

UNIVERSITAT DE BARCELONA

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado de Biopatología en medicina

Bienio 2007-2008

MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DEL SÍNDROME DE APNEA/HIPOPNEA DURANTE EL SUEÑO: MECANISMOS IMPLICADOS

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR MARIA NÁCHER ESPUIG
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD
DE BARCELONA

DIRECTORES: Dr. Josep Maria Montserrat Canal
Dra. Anna Serrano Mollar

TUTOR: Dr. Josep Maria Montserrat Canal

AUTOR: Maria Nácher Espuig

Barcelona, 2008



© Maria Nácher Espuig, 2008

Imágenes de la portada:

Tinción de P-selectina por inmunohistoquímica en cortes histológicos de colon.

Diseño y maquetación: Julia Pérez Jorge

Impreso y encuadernado por Logísticacaimés.
Barcelona 2008

“En la vida, no hay nada que temer, todo se tiene que entender.”
(Marie Curie, 1867-1934)

A mis padres,
A mis abuelos,
A mi pequeña Julia,

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Aprovecho este espacio irreplicable que me brinda el final de esta tesis para hacer una reflexión por el sendero de la investigación y rendir un merecido homenaje a todas aquellas personas que me ayudaron en este trayecto. Transcurridos estos cuatro años, se pasan etapas difíciles y duras, aunque siempre guardando equilibrio con las grandes satisfacciones, y en definitiva como resultado de todas estas circunstancias he ido madurando tanto profesionalmente como persona.

Me gustaría empezar los agradecimientos a las personas que confiaron en mí desde el principio según fueron apareciendo en mi camino. Al Dr. JM Montserrat Canal, Director de esta tesis, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por haberme guiado y enseñado durante estos años. A la Dra. Anna Serrano Mollar, Directora de esta tesis, por haber confiado en mí desde el momento en que llegué aquí, porque gracias a su tesón, paciencia y optimismo he podido realizar esta tesis. Mi inmenso reconocimiento por su apoyo y por todo el tiempo que me ha brindado. Por todos los momentos duros y buenos que hemos pasado juntas. T'estimu molt noieta.

Al Dr. Diego Cortés, por ser el primero que confió en mí y me enseñó a luchar por lo que me propusiera. Porque sin él no hubiera caído en tan buenas manos. Al Dr. Oriol Bulbena, mi manager, por haberme aceptado para trabajar en su grupo, por ofrecerme siempre su apoyo durante todo este tiempo, siempre dispuesto a ayudar y transmitirme su buen humor, por todo lo que he aprendido al estar a su lado, y por todas las conversaciones instructivas. Al Dr. Daniel Closa, por todo lo que me ha transmitido y enseñado, por su ayuda, por los momentos en los que nos hemos divertido jugando en la mágica ciencia y perdiéndonos en este fabuloso mundo. Al Dr. Ramón Farré y al Dr. Daniel Navajas, por haberme enseñado su rigurosidad científica y a todo su laboratorio, especialmente al Miguel Ángel, por toda la paciencia que ha tenido conmigo, gracias por toda tu ayuda.

Al Profesor Emili Gelpí, Director del IIBB, por haberme aceptado como becaria en el IIBB y a todo el personal administrativo del centro, por su eficacia y simpatía.

Al Dr. Julià Panés y todo su laboratorio, en especial, al Ximo y al Félix, por haberme ayudado con la técnica de microscopía intravital y por estar dispuestos a ayudarme en cualquier momento.

A la Leti y a la Magda, siempre pienso la suerte que tuve de coincidir con vosotras, por cuidarme tan bien desde el principio, gracias por todo lo que me enseñasteis y ayudasteis, fue un placer trabajar con vosotras, porque os he echado de menos cada día y os continuaré echando de menos siempre. Al Nacho y a la Olga, gracias a su ánimo en los momentos que más lo necesitaba, por ser parte de mi familia de Barcelona, por todos los bailoteos, birras y fiestas que nos hemos dado, sin olvidar los grandes momentos de tertulia.

A la Gemmeta i a la Valeria, perquè sou dos solets, gràcies per aguantar-me en els mals moments i per estar sempre dispostes a ajudar-me, perquè formem una gran família feliç, per totes les anècdotes que em ningut juntes, dinarets, soparets, birretes... amunt l'equip AITES!

A todos mis compañeros de laboratorio que fueron cómplices conmigo de todo el esfuerzo. Me ha encantado compartir y haber tenido una convivencia ejemplar con todos vosotros durante estos años, a todas/os; a la Ángeles, por animar al laboratorio cuando está por allí, a la Marta, por su cariño, a José, Emma, Neus, Javi, Patricia, Montse, Sabrina, Eugenia, Albert, Izabel, Amin, Araní, Joan, Ana, Fran y por los que vuelan por otro lugar: Susana, Txell, Esther, Rosa, Llorenç, Zoila, Iolanda, la Mercè, por todos los buenos ratos que hemos pasado, tanto diurnos como nocturnos, ha sido un placer trabajar con vosotros! A Ismail y a Isaac, por todos los momentos que hemos compartido en los cursos de doctorado, por las risas que nos hemos echado. Y para el resto de la gente de la 6ª planta del IIBB; Lola, Laura, Rubén, Mercedes, Jordi, Víctor, Mireia, Eli, Rocío, Aroa, Silvia, y a un largo etcétera, por su ayuda, por los momentos compartidos en la cantina y en las grandes celebraciones. A la Gina, Anna Sola, Carme Xaus, al Pep, a la Tere por su sonrisa de buena mañana y al Eduard por toda su ayuda informática.

A la gente del servicio de neumología, tanto los de la segunda planta como los del sótano, sobre todo a los del laboratorio del sueño, por todo lo que me han enseñado y ayudado durante mi estancia; a Carmeta por sus clases instructivas del principio, a Lourdes, Gema, Eugeni, Marta por su ayuda técnica, porque fue un placer coincidir contigo en la recta final... a José Luís, Maria Molina, Federico, Hernán, Phillip... a Roberto Rovinovich, Ricardo, al grupo del Víctor Peinado, en especial a Elisabet, por todos los momentos compartidos en congresos... y por último, mi enorme agradecimiento a Gabi, mi antecesor, gracias por tu ayuda del principio.

Al servicio de cardiología, en especial a Xavi por su ayuda en la medición de la presión arterial.

Al personal del estabulario, siempre dispuesto a ayudar; y por todas las celebraciones que hemos compartido. Al Santi y al Abraham, porque ha sido mucho más ameno trabajar con vuestra compañía todas esas horas de estabulario.

A la Dra. Mª Jesús Sanz, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por trasmitirme su alegría y la pasión por la ciencia. Al Dr. Julio Ancochea, por encontrar un hueco en su agenda para formar parte de mi tribunal.

A mis niñitas Nurieta, Senda, Michaela y Bea, por haber sido mi familia de casa en Barcelona, por todos los momentos que hemos compartido, habéis hecho que me sienta muy bien viviendo en Barcelona, porque ya sois una parte importante de mí.

A Anna, Carmina, Rebeca, Sori y Paqui, que aunque no os cuide tanto como debería siempre os tengo ahí. Gracias porque siempre sois vosotras las que me seguís el rastro. Vos viuic molt xiquetes. I ja sabeu, ja tenim una altra cosa que celebrar!

A Julia, Núria, Maria, Cris, Clara, Anja, por ser mis amigas desde los 6 años, porque aunque no nos vemos tanto como quisiéramos, siempre hacemos lo posible por mantenernos informadas. Sé que os tengo y puedo contar con vosotras siempre. Os quiero mucho niñas. A Anita "la murciana" porque la quiero con toda mi alma!

A Maribel, Patricia, Rosana, Maria Montava, Maria Lluch, Maritrini, Finín, Noemí, Reme, Rebeca, Ana, Lucía, Julia, Marta, Souad, Sanae y el resto de las amigas de la universidad porque a pesar de los kilómetros nos mantenemos juntas. A Inma, mi sorellina italiana, por ser tan gran amiga, por todo el apoyo que me ha dado siempre.

A tutti gli ubriamus!!! Goretti, Rocío, María, Erica, Paco, Nacho, Manel, Manu, Martin, Ela, Frauke, Hannes, grazie mille bambini per tutto quello chè mi hai dato, siete mitici, vi voglio tanto bene.

Como no, a mi niño Raúl, por aguantarme día a día en este final de tesis, por su gran apoyo, por todo su cariño y amor.

La dedicatoria fundamental de esta tesis indudablemente es para mis padres a los que quiero tanto, Jose Vte. Nácher y Amparo Espuig, y a mis hermanos, Ana, Fernando y Alberto, porque sois vosotros los que siempre os habéis llevado la peor parte en mis peores momentos, gracias por todo lo que me aguantáis, no sabéis cuánto os necesito y os quiero.

Y para mis maravillosos abuelos, que los quiero más que nada en el mundo, Jose M^a y Amparo, Paco y Concha, y para el resto de la familia Nácher y de la familia Espuig: Juan pare, M^a Carmen, Maria, Laura, Juan fill, Roberto, Conchi, Marta, Rober, Paco, Pili, Blanca, Isabel, José, Enri, Pepe, Santi y para la pequeña Julia.

Y a todos aquellos que he dejado de mencionar, que en algún momento han estado dispuestos a ayudar cuando lo he necesitado. Muchas gracias!

Barcelona, Marzo 2008.

ABREVIATURAS

AP-I	Proteína de activación I
BiPAP	Presión positiva continua en la vía aérea superior a dos niveles
CSF	Factor estimulador de colonias
CPAP	Presión positiva continua en la vía aérea superior
DI	Diámetro interno
ECG	Electrocardiograma
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
EOG	Electrooculograma
EPAP	Presión positiva espiratoria en la vía aérea superior
EPAS-I	Proteína de dominio PAS endotelial
ET-I	Endotelina-I
F_{iO_2}	Fracción de oxígeno inspirado
GF	Factores de crecimiento
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HIF	Factor inducible por hipoxia
IAH	Índice de apnea-hipopnea
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IκB	Proteína inhibidora κ B
IL	Interleucina

INF-γ	Interferón gamma
IPAP	Presión positiva inspiratoria en la vía aérea superior
6kPGF_{1α}	6-keto-Prostaglandina F _{1α}
I	Largo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MIP	Proteínas inflamatorias de macrófagos
NF-κB	Factor nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
NREM	No movimientos oculares rápidos
PCO₂	Presión parcial de dióxido de carbono
PCR	Proteína C reactiva
PECAM	Molécula de adhesión plaqueta-célula endotelial
P_{ext}	Presión externa
PGI₂	Prostaciclina
P_{tr}	Presión traqueal
PSG	Polisomnografía
REM	Movimientos oculares rápidos
RLO	Radicales libres de oxígeno
SACS	Síndrome de la apnea central durante el sueño
SAHS	Síndrome de apnea/hipopnea durante el sueño
SaO₂	Saturación de oxígeno
SRVAS	Síndrome del incremento de la resistencia de la vía aérea superior

TxA₂	Tromboxano A ₂
TxB₂	Tromboxano B ₂
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VAS	Vía aérea superior
VCAM	Molécula de adhesión célula vascular
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
V'	Flujo de respiración

I. INTRODUCCIÓN	21
I.1. Generalidades	21
I.1.1. Anatomía y fisiología de la vía aérea superior	22
I.2. Trastornos respiratorios durante el sueño	24
I.2.1. Ronquido	24
I.2.2. Síndrome del incremento de la resistencia de la vía aérea superior	25
I.2.3. Síndrome de apnea/hipopnea durante el sueño.....	25
I.2.4. Síndrome de apnea central durante el sueño.....	26
I.3. Síndrome de apnea/hipopnea durante el sueño (SAHS)	27
I.3.1. Epidemiología del SAHS.....	28
I.3.2. Etiopatogenia del SAHS.....	29
I.3.3. Prognóstico del SAHS	32
I.3.4. Sintomatología del SAHS	32
I.3.5. Diagnóstico del SAHS.....	33
I.3.6. Tratamiento del SAHS.....	34
I.4. Patologías asociadas al síndrome de apnea/hipopnea durante el sueño.....	38
I.4.1. Activación simpática	41
I.4.2. Estrés oxidativo inducido por radicales libres	43
I.4.3. Proceso inflamatorio.....	44
I.4.3.1. Reactantes de fase aguda.....	44
I.4.3.2. Citocinas.....	45
I.4.3.3. Moléculas de adhesión	49
I.4.3.4. Factores de transcripción.....	52
I.4.4. Disfunción endotelial	55
I.4.5. Angiogénesis y aterogénesis	59

1.5. Modelos animales de experimentación.....	60
2. OBJETIVOS	65
2.1. Estudio 1.....	66
2.2. Estudio 2.....	67
2.3. Estudio 3.....	68
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
3.1. Animales de experimentación	71
3.2. Descripción del segmento colapsable de la VAS.....	71
3.2.1. Caracterización del segmento colapsable de la VAS.....	73
3.3. Modelo experimental.....	74
3.3.1. Modelo agudo.....	74
3.3.1.1. Diseño experimental.....	74
3.3.2. Modelo crónico.....	74
3.3.2.1. Diseño experimental.....	74
3.4. Grupos experimentales.....	75
3.4.1. Estudio 1	75
3.4.2. Estudio 2.....	76
3.4.3. Estudio 3.....	77
3.5. Recogida y procesamiento de las muestras	77
3.6. Determinaciones bioquímicas	78
3.6.1. Mediadores inflamatorios	78
3.6.1.1. Citocinas.....	78
3.6.1.1.1. Factor de necrosis tumoral, Interleucina-1, Interleucina-6.....	78
3.6.1.2. Factor nuclear kappa B	78

3.6.2. Proteínas.....	78
3.6.3. Corticosterona.....	78
3.6.4. Mediadores disfunción endotelial.....	79
3.6.4.1. Tromboxano B ₂	79
3.6.4.2. 6-keto-Prostaglandina F _{1α}	79
3.7. Microscopía intravital: Estudio de las interacciones leucocito-endotelio.....	79
3.8. Estudio histológico.....	80
3.8.1. Técnica de inmunohistoquímica.....	80
3.9. Estudio estadístico.....	81
4. RESULTADOS Y ARTÍCULOS.....	83
4.1. Estudio 1.....	83
4.2. Estudio 2.....	89
4.3. Estudio 3.....	105
5. DISCUSIÓN.....	111
6. CONCLUSIONES.....	117
7. BIBLIOGRAFÍA.....	119
8. ANEXO.....	141

I.1. GENERALIDADES

El sueño es una conducta natural, periódica, transitoria y reversible¹, universal en el reino animal e imprescindible para la vida, ya que su privación absoluta, al menos en los mamíferos, produce la muerte^{2,3}. A pesar de que el ser humano pasa aproximadamente un tercio de su existencia durmiendo, la naturaleza, la función y los acontecimientos que suceden durante el sueño son poco conocidos.

Aunque externamente la conducta del individuo dormido es muy similar durante todo el período de sueño, el cerebro sufre una serie de cambios, que pueden reconocerse mediante técnicas electrofisiológicas. El registro de la actividad de algunas variables fisiológicas durante el sueño se conoce como polisomnografía (PSG) (Figura 1). Entre estas variables se encuentran:

- Variables neurológicas: el electroencefalograma (EEG), el electrooculograma (EOG) y el electromiograma (EMG) del mentón, con los que se evalúa los diferentes estadios del sueño.
- Variables cardíacas: el electrocardiograma (ECG) para la monitorización del ritmo cardíaco.
- Variables respiratorias: los sensores de flujo aéreo, el esfuerzo respiratorio toracoabdominal, la oximetría de pulso y los ronquidos, para la evaluación respiratoria.

