve stimulation. *Acta Physiol Scand.* 1982;115:517-519.
 100. Luscinskas FW, Ding H, Lichtman AH. P-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4⁺ T lymphocytes on tumor necrosis factor alpha-activated vascular endothelium under flow. *J Exp Med.* 1995;181:1179-1186.
 101. Lyberg T, Krogstad O, Djupesland G. Cephalometric analysis in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. I. Skeletal morphology. *J Laryngol Otol.* 1989;103:287-292.
 102. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet.* 2005;365:1046-1053.
 103. Marriott I, Mason MJ, Elhofy A, Bost KL. Substance P activates NF-kappa B independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. *J Neuroimmunol* 2000;102:163-171.
 104. Martins AB, Tufik S, Moura SM. Physiopathology of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *J Bras Pneumol.* 2007;33:93-100.
 105. Mathew OP, Abu-Osba YK, Thach BT. Genioglossus muscle responses to upper airway pressure changes: afferent pathways. *J Appl Physiol.* 1982;52:445-450.
 106. Mathew OP, Sant'Ambrogio G, Fisher JT, Sant'Ambrogio FB. Respiratory afferent activity in the superior laryngeal nerves. *Respir Physiol.* 1984;58:41-50.

107. McDonald DM, Mitchell RA, Gabella G, Haskell A. Neurogenic inflammation in the rat trachea. II. Identity and distribution of nerves mediating the increase in vascular permeability. *J Neurocytol.* 1988;17:605-628.
108. McNicholas WT, Bonsignore MR; Management Committee of EU COST ACTION B26. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J.* 2007;29:156-178.
109. Miles PG, Vig PS, Weyant RJ, Forrest TD, Rockette HE Jr. Craniofacial structure and obstructive sleep apnea syndrome--a qualitative analysis and meta-analysis of the literature. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996;109:163-172.
110. Morrell MJ, Arabi Y, Zahn B, Badr MS. Progressive retropalatal narrowing preceding obstructive apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1974-1981.
111. Mortimore IL, Marshall I, Wraith PK, Sellar RJ, Douglas NJ. Neck and total body fat deposition in nonobese and obese patients with sleep apnea compared with that in control subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:280-283.
112. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res.* 2006;7:125.
113. Nacher M, Serrano-Mollar A, Farre R, Panes J, Segui J, Montserrat JM. Recurrent obstructive apneas trigger early systemic inflammation in a rat model of sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 2007;155:93-96.
114. Nathan RA, Eccles R, Howarth PH, Steinsvag SK, Togias A. Objective monitoring of nasal patency and nasal physiology in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:S442-S459.

-
115. Navajas D, Farré R, Rotger M, Badia R, Puig-de-Morales M, Montserrat JM. Assessment of airflow obstruction during CPAP by means of forced oscillation in patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1526-1530.
 116. Nguyen AT, Jobin V, Payne R, Beaugard J, Naor N, Kimoff RJ. Laryngeal and velopharyngeal sensory impairment in obstructive sleep apnea. *Sleep.* 2005;28:585-593.
 117. Nguyen HX, O'Barr TJ, Anderson AJ. Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF-alpha. *J Neurochem.* 2007;102:900-912.
 118. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, et al. Association of sleepdisordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study: sleep Heart Health Study. *JAMA* 2000;283:1829-1836.
 119. Norton PG, Dunn EV. Snoring as a risk factor for disease: an epidemiological survey. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985;291:630-632.
 120. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol.* 2004;201:167-180.
 121. Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, Ouchi Y. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J Appl Physiol.* 2003;94:179-184.
 122. Olopade CO, Christon JA, Zakkar M, Hua C, Swedler WI, Scheff PA, Rubinstein I. Exhaled pentane and nitric oxide levels in patients with obstructive sleep apnea. *Chest.* 1997;111:1500-1504
 123. Patil SP, Schneider H, Schwartz AR, Smith PL. Adult obstructive sleep apnea: pathophysiology and diagnosis. *Chest.* 2007a;132:325-337.

124. Patil SP, Schneider H, Marx JJ, Gladmon E, Schwartz AR, Smith PL. Neuromechanical control of upper airway patency during sleep. *J Appl Physiol*. 2007b;102:547-556.
125. Paulsen FP, Steven P, Tsokos M, Jungmann K, Müller A, Verse T, Pirsig W. Upper airway epithelial structural changes in obstructive sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:501-509.
126. Pepin JL, Leger P, Veale D, Langevin B, Robert D, Levy P. Side effects of nasal continuous positive airway pressure in sleep apnea syndrome. Study of 193 patients in two French sleep centers. *Chest*. 1995;107:375-381.
127. Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA*. 2000;284:3015-3021.
128. Pepperell JC, Ramdassingh-Dow S, Crosthwaite N, Mullins R, Jenkinson C, Stradling JR, Davies RJ. Ambulatory blood pressure after therapeutic and subtherapeutic nasal continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea: a randomised parallel trial. *Lancet*. 2002;359:204-210.
129. Peter JH, Amend G, Faust M et al. Snoring and sleep apnea syndrome *Wien Med Wochenschr*. 1989;139:264-273.
130. Phillipson EA. Sleep apnea--a major public health problem. *N Engl J Med*. 1993;328:1271-1273.
131. Plowman LD, Lauff DC, Berthon Jones M, Sullivan CE. Waking and genioglossus muscle responses to upper airway pressure oscillation in sleeping dogs. *J Appl Physiol* 1990;68:2564-2573.