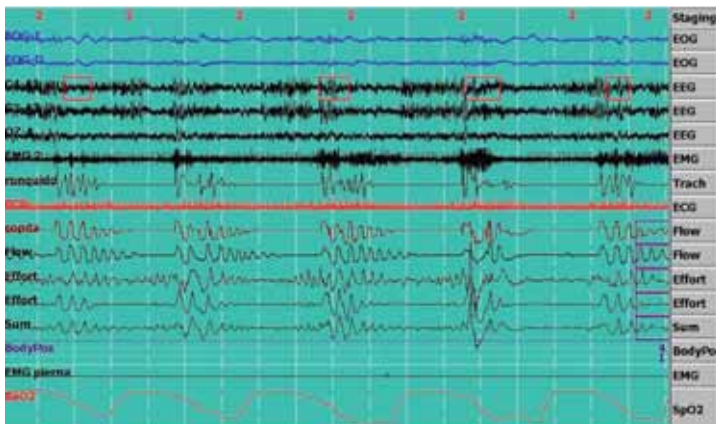


Figura 1. Registro de un estudio Polisomnográfico.

Se sabe que en el sueño se repiten, de un modo cíclico, una serie de estadios caracterizados por patrones neurofisiológicos definidos, conocidos como fases o estadios de sueño⁴ (Figura 2). El sueño suele dividirse en dos fases: fase REM o de movimientos oculares rápidos, que representa entre un 20 % y un 25 % de la noche y fase no REM (NREM) en el que se incluyen los estadios I, II, III y IV. En un individuo sano, el sueño se inicia con varios minutos en estadio I, al que siguen los estadios II, III y IV. A continuación, aparecen de nuevo los estadios II y III y, finalmente, surge la fase REM. Un adulto joven presenta un ciclo completo NREM-REM cada 60-90 min (Figura 2).

La fase REM es aquella en la que habitualmente se sueña. Puede definirse como una etapa de gran actividad cerebral y paresia corporal, dado que se produce la pérdida de tono de todos los músculos del organismo, excepto del diafragma y de los músculos oculares. Para que el sueño sea reparador, las fases previamente descritas deben repetirse de forma cíclica durante toda la noche. En una noche normal se registran unos 5 ciclos de sueño, con mayor presencia de sueño profundo NREM al principio de la noche y REM al final de la misma (Figura 2). Este proceso está presente en casi todos los mamíferos y, aunque no conocemos bien las razones de porqué los ciclos de sueño deben secuenciarse de este modo, sabemos que si no se producen en la cantidad y calidad adecuada se afecta la calidad de sueño y, como consecuencia, su función en la homeostasis y en el estado de salud del sujeto.

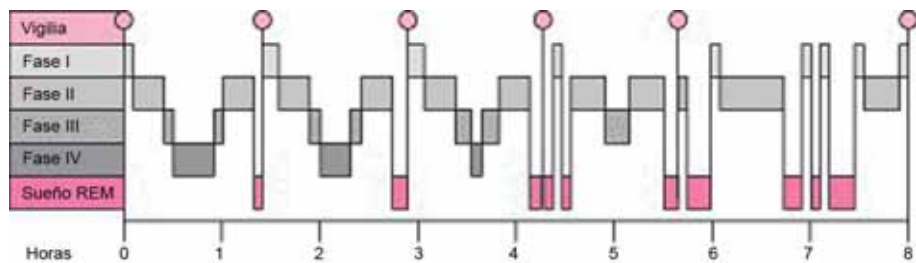


Figura 2. Fases del ciclo del sueño. El sueño empieza tras unos minutos despierto, que se sigue de un rápido paso a fases superficiales y profundas del sueño. Las fases superficiales I y II abundan más durante las primeras horas de sueño seguidas de fases III y IV. Después de 60 min suele aparecer la fase REM que se repite cada 90 min, con una duración cada vez más amplia.

Las enfermedades respiratorias que se presentan durante el sueño pueden alterar las diferentes fases de éste, fragmentarlo y, como consecuencia, el sueño deja de ser reparador, dando somnolencia diurna como síntoma predominante.

1.1.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA VÍA AÉREA SUPERIOR

La vía aérea superior (VAS) es una región anatómica implicada en el desarrollo de las enfermedades respiratorias que se presentan durante el sueño. Las funciones fisiológicas fundamentales en las que interviene la VAS son: la ventilación, la deglución y la fonación. Para la realización de estas funciones está formada tanto por estructuras rígidas como por otras flexibles, reguladas por un complejo sistema sensorial y neuromuscular que hace posible que durante la ventilación la VAS permanezca abierta, mientras que para la deglución y la fonación se estrecha y se cierra.

La VAS está constituida por las fosas nasales, la faringe y la laringe (Figura 3). La faringe es un tubo dinámico, formado por tejidos blandos. Su luz viene determinada en primer lugar por el delicado equilibrio entre las presiones inspiratoria, espiratoria y la presión atmosférica y en segundo lugar por la tonicidad de la musculatura de la VAS. La faringe se divide en tres regiones: a) nasofaringe, que va desde los cornetes nasales hasta el paladar duro; b) orofaringe, que puede a su vez subdividirse en una región retropalatina, que va desde el paladar duro hasta la región más caudal del paladar blando y se llama también velofaringe, y otra retrolingual, que va desde la porción caudal del paladar blando hasta la base de la epiglotis; y c) hipofaringe, que se extiende desde la base de la lengua hasta la laringe (Figura 3).

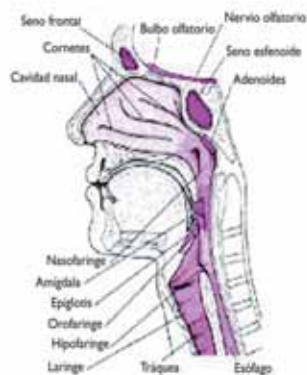


Figura 3. Esquema de la VAS

En la orofaringe, las paredes anterior, posterior y lateral están formadas por las siguientes estructuras: en la pared anterior se encuentra el paladar blando, la lengua y las amígdalas linguales; en la pared posterior están los músculos constrictores superiores, medios e inferiores, que se extienden también hacia la porción lateral; y, por último, en la porción lateral se localiza, además, el tejido que está entre el borde lateral de la VAS y el borde medial de la almohadilla grasa parafaríngea en la región retropalatina. En la región retrolingual, las paredes laterales están constituidas por el tejido situado entre el borde lateral de la VAS y la mandíbula. En las paredes laterales, junto con las amígdalas palatinas, se sitúa una serie de músculos: el hipogloso, el estiloso, el estilohioideo, el estilofaríngeo, el palatogloso, el palatofaríngeo y el constrictor faríngeo. La misión de estos músculos, todos constrictores, es la de facilitar el cierre de la glotis, permitir la tos y contribuir al estrechamiento espiratorio de la VAS. Por último, quedan por describir los músculos dilatadores, que son el tensor del paladar, el genihoideo, el esternohioideo y el geniogloso. Estos músculos desempeñan una misión fundamental, ya que pueden modificar el tamaño y la configuración de la faringe, por lo que son los responsables de mantener la permeabilidad de la luz y el flujo aéreo. Para que se produzcan los movimientos respiratorios, se requiere una activación muscular previa. Podríamos decir que existen dos grandes grupos musculares; los músculos de la VAS: elevadores y constrictores de la faringe, la musculatura de la lengua y velo del paladar y el músculo del diafragma que genera presión.

1.2. TRANSTORNOS RESPIRATORIOS DURANTE EL SUEÑO

La relevancia de los trastornos respiratorios durante el sueño sólo se ha reconocido durante las tres últimas décadas, coincidiendo con el redescubrimiento del *síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño* (SAHS), el cual, junto al insomnio, es el trastorno nocturno más común. Los trastornos respiratorios durante el sueño se dividen en dos grandes grupos:

1) Trastornos en que el problema acontece en la VAS, a nivel del área faríngea^{5,6}. Según el grado de colapso de la VAS (Figura 4) se clasifican en:

- Ronquido
- Incremento de la resistencia de la VAS
- Apnea/hipopnea durante el sueño



Figura 4. Imagen de un sujeto sano, un sujeto con incremento de la resistencia en la VAS y un sujeto con obstrucción en la VAS.

2) Trastornos en los que el problema estriba en los centros respiratorios o enfermedades de la caja torácica:

- Apnea central del sueño

1.2.1. RONQUIDO

El ronquido es un fenómeno acústico complejo, que tiene lugar durante el sueño como consecuencia de la vibración de las estructuras orofaríngeas⁷. Expresa la existencia de una resistencia al flujo aéreo en la VAS. Su prevalencia es elevada en la población general, estimándose en un 40 % en los varones y en un 20 % en las mujeres, y aumenta con la edad⁸. Se asocia con obesidad, tabaquismo, alcoholismo y obstrucción nasal. La importancia del ronquido tiene una doble vertiente. Por una parte, es un fenómeno social, por las implicaciones que tiene sobre la pareja, ya que llega a producir situaciones difícilmente compatibles con una

convivencia normal. Por otra parte, es de interés médico, por su asociación con diversas enfermedades, tales como la hipertensión arterial, la cardiopatía isquémica, los accidentes cerebrovasculares, la hipersomnia diurna y la alteración de la calidad de vida⁹⁻¹³. Además puede decirse que es un “detector” del síndrome de apnea durante el sueño. El tratamiento inicial del ronquido se basa, sobre todo, en la eliminación de los factores de riesgo asociados. En los últimos años se han desarrollado diversos procedimientos, sobre todo quirúrgicos, como la uvulopalatofaringoplastia, la uvulopalatoplastia asistida por láser, la somnoplastia o ablación del paladar blando por radiofrecuencia, la cirugía del paladar y los tratamientos protésicos cuya eficacia sólo acontece cuando se seleccionan adecuadamente los pacientes.

I.2.2. SÍNDROME DEL INCREMENTO DE LA RESISTENCIA DE LA VÍA AÉREA SUPERIOR

En 1993 la expresión *síndrome del incremento de la resistencia de la VAS* (SRVAS) fue usada por Guilleminault y col. para describir a un subgrupo de pacientes que hasta entonces eran diagnosticados, en su mayor parte, de hipersomnia idiopática¹⁴. Este término se aplicaba para describir somnolencia diurna excesiva sin una causa aparentemente definida en el estudio de PSG.

Estos pacientes con un SRVAS presentan incrementos repetitivos de la resistencia en la VAS definidos por incrementos en la presión esofágica negativa inspiratoria, que ocurre concomitantemente con la disminución del flujo oronasal, en ausencia de desaturación de oxígeno y presencia de apneas o hiponeas. Estos períodos de breve aumento de la resistencia finalizan con un microdespertar transitorio (definido como un aumento de actividad EMG y desviación a fase I en el EEG) seguido de una disminución de la resistencia en la VAS. La mayoría de los datos publicados hasta el momento actual señalan que los microdespertares transitorios son la causa de los síntomas en el SRVAS, especialmente por la ausencia de desaturación de oxígeno^{15,16}.

El diagnóstico clínico del SRVAS¹⁷ es confuso por la falta de estandarización en la nomenclatura, así como por los criterios y las técnicas empleadas para su medición. Los datos de Guilleminault y col. indican que los pacientes con SRVAS suelen ser jóvenes y delgados¹⁴. La clave diagnóstica en el SRVAS es el incremento en la resistencia de la VAS y se caracteriza clínicamente por la roncopatía y la hipersomnia diurna y por la PSG caracterizada por la ausencia de desaturación patológica de oxígeno, reducción significativa de la fase NREM y sobre todo por periodos cortos de limitación al flujo aéreo que requiere tecnología no habitual para su diagnóstico. En muchos casos la medición del flujo mediante una sonda nasal permite su diagnóstico.

I.2.3. SÍNDROME DE APNEA/HIPOPNEA DURANTE EL SUEÑO

La apnea/hipopnea durante el sueño se caracteriza por la interrupción o disminución del flujo aéreo oronasal durante el sueño debido a la obstrucción completa (apnea) o parcial

(hipopnea) de la VAS, a pesar de los esfuerzos respiratorios repetidos. Cuando los episodios de apneas e hipopneas repetidos durante el sueño, que provocan constantes desaturaciones de la oxihemoglobina y microdespertares transitorios que conllevan a un sueño no reparador, se acompañan de un cuadro de somnolencia, trastornos neuropsiquiátricos, cardiorrespiratorios, inflamatorios y metabólicos secundarios a una alteración de la VAS, dan lugar al SAHS¹⁸. Habitualmente se trata de pacientes obesos con cuello ancho y corto, roncadoreos, con antecedentes de hipertensión arterial y que aquejan de somnolencia diurna, en los casos graves ésta les dificulta su actividad social y laboral. Con menor incidencia, el SAHS puede presentarse también en sujetos no obesos, especialmente cuando existen anomalías en el área faríngea o craneofaciales como la retrognatia. Además, el SAHS también afecta a la población infantil, sobre todo cuando tienen amígdalas hipertróficas. En la Tabla I se muestran los factores predisponentes para el desarrollo del SAHS.

Tabla I. Factores predisponentes para desarrollar SAHS.

-
1. Malformaciones maxilofaciales:
 - Micrognatia
 - Retrognatia
 - Síndrome de Prader Willi
 2. Trastornos médicos generales:
 - Obesidad
 - Hipotiroidismo
 - Cifoescoliosis
 - Acromegalia
 3. Obstrucción de las vías aéreas superiores:
 - Cavidad nasal:
 - Dismorfias y luxaciones septales
 - Hipertrofia de cornetes. Rinitis.
 - Pólipos. Tumores.
 - Nasofaringe: Adenoides.
 - Orofaringe:
 - Amígdalas y/o úvulas hipertróficas.
 - Hipofaringe: base de la lengua hipertrófica.
 - Laringe: edema de las cuerdas vocales.
-

1.2.4. SÍNDROME DE APNEA CENTRAL DURANTE EL SUEÑO

La prevalencia real del síndrome de apnea central durante el sueño (SACS) aunque no se conoce con exactitud es muy baja. Se sabe que aproximadamente el 10 % de los pacientes con SAHS presentan también apneas centrales.

La apnea central se produce por la falta de actividad de los músculos respiratorios. Se han descrito varios mecanismos relacionados con el control ventilatorio, como probables causas de esta falta de contracción de la musculatura respiratoria¹⁹. El SACS da origen a un amplio

espectro de manifestaciones clínicas, ya que pueden ser desde completamente asintomáticas hasta muy sintomáticas y producir importantes manifestaciones clínicas. Cada episodio apneico finaliza con un despertar transitorio, que altera la estructura del sueño. Por ello, el insomnio puede ser el síntoma más frecuente, junto con la sensación de muerte inminente por el “olvido” de respirar. Los pacientes no suelen ser obesos. Las repercusiones del SACS sobre el organismo son menos graves que las que producen el SAHS. Las apneas centrales son de menor duración que las obstructivas, acontecen a volúmenes pulmonares mayores y mientras duran no existe consumo de oxígeno por parte de los músculos respiratorios, por lo que la desaturación arterial de la oxihemoglobina es menor.

Por definición, en las apneas centrales no existen movimientos toraco-abdominales. Una forma especial de apneas centrales durante el sueño es la respiración de Cheyne-Stokes. Se producen apneas centrales seguidas de un periodo de in crescendo-decrescendo de la ventilación. Se producen en pacientes con cardiopatías graves y van asociadas a un mal pronóstico de la cardiopatía. Su etiología hay que buscarla en el retraso de la sangre en llegar a los centros respiratorios. A pesar de que muchas de las alteraciones que ocurren en el SACS son de menor magnitud que las que ocurren en el SAHS, en las primeras se han observado trastornos del ritmo cardíaco, principalmente bradicardias y pausas sinusales. Estas arritmias se deben a la hipoxemia y al estímulo vagal producido por la propia apnea o hipopnea. El diagnóstico del SACS se establece mediante la PSG.

I.3. SÍNDROME DE APNEA/HIPOPNEA DURANTE EL SUEÑO

El SAHS es una patología crónica caracterizada por episodios repetidos de apnea/hipopnea durante el sueño²⁰. Cada apnea se caracteriza por la suspensión del flujo de aire durante un tiempo mínimo de 10 s y termina con una brusca reanudación de la ventilación. Las apneas se clasifican como obstructivas si hay evidencia de un esfuerzo continuado de la respiración, como un movimiento paradójico de la pared del tórax y el abdomen. Cada ciclo de apnea y reanudación de la ventilación esta acompañado por la desaturación y restauración arterial de la oxihemoglobina. Mientras que la hipopnea se define como una reducción discernible del flujo de aire durante 10 s o más, asociado con despertares transitorios y/o un 3 % de decrecimiento en la saturación de oxígeno (SaO_2). Estos ciclos de apnea/hipopnea exponen a los pacientes a una hipoxia intermitente durante la noche. Se piensa que el desarrollo de la hipoxia intermitente y las respuestas fisiológicas son los responsables de las manifestaciones clínicas subsiguientes de daño vascular²¹.

El SAHS se presenta clínicamente con complicaciones de exceso de sueño diurno, fatiga, irritabilidad, déficit en la atención y en la memoria, y con síntomas nocturnos los cuales pueden incluir una historia de ronquidos, apnea, obstrucciones y despertares frecuentes²². Hay un criterio estandarizado para medir la gravedad de las apneas e hipopneas, es el índice de apnea/hipopnea (IAH)²³. El IAH se denomina como el número total de episodios de apneas e hipopneas por hora de sueño. El SAHS se define clásicamente como un IAH de 5 o más por hora con síntomas asociados²² y su gravedad se clasifica según se muestra en la tabla 2²³:

Tabla 2. Índice Apnea/Hipopnea.

Severidad del SAHS	IAH	Desaturación O ₂
Leve	5-15	85 - 90 %
Moderado	15-30	75 - 84 %
Severo	> 30	< 75 %

1.3.1. EPIDEMIOLOGIA DEL SÍNDROME DE APNEA/HIPOPNEA DURANTE EL SUEÑO

El SAHS es una enfermedad muy prevalente que afecta entre el 4 % y el 6 % de hombres y entre el 2 % y el 4 % de las mujeres en la población general adulta de edades medias, y entre el 1 % y el 3 % de la población infantil²⁴⁻²⁸. Esta prevalencia del SAHS aumenta con la edad. Por otra parte, se ha mostrado que el SAHS está asociado con el deterioro de la calidad de vida, la presencia de hipertensión arterial, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares y está relacionado con la aparición de accidentes de tráfico y siniestralidad laboral. Así mismo, se acepta una mayor incidencia de mortalidad asociado al SAHS que en la población normal. Por ello, sabiendo que disponemos de tratamientos eficaces, se considera que esta enfermedad es un problema de salud pública de primera magnitud. Además, se ha demostrado que no diagnosticar y, por lo tanto, no tratar a los pacientes con SAHS supone un consumo de recursos sanitarios entre 2 y 3 veces mayor que los consumidos una vez que el SAHS es tratado eficazmente. A pesar de todos estos datos sobre la relevancia del SAHS, los estudios realizados en los diferentes sectores de edad, evidencian que en España existen entre 1 200 000 y 2 150 000 sujetos con SAHS relevante y, por tanto, sujetos a ser tratados. No obstante, actualmente tan sólo se han diagnosticado y tratado entre el 5 % y el 9 % de la población afectada.

En cuanto a los factores de riesgo asociados al SAHS son:

- 1) Género masculino. Se ha demostrado que el SAHS es entre 2 y 3 veces más frecuente en hombres que en mujeres, aunque después de la menopausia la prevalencia tiende a igualarse a la de los varones²⁷. Además, las mujeres que acuden a las consultas especializadas suelen ser más obesas, con más comorbilidad y en situaciones más graves. Por ello, aunque las mujeres parecen estar más protegidas que los hombres frente a las consecuencias cardiovasculares del SAHS, esta ventaja se ve enmascarada por el hecho de que se presentan en una situación más grave.
- 2) Obesidad. Un porcentaje relevante de pacientes con SAHS son obesos y la reducción de peso en estos pacientes se traduce en una mejoría del SAHS que puede llegar a remitirla.
- 3) Alcohol. Su consumo agrava un SAHS existente por depresión de la actividad de la musculatura dilatadora faríngea, favoreciendo un desequilibrio entre las fuerzas dilatadoras y las constrictoras de la VAS. Además, el alcohol condiciona que las apneas sean de mayor duración y las desaturaciones más severas.

4) Tabaco. Se ha observado que los fumadores tienen mayor riesgo de desarrollar un SAHS. Posiblemente por la relación con fenómenos de irritación e inflamación de la VAS, lo que tiende a incrementar su resistencia.

5) Fármacos. Las benzodiazepinas disminuyen la respuesta ventilatoria a la hipoxia y a la hipercapnia durante el sueño y también durante la vigilia lo que podría favorecer la aparición de un SAHS.

6) Posición corporal. Algunos pacientes sólo presentan un SAHS al adoptar la posición de decúbito supino y todos los SAHS se agravan en esa posición por lo que es mejor evitarla. Se define un SAHS posicional cuando el IAH en decúbito supino dobla al obtenido con el resto de posiciones.

En la literatura médica existe una gran controversia en cuanto a la asociación causal de esta enfermedad con procesos tan frecuentes y tan relacionados con la comorbilidad en las sociedades occidentales, sin embargo, la relación de causalidad es hoy en día el objetivo fundamental de los trabajos de investigación que se centran en este tema.

I.3.2. ETIOPATOGENIA DEL SÍNDROME DE APNEA/HIPOPNEA DURANTE EL SUEÑO

Factores responsables del inicio de las apneas:

Para entender la etiopatogenia del SAHS es necesario recordar que el control de la ventilación se realiza por dos vías, la voluntaria y la automática. La vía automática es la única que actúa durante el sueño y regula la ventilación según las necesidades del organismo a través de una serie de receptores (quimiorreceptores y mecanorreceptores). Para ello, desde los centros respiratorios se emiten una serie de estímulos dirigidos a dos grupos musculares: a) los ventilatorios, responsables de la mayor o menor ventilación pulmonar; y b) los que mantienen abierta la luz de la VAS, con el objeto de mantenerla permeable durante la contracción de los músculos ventilatorios. Ambos grupos musculares deben estar adecuadamente coordinados para que la ventilación pulmonar sea eficaz. Durante la inspiración, la contracción de los músculos ventilatorios provoca una presión pleural subatmosférica (negativa) que se transmite a la faringe y permite la entrada de aire en los pulmones. En la región faríngea, la presión negativa intraluminal tiende a colapsar su luz. Sin embargo, la acción de los músculos de la VAS que siempre es previa a la acción de los músculos ventilatorios, evita el colapso (Figura 5). La génesis de las apneas obstructivas durante el sueño se debe a la conjunción de dos factores. Por una parte, factores anatómicos tales como la obesidad con cuello corto, anomalías craneofaciales o hipertrofia amigdalar provocan una reducción de la luz de la VAS y la hacen mucho más colapsable, hasta llegar a ocasionar el cierre completo²⁹⁻³¹. Por otra parte, un factor funcional, debido a la alteración de los mecanismos responsables de mantener la VAS abierta. Un defecto en los mismos, producirá apneas obstructivas, puesto que la presión subatmosférica resultante de la contracción de los músculos ventilatorios, colapsa la faringe al no actuar adecuadamente los mecanismos que la mantienen abierta durante el sueño³² (Figura 5). Como consecuencia de la obstrucción faríngea, se generan esfuerzos inspiratorios

progresivamente más acusados, que no hacen más que mantener el cierre de la VAS, hasta que se produce un microdespertar transitorio, se activan de nuevo los músculos de la VAS y se produce el final de la apnea (Figura 6). En ocasiones, los factores anatómicos son totalmente responsables de la presencia de apneas obstructivas y constituyen una indicación de tratamiento quirúrgico. La distinción entre las apneas y las hipopneas, aunque tiene interés epidemiológico, carece de trascendencia clínica y ambos eventos tienen los efectos deletéreos similares para el organismo y por ello se suman y se presentan juntas como el IAH ya mencionado. Sin embargo, desde el punto de vista etiopatológico existen diferencias marcadas entre las apneas e hipopneas. Las apneas o cierre total de la VAS se debe fundamentalmente a un colapso inducido por el tejido que rodea a la faringe junto a un déficit marcado de la musculatura de la VAS. Es una obstrucción estática. Las hipopneas en cambio, acontecen en sujetos en los que la musculatura de la VAS es parcialmente deficiente y se cierra sólo en parte, como consecuencia del propio esfuerzo inspiratorio que tiene tendencia a reducir la luz faríngea, pero no a colapsarla totalmente. Por tanto, cuando el balance entre las fuerzas y sincronización que mantienen abierta la VAS y las que tienden a colapsarla se decanta hacia estas últimas, se producen las apneas obstructivas.

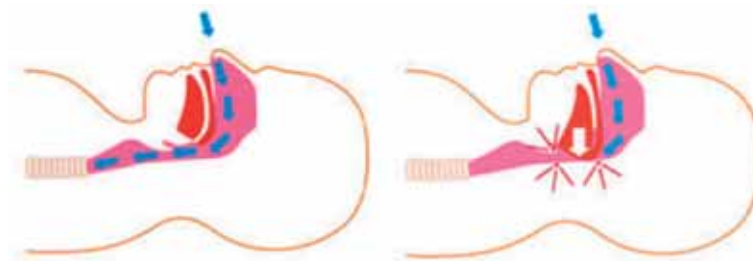


Figura 5. Imagen de una respiración normal continua donde los músculos de la VAS están relajados, y una respiración patológica debido a que los músculos de alrededor de la lengua y úvula se relajan excesivamente bloqueando la VAS.

Factores responsables del final de las apneas

Como consecuencia de la obstrucción faríngea, se generan cada vez esfuerzos inspiratorios más acusados, que no hacen más que mantener el cierre de la VAS, hasta que el propio esfuerzo respiratorio y/o la hiperemia que se produce como consecuencia de la apnea provoca un microdespertar transitorio que es el responsable del final de la apnea. Este microdespertar transitorio tiene un efecto dispar; por una parte es beneficioso, ya que induce el final de la apnea, y por otra parte, deletéreo porque fragmenta el sueño, con lo cual deja de ser reparador y en consecuencia produce un conjunto de síntomas diurnos, especialmente la somnolencia y el cansancio.

Consecuencias fisiopatológicas

La secuencia de fenómenos que ocurren durante la noche en los pacientes con SAHS origina una serie de cambios fisiopatológicos responsables de las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad. En la figura 6 se muestra cómo de un modo constante se repite siempre el

mismo ciclo: sueño, apnea, cambios gasométricos, microdespertar transitorio y fin de la apnea. Durante la apnea y como consecuencia de la obstrucción de la VAS, se generan presiones pleurales cada vez más negativas, con el fin de vencer la obstrucción existente, lo que provoca el aumento de la poscarga de ambos ventrículos. Los cambios gasométricos repetidos producen vasoconstricción pulmonar y sistémica, causa de hipertensión arterial sistémica y pulmonar que pueden incidir en que estos pacientes sufran de otras enfermedades cardiovasculares, tales como la cardiopatía coronaria o accidentes vasculares cerebrales.

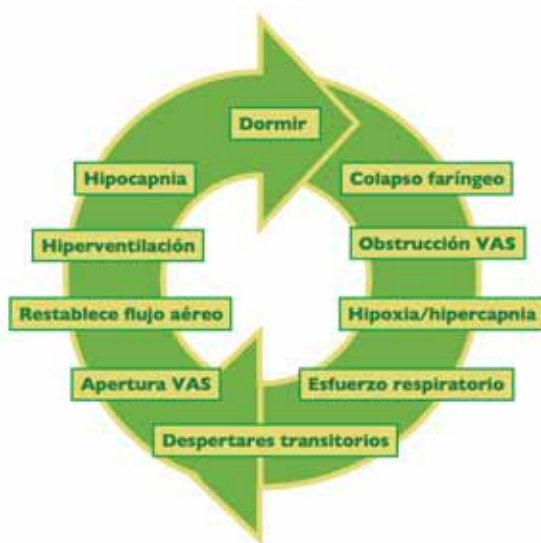


Figura 6. Secuencia de acontecimientos que se dan lugar en los episodios de apnea/hipopnea.

Las arritmias son frecuentes, especialmente episodios de arritmia completa por fibrilación auricular. En los sujetos obesos los cambios gasométricos nocturnos contribuyen de un modo decisivo a la hipoventilación diurna crónica. Las evidencias actuales demuestran que los fenómenos hipoxia/normoxia, secundarios a los fenómenos de apnea/hipopnea, y su finalización, son responsables de la aparición de estrés oxidativo, la producción de radicales libres, la liberación de mediadores inflamatorios y de fenómenos de apoptosis. Todos estos mecanismos se traducen en un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares, cerebrovasculares y un exceso en la mortalidad que hacen que el SAHS sea considerado como una enfermedad sistémica. Por otra parte, los microdespertares transitorios repetidos son los responsables de la fragmentación del sueño, que determina la mayoría de las manifestaciones neuropsiquiátricas, como la somnolencia diurna y los trastornos cognitivos.

Asimismo, el descenso en los volúmenes pulmonares que se produce durante el sueño, sobre todo en las personas obesas, cualquier alteración anatómica como malformaciones óseas (micrognatia, retrognatia), o de las partes blandas (macrogllosia, úvula larga y flácida, paladar blando alargado), o la hipertrofia amigdalina³³⁻³⁵ puede reducir el calibre de la luz

faríngea, predisponiéndola al colapso y a la aparición de apneas^{5,36,37}. Además, se ha sugerido que los factores genéticos que regulan los diversos factores de riesgo (obesidad, anomalías maxilofaciales) podrían ser los responsables en el desarrollo de la patología del SAHS, así como, el control de otros genes que inducen mediadores involucrados en las consecuencias clínicas (somnolencia, hipertensión arterial)³⁸ (Figura 7).

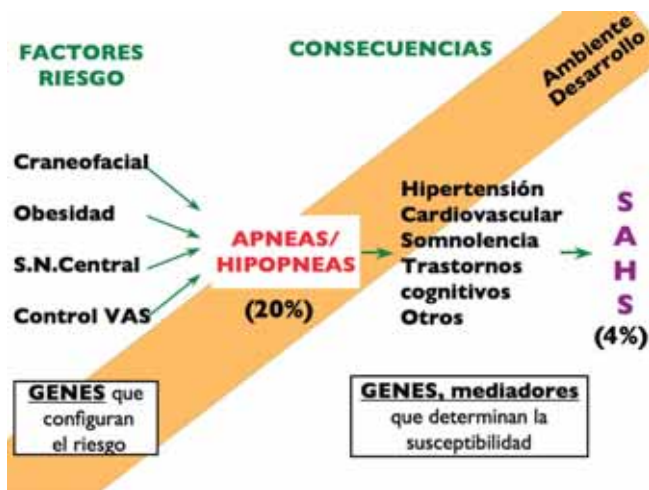


Figura 7. Esquema de los factores implicados en el desarrollo del SAHS.

1.3.3. PROGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE APNEA/HIPOPNEA DURANTE EL SUEÑO

En estudios realizados en pacientes con SAHS, la tasa de mortalidad es mayor que en la población general, principalmente debido a eventos de origen cardiovascular³⁹. Se observó que un 55 % de estas muertes ocurrieron durante el periodo del sueño⁴⁰. En estudios observacionales se ha establecido una asociación causal entre SAHS e hipertensión arterial, y una mayor asociación en proporción a la gravedad del SAHS⁴¹. Además, el SAHS también se asocia a un aumento del riesgo, entre 3 y 7 veces, de padecer accidentes de tráfico y laborales^{42,43}.

1.3.4. SINTOMATOLOGÍA DEL SÍNDROME DE APNEA/HIPOPNEA DURANTE EL SUEÑO

Los síntomas más frecuentes de las apneas obstructivas son tres: la somnolencia diurna, los ronquidos nocturnos y las apneas observadas por el compañero/a de cama. Habitualmente, en algunos casos se asocian trastornos cognitivos. Con frecuencia, estos pacientes han sufrido accidentes de tráfico, tienen antecedentes de hipertensión arterial y cardiopatía coronaria así como despertares con sensación de obstrucción de la VAS (asfisia) que suelen ser más

percibidos por el compañero/a de cama. La sintomatología nocturna y diurna se resume en la tabla 3. Debe tenerse en cuenta que la excesiva somnolencia diurna es difícil de medir, tanto objetiva como subjetivamente, y constituye un síntoma muy prevalente que afecta en torno al 20 % de la población general, por lo que su evaluación debe ser realizada con cuidado. El test más utilizado para valorar la somnolencia es el test de EPWORTH^{44,45}.