-
132. Pride NB, Permutt S, Riley RL, Bromberger-Barnea B. Determinants of maximal expiratory flow from the lungs. *J Appl Physiol*. 1967;23:646-662.
 133. Puig F, Rico F, Almendros I, Montserrat JM, Navajas D, Farre R. Vibration enhances interleukin-8 release in a cell model of snoring-induced airway inflammation. *Sleep*. 2005;28:1312-1316.
 134. Punjabi NM, O'hearn DJ, Neubauer DN, Nieto FJ, Schwartz AR, Smith PL, Bandeen-Roche K. Modeling hypersomnolence in sleep-disordered breathing. A novel approach using survival analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1703-1709.
 135. Punjabi NM, Bandeen-Roche K, Marx JJ, Neubauer DN, Smith PL, Schwartz AR. The association between daytime sleepiness and sleep-disordered breathing in NREM and REM sleep. *Sleep* 2002;25:307-314.
 136. Punjabi NM, Shahar E, Redline S, Gottlieb DJ, Givelber R, Resnick HE. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol* 2004;160:521-530.
 137. Racionero Casero MA, Garcia Rio F, Pino Garcia JM, Prados Sanchez C, Diaz Lobato S, Villamor Leon J. The sleep apnea syndrome as a health problem. An estimation of its prevalence and morbimortality. *An Med Interna*. 1999;16:97-102.
 138. Reid MB, Lannergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor-alpha: involvement of muscle myofilaments. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:479-484.
 139. Remmers JE, deGroot WJ, Sauerland EK, Anch AM. Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep. *J Appl Physiol* 1978;44:931-938.

140. Riccio MM, Myers AC, Udem BJ. Immunomodulation of afferent neurons in guinea-pig isolated airway. *J Physiol.* 1996;491:499-509.
141. Richards GN, Cistulli PA, Ungar RG, Berthon-Jones M, Sullivan CE. Mouth leak with nasal continuous positive airway pressure increases nasal airway resistance. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:182-186.
142. Rivlin J, Hoffstein V, Kalbfleisch J, McNicholas W, Zamel N, Bryan AC. Upper airway morphology in patients with idiopathic obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis.* 1984;129:355-360.
143. Rowley JA, Williams BC, Smith PL, Schwartz AR. Neuromuscular activity and upper airway collapsibility. Mechanisms of action in the decerebrate cat. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:515-521.
144. Rubinstein I, Hoffstein V, Bradley TD. Lung volume-related changes in the pharyngeal area of obese females with and without obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J.* 1989;2:344-351.
145. Rubinstein I. Nasal inflammation in patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope.* 1995;105:175-177.
146. Ryan CM, Bradley TD. Pathogenesis of obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol.* 2005;99:2440-2450.
147. Ryan S, McNicholas WT, O'Regan RG, Nolan P. Upper airway muscle paralysis reduces reflex upper airway motor response to negative transmural pressure in rat. *J Appl Physiol* 2003;94:1307-1316.
148. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation.* 2005;112:2660-2667.

-
149. Salerno FG, Carpagnano E, Guido P, et al. Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. *Respir Med.* 2004;98:25-28.
 150. Salomonsson S, Lundberg IE. Cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity.* 2006;39:177-190.
 151. Sanders MH, Kern N. Obstructive sleep apnea treated by independently adjusted inspiratory and expiratory positive airway pressures via nasal mask. Physiologic and clinical implications. *Chest.* 1990;98:317-324.
 152. Sanico AM, Stanisiz AM, Gleeson TD, et al. Nerve growth factor expression and release in allergic inflammatory disease of the upper airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1631-1635.
 153. Santambrogio L, Benedetti M, Chao MV, Muzaffar R, Kulig K, Gabellini N, Hochwald G. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol.* 1994;153:4488-4495.
 154. Sarin S, Udem B, Sanico A, Togias A. The role of the nervous system in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:999-1016.
 155. Schellenberg JB, Maislin G, Schwab RJ. Physical findings and the risk for obstructive sleep apnea. The importance of oropharyngeal structures. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:740-748.
 156. Schwab RJ, Gefer WB, Hoffman EA, Gupta KB, Pack AI. Dynamic upper airway imaging during awake respiration in normal subjects and patients with sleep disordered breathing. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:1385-1400.

157. Schwab RJ, Gupta KB, Gefter WB, Metzger LJ, Hoffman EA, Pack AI. Upper airway and soft tissue anatomy in normal subjects and patients with sleep-disordered breathing. Significance of the lateral pharyngeal walls. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1673-1689.
158. Schwab RJ. Properties of tissues surrounding the upper airway. *Sleep*. 1996;19:S170-S174.
159. Schwab RJ. Upper airway assessment: radiographic and other imaging techniques. *Otolaryngol Clin North Am*. 1998;31:931-968.
160. Schwab RJ, Pasirstein M, Pierson R, et al. Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:522-530.
161. Schwartz AR, Smith PL, Wise RA, Gold AR, Permutt S. Induction of upper airway occlusion in sleeping individuals with subatmospheric nasal pressure. *J Appl Physiol*. 1988;64:535-542.
162. Sekosan M, Zakkar M, Wenig BL, Olopade CO, Rubinstein I. Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope*. 1996;106:1018-1020.
163. Shepard JW Jr, Thawley SE. Evaluation of the upper airway by computerized tomography in patients undergoing uvulopalatopharyngoplasty for obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140:711-716.
164. Shepard JW Jr, Thawley SE. Localization of upper airway collapse during sleep in patients with obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141:1350-1355.
165. Shindoh C, Hida W, Ohkawara Y, Yamauchi K, Ohno I, Takishima T, Shirato K. TNF-alpha mRNA expression in diaphragm muscle after endotoxin administration.

-
166. Am J Respir Crit Care Med. 1995;152:1690-1696. Shirasaki H, Asakura K, Narita SI, Kataura A. Expression of substance P (NK1) receptor mRNA in human nose. *Acta Otolaryngol.* 1998;118:717-722.
167. Smith PL, Wise RA, Gold AR, Schwartz AR, Permutt S. Upper airway pressure-flow relationships in obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol.* 1988;64:789-795.
168. Spies JM, Westland KW, Bonner JG, Pollard JD. Intraneural activated T cells cause focal breakdown of the blood-nerve barrier. *Brain.* 1995;118:857-868.
169. Stauffer JL, Buick MK, Bixler EO, et al. Morphology of the uvula in obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:724-728.
170. Steiropoulos P, Tsara V, Nena E et al. Effect of continuous positive airway pressure treatment on serum cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest.* 2007;132:843-851.
171. Strohl KP, Fouke JM. Dilating forces on the upper airway of anesthetized dogs. *J Appl Physiol.* 1985;58:452-458.
172. Strohl KP, Redline S. Nasal CPAP therapy, upper airway muscle activation, and obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis.* 1986;134:555-558.
173. Strohl KP, Thomas AJ, StJean P, Schlenker EH, Koletsky RJ, Schork NJ. Ventilation and metabolism among rat strains. *J Appl Physiol* 1997;82:317-323.
174. Sullivan CE, Issa FG, Berthon-Jones M, Eves L. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet.* 1981 Apr 18;1:862-865.