Tabla 3. Sintomatología asociada al SAHS.

-
- Síntomas Diurnos:
 - Somnolencia diurna
 - Incoordinación motora y fatigabilidad matutina
 - Cefalea matutina
 - Irritabilidad
 - Sequedad orofaríngea
 - Pérdida de memoria
 - Síntomas Nocturnos:
 - Apneas o pausas respiratorias
 - Ronquidos y jadeos
 - Somniloquia
 - Interrupción del sueño, sueño agitado
-

La exploración física puede mostrar obesidad, cuello corto y, en algunos casos, retrognatia (posición del maxilar inferior por detrás de la línea de la frente). La exploración otorrinolaringológica puede revelar una faringe edematosa y pequeña y, en ocasiones, amígdalas hipertróficas y también obstrucción nasal. A veces la úvula es grande y presenta petequias secundarias al traumatismo físico del ronquido que se producen durante la noche.

I.3.5. DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE APNEA/HIPOPNEA DURANTE EL SUEÑO

El SAHS puede ocurrir a cualquier edad (incluso en niños a causa de amígdalas hipertróficas) o en pacientes no obesos. En ocasiones el IAH puede ser muy elevado y los síntomas mínimos. El diagnóstico definitivo se establece por la noche mediante la PSG, la cual implica grabaciones continuas del sueño y de la respiración. Las fases del sueño son determinadas mediante el EEG, el EOG y el EMG. La respiración se controla midiendo el esfuerzo respiratorio (clásicamente por monitorización del movimiento del tórax y del abdomen por pletismografía de inductancia), el flujo de aire nasal y la SaO₂. La monitorización adicional incluye ronquidos, posición corporal y ECG. Como ya se ha mencionado previamente la severidad del SAHS se define por el IAH y por los síntomas asociados a la somnolencia diurna.

Actualmente, existen para el diagnóstico sistemas de poligrafía simplificados que únicamente analizan variables respiratorias (poligrafías respiratorias) que pueden utilizarse tanto en el domicilio como en el laboratorio del sueño, siendo muy útiles para el diagnóstico en muchos casos, especialmente para descartar SAHS en los casos de baja probabilidad y para

confirmarlo en los de alta probabilidad. La PSG convencional tiende a reservarse para los casos complejos o cuando la sintomatología no concuerda con los resultados de la poligrafía respiratoria. La oximetría es una técnica con la que se analiza la SaO_2 de modo continuo y que permite priorizar a los pacientes. Se considera que un sujeto padece un SAHS cuando junto a un IAH elevado se asocia una sintomatología clínica compatible y/o complicaciones asociadas a la enfermedad.

Las entidades con las que se plantea el diagnóstico diferencial aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4. Diagnóstico diferencial del SAHS.

-
1. Disnea nocturna
 - Insuficiencia cardíaca
 - Asma bronquial
 - Reflujo gastroesofágico
 2. Hipersomnias y/o fatigabilidad excesiva diurna
 - Síndrome de hipoventilación alveolar
 - Síndrome de apnea central del sueño
 - Problemas neurológicos
 - Narcolepsia
 - Mioclonías nocturnas
 - Mala higiene del sueño
 3. Actividad motora nocturna excesiva
-

1.3.6. TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE APNEA/HIPOPNEA DURANTE EL SUEÑO

El síntoma predominante del SAHS es la excesiva somnolencia durante el día y es también el motivo fundamental para iniciar tratamiento en la mayoría de casos, junto con la presencia de comorbilidad y/o enfermedad cardiovascular.

Las alternativas terapéuticas disponibles en la actualidad para tratar el SAHS¹⁸ están encaminadas a:

- 1) Eliminar la obstrucción respiratoria completa o parcial (apneas o hipopnea) y la caída en la SaO_2 en cualquier posición corporal o fase del sueño.
- 2) Lograr que el paciente duerma bien, mejorando su calidad del sueño y disminuyendo o eliminando los microdespertares transitorios, principales responsables de los síntomas neurológicos.

Los dos pilares básicos del tratamiento son las medidas higiénico-dietéticas del sueño y la presión positiva continua (CPAP) en la VAS. La cirugía maxilo-facial y la otorrinolaringológica son útiles en casos con anomalías específicas.

Las opciones terapéuticas de que se dispone en la actualidad son las siguientes:

- 1) Medidas higiénico-dietéticas^{41,46}: Permiten mejorar la sintomatología, dormir suficientes horas con un horario regular, abstinencia alcohólica (fundamentalmente vespertina) y tabáquica, pérdida de peso en sujetos obesos, tratamiento de la obstrucción nasal, evitar el decúbito supino durante el sueño, y la supresión de fármacos depresores del sistema nervioso central (benzodiazepinas, narcóticos o barbitúricos).
- 2) Dispositivos intraorales⁴⁷: Estos producen un desplazamiento de la mandíbula hacia adelante, con lo que aumenta el espacio retrofaríngeo y se evita la caída de la mandíbula y lengua hacia atrás. Están especialmente indicados en los sujetos sin obesidad mórbida y que no padezcan apneas, fundamentalmente en supino. Su principal indicación es el SAHS leve-moderado y pacientes con SAHS grave que no toleran o rechazan la CPAP. Su mayor inconveniente es que su aplicación requiere, además de una unidad de sueño, la colaboración de un odontólogo especializado. Su eficacia es superior al 50% en el SAHS, y entre el 70 % y el 80 % en la roncopatía crónica.
- 3) Tratamientos quirúrgicos: Consisten en la cirugía otorrinolaringológica, fundamentalmente la uvulopalatofaringoplastia o resección parcial del paladar. Ambas técnicas obtienen resultados positivos en torno al 50 % de los casos, por lo que su utilidad práctica es muy limitada. La cirugía de adelantamiento máximo-mandibular obtiene mejores resultados pero, dada su agresividad, no tiene mucha aceptación. La cirugía máximo-facial en presencia de alteraciones anatómicas en dichas áreas debe ser considerada. La traqueotomía es de utilización muy excepcional.
- 4) CPAP nasal: El desarrollo y evolución de esta técnica ha permitido que el empleo de CPAP por vía nasal durante el sueño sea, actualmente, el tratamiento de elección del SAHS^{48,49}, obteniendo rápidamente mejorías objetivas y subjetivas en la calidad del sueño, en las funciones cognitivas, en el nivel de atención y en las mediciones de la calidad de vida, al normalizar la arquitectura del sueño. La CPAP es mejor tolerada por los pacientes que los dispositivos intraorales.

El beneficio de la CPAP se produce especialmente en pacientes con síntomas importantes y un IAH >30 (Tabla 5). Cuanto más grave es el SAHS, más se benefician los pacientes de este tratamiento⁵⁰.

Tabla 5. Indicaciones de la CPAP.

IAH > 30 sin síntomas (individualizar)
IAH < 30 sintomático no debido a otras entidades: CPAP y valorar respuesta
IAH > 30 con síntomas: CPAP

La CPAP no es un tratamiento curativo, lo que obliga a que su aplicación tenga que ser continuada. La aceptación del tratamiento y su seguimiento es superior al 70 %, con un cumplimiento medio superior a las 5 h por noche cuando se realiza un seguimiento intensivo⁵¹. Se considera buen cumplimiento cuando un paciente utiliza la CPAP más de 4 h diarias.

El objetivo del tratamiento con CPAP, es mejorar los síntomas del paciente, pero también corregir todas las alteraciones fisiopatológicas. Cada paciente requiere una presión determinada que obliga a un nuevo estudio conocido como titulación de CPAP. Se aumenta la presión hasta que desaparecen todos los eventos respiratorios. Aunque existen diferentes equipos de CPAP, todos constan de un generador de presión, las tubuladuras, la mascarilla nasal con válvula espiratoria y los arneses para la sujeción de la máscara (Figura 8).



Figura 8. Tratamiento con la máscara de CPAP.

Algunos pacientes que no toleran la CPAP debido a un aumento en la resistencia en la VAS durante la espiración, se benefician de aparatos de segunda generación tales como la presión positiva continua a dos niveles (BiPAP) en la VAS, la cual permite ajustes independientes de las presiones inspiratorias y espiratorias. La presión positiva inspiratoria (IPAP) en la VAS se inicia en respuesta a un bajo nivel de flujo inspiratorio generado por el paciente (aprox. 40 ml/s). La presión cicla hasta el nivel de presión positiva espiratoria (EPAP) en la VAS cuando el flujo inspiratorio cae por debajo del nivel umbral. Estos aparatos BiPAP se ajustan para liberar EPAP hasta un nivel suficiente que prevenga el colapso de la VAS durante la espiración. Al iniciar el esfuerzo inspiratorio, un mínimo flujo inspiratorio es suficiente para suscitar la liberación de un nivel predeterminado de IPAP, para prevenir el colapso de la VAS asociado con la inspiración. Un aumento del IPAP puede aumentar la permeabilidad de la VAS, eliminando la hipopnea y la caída en la SaO_2 .

La modalidad de BiPAP puede utilizarse efectivamente en pacientes con SAHS, pero debido al alto coste de los equipos, sólo se reserva para pacientes que no toleran o han tenido complicaciones con la CPAP. Con este método, la presión media en la máscara es más baja que con CPAP, por lo que el escape de aire alrededor de la misma es menos pronunciado. Además esta menor presión tiende a minimizar el malestar torácico observado en algunos pacientes con CPAP por el aumento de la resistencia en la VAS durante la espiración.

Actualmente se han diseñado aparatos de CPAP que tienen la capacidad de auto-titulación (CPAP automáticas), es decir, que responden dinámicamente a los cambios en la resistencia de la VAS del paciente, incrementando o disminuyendo la presión en respuesta a cambios en

la presión, flujo o incluso en las oscilaciones del ronquido, respondiendo así a las variaciones fisiológicas dadas por la posición. Mediante la CPAP automática se pretende disminuir los niveles de presión requeridos durante el sueño y así mejorar la comodidad del paciente. A pesar de estas ventajas teóricas, el papel de la CPAP automática aún no está claramente definido para el SAHS.

5) Otras estrategias terapéuticas: cirugía de derivación gástrica de reducción de peso en pacientes con obesidad mórbida.

El inicio del tratamiento con cualquiera de las opciones terapéuticas mencionadas deberá siempre ir precedida de la aplicación de medidas higiénicas del sueño y pérdida de peso si procede.

El recientemente publicado Documento Nacional de Consenso sobre el SAHS que agrupa múltiples sociedades científicas, junto con otros documentos publicados por la Sociedad Española de Neumología permiten resumir el tratamiento con CPAP del modo siguiente:

1) En pacientes con un IAH ≥ 30 que presenten síntomas relacionados con el SAHS, comorbilidad grave o enfermedad cardiovascular, se deberán tratar con medidas higiénico-dietéticas y CPAP. En caso que presenten alteraciones anatómicas manifiestas se considerará la opción quirúrgica.

2) En pacientes con IAH entre 5 y 30, sin clínica acusada se aplicarán las medidas higiénico-dietéticas del sueño y control de la evolución.

3) En pacientes con síntomas secundarios al SAHS con IAH entre 5 y 30, una vez excluidas otras enfermedades responsables de los síntomas se aplicarán las medidas generales antes mencionadas y se considerará la prueba terapéutica con CPAP, comprobándose su eficacia tras tres meses de tratamiento. En este grupo podrán incluirse los pacientes con SRVAS, en los que la prescripción de tratamiento con CPAP dependerá de la sintomatología relevante.

4) En pacientes con un IAH ≥ 30 sin síntomas referidos por el paciente o sus familiares o sin enfermedad vascular asociada y/o comorbilidad, la eficacia de la terapia con CPAP no está plenamente demostrada en la actualidad, aunque las evidencias sugieren de manera creciente que este tipo de pacientes están sometidos a un elevado riesgo cardiovascular. Por ello, la decisión en estos casos deberá ser individualizada y de acuerdo con el paciente. No obstante, estos pacientes deberán seguir un control en una consulta especializada.

En la gran mayoría de los casos graves es prioritario iniciar el tratamiento con CPAP que impide el colapso de la VAS (Figura 8). La mayoría de los pacientes la tolera perfectamente, con una mejoría espectacular de su sintomatología clínica y un aceptable cumplimiento del mismo. Sin embargo, los datos disponibles evidencian que en España hay instaladas unas 288 CPAP/100 000 habitantes. Esta cifra implica que a pesar de los innegables avances de los últimos años, ni siquiera se ha llegado a tratar al 10 % de los pacientes con SAHS en sus formas más graves.

1.4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL SÍNDROME DE APNEA/HIPOPNEA DURANTE EL SUEÑO

Durante el SAHS los cambios patológicos que se producen, tanto en el sistema respiratorio como en el cardiocirculatorio, pueden tener importantes consecuencias sobre la evolución de los pacientes. Los cambios en la presión intratorácica, la hipoxia/normoxia y los microdespertares transitorios son los principales factores responsables de los incrementos de presión arterial que se producen hacia el final de cada apnea obstructiva, que finalmente pueden dar lugar a la aparición de efectos cardiovasculares agudos y crónicos (Tabla 6).

A medio plazo, el SAHS se asocia a una hiperactividad del sistema nervioso simpático, mediada por quimiorreceptores, y a una depresión del sistema parasimpático, mediada por barorreceptores, así como a alteraciones endoteliales y de la coagulación⁵². A largo plazo, el SAHS se ha asociado a la hipertensión arterial, la hipertensión pulmonar, la cardiopatía isquémica, las arritmias cardíacas, la disfunción ventricular izquierda, la enfermedad cerebrovascular y la aterosclerosis. La asociación de los trastornos respiratorios durante el sueño con las enfermedades cardiovasculares tiene gran importancia clínica, puesto que condicionan el pronóstico y la evolución de estas últimas⁵³.

Tabla 6. Posibles efectos fisiopatológicos del SAHS sobre el sistema cardiovascular⁵⁴.

EFFECTOS AGUDOS
Disminución del aporte de oxígeno al miocardio
Hipoxia intermitente
Disminución del gasto cardíaco
Incremento de la demanda de oxígeno del miocardio
Despertares transitorios
Activación del sistema nervioso simpático
Incremento postcarga del ventrículo izquierdo
Negativización de la presión intratorácica
Elevación de la presión sanguínea
Aumento de la frecuencia cardíaca
Isquemia miocárdica nocturna
Edema pulmonar nocturno
Arritmias cardíacas
EFFECTOS CRÓNICOS
Alteraciones del sistema nervioso autónomo
Activación del sistema nervioso simpático
Disminución de la variabilidad de la frecuencia cardíaca
Deterioro del control mediante barorreflejos de la frecuencia cardíaca
Hipertensión arterial sistémica: nocturna y diurna
Efectos miocárdicos
Hipertrofia ventricular izquierda
Disfunción e insuficiencia ventricular izquierda
Disfunción diastólica ventricular derecha
Aumento de la agregabilidad plaquetaria y de la coagulabilidad
Incremento del riesgo de accidentes cardíacos y cerebrovasculares embólicos y trombóticos

De esta forma, los trastornos respiratorios durante el sueño se sitúan como un nuevo factor de riesgo cardiovascular (Tabla 6), con la trascendencia derivada de la elevada comorbilidad de origen cardíaco y cerebrovascular propia de los países desarrollados. Sin embargo, es necesario considerar que entre el corazón y el pulmón existe una relación recíproca durante el sueño. Así, mientras que los trastornos durante el sueño producen diversas alteraciones de la función cardíaca, también a la inversa, las enfermedades cardíacas también pueden originar importantes trastornos respiratorios durante el sueño.

Tanto el desarrollo de modelos animales para el estudio de la hipoxia intermitente aguda y crónica, como las recientes iniciativas en investigación clínica en pacientes con SAHS, han permitido evaluar con mayor exactitud los mecanismos desencadenantes entre el SAHS y el daño vascular (Figura 9).

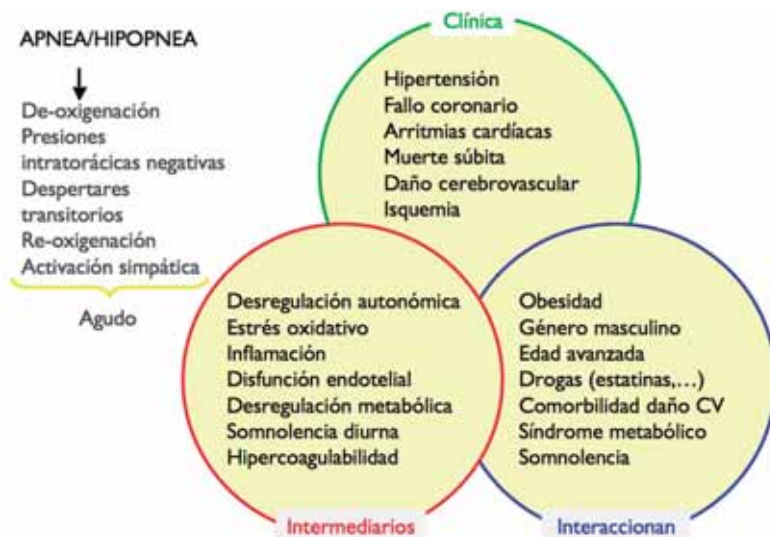


Figura 9. Esquema de los factores implicados que correlacionan el SAHS en el desarrollo de enfermedades vasculares.

La característica principal del SAHS es la oscilación repetida en la SaO_2 durante el sueño, lo que produce una exposición crónica a la hipoxia intermitente. Esta condición de hipoxia intermitente a lo largo de todo el periodo del sueño se cree que es la responsable de las consecuencias clínicas derivadas del SAHS⁵⁵⁻⁵⁷. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la hipoxia intermitente da lugar a un daño vascular en el SAHS son desconocidos.

Se han propuesto un gran número de mecanismos por los que el SAHS produce efectos cardiovasculares agudos y crónicos (Figura 9). Uno de los principales mecanismos desencadenantes se cree que es de origen neurogénico (Figura 10). Se ha descrito que el cese de flujo de aire que resulta en hipoxemia e hipercapnia, conduce como consecuencia a la activación de quimiorreceptores⁵⁸. Esto a su vez provoca un aumento en la actividad simpática vascular, así como en el nivel de catecolaminas circulantes, con el consiguiente aumento de la resistencia vascular periférica. La vasoconstricción generada en la vasculatura periférica y el aumento del gasto cardíaco producido por los cambios en las presiones

intratorácicas al final de la apnea, produce aumentos repentinos en la presión arterial⁵⁸. Estos efectos hemodinámicos agudos del SAHS también son evidentes en la circulación cerebral⁵⁹⁻⁶¹. Otros posibles mecanismos descritos en pacientes con SAHS que también provocan la hipertensión crónica, incluyen alteraciones en los barorreceptores⁶², la disfunción endotelial⁶³, el aumento de la endotelina^{64,65} y la disminución de óxido nítrico (NO)^{66,67}. Además el SAHS puede desencadenar aterosclerosis ya que se ha observado una elevada prevalencia de SAHS en pacientes con enfermedad en la arteria coronaria, y porque los pacientes con SAHS también muestran un aumento de marcadores de aterosclerosis sistémica^{68,69}. Es probable que existan múltiples mecanismos que aumenten el riesgo de aterosclerosis en el SAHS, como el estrés oxidativo⁵⁶, la activación simpática y la disfunción endotelial. Por otro lado, es de gran interés la asociación entre el SAHS y la inflamación. Los procesos inflamatorios desempeñan un papel fundamental en el inicio y la progresión de los procesos aterogénicos. Algunos mediadores inflamatorios, como la proteína C reactiva (PCR), participan directamente en el daño endotelial y en la aterogénesis. Diferentes estudios sugieren que el SAHS induce un estado inflamatorio que se acompaña de aumento de la PCR^{70,71}, y de diferentes moléculas de adhesión, así como el aumento de la expresión de las moléculas de adhesión en los leucocitos y su mayor adhesión a las células endoteliales⁷²⁻⁷⁴. Por lo tanto, la inflamación sistémica podría explicar, en parte, la asociación epidemiológica entre el SAHS y el desarrollo de la aterosclerosis.

Algunos datos epidemiológicos sugieren que el SAHS está relacionado de forma independiente con un aumento de probabilidades de sufrir infarto de miocardio⁷⁵, arritmias cardíacas⁷⁶, hipertensión pulmonar^{17,77,78}, así como tromboembolismo venoso⁷⁹. Muchos de estos resultados son aún controvertidos, de manera que su etiología, fisiopatología y significación clínica tendrán que ser confirmados en futuros estudios.

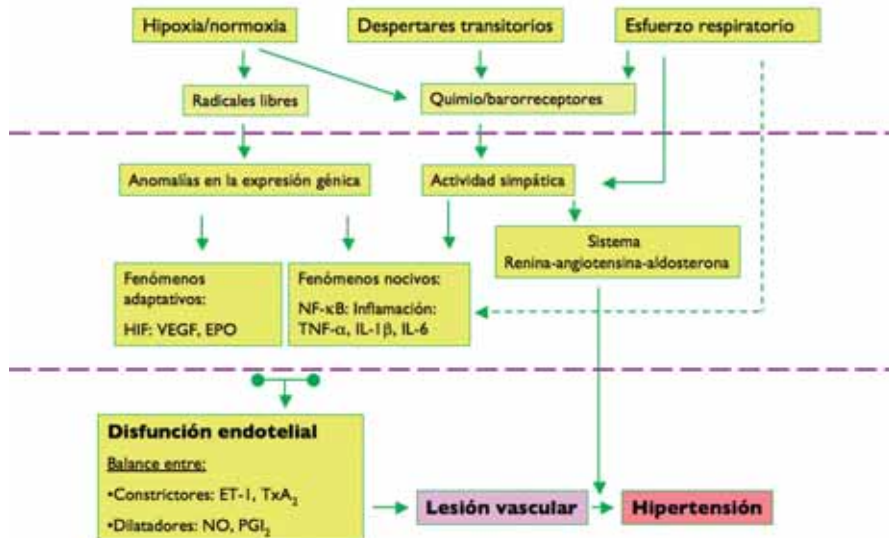


Figura 10. Principales mecanismos desencadenantes en el SAHS.

En este sentido, Lavie⁵⁶ propuso estudiar 4 mecanismos potencialmente candidatos a inducir lesión vascular: a) estrés oxidativo y radicales libres; b) inflamación; c) disfunción endotelial; y d) valoración de la angiogénesis. Tal como muestra la figura 10, la hipótesis global se basaba en el siguiente razonamiento: las apneas/hipopneas, a través de los esfuerzos musculares realizados o como consecuencia de los episodios de hipoxia/normoxia, dan lugar a un aumento de oxidasas y a una disfunción mitocondrial que impulsan un marcado incremento de radicales libres y otros mediadores. Éstos, dan lugar a una activación de los factores de transcripción redox sensibles, como el factor inducible de hipoxia (HIF-1), el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la proteína de activación I (AP-1), que a su vez inducen la expresión génica de mediadores inflamatorios, responsables de un proceso inflamatorio. Se activan las células endoteliales, contribuyendo al aumento de adhesión entre éstas y los leucocitos, aumenta la angiogénesis y como consecuencia final dan lugar a la lesión vascular y al desarrollo de la patología cardiovascular. El conocimiento de los mecanismos implicados en la patogénia del SAHS permitirá abrir la posibilidad a nuevas opciones terapéuticas.

1.4.1. ACTIVACIÓN SIMPÁTICA

Como se ha comentado anteriormente, se piensa que la hipoxia intermitente estimula la actividad quimiorreceptora, incrementando la actividad del sistema nervioso simpático, el cual lleva a la vasoconstricción y, potencialmente, a la hipertensión sistémica. La figura 11 muestra un diagrama esquemático teórico que resume las vías por las cuales la hipoxia intermitente puede llevar a hipertensión. Como la actividad del sistema nervioso simpático permanece elevada después de la eliminación de la hipoxia⁸⁰, se piensa que la hipoxia intermitente desnivela la actividad simpática e incrementa la respuesta a las subsiguientes hipoxias^{81,82}. La elevada actividad del sistema nervioso simpático resulta en la activación del músculo liso vascular, dando lugar a vasoconstricción y a un aumento de la presión sanguínea sistémica⁸³. Además, la elevada actividad del sistema nervioso simpático se cree que regula la producción de angiotensina II por estimulación de la producción de renina en el riñón⁸³. La angiotensina II es un potente vasoconstrictor, importante en la regulación de la presión sanguínea sistémica. Existen otros mecanismos que podrían dar lugar a la alteración de la función vasoconstrictora y a la hipertensión sistémica, tales como la alteración barorefleja^{84,85} y el aumento en la producción del vasoconstrictor Endotelina-1⁶⁴.

El sistema renina-angiotensina está altamente involucrado en el control de la presión sanguínea sistémica. La renina que se produce en los riñones convierte al angiotensinógeno en angiotensina I, la cual a su vez es convertida en angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina, que es el mediador vasoactivo⁸⁶. La angiotensina II circulante tiene dos efectos: a) causa vasoconstricción y b) estimula el cortex adrenal para secretar aldosterona⁸⁶. La aldosterona disminuye la secreción de sodio causando retención de agua, fenómeno importante en el control del volumen sanguíneo y de la presión sanguínea⁸⁶. En este sentido, se ha demostrado que la angiotensina II está aumentada en pacientes con SAHS, dando lugar a una respuesta vasoconstrictora que probablemente contribuya a la hipertensión secundaria observada en aproximadamente en el 50 % de pacientes con SAHS^{87,88} (Figura 11).

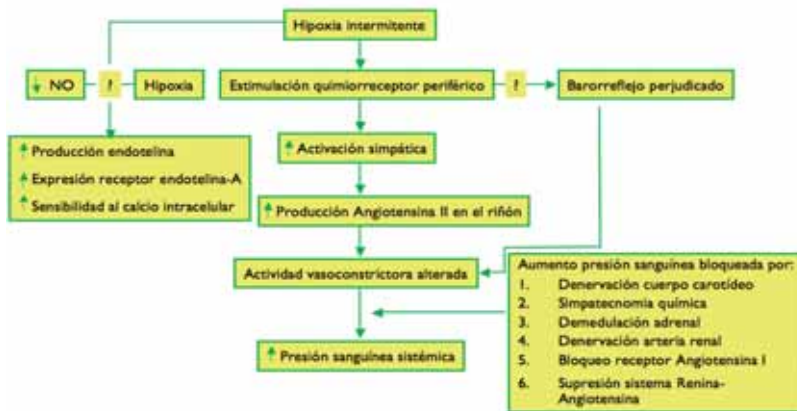


Figura 11. Diagrama esquemático de las vías de hipótesis por las cuales la hipoxia da lugar a hipertensión.

Moller *y col.* observaron que pacientes con SAHS mostraban valores altos en la presión sanguínea, tanto diurnos, como nocturnos, y elevados niveles en plasma de angiotensina II y aldosterona⁸⁹. La terapia con CPAP redujo la presión sanguínea y se asoció a una disminución de la actividad del sistema renina-angiotensina. Por otro lado, se ha descrito que pacientes con SAHS muestran más sensibilidad al vasoconstrictor angiotensina II⁸⁷.

Otro posible mecanismo que da lugar a la alteración de la función vasoconstrictora incluye la Endotelina-I (ET-I), un neuropéptido vasoconstrictor el cual se produce por la enzima convertidora de la endotelina desde el péptido precursor, la ET-I grande⁹⁰ (Figura 11). La ET-I se produce en las células del endotelio vascular en respuesta a la hipoxia y reduce la viabilidad del NO, esto puede ser responsable de un aumento en la producción de la ET-I. Diferentes estudios han demostrado que en pacientes con SAHS la ET-I no está elevada en plasma, pero sí la ET-I grande, y que la terapia con CPAP reduce los niveles plasmáticos de ET-I grande^{91,92}.

Por otro lado, los pacientes con SAHS presentan una elevada actividad del nervio del músculo simpático^{62,93}, un aumento en los niveles plasmáticos de catecolaminas⁹⁴ y tienen reducida la respuesta vascular α - y β -adrenérgica⁹⁵, lo que sugiere una regulación funcional de los receptores simpatoadrenérgicos vasculares.

Los modelos animales han sido utilizados para demostrar que la hipoxia intermitente altera la respuesta adrenérgica vascular⁹⁶. Fletcher *y col.* estudiaron intensamente en un modelo de rata los efectos de la hipoxia intermitente en el desarrollo de la hipertensión y el papel del sistema nervioso simpático, quimiorreceptores periféricos y el sistema renina-angiotensina en esta respuesta^{83,97-99}. Primero determinaron que la hipoxia intermitente da lugar a un incremento de 13 mmHg en el valor de la presión arterial sanguínea¹⁰⁰. Además, demostraron que el bloqueo del receptor angiotensina-I con losartan prevenía el aumento de la presión arterial que tiene lugar después de la hipoxia intermitente⁹⁸ y que la supresión del sistema renina-angiotensina prevenía el incremento en la presión arterial sanguínea⁸³. Este trabajo generó la sospecha de que la hipertensión producida en el SAHS podía ser el resultado de la sobreactividad del sistema adrenérgico y del sistema renina-angiotensina.

I.4.2. ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR RADICALES LIBRES

Desde un punto de vista químico, los radicales libres son moléculas, iones o átomos que contienen uno o más electrones desapareados. Debido a este electrón desapareado, los radicales libres pueden captar o ceder electrones muy fácilmente, lo que les confiere una gran capacidad reactiva. Cuando estos radicales libres contienen oxígeno se denominan radicales libres de oxígeno (RLO). La toxicidad de los RLO está asociada con su alta reactividad con un no-radical, dando lugar a metabolitos más o menos reactivos que el original. Existen tres RLO principales: el ión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$). El H_2O_2 no es estrictamente un RLO ya que no tiene un electrón libre, pero se considera junto con los RLO por su capacidad de formar radicales hidroxilo.

El estrés oxidativo puede producirse como consecuencia de un incremento de la exposición a oxidantes o del descenso de la protección contra estos oxidantes; ambos problemas pueden ocurrir simultáneamente¹⁰¹. De hecho, se define el estrés oxidativo como un desequilibrio entre la producción de RLO y la protección antioxidante^{102,103}. El estrés oxidativo, provocado por cualquiera de estas causas, puede causar daño a proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. De este modo, enzimas y proteínas estructurales, membranas, glúcidos simples y compuestos, ADN y ARN, son todos ellos susceptibles de sufrir daño oxidativo^{101,103,104}.

Los sistemas biológicos poseen varios mecanismos productores de estas especies reactivas. Dentro de los sistemas endógenos, uno de los mecanismos más importantes de producción de radicales libres es la cadena de transporte de electrones mitocondrial, concretamente la denominada reducción monovalente o incompleta del $O_2^{\cdot-}$ -que representa entre un 3 % y un 5 % del total- en la que el $O_2^{\cdot-}$ va captando electrones de forma secuencial, y va generando especies reactivas. Además de este mecanismo existen otros muchos, de origen endógeno, que forman radicales libres, como son fundamentalmente los mecanismos de acción bactericida de los leucocitos y los macrófagos, el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos y las reacciones del citocromo P450¹⁰⁵.

Las apneas recurrentes inducen hipoxia y normoxia repetidas durante el sueño, lo que genera una gran cantidad de RLO⁵⁶. El estrés oxidativo que acompaña a un proceso de hipoxia/normoxia es la consecuencia del desequilibrio entre el aumento de la producción de RLO por parte de los sistemas generadores de RLO y la falta de eficacia de los sistemas antioxidantes para neutralizarlos. Los RLO dan lugar al desarrollo del estrés oxidativo, el cual regula la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), la pérdida de viabilidad del NO y la respuesta inflamatoria vascular⁵⁶, jugando un papel crítico en la patogénesis de la disfunción endotelial.