175. Suratt PM, Dee P, Atkinson RL, Armstrong P, Wilhoit SC. Fluoroscopic and computed tomographic features of the pharyngeal airway in obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis.* 1983;127:487-492.
176. Takeuchi T, Futatsuka M, Imanishi H, Yamada S. Pathological changes observed in the finger biopsy of patients with vibration-induced white finger. *Scand J Work Environ Health.* 1986;12:280-283.
177. Tan JC, Kalapesi FB, Coroneo MT. Mechanosensitivity and the eye: cells coping with the pressure. *Br J Ophthalmol* 2006;90:383-388.
178. Teculescu D. Sleeping disorders and injury prevention of occupational or domestic accidents. *Sante Publique.* 2007;19:147-152.
179. Togias AG, Naclerio RM, Proud D, et al. Nasal Challenge with Cold, Dry Air Results in Release of Inflammatory Mediators - Possible Mast-Cell Involvement. *J Clin Invest* 1985;76:1375-1381.
180. Tschumperlin DJ, Shively JD, Swartz MA, Silverman ES, Haley KJ, Raab G, Drazen JM. Mechanotransduction in the lung - Bronchial epithelial compression regulates MAP kinase signaling and HB-EGF-like growth factor expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L904-L911.
181. Tschumperlin DJ, Drazen JM. Chronic effects of mechanical force on airways. *Annu Rev Physiol* 2006;68:563-583.
182. Tsubone H. Nasal 'pressure' receptors. *Nippon Juigaku Zasshi.* 1990;52:225-232.
183. Tsuchida S, Engelberts D, Roth M, McKerlie C, Post M, Kavanagh BP. Continuous positive airway pressure causes lung injury in a model of sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L554-L564.

184. Umeno E, Nadel JA, McDonald DM. Neurogenic inflammation of the rat trachea: fate of neutrophils that adhere to venules. *J Appl Physiol.* 1990;69:2131-2136.
185. Van Zutphen C, Janssen P, Hassan M, Cabrera R, Bailey EF, Fregosi RF. Regional velopharyngeal compliance in the rat: influence of tongue muscle contraction. *NMR Biomed.* 2007;20:682-691.
186. Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999;277:L167-L173.
187. Watanabe T, Isono S, Tanaka A, Tanzawa H, Nishino T. Contribution of body habitus and craniofacial characteristics to segmental closing pressures of the passive pharynx in patients with sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:260-265.
188. Woodson BT, Garancis JC, Toohill RJ. Histopathologic changes in snoring and obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope.* 1991;101:1318-1322.
189. Wu X, Myers AC, Goldstone AC, Togias A, Sanico AM. Localization of nerve growth factor and its receptors in the human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:428-433.
190. Xu WB, Haddad EB, Tsukagoshi H, Adcock I, Barnes PJ, Chung KF. Induction of macrophage inflammatory protein 2 gene expression by interleukin 1 beta in rat lung. *Thorax.* 1995;50:1136-1140.
191. Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med.* 2005;353:2034-2041.

192. Yong SC, Chen SJ, Boo NY. Incidence of nasal trauma associated with nasal prong versus nasal mask during continuous positive airway pressure treatment in very low birthweight infants: a randomised control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:F480-F483.
193. Younes M. Role of arousals in the pathogenesis of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:623-633.
194. Young JW, McDonald JP. An investigation into the relationship between the severity of obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome and the vertical position of the hyoid bone. *Surgeon*. 2004;2:145-151.
195. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med*. 1993;328:1230-1235.
196. Young T, Finn L, Kim H. Nasal obstruction as a risk factor for sleep-disordered breathing. The University of Wisconsin Sleep and Respiratory Research Group. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99:S757-S762.

Anexo A

Protocolo para la cuantificación de la expresión génica

A.1 Introducción

La presente tesis contiene tres estudios en los que se ha cuantificado la expresión génica relativa de una serie de marcadores que podrían estar involucrados en los procesos inflamatorios estudiados. Para ello, el doctorando ha tenido que poner a punto y optimizar una serie de técnicas para poder determinar, a partir de muestras tisulares, la expresión génica de los marcadores inflamatorios relevantes. Básicamente estas técnicas, que no estaban implementadas en el laboratorio, son:

- a) El aislamiento del RNA a partir de las muestras de tejido animal mediante el sistema 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, Calif), que permite un proceso de separación por filtración selectivo.
- b) El paso del RNA, una vez aislado, a cDNA por transcripción reversa.
- c) La amplificación mediante PCR en tiempo real con el sistema 3100 PCR real time (Applied Biosystems, Foster City, Calif).
- d) Finalmente, la comparación entre los diferentes grupos mediante el software proporcionado por el sistema de PCR que está basado en el método estándar comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

A.2 Aislamiento de RNA a partir de tejido

El siguiente protocolo está modificado del proporcionado por el fabricante Applied Biosystems: “Tissue RNA isolation” (Nº de referencia 4330252).

El proceso de aislamiento de RNA a partir de muestras tisulares consta de cuatro pasos a seguir:

- Obtención, congelación y almacenaje del tejido.
- Homogeneización del tejido.
- Prefiltrado.
- Purificación del RNA.

A.2.1 Obtención y almacenaje del tejido

El RNA presente en la muestra de tejido extraída del organismo comienza rápidamente a desnaturalizarse por la acción de RNAsas. Para preservar las muestras, éstas se almacenan congeladas en *nucleic acid purification lysis solution*.