Hay muchas evidencias del gran impacto que suponen los RLO en el desarrollo del daño endotelial debido a la activación de las células endoteliales y los neutrófilos, responsables de la producción de RLO como consecuencia de la hipoxia/normoxia^{56,106,107}. El número de marcadores de estrés oxidativo así como sus niveles, se relacionan con la severidad del SAHS¹⁰⁸⁻¹¹⁰. En un estudio realizado en pacientes con SAHS se observaron incrementos en la oxidación de LDL y peroxidación lipídica, comparado con sujetos control¹⁰⁸. Asimismo, otro estudio clínico demostró un aumento en los niveles de peróxidos lipídicos en sangre en

pacientes con SAHS¹⁰⁹. Ambos estudios mostraron que el tratamiento con CPAP es efectivo suprimiendo los cambios en el estado redox asociados con el SAHS^{108,109}.

En condiciones basales, las defensas contra el estrés oxidativo son suficientes para contrarrestar la peroxidación lipídica que se produce en el organismo, pero cuando el pulmón es sometido a un proceso de hipoxia/normoxia, la peroxidación lipídica se ve aumentada y puede sobrepasar la capacidad de los sistemas antioxidantes¹¹¹. La disminución de fosfolípidos, consecuencia de la peroxidación lipídica, conduce a una alteración de la membrana plasmática¹¹². Además, ciertos productos producidos en este proceso, como el malondialdehído, 8-dihidroxi-2'-deoxiguanosina y 4-hidroxinonenal, pueden influir en el proceso de acumulación de neutrófilos e inducir necrosis¹¹³.

Además de la formación de RLO, la hipoxia/normoxia da lugar a la activación de factores de transcripción redox-sensibles implicados en el SAHS como el NF- κ B y el HIF-1^{106,114}. Éste sería un mecanismo indirecto de inducción de daño vascular por parte de los RLO.

1.4.3. PROCESO INFLAMATORIO

Desde que se reconoció que la aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico, se han desarrollado numerosos estudios clínico-epidemiológicos que han intentado identificar algún marcador plasmático de inflamación que pudiera utilizarse, al mismo tiempo, como un marcador del proceso aterogénico y de sus complicaciones. La mayoría de los estudios se han centrado en el análisis de las proteínas reactantes de fase aguda, como son la PCR, algunas citocinas (TNF, IL-1 y IL-6), algunas moléculas de adhesión solubles (P-selectina, VCAM y ICAM) y la determinación de factores de transcripción (NF- κ B, HIF-1)¹¹⁵⁻¹¹⁸.

1.4.3.1. REACTANTES DE FASE AGUDA

Proteína C reactiva

La PCR es una proteína de fase aguda sintetizada principalmente por el hígado. En situaciones de inflamación o de infección aguda aumenta su concentración plasmática hasta 1 000 veces por encima de su valor basal. La síntesis hepática de la PCR está directamente regulada por citocinas, fundamentalmente por la IL-6. Los niveles de PCR son un índice más objetivo del estado inflamatorio que la determinación de esta citocina o de otras que también inducen su síntesis (TNF- α , IL-1), ya que la PCR no experimenta variaciones circadianas. Numerosas evidencias subrayan el papel de la PCR como un factor independiente de riesgo cardiovascular en diferentes grupos de población: sujetos sanos, enfermos con una angina estable y pacientes con una enfermedad coronaria aguda^{117,119,120}. Las concentraciones séricas de la PCR se relacionan directamente con factores vinculados al riesgo cardiovascular (la edad, el tabaquismo, el índice de masa corporal, la hipertensión arterial, la colesterolemia, la homocisteinemia)¹²¹⁻¹²³. Así pues, independientemente de su capacidad proaterogénica

intrínseca, todos estos factores deben tenerse en cuenta al valorar la PCR de cada paciente. Dos estudios diferentes demostraron que pacientes con SAHS presentaban un aumento de los niveles de PCR^{70,71}. En el trabajo de Yokoe y *col.* se observó, además, una correlación positiva entre las concentraciones plasmáticas de PCR y de IL-6 en los pacientes estudiados⁷¹. En este mismo sentido, otro estudio clínico detectó que las concentraciones de PCR estaban significativamente aumentadas respecto a las del grupo control únicamente en los pacientes con SAHS que eran obesos¹²⁴. Estos resultados indican que la obesidad podría ser el principal desencadenante de la respuesta inflamatoria, que a su vez podría verse potenciada por la repetición de los episodios de hipoxia/normoxia característicos del SAHS. En resumen, estas observaciones destacan la importancia de controlar el factor de confusión que tiene la obesidad en estos estudios, así como la presencia de otros posibles factores de riesgo cardiovascular, que pueden dificultar la interpretación de los resultados hallados para estos marcadores de inflamación en los enfermos con SAHS.

1.4.3.2. CITOCINAS

Las citocinas son un grupo de péptidos de bajo peso molecular, no estructurales, solubles, generalmente glicosiladas, que comparten varias propiedades y funciones:

Son producidas por una amplia variedad de células, en concreto células del sistema hematopoyético como linfocitos, monocitos y macrófagos, en respuesta a diferentes estímulos.

- Son sintetizadas durante las fases efectoras de la inmunidad natural y específica.
- Promueven y regulan la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Intervienen en la hematopoyesis y en la remodelación de los tejidos y participan en la regulación del metabolismo intermediario y en el balance calórico.
- Su secreción es breve, autolimitada y no se almacenan como moléculas preformadas. Su síntesis comienza por una nueva transcripción genética transitoria.
- Actúan sobre diferentes tipos celulares, propiedad que se conoce como pleiotrofismo y a menudo, tienen efectos diferentes sobre la misma célula diana.
- Son funcionalmente activas a muy bajas concentraciones. Inician su acción al unirse a receptores específicos de la membrana de la célula diana. Ésta puede ser la misma célula que secreta la citoquina (acción autocrina), una célula próxima (acción paracrina) o bien una célula distante a la que llega a través de la circulación (acción endocrina).
- La expresión de los receptores de las citocinas está regulada por su presencia, ya sea de la misma citocina o de otra, e intervienen como integrantes de un sistema funcional con interconexiones en cascada y circuitos de retro-alimentación positivos o negativos, ya que generalmente no actúan solas.

- Diferentes tipos de citocinas pueden ser secretados por una misma célula frente a un mismo estímulo. Asimismo, inducen la síntesis de otras citocinas sobre la célula en la que ejercen su efecto y actúan modulando positiva o negativamente el número y la afinidad de los receptores de otras citocinas y la expresión de sus propios receptores. Sus acciones potencian, cooperan o interfieren el efecto de otras citocinas.

Existen diferentes denominaciones y clasificaciones de las citocinas según la actividad biológica y las células que las producen (tabla 7).

Tabla 7. Clasificación de las citocinas.

Grupo general	Ejemplos
Interleucinas (IL)	IL-1, IL-6, IL-8...
Interferones (IFN)	IFN- α , IFN- β ...
Factores de necrosis tumoral (TNF)	TNF- α , TNF- β ...
Factores de estimulación de colonias (CSF)	GM-CSF, M-CSF...
Proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP)	MIP-1 α , MIP-1 β ...
Factores de crecimiento (GF)	Fibroblasto-GF...

En el sistema nervioso central las citocinas actúan modulando distintos procesos potencialmente importantes en el SAHS, como el sueño, el apetito, el control ventilatorio y la termorregulación. El sistema nervioso central no sólo responde a los cambios en las concentraciones periféricas de las citocinas, sino que estas últimas también se producen y actúan en el propio sistema nervioso central.

En un proceso de hipoxia se encuentran implicadas numerosas citocinas, hecho que contribuye a la gran complejidad de esta patología; las citocinas que se expresan en este proceso pueden ser pro- o anti-inflamatorias. Las citocinas proinflamatorias que se encuentran más comúnmente implicadas en la hipoxia son el TNF- α y la IL-1, ambas tienen potentes acciones proinflamatorias. Las dos inducen la síntesis de la quimiocina IL-8¹²⁵ y regulan la expresión de moléculas de adhesión, promoviendo interacciones entre leucocitos y células endoteliales¹²⁶, lo que produce una liberación mayor de citocinas.

El estudio de las citocinas en los pacientes con SAHS tiene interés por varias razones. En primer lugar, porque actualmente puede considerarse a ciertas citocinas como factores relacionados con la regulación fisiológica del sueño^{127,128}. En este sentido, existen estudios que indican que la alteración en el patrón circadiano normal en la secreción de algunas citocinas, con aumento de su producción durante el día, podría ser un mecanismo importante en el desarrollo de la somnolencia diurna y de la fatiga crónica excesiva que presentan los pacientes con SAHS. En segundo lugar, diversas investigaciones han apreciado una asociación entre el índice de masa corporal y los niveles circulantes del TNF- α y de la IL-6. Esta asociación también se ha puesto de manifiesto en el SAHS, junto con el posible efecto independiente de la obesidad sobre la secreción de dichas citocinas en estos enfermos. Por último, también se ha sugerido que las citocinas juegan un papel como marcadores de la respuesta inflamatoria en la valoración del riesgo cardiovascular en el SAHS¹²⁹. Sin embargo, el factor de confusión

que significa la obesidad, así como la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular; dificultan la interpretación de los resultados. Por tanto, es necesario profundizar en el estudio de este campo, para poder delimitar la trascendencia biológica de estas citocinas como marcadores de inflamación y así, establecer el papel real de las mismas como indicadores de los diferentes procesos asociados al SAHS.

En los pacientes con SAHS se han detectado trastornos en el perfil circadiano de varias citocinas, señalándose diversos mecanismos a través de los cuáles se podría ver alterado este ritmo de secreción: a) la fragmentación del sueño; b) la hipoxia intermitente; c) el estrés oxidativo generado por la liberación de radicales libres secundarios a los episodios de hipoxia/normoxia; d) la respuesta de “alerta” originada por el despertar que sigue a la apnea.

Interleucina I

Existen 2 tipos de IL-1, la IL-1 α y la IL-1 β . Ambos pertenecen a la misma familia, junto a su antagonista (el IL-1ra), que actúa como un inhibidor competitivo de la IL-1. La IL-1 es producida principalmente por los monocitos, los macrófagos y los linfocitos, aunque también es sintetizada por las células epiteliales, endoteliales y por los astrocitos en el sistema nervioso central. La IL-1 β es la forma predominante que se detecta en el plasma y en los líquidos tisulares¹³⁰. La IL-1 es una molécula proinflamatoria, que contribuye al crecimiento celular y a la remodelación de los tejidos. Promueve la respuesta inmune antígeno-específica y actúa de forma sinérgica con otras citocinas, como el TNF- α , compartiendo la capacidad para producir fiebre e inducir la síntesis hepática de proteínas plasmáticas de fase aguda¹³¹.

Los estudios experimentales de Krueger y col.¹³², realizados con conejos, pusieron de manifiesto diversas observaciones: a) los efectos de la IL-1 sobre el sueño son dosis-dependientes; b) la IL-1 produce un incremento del sueño profundo (estadios III y IV) y suprime el sueño REM; c) estos efectos son específicos de esta proteína; d) además, son independientes del efecto pirogénico de esta citocina. Los efectos somatogénicos de la IL-1 también se han detectado en otras especies animales, constatándose un patrón de respuesta circadiano¹³³⁻¹³⁶. Por otro lado, también se ha observado que la IL-1 participa en la regulación fisiológica del sueño^{137,138} lo que sugiere un papel importante en la respuesta a la privación y alteración del mismo¹³⁹⁻¹⁴¹.

Factor de necrosis tumoral

El TNF es una proteína soluble que tiene dos isoformas:

El TNF- α o caquetina, producido principalmente por los monocitos y los macrófagos, y el TNF- β o linfotóxina, producido principalmente por los linfocitos. Estudios más recientes demostraron que la expresión y la síntesis de esta sustancia puede observarse en células extrínsecas, como las del músculo esquelético y cardíaco, las del tejido adiposo y las del cerebro^{142,143}. La síntesis del TNF- α se induce principalmente por endotoxinas bacterianas, antígenos fúngicos y virus, lo que subraya la importancia de esta citocina en la infección y la inflamación. El TNF- α tiene funciones similares a las de la IL-1. Participa en la estimulación de la respuesta inmune, aumenta la expresión de moléculas de adhesión a nivel endotelial y estimula la síntesis de otras citocinas inflamatorias, como la IL-1, la IL-6 o el IFN γ . *In vivo*,

la administración del TNF- α induce importantes cambios fisiológicos: produce daño tisular, cambios metabólicos e incrementa la actividad procoagulante del endotelio, favoreciendo la coagulación intravascular y la trombosis capilar. Por otro lado, los mecanismos biológicos y moleculares a través de los que el TNF- α puede regular el peso corporal son: la inducción de la resistencia insulínica, la inhibición de la actividad y la expresión de la lipoproteinlipasa, y la modulación de los niveles de leptina. El hecho de que el TNF- α pueda intervenir y modular, de forma directa o indirecta, estos tres mecanismos confiere una especial relevancia al estudio de esta citocina en el conocimiento de la fisiopatología de la obesidad en los seres humanos¹⁴⁴.

En distintas especies animales se ha detectado un aumento del sueño profundo, acompañado de una reducción en el sueño REM, tras la administración del TNF, mientras que el bloqueo de esta citocina con anticuerpos anti-TNF reduce el sueño profundo. Las interacciones entre la IL-1 y el TNF- α parecen importantes en la regulación del sueño¹⁴⁵. Por ejemplo, los efectos de la IL-1 sobre el sueño se atenúan si previamente se administra un antagonista del TNF. Lo mismo ocurre con la acción del TNF, que puede inhibirse con un antagonista de la IL-1¹⁴⁵. En los seres humanos, los niveles plasmáticos del TNF- α exhiben un patrón circadiano y las concentraciones más elevadas se detectan durante la noche^{139,146}.

Interleucina 6

La IL-6 es una citocina pleiotrópica con numerosas funciones fisiopatológicas^{147,148}. Se sintetiza principalmente por células inmunitarias, como monocitos o linfocitos, aunque también en otros tipos celulares como los fibroblastos, las células endoteliales o los adipocitos^{118,147-149}. Es, junto al TNF- α y la IL-1, un mediador clave en la respuesta de fase aguda de los procesos inflamatorios¹⁵⁰. Probablemente también es el mayor inductor fisiológico de la síntesis de las proteínas que forman parte de esta respuesta, como el fibrinógeno y la PCR. Tiene, además, importantes funciones endocrino-metabólicas, como la estimulación de la liberación de corticosteroides durante la inflamación y la regulación del metabolismo óseo, al actuar sobre el desarrollo y la función de los osteoblastos y los osteoclastos. Se considera como una “hormona de estrés” por su correlación con los niveles de catecolaminas circulantes y la posibilidad de inducir su secreción a través de los receptores β -adrenérgicos. También participa en la secreción de la vasopresina y de la hormona del crecimiento, además de incrementar la temperatura corporal y actuar inhibiendo la función tiroidea^{147,151}.

El papel de esta citocina en la regulación fisiológica del sueño se ha estudiado menos que el de las dos citocinas expuestas anteriormente y los resultados no son concluyentes. Sin embargo, el patrón circadiano que exhiben los niveles plasmáticos de esta citocina, junto a la detección de una mayor elevación de esos niveles durante el día, en pacientes con trastornos que cursan con somnolencia diurna excesiva, sugiere la implicación, directa o indirecta, de esta sustancia en tales alteraciones^{152,153}.

La alteración del patrón circadiano normal de ciertas citocinas somnógenas, con aumento de su secreción durante el día, podría ser un mecanismo implicado en el desarrollo de la somnolencia diurna excesiva y de la fatiga crónica que presentan los pacientes con SAHS^{154,155}.

1.4.3.3. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

La respuesta inflamatoria se caracteriza, en primer lugar, por una dilatación de los vasos para incrementar el flujo sanguíneo. A continuación, se producen una serie de cambios estructurales en la vasculatura que acaban con la migración de los leucocitos a través del endotelio. Los leucocitos circulantes son reclutados hacia las áreas de inflamación por un proceso que requiere la interacción leucocito-endotelio a través de las llamadas moléculas de adhesión.