Protocolo:

- a.- La muestra de tejido extraída del organismo se coloca inmediatamente en *nucleic acid purification lysis solution (2X)*
- b.- Para largos periodos el tejido se almacena a una temperatura de -20 a -80 °C y para periodos inferiores, a 8 horas a 4 °C.

A.2.2 Homogeneización del tejido

En este paso se consigue la disgregación completa del tejido mediante el uso de un homogeneizador Polytron 2100 (Kinematica, Luzern, Switzerland).

Protocolo:

- a.- Descongelar y diluir el tejido almacenado en *nucleic acid purification lysis solution* 2X con PBS estéril para conseguir una dilución 1X (*lysis buffer*). La carga óptima de tejido es de 20mg/mL.
- b.- Homogeneizar la muestra de tejido durante 30 s aproximadamente a máxima velocidad. Repetir el proceso si permanecen grandes partículas.
- c.- Colocar el homogeneizado en hielo durante 30 min para deshacer la espuma formada durante la homogeneización y terminar de disgregar el tejido.
- d.- Limpiar el rotor del homogeneizador mediante las siguientes soluciones con este orden:
 - 10% lejía.
 - Agua Milli-Q.
 - 70% metanol.
 - Agua Milli-Q.
 - Secar con papel absorbente limpio.

Nota: Si se desea se puede guardar el homogeneizado:

- Para largos periodos, a -20°C.
- Para un corto periodo (máx. 24h.), a 4°C.

A.2.3 Prefiltrado

Para el aislamiento de RNA se utiliza el sistema 6100 Nucleic Acid PrepStation. Este sistema está basado en la eliminación de restos contaminantes a partir del filtrado del homogeneizado de tal forma que el RNA queda adherido a la membrana del filtro (filtro de aislamiento). En los tejidos analizados es necesario un prefiltrado (sin apetencia al RNA) que consiga eliminar las fibras de colágeno y trazas mal disgregadas que podrían colapsar posteriormente los filtros de aislamiento.

Protocolo:

a.- Colocar los componentes necesarios en el sistema Nucleic Acid PrepStation (Figura A.1):

a.1- Placa *Deep well plate*: se coloca en el compartimento de colección. Permite recoger el prefiltrado.

a.2- Placa *Tissue pre-filtrer tray I*: esta placa posee filtros que permiten la eliminación de las grandes trazas de colágeno y tejido mal disgregado presente en el homogeneizado, evitando el posible colapso posterior en el filtro de aislamiento.

b.- Mover el carro a la posición de colección y ponerlo en posición de sellado.

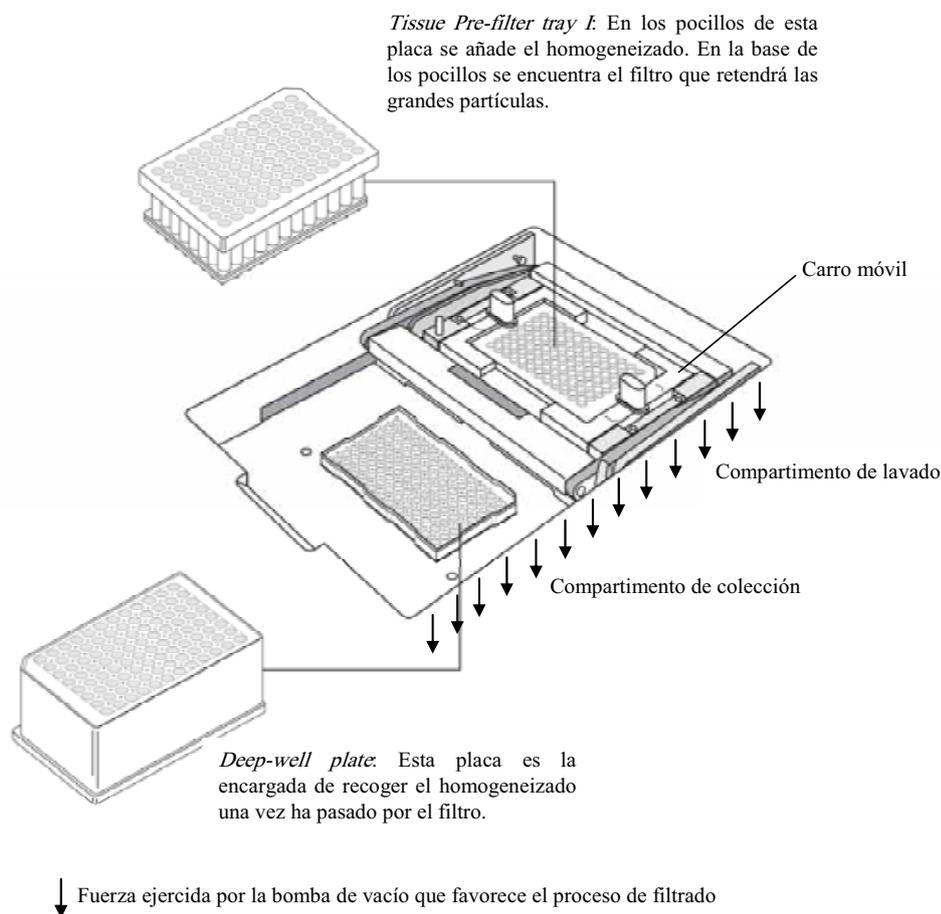


Figura A.1. Esquema del sistema 6100 Nucleic Acid PrepStation para el prefiltrado del homogeneizado. Este procedimiento, que es opcional, elimina las fibras de colágeno presentes en el homogeneizado (modificado del protocolo 4330252, Applied Biosystems, Foster City, Calif).

c.- Cubrir cualquier pocillo no usado mediante cinta adhesiva.

d.- Proceder usando el método preprogramado “*Pre-filter Method*”:

Paso	Descripción	Vol (µL)	Tiempo (seg.)	Vacío (%)	Posición del carro
1	Pre-humedecer los pocillos con <i>RNA Purification Wash Solution I</i>	40			Lavado
2	Cargar muestras	10-650	180	80	Colección
3	Repetición del vacío		120	80	Colección
4	Agitar carro				Colección

e.- Comprobar que ha pasado todo el material a través de los filtros de la placa *tissue pre-filter tray I*. En caso contrario, repetir el paso anterior hasta que haya pasado todo el material.

f.- Apagar el aparato.

g.- Tomar las placas *tissue pre-filter tray I* y *deep-well plate* del instrumento.

h.- Guardar la placa *deep-well plate* con la muestra prefiltrada para el siguiente paso.

A.2.4 Purificación de RNA

Una vez el tejido está disgregado y prefiltrado eficazmente se procede a la purificación del RNA. Este procedimiento también se realiza en el sistema 6100 Nucleic Acid PrepStation, pero con los componentes que permiten el aislamiento del RNA (Figura A.2). Además, se utiliza un tratamiento opcional de DNAsa que elimina los restos contaminantes de DNA genómico que puedan permanecer en la muestra.

Protocolo:

a.- Cargar los componentes en el sistema 6100 Nucleic Acid PrepStation (Figura A.2):

- Placa *96-well archive plate* en el compartimento de colección.

- Placa *splash guard* en el compartimento de lavado.

- Placa *total RNA purification tray* en el carro, y fijarlo con las dos palancas.

b.- Mover el carro a la posición de lavado.

- c.- Cargar los pocillos de la placa *total RNA purification tray* con las muestras del homogeneizado prefiltrado. Es aconsejable pre-humedecer los pocillos con 40 μL de *RNA Purification Wash Solution I*.
- d.- Optimización de carga. En este paso se determina cual es la cantidad o carga óptima para conseguir eficientemente la mayor cantidad de RNA de las muestras.
- d.1- Añadir las siguientes cantidades del homogeneizado a los pocillos de la placa de purificación: 100 μL , 200 μL , 300 μL , 500 μL y 600 μL .
- d.2- Determinar cual es la cantidad máxima que pasa a través de la placa de

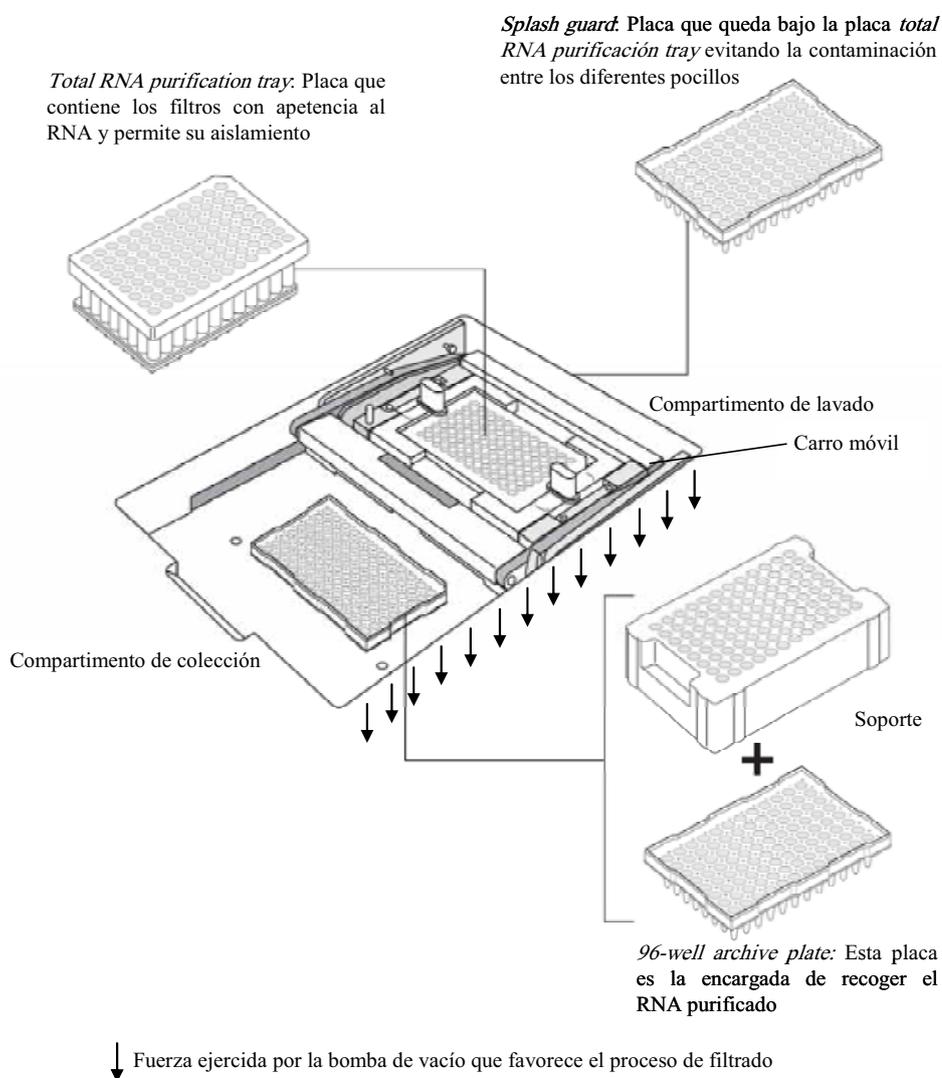


Figura A.2. Esquema del sistema 6100 Nucleic Acid PrepStation para la extracción del RNA (modificado del protocolo 4330252, Applied Biosystems, Foster City, Calif).

purificación fiablemente. En el caso de no pasar suficiente homogeneizado a través de los filtros puede deberse a 2 causas fundamentalmente: Que la muestra esté altamente concentrada o que se necesite realizar algún paso de pre-procesamiento (tratamiento con proteinasa-K). En todo caso la solución madre puede diluirse nuevamente con más cantidad de *lysis buffer* y volver a realizar la optimización de carga.

e.- Proceso de extracción de RNA: para la extracción de RNA se utiliza el método “*RNA Tissue-Filtr-DNA Method*” prefijado en el sistema de extracción 6100 Nucleic Acid PrepStation. En este método se incluye el tratamiento con DNAsa:

Paso	Descripción	Vol (µL)	Tiempo (seg.)	Vacío (%)	Posición del carro
1	Pre-humedecer los pocillos con <i>RNA Purification Wash Solution I</i>	40			Lavado
2	Añadir lisado	10-650	180	80	Lavado
3	Añadir <i>RNA Purification Wash Solution I</i>	500	180	80	Lavado
4	Añadir <i>RNA Purification Wash Solution II</i>	400	180	80	Lavado
5	Añadir <i>RNA Purification Wash Solution II</i>	300	120	60	Lavado
6	Añadir <i>RNA Purification Wash Solution II</i>	300	120	60	Lavado
7	Vacío pre-elución		300	90	Lavado
8	Mover carro a bandeja de colección				Colección
9	Añadir <i>Nucleic Acid Purification elution solution</i>	150	120	40	Colección
10	Recoger 96-well archive plate con las muestras de RNA aisladas				

A.3 Reacción de transcripción reversa (RT)

El siguiente protocolo está modificado del proporcionado por el fabricante Applied Biosystems: “Relative quantification getting started guide” (Nº de referencia: 4347824).

Mediante el uso de *High Capacity cDNA Archive Kit* se realiza la reacción de transcripción reversa del RNA a cDNA.

Protocolo:

- a.- Se trabaja con un volumen final de 100 μL : 50 μL de muestra + 50 μL de reactivo.
- b.- Dejar que se realice la reacción en la PCR. Para ello se programa el aparato 120 min a 37 °C, que es la temperatura óptima de la reacción. Una vez transcurrido este tiempo se consigue pasar todo el RNA a cDNA. Finalmente se consigue un volumen total de 100 μL con cDNA.
- c.- Hacer alícuotas de 30 μL (puede variar según experimento).

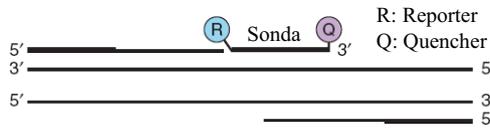
Nota: Si se desea, se puede almacenar el cDNA: a -20 °C varias semanas o a -80 °C durante varios meses.

A.4 PCR en tiempo real

El siguiente protocolo está modificado del proporcionado por el fabricante Applied Biosystems: “Relative quantification getting started guide” (Nº de referencia: 4347824).

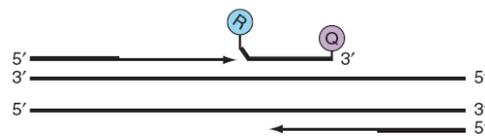
La utilización de la PCR en tiempo real implica varias ventajas respecto a la utilización de la PCR convencional, entre las que se incluyen una mayor precisión y objetividad de los resultados obtenidos. Para la amplificación del cDNA y su posterior cuantificación se utiliza el sistema 7300 real time PCR system y más concretamente, se usa la técnica basada en las sondas Taqman® (Figura A.3). Estas sondas (que

Polimerización



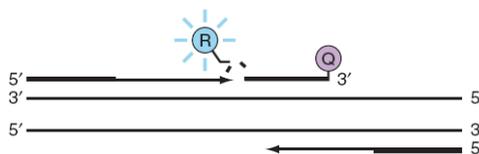
Paso 1: Una molécula fluorescente “reporter” (R) y otra que absorbe la misma fluorescencia “quencher” (Q) están unidas por la misma sonda.

Desplazamiento polimerasa



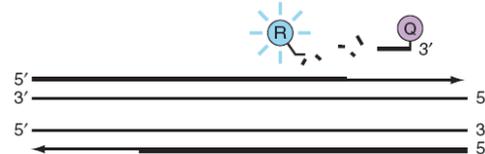
Paso 1 (continuación): Cuando ambas moléculas (R y Q) están unidas en la misma molécula la emisión de R es absorbida por Q.

Rotura



Paso 2: En cada ciclo, la polimerasa libera la molécula fluorescente (R).

Polimerización completada



Paso 3: Una vez separadas ambas moléculas, la molécula R emite su fluorescencia característica.

Figura A.3. Las sondas Taqman proporcionan sondas fluorescentes para permitir la detección de un producto específico que se genera durante cada ciclo de la PCR (modificado de Applied Biosystems: “*Relative quantification getting started guide*”).

complementan con el marcador deseado) poseen un extremo fluorescente en el extremo 5' (*reporter*) y una molécula localizada en el extremo 3' que es capaz de absorber la fluorescencia cuando están unidas por la sonda (*quencher*). Durante la polimerización de la cadena complementaria, la polimerasa rompe la sonda liberando ambas moléculas y favoreciendo la captación de fluorescencia emitida por la molécula fluorescente (*reporter*).

Protocolo:

- a.- Preparación de las muestras con los reactivos en la placa óptica (96 pocillos):
 - Master Mix.
 - Ensayo de expresión génica (específico para un marcador).

- cDNA (Se puede vortear un poco antes de añadirlo). La cantidad de cDNA que se pone en cada pocillo debe de ser la misma. De hecho, este procedimiento se lleva a cabo gracias a la previa estimación de la cantidad y pureza del RNA mediante espectrofotometría.
- Agua Milli-Q.

Componentes de la reacción	Volumen/pocillo 20 μ L	Volumen/pocillo 50 μ L*	Concentración final
Taqman Universal PCR Master Mix. No AmpErase UNG (2X)	10	25	1X
Ensayo de expresión génica	1	2,5	1X
cDNA diluído en agua Milli-Q	9	22,5	---
Volumen total	20	50	

* Es el volumen final que se usa por defecto.

b.- Diseño de la placa: es importante un buen diseño de la placa en el estudio. Es aconsejable la realización en triplicado de cada uno de los casos. Por otro lado, es necesario comprobar la ausencia de contaminación en los reactivos, que se garantiza con la realización de ensayos sin la incorporación de cDNA, en cuyo caso no debería detectarse amplificación.

c.- Sellado de la placa.

d.- Configuración de la PCR: los parámetros de la PCR se pueden controlar mediante el software proporcionado por el fabricante de la PCR:

d.1.- Abrir el programa “7300 system SDS Software”.

d.2.- Insertar los datos referentes a:

- Genes a estudiar y marcador fluorescente utilizado.
- Diseño de la placa.

d.3.- Insertar los valores del termociclador: periodo de tiempo, temperaturas y número de ciclos (Figura A.4).

d.4- Comenzar el proceso de amplificación (Figura A.5).