El mecanismo se divide en cuatro etapas: rodamiento o rolling, adherencia, activación y extravasación al interior del tejido (Figura 12). El inicio de la interacción entre los neutrófilos circulantes y el endotelio, comporta el desplazamiento de los neutrófilos de la corriente de células sanguíneas hacia la pared del vaso y el subsiguiente rodamiento de éstas a lo largo del endotelio.

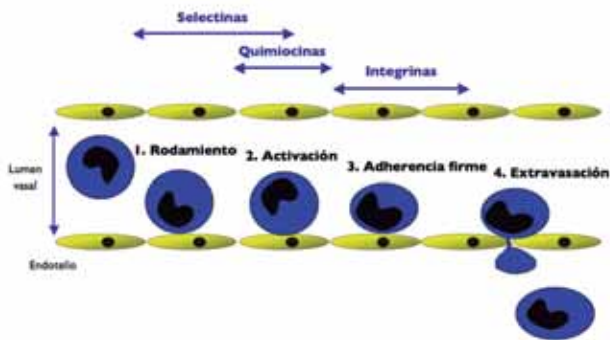


Figura 12. Secuencia de acontecimientos en el proceso de infiltración de neutrófilos.

Esta fase inicial está regulada por las selectinas: familia de receptores de membrana que comparten un dominio lectina extracelular en el extremo amino-terminal, seguido de un dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico y de 2 a 9 secuencias consenso repetidas. Se insertan vía hidrofóbica a un dominio transmembrana y tienen una pequeña cola citoplasmática¹⁵⁶ (Figura 13).

La más pequeña de las selectinas, la L-selectina se expresa en neutrófilos y su ligando sólo se encuentra en el endotelio activado. La P-selectina se expresa en plaquetas y en células endoteliales activadas. La E-selectina se expresa en el endotelio (Figura 13). La expresión de estas moléculas tiene lugar muy rápidamente en respuesta a diferentes estímulos. La P-selectina es la selectina más importante implicada en el rodamiento de los neutrófilos, hasta incluso, en ausencia de la L-selectina puede ejercer su acción. Aunque fue inicialmente identificada en los llamados gránulos α de las plaquetas, también se encuentra de forma constitutiva almacenada en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. En respuesta a un estímulo activador, la P-selectina es movilizad hacia la membrana celular, expresándose en la superficie endotelial pocos minutos después de la activación del endotelio. Posteriormente, la P-selectina puede ser otra vez dirigida hacia el interior de la

célula y reutilizada, o bien puede desprenderse y ser liberada al plasma, dando lugar a la P-selectina soluble, que puede ser cuantificada. Las células endoteliales, además de movilizar hacia su superficie los depósitos de P-selectina preformada, pueden también sintetizar de nuevo P-selectina, activando la transcripción, en respuesta a determinados estímulos como la endotoxina o ciertas citocinas. Esta síntesis se traduce en un segundo pico de expresión, que se detecta en la superficie de las células entre 4 h y 5 h después del estímulo. En cambio, la E-selectina no se encuentra de forma constitutiva en la superficie de las células endoteliales. Al no existir E-selectina preformada, la síntesis y la expresión de esta molécula está totalmente regulada a nivel transcripcional¹⁵⁷, y puede ser detectada en la superficie de las células a las 2 h de un estímulo como la IL-1 o el TNF- α . A diferencia de las dos anteriores, la L-selectina es una molécula de adhesión leucocitaria. Las interacciones entre la L-selectina y el endotelio no requieren la activación del leucocito, ya que la L-selectina se expresa en su superficie de manera constitutiva. La L-selectina se ha implicado en los fenómenos de adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales ya activadas, pero no a las células endoteliales quiescentes. Este hecho hace suponer que el ligando de la L-selectina no se encuentra en la superficie endotelial de forma constitutiva y que, en cambio, se expresa como resultado de la activación de estas células. Su función está controlada por la aparición de sus ligandos¹⁵⁸. Los receptores de las selectinas son proteínas de tipo mucina, con numerosas cadenas laterales glucosiladas que sirven de soporte a los tetrasacáridos sialil-Lewis X (sLe^x) y sialil-Lewis A (sLe^a), con actividad de ligando por el dominio lectina común de las tres selectinas.

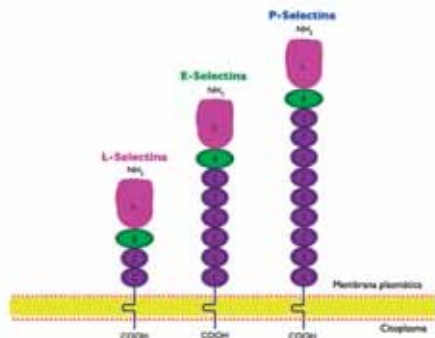


Figura 13. Estructura de las selectinas.

La adherencia de los neutrófilos a la superficie endotelial está mediada por la interacción entre moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (moléculas de adhesión diferentes a las selectinas), expresadas en la superficie del endotelio y las integrinas en los neutrófilos. Las integrinas son proteínas heterodímeras que resultan de la unión no covalente de dos subunidades α y β . En los neutrófilos, se expresan únicamente un tipo determinado de integrinas: β_2 como resultado de la unión de una subunidad β (llamada CD 18), con una de las tres posibles subunidades α , como CD11a, CD11b y CD11c. La superfamilia de las inmunoglobulinas incluye numerosas moléculas, de las cuales 4 se expresan en la superficie de las células endoteliales y participan en la adhesión de los neutrófilos, como las moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1 y ICAM-2), la molécula de adhesión plaqueta-célula

endotelial (PECAM-1) y la molécula de adhesión célula vascular (VCAM-1). La CD11a/CD18 interacciona con la ICAM-1 y la ICAM-2. La CD11b/CD18 interacciona únicamente con la ICAM-1 y el ligando CD11c/CD18 no está bien definido¹⁵⁹. La adherencia tiene lugar cuando las integrinas del neutrófilo (CD11a/CD18 o CD11b/CD18) se unen a las moléculas de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas expresadas por el endotelio (ICAM-1 o ICAM-2). La síntesis de la ICAM-1 se da en el término de pocas horas después del estímulo, mientras que la ICAM-2 se expresa constitutivamente¹⁶⁰. Después de la activación del neutrófilo, una gran parte de éstos migran entre las células endoteliales y extravasan el endotelio con la contribución de quimiotácticos exógenos¹⁶¹. Las moléculas de adhesión implicadas en estas interacciones incluyen ICAM-1, PECAM-1 por parte del endotelio y PECAM-1 e integrina a nivel del neutrófilo.

En pacientes con SAHS se ha observado una acumulación de neutrófilos en la VAS¹⁶² y unos niveles plasmáticos de P-selectina soluble aumentados^{163,164}. Entre los mecanismos de inducción de P-selectina destacan los relacionados con las citocinas y los RLO¹⁶⁵. Estudios *in vitro* en cultivos de células endoteliales demuestran que el TNF es un potente inductor de la síntesis de P-selectina¹⁶⁶. Dado que los niveles de TNF están aumentados significativamente y llegan al máximo pocas horas antes del pico de expresión de la P-selectina¹⁶⁷, se podría sugerir que esta citocina podría ser uno de los agentes inductores de la expresión de esta molécula de adhesión en las células endoteliales.

Neutrófilos

La acumulación de neutrófilos que tiene lugar en el tejido como consecuencia de la hipoxia/normoxia viene condicionada por una serie de cambios celulares que alteran las características de adherencia de los neutrófilos, así como una red de interacciones entre leucocitos, citocinas y quimioatrayentes¹⁶⁸. Entre estos cambios se incluyen la producción de citocinas (IL-1, TNF- α) por parte de las células y el aumento de la expresión de moléculas de adhesión, a nivel endotelial, como la ICAM-1¹⁶⁹.

Células endoteliales.

Diferentes trabajos señalan a las células endoteliales como uno de los principales tipos celulares afectados por un proceso de hipoxia/normoxia^{56,170}. Durante la hipoxia, se producen alteraciones en el intercambio iónico celular, lo que comporta edema en el endotelio. La separación de las células endoteliales de su matriz representa un componente crítico del daño por hipoxia. Esta separación puede venir mediada por diferentes proteasas, concretamente metaloproteinasas¹⁷¹. De todas formas, no es hasta la normoxia cuando las células endoteliales sufren el daño debido a la formación de RLO⁵⁶. Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales este deterioro de las células endoteliales puede contribuir a la generación de la lesión asociada a este proceso. Por un lado, en la fase temprana de la normoxia, las células endoteliales disminuyen la producción de NO que es un vasodilatador¹⁷²; paralelamente, en este periodo se produce un aumento en la concentración de endotelina a nivel endotelial, lo que provoca la contracción de las células endoteliales¹⁷³. Estas dos circunstancias conllevan una reducción en el flujo sanguíneo, contribuyendo al empeoramiento de la circulación. Por otro lado, también se ha observado un desequilibrio entre la producción de NO y del O₂⁻ a

nivel de las células endoteliales. En condiciones normales, la producción de NO es suficiente para contrarrestar la producción de O_2^- ; lo que permite que el NO actúe de secuestrador de los RLO, prevenga la agregación plaquetaria y minimice las interacciones de adhesión entre los neutrófilos y la superficie de las células endoteliales¹⁷⁴. Al producirse una hipoxia y disminuir los niveles de NO, éste ya no es suficiente para realizar estas funciones, lo que conlleva a un daño endotelial^{174,175}.

I.4.3.4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Factor nuclear kappa B

La inducción de la expresión génica es un mecanismo regulador clave que requiere que proteínas activadoras de la transcripción se unan al ADN después de ser expuestas a un estímulo específico. De todos los factores de transcripción conocidos, el NF- κ B y la AP-1 parecen ser los más relevantes en la regulación de los genes implicados en la respuesta inflamatoria. El NF- κ B es un factor de transcripción que regula la expresión de diferentes genes, incluyendo citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y algunas proteínas¹⁷⁶. El NF- κ B juega un papel muy importante en las respuestas celulares a diferentes tipos de agresiones, regulando la expresión inducible de genes involucrados en la respuesta inflamatoria e inmune¹⁷⁷ (Figura 14).

El NF- κ B es un miembro de la familia de proteínas Rel, una familia de factores de transcripción que comparten la misma estructura y el lugar de unión al ADN. Clásicamente la forma activada del NF- κ B es un heterodímero que normalmente consiste en dos proteínas de 65 kDa (p65) también llamada Rel A, y de 50 kDa (p50). Otras subunidades como p105: un precursor de p50 (NF- κ B1), p100: un precursor de p52 (NF- κ B2), c-Rel y Rel B también pueden estar presentes en diferentes formas del NF- κ B. Todas estas subunidades pueden estar formando homodímeros o heterodímeros, confiriendo diferentes afinidades del NF- κ B por el ADN. En las células no estimuladas, el NF- κ B se encuentra en el citoplasma en forma inactiva asociado a una proteína que lo inhibe, llamada proteína inhibidora κ B (I κ B), la cual impide la translocación del NF- κ B al núcleo cuando no hay señal de activación. Cuando la célula recibe una señal de activación el I κ B se fosforila y se degrada rápidamente por enzimas proteolíticas^{176,178,179}. La activación del NF- κ B representa el último eslabón de la vía de señales de transducción desde la superficie celular hasta el núcleo. Existe una gran variedad de estímulos extracelulares que pueden disparar la activación del NF- κ B, como los RLO, las citocinas, los oxidantes y la hipoxia¹⁸⁰.

Los RLO están reconocidos como importantes inductores de la expresión de genes vía la activación del NF- κ B¹⁷⁸. Además, la hiperoxia, el peróxido de hidrogeno y la peroxidación lipídica, también dan lugar a la activación del NF- κ B. Muchas de las citocinas que activan el NF- κ B, también dan lugar a un incremento en la producción celular de RLO¹⁷⁹. Citocinas como el TNF- α , activan el NF- κ B a través de diferentes familias de receptores de membrana e interacciones proteicas que inducen la fosforilación del I κ B¹⁸¹. Por otra parte, la activación del NF- κ B puede sufrir una retroalimentación positiva, a través de mecanismos extracelulares,

que amplifican las señales inflamatorias. Diferentes señales activarán el NF- κ B, que dará lugar al aumento de la producción de citocinas y a su liberación, lo que amplificará la señal inicial¹⁸².

La activación del NF- κ B es esencial para la síntesis de un gran número de citocinas como el TNF- α y IL-1, quimiocinas, factores de la regulación de la apoptosis, factores de crecimiento, factores de la proliferación celular y moléculas de adhesión, las cuales son mediadores importantes de las respuestas inflamatorias y los desordenes proliferativos de la vasculatura incluyendo la aterosclerosis¹⁸³. Estudios clínicos muestran que pacientes con SAHS presentan en plasma niveles elevados de mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas (TNF- α , IL-6, IL-18), quimiocinas (IL-8, MCP-1) y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina y L-selectina), y un incremento en la expresión de contra-receptores de moléculas de adhesión como el CD15 y CD11c en monocitos^{73,184,185}. El hecho que el SAHS vaya precedido o asociado a una respuesta inflamatoria, en la cual muchos de los mediadores regulados por el NF- κ B están alterados, hace pensar que la activación de este factor nuclear puede ser uno de los mecanismos importantes en la patogenia de esta enfermedad. Asimismo, recientemente se ha observado que pacientes con SAHS presentan el NF- κ B activado en monocitos¹⁸⁶, por lo tanto la activación del NF- κ B tendría un papel importante tanto a nivel de la inflamación sistémica como en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares asociadas a SAHS.

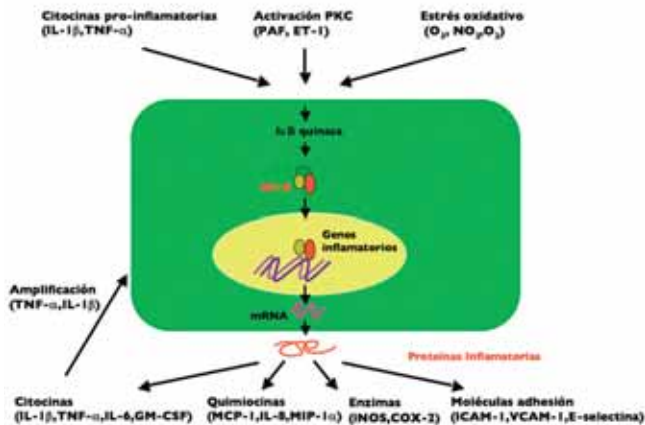


Figura 14. Mecanismo de activación del NF- κ B.

Factor inducible de hipoxia

El HIF-1 es un factor de transcripción que activa genes de proteínas que median la respuesta adaptativa a la reducción en la biodisponibilidad del oxígeno. Participa en el metabolismo de la glucosa y energético, angiogénesis, reactividad vascular y remodelación, proliferación celular, y en la supervivencia celular. Los productos proteicos identificados de los genes diana del HIF-1 incluyen entre otros al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el péptido natriurético atrial, la ET-1, enzimas glicolíticos, la eritropoyetina y la NO sintasa inducible^{183,187-189}.

El HIF-1 se expresa en todas las células nucleadas en respuesta a la hipoxia. El HIF-1 está compuesto por la subunidad HIF-1 β , la cual está expresada constitutivamente, y una subunidad HIF-1 α , la cual está regulada por las condiciones de hipoxia. Al menos se han identificado tres isoformas de la subunidad HIF-1 α , aunque las que tienen un papel predominante en la respuesta transcripcional a la hipoxia son HIF-1 α y HIF-2 α o proteína de dominio PAS endotelial (EPAS-1). En condiciones de normoxia, el HIF-1 α y HIF-2 α son degradados por un mecanismo que induce la hidroxilación de dos residuos propil, ubiquitinación y degradación proteosomal. Mientras el HIF-1 α está expresado ubicuamente, el HIF-2 α fue originalmente identificado en células endoteliales y en algunos tejidos altamente vascularizados, por eso recibe el nombre de EPAS-1. Aunque más tarde también se identificó el HIF-2 α en otros tipos celulares. Las dos subunidades HIF- α inducen la activación transcripcional vía interacción con los elementos de respuesta a la hipoxia (Figura 15).