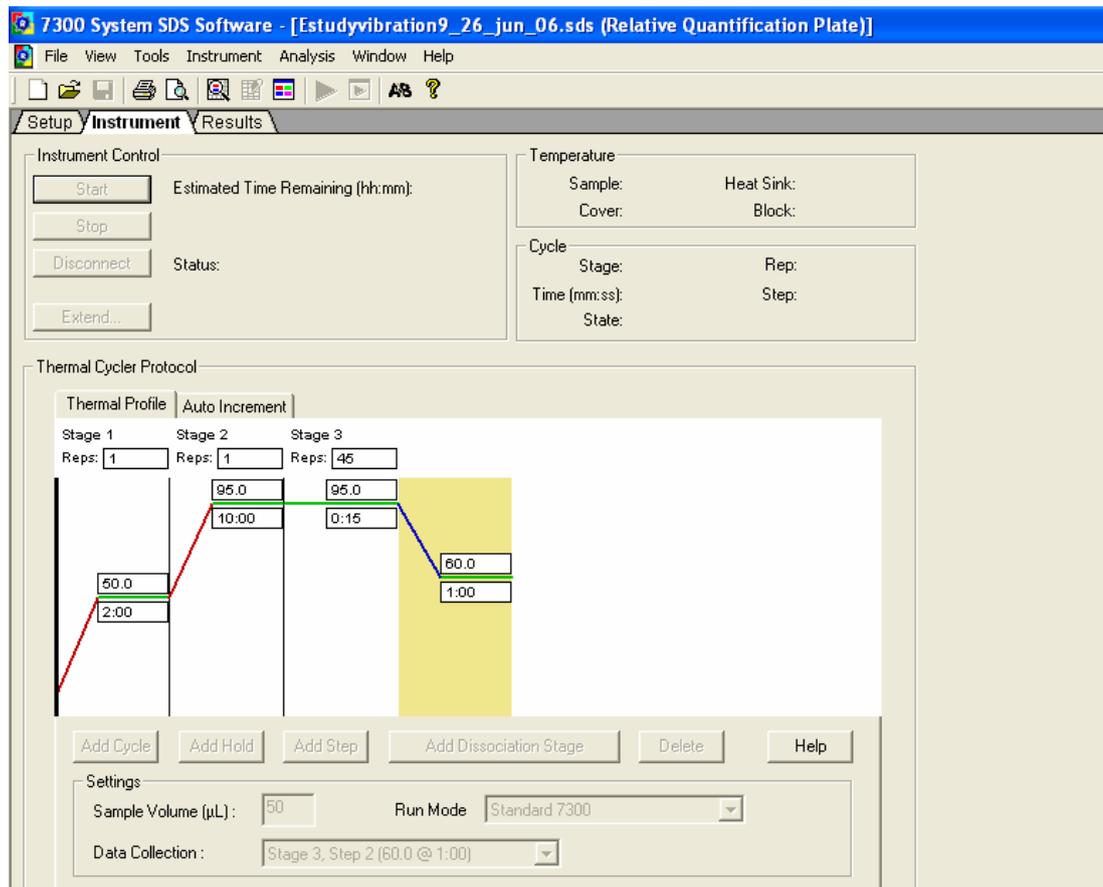


Figura A.4. Configuración de los parámetros de cada ciclo del termociclador. El software proporcionado permite modificar el número ciclos, la duración y la temperatura de cada una de las fases. En el caso de utilizar sondas Taqman (*Assays on Demand*) las fases 1 y 2, que se corresponden con la activación de la polimerasa, sólo ocurren al comienzo, mientras que la fase 3, que consta de 1 min a 60 °C (polimerización) y 15 s a 95°C (separación de las cadenas complementarias), permite la amplificación del cDNA. La franja amarilla indica que al final de dicho proceso (1 min a 60 °C) el sistema de PCR registra la fluorescencia emitida por cada pocillo de la placa.

A.5 Método comparativo.

Para la comparación de la expresión génica de un marcador es necesaria la estimación del valor Ct (ciclo umbral), que es el ciclo en el que la emisión de fluorescencia alcanza un determinado umbral que es posicionado en la fase exponencial de la reacción. La determinación de este valor umbral se realiza de manera automática por el programa *7300 System SDS Software* (Applied Biosystems) que lo estima para el

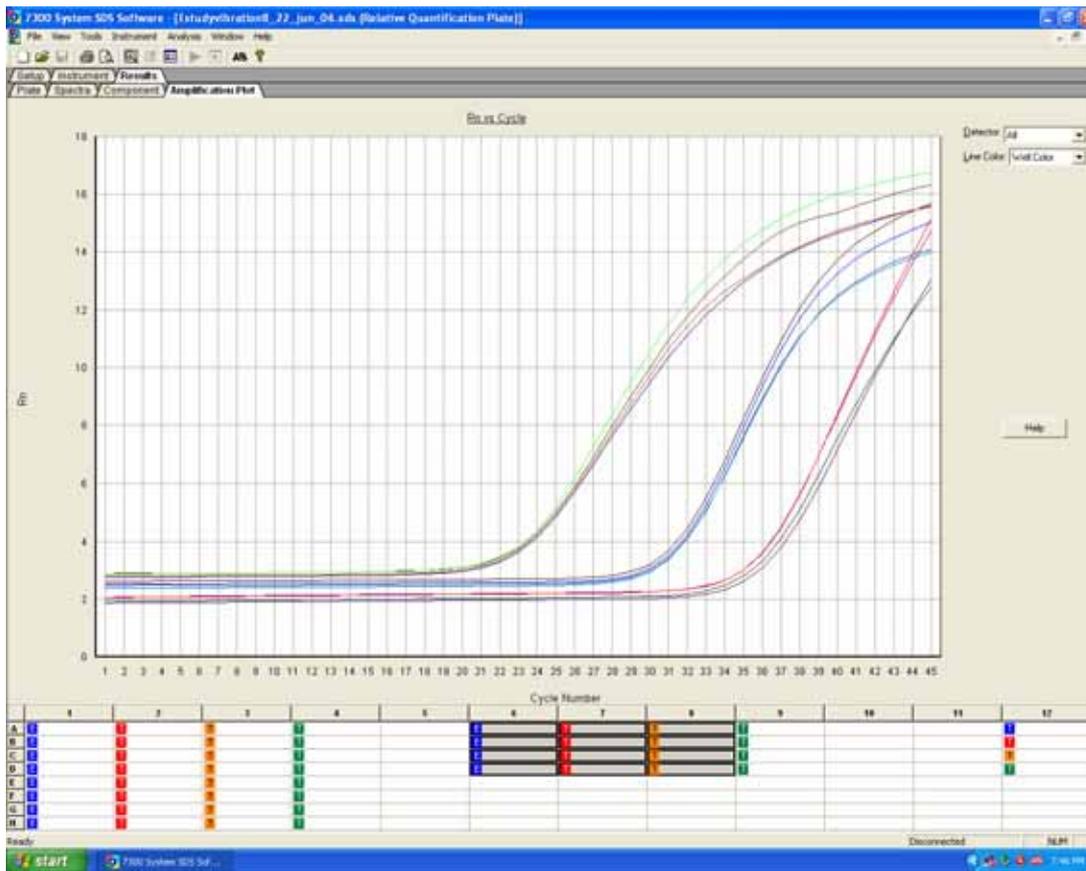


Figura A.5. Registro de la fluorescencia (Y) emitida durante los 45 ciclos (X) en los que se va amplificando el cDNA y liberando el producto fluorescente.

valor medio de la fase exponencial de la reacción. Este valor depende de la cantidad de gen (marcador) presente en el inicio de la reacción y por tanto, de la cantidad total de cDNA. Para poder normalizar los valores se utiliza el marcador endógeno GAPD cuya expresión es constitutiva e independiente de los estímulos aplicados. Con los Ct obtenidos del marcador endógeno, se pueden normalizar los valores de Ct del resto de los marcadores, de tal forma que se puede cuantificar la variación en la expresión génica de los diferentes marcadores entre diferentes muestras mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen 2001).

Protocolo:

- a.- Tomar los valores de Ct para cada marcador (incluido el endógeno) mediante el programa *7300 PCR System SDS Software*.

b.- Normalizar los valores de cada uno de los marcadores con su referencia endógena (GAPD):

$$\Delta Ct = Ct_g - Ct_e$$

(Ct_g = Valor de Ct para el marcador a estudiar)

(Ct_e = Valor de Ct para el marcador endógeno)

c.- Comparar con el grupo control.

c.1.- Calcular $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{grupo sometido a estímulo}) - \Delta Ct (\text{grupo control}).$$

c.2.- Calcular $2^{-\Delta\Delta Ct}$, este valor es el que finalmente nos informa de la variación en la expresión génica entre ambos grupos.

Anexo B

Publicaciones y conferencias

B.1 Publicaciones

1. **Almendros I**, Acerbi I, Vilaseca I, Monserrat JM, Navajas D, Farre R. Continuous positive airway pressure (CPAP) induces early nasal inflammation. SLEEP 2007 (In press).
2. **Almendros I**, Acerbi I, Puig F, Monserrat JM, Navajas D, Farre R. Upper-Airway Inflammation Triggered by Vibration in a Rat Model of Snoring. SLEEP. 2007;30:225-227.
3. Roca-Cusachs P, **Almendros I**, Sunyer R, Gavara N, Farre R, Navajas D. Rheology of passive and adhesion-activated neutrophils probed by Atomic Force Microscopy. Biophys J. 2006;91:3508-3518.
4. Puig F, Rico F, **Almendros I**, Montserrat JM, Navajas D, Farre R. Vibration enhances interleukin-8 release in a cell model of snoring-induced airway inflammation. SLEEP 2005;28:1312-1316.

B.2 Conferencias y congresos

1. **Almendros I**, Navajas D, Farré R. Intratracheal negative pressure triggers upper airway inflammation in a rat model of sleep apnea. IBEC Symposium 2007. Barcelona.

2. **Almendros I**, Acerbi I, Vilaseca I, Montserrat JM, Navajas D, Farré R. Compression of the nasal wall tissue is a pro-inflammatory stimulus in healthy rats. European Respiratory Society Annual Congress 2007. Stockholm.
3. **Almendros I**, Acerbi I, Vilaseca I, Montserrat JM, Navajas D, Farré R. Nasal CPAP induces early nasal inflammation in healthy rats. 5^o World Sleep Congress of the WFSRSMS. Australia 2007.
4. Gutierrez PT, **Almendros I**, Farre R, Closa D. Lack of systemic inflammation during unilateral lung hyper-ventilation. 8th World Congress on Inflammation. Copenhagen 16-20 June, 2007.
5. **Almendros I**, Montserrat JM, Navajas D, Farre R. Modelo animal para el estudio de los efectos inflamatorios asociados a la CPAP. 40^o Congreso Nacional SEPAR, Barcelona, 1-4 Junio 2007.
6. **Almendros I**, Gutierrez PT, Closa D, Farré R. La sobreventilación de un pulmón no induce respuesta inflamatoria sobre el pulmón contralateral. 40^o Congreso Nacional SEPAR, Barcelona, 1-4 Junio 2007.
7. **Almendros I**, Puig F, Montserrat JM, Navajas D y Farre R. Modelo animal para el estudio de los efectos inflamatorios del ronquido en la vía aérea superior. 39^o Congreso Nacional SEPAR, Sevilla, 3-5 Junio 2006.
8. Roca-Cusachs P, **Almendros I**, Farre R, Navajas D. Neutrophil microrheology probed by atomic force microscopy. Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology, San Francisco, CA, USA, 2006.