Hasta el momento, el HIF-1 se ha relacionado siempre con la regulación de la expresión de genes en respuesta a la falta de oxígeno. El HIF-1 se inactiva con incrementos en la concentración intracelular de RLO. Concretamente la hipoxia induce la activación de la expresión génica de HIF-1, que se inactiva rápidamente en presencia de oxígeno o RLO. Por ello, su activación está asociada a una respuesta adaptativa a la hipoxia y no a la normoxia. Lo que haría pensar que HIF-1 juega un papel protector contra el estrés oxidativo¹⁸³. No obstante, recientes investigaciones indican que el HIF-1 puede activarse en respuesta a estímulos no hipóxicos, ya que se ha observado que los RLO regulan la estabilidad del HIF-1 y su actividad transcripcional en células oxigenadas y también en condiciones hipóxicas. Por lo tanto, los RLO jugarían un papel importante en las vías de regulación dependientes de HIF-1, tanto en condiciones normales, como en condiciones patológicas¹⁹⁰. Actualmente ningún estudio clínico ha demostrado la activación directa del HIF-1 en pacientes con SAHS; todas las investigaciones se han encaminado al estudio de los productos génicos expresados por HIF-1, para demostrar indirectamente la activación del HIF-1. En este sentido existen algunos trabajos que demuestran, que en pacientes con SAHS hay un incremento en los niveles plasmáticos tanto del VEGF¹⁹¹, como del péptido natriurético atrial¹⁹², de la eritropoyetina¹⁹³ y del precursor de la ET-1⁹².

La activación de HIF-1 en pacientes con SAHS daría lugar a la expresión de genes relacionados con la adaptación de las células a la hipoxia. En este sentido, el SAHS sería un buen ejemplo clínico de preconditionamiento en el desarrollo de respuestas adaptativas a la hipoxia intermitente. Sin embargo, la expresión de estos genes pueden dar lugar a su vez al desarrollo de angiogénesis que podría desencadenar finalmente en un daño vascular.

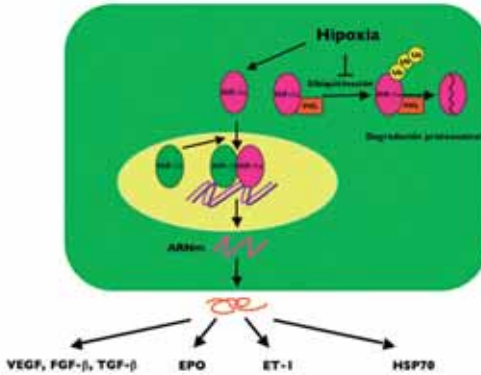


Figura 15. Mecanismo de activación del HIF-1.

1.4.4. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El endotelio es una capa de tejido dinámico que constituye una fuente y/o diana de múltiples factores de crecimiento y mediadores vasoactivos que regulan las propiedades físicas y bioquímicas de los vasos sistémicos así como la contractilidad vascular y el crecimiento celular¹⁹⁴. El endotelio no es un tejido homogéneo, incluye una variabilidad anatómica en forma, talla y grosor; además de una heterogeneidad funcional, como la magnitud de la dilatación NO-dependiente en diferentes partes vasculares. Sin embargo, el control del tono vascular, el mantenimiento de la homeostasis y la angiogénesis, a parte de la provisión de una barrera permeable selectiva entre la sangre y los tejidos, son las acciones dominantes de la capa endotelial en la mayoría de las partes¹⁹⁵.

Tal y como se ha descrito anteriormente, uno de los mecanismos por los cuales el SAHS puede desencadenar en una patología cardiovascular incluye la disfunción endotelial^{196,197} a través de diferentes vías como la hipoxemia, la producción de RLO y la activación simpática. La disfunción endotelial puede entonces dar lugar a vasoconstricción, proliferación de músculo liso vascular, hipercoagulabilidad, trombosis y eventualmente, procesos adversos cardiovasculares¹⁹⁸. Además, el SAHS también se asocia a la obesidad, la hipertensión, y la desregulación metabólica, lo que a la vez puede contribuir a los efectos adversos en el endotelio. El daño endotelial se produce por una alteración de las hormonas endoteliales que son las responsables del mantenimiento del tono vascular, la homeostasis y la prevención de la proliferación de células anormales, incrementando la coagulación, alterando el tráfico de leucocitos y la exposición de estructuras subendoteliales a diversos factores de crecimiento en la sangre¹⁹⁴. La vasoconstricción resultante, la proliferación del músculo liso vascular y la hipercoagulabilidad puede desencadenar consecuencias cardiovasculares adversas asociadas con el SAHS, como la hipertensión, el daño arteriocoronario y el daño cerebrovascular^{199,200}. En pacientes con SAHS el tratamiento con CPAP ha mostrado una mejoría en la función endotelial.

Para el ensayo de la disfunción endotelial en pacientes con SAHS, se realiza la evaluación funcional de las respuestas vasculares, midiendo cambios en el flujo de sangre en respuesta a vasodilatadores endotelio-dependientes o hipoxemia. La cuantificación de niveles de células endoteliales apoptóticas circulantes e índices plasmáticos de diversos biomarcadores endoteliales, incluyendo un gran número de mediadores vasoactivos, inflamatorios y homeostáticos. Además, diversos estudios han utilizado la infusión intra-arterial de vasodilatadores endotelio-dependientes, como la acetilcolina y el nitroprusiato de sodio^{63,201}, para el ensayo de la función endotelial microvascular arterial a nivel basal en pacientes con SAHS y también como en respuesta a la terapia con CPAP^{63,201}. La detección de la disfunción endotelial también se puede determinar mediante la medición de flujo ultrasónico de alta resolución mediante la dilatación de la arteria branquial^{196,202}. Por otro lado, el estudio del flujo de sangre cerebral en respuesta a la hipoxia también determina la función endotelial, ya que la vasculatura cerebral responde a la hipoxia con vasodilatación, mediante el incremento del NO endotelio-dependiente. Un estudio reciente en pacientes con SAHS comparados con controles ha demostrado que el flujo de sangre cerebrovascular está alterado en respuesta a la hipoxia y que se reestablece entre 4 y 6 semanas después de la terapia con CPAP²⁰³. Asimismo, la determinación de los niveles de células endoteliales circulantes proporciona un marcador directo de daño endotelial. Se ha observado que tanto en los infartos de miocardio²⁰⁴ como en la enfermedad vascular periférica aterosclerótica²⁰⁵, las células endoteliales circulantes están incrementadas. En este sentido, un estudio *in vitro* realizado con células endoteliales humanas sugirió que en los síndromes coronarios agudos, la extensión de la apoptosis endotelial se correlaciona con la extensión del daño coronario²⁰⁶. Basados en los estudios citados, se realizó una investigación clínica en pacientes con SAHS, donde se determinaron los niveles circulantes de células endoteliales. Los resultados de este estudio mostraron en los pacientes con SAHS comparado con los sujetos controles, un incremento de células endoteliales circulantes, y además observaron una correlación entre el nivel de células endoteliales circulantes y una vasodilatación anormal. La terapia con CPAP fue capaz de atenuar todas estas alteraciones¹⁷⁰.

La obesidad es un importante factor de riesgo para el SAHS²⁰⁷, y la leptina se ha propuesto como causa fundamental de la obesidad, ya que en sujetos obesos se han observado niveles alterados o insensibilidad a la leptina²⁰⁷. Asimismo, se ha demostrado que niveles altos de leptina están asociados con distensibilidad arterial deteriorada en humanos²⁰⁸. Los receptores de leptina están presentes en las células endoteliales²⁰⁹, sugiriendo que el endotelio puede ser una diana para la leptina. Estos receptores al unirse a la leptina pueden desencadenar la formación de angiogenesis²¹⁰ y proliferación del músculo liso vascular²¹¹. Por lo tanto, la leptina, esta asociada con la disfunción endotelial y desórdenes cardiovasculares^{212,213}. Además, la leptina también induce la producción del RLO en las células endoteliales humanas²¹⁴, las cuales pueden tener un papel importante en el desarrollo de la aterogenesis. En este sentido, se ha descrito que en pacientes con SAHS los niveles de leptina están aumentados y disminuyen mediante la terapia con CPAP^{215,216}.

El endotelio es una fuente de mediadores vasoactivos. Un balance entre estos mediadores, incluyendo factores vasoconstrictores como el sistema renina-angiotensina-aldosterona, ET-1 y tromboxano A₂ (TxA₂), y factores vasodilatadores como el NO y prostaciclina (PGI₂), median el tono vascular normal, la homeostasis, y la reparación y el crecimiento del daño

vascular²¹⁷. Una alteración en este balance puede cambiar el entorno vascular y la arquitectura y propiedades tensiles de la vasculatura, promoviendo vasoconstricción e impidiendo la vasodilatación endotelial.

Factores Vasoconstrictores y SAHS

Sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina vía el receptor de la angiotensina I, causa vasoconstricción, daño endotelial y crecimiento celular. La activación del sistema renina-angiotensina mediante la hipoxia recurrente puede contribuir al incremento de la presión sanguínea en pacientes con SAHS. Fletcher y *col.* observaron un incremento en los valores de presión arterial en ratas expuestas a hipoxia crónica recurrente, semejante a lo que se ha observado en pacientes con SAHS, y la atenuación de esta respuesta administrando el inhibidor del receptor de la angiotensina I⁸³. En pacientes con SAHS, se han detectado niveles plasmáticos más altos de aldosterona y angiotensina II, comparado con sujetos controles⁸⁹.

Endotelina-I

La ET-I es un péptido potente vasoconstrictor con propiedades mitogénicas que es ubiquitinizado en células endoteliales vasculares humanas²¹⁸. Un estudio en ratas expuestas a hipoxia/hipercapnia intermitente mostró un incremento, tanto en ET-I en plasma, como en la presión sanguínea²¹⁹. Los estudios realizados en pacientes con SAHS, en relación a los niveles de ET-I en plasma, han dado resultados contradictorios. Por un lado, algunos estudios demostraron un incremento en los niveles sistémicos de ET-I comparado con sus homólogos sanos^{64,65,220}, estos niveles descendieron mediante la terapia con CPAP⁶⁴. Un estudio reciente encontró niveles elevados de ET-I sólo en pacientes con SAHS moderado o severo, pero no ligero²²¹. En este sentido, en otro estudio se observaron niveles elevados del precursor de la ET-I en plasma, en pacientes con SAHS no tratados, los cuales se restablecieron mediante la terapia con CPAP⁹². Por otro lado, otros estudios han fracasado al no encontrar ninguna asociación entre SAHS y el aumento de ET-I^{89,91}. Es importante destacar que en el primer estudio, la mayoría de los pacientes controles tenían una historia clínica de hipertensión y desordenes cardiovasculares, sugiriendo la posibilidad de disfunción endotelial en ambos grupos, por lo cual es posible que no se obtuvieran diferencias significativas en los niveles de ET-I entre los pacientes con SAHS y sujetos control⁹¹. Actualmente, todavía no se ha demostrado que un incremento en los niveles de este péptido pueda jugar un papel en la génesis de la hipertensión en pacientes con SAHS.

Tromboxano

El TxA₂ es un potente agente vasoconstrictor y trombogénico. Su vida media en medio acuoso es de unos treinta segundos, transformándose de forma no enzimática, en el metabolito tromboxano B₂ (TxB₂). Inicialmente se describió como producto del metabolismo del ácido araquidónico por las plaquetas, aunque actualmente se sabe que las plaquetas no son la única fuente de este metabolito, ya que se ha demostrado que también es producido por las células endoteliales.

El TxB_2 además de tratarse de una potente sustancia vasoconstrictora, también es un mitógeno de las células del músculo liso y un inductor de la agregación plaquetaria. En pacientes con SAHS se observaron un aumento en los niveles de TxB_2 , y estos niveles se restablecieron mediante el tratamiento con CPAP. Además, se demostró que esta sustancia vasoactiva puede jugar un papel importante en el desarrollo de la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares asociadas al SAHS²²². En un estudio realizado en pacientes con hipertensión pulmonar se mostró que la inhibición del tromboxano causaba una ligera mejoría en la hemodinámica pulmonar²²³.

Factores Vasodilatadores y SAHS

Óxido nítrico

El flujo mediado por la dilatación de arterias periféricas dependientes del incremento del NO de las células endoteliales, es un marcador ampliamente aceptado de función endotelial vascular, incluyendo esto en arterias coronarias^{224,225}. Existe una asociación entre la reactividad branquial y la hipoxemia, sugiriendo que el estrés hipoxémico puede ser un factor crucial que contribuye a la disfunción endotelial¹⁹⁷. Una evidencia de esta hipótesis se ha observado en un estudio reciente en pacientes con SAHS, donde se ha mostrado una mejoría en el flujo sanguíneo debido a la dilatación provocada después de la administración intravenosa de Vitamina C (antioxidante y captador de radicales libres)²⁰². Es importante remarcar que la vasodilatación dependiente del endotelio es dañina en estos pacientes incluso en la ausencia de hipertensión u otras enfermedades, incluyendo el daño cardiovascular patente, lo que sugiere que el SAHS es un factor de riesgo de disfunción endotelial⁶³. Además, los niveles de NO, determinados a partir de los nitritos y nitratos en suero, están disminuidos en sujetos con SAHS, comparados con controles, los cuales se revierten a niveles basales mediante la terapia con CPAP^{66,67}.

Prostaciclina

La PGI_2 tiene una potente actividad vasodilatadora, antiagregante plaquetaria y relajante de la musculatura lisa²¹⁷. Su vida media es muy corta, 3 min en medio acuoso, transformándose rápidamente en 6-keto-Prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$ ($6\text{kPGF}_{1\alpha}$), el metabolito estable. Es sintetizada a través de la ciclooxigenasa por la vía del ácido araquidónico en el endotelio vascular. Aunque la PGI_2 no puede contribuir a la vasodilatación basal, protege contra la vasoconstricción y remodelación tisular en respuesta a diversos estímulos. En un estudio en ratones sometidos a hipoxia crónica recurrente, se observó que la administración de PGI_2 protegía de la lesión endotelial asociada a la hipoxia²²⁶, y que ratones deficientes de los receptores de la PGI_2 desarrollan hipertensión pulmonar severa en respuesta a la hipoxia intermitente crónica²²⁷. Por otro lado, se ha observado una disminución en la expresión de la PGI_2 -sintasa en las arterias pulmonares de pacientes con hipertensión pulmonar arterial idiopática grave e hipertensión portopulmonar²²⁸ y una disminución en los niveles urinarios de los metabolitos de la PGI_2 en pacientes con hipertensión pulmonar²²⁹. Por todo ello, la disminución de los niveles de la PGI_2 podría explicar la vasoconstricción pulmonar, la proliferación de las células del músculo liso, y una mayor coagulación asociada al SAHS²³⁰.

1.4.5. ANGIOGÉNESIS Y ATEROGÉNESIS

El SAHS y la angiogénesis tienen en común el estrés oxidativo y la inflamación implicados en la disfunción endotelial²³¹ que finalmente podría desembocar en enfermedades cardiovasculares.

La aterosclerosis es un daño progresivo caracterizado por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las arterias largas. Debido a las diferencias en el flujo dinámico de la sangre, hay áreas de la vasculatura más propensas a la formación de la lesión como las ramificaciones o zonas de bifurcación²³². Los procesos que caracterizan la formación de la aterosclerosis son principalmente tres:

- 1) Proliferación de células del músculo liso, macrófagos y linfocitos T.
- 2) Formación por parte de las células del músculo liso del tejido conectivo en la matriz, que comprende fibras elásticas, colágeno y proteoglicanos.
- 3) Acumulación de lípidos y colesterol libre y esterificado en la matriz y células asociadas.

En la aterosclerosis la inflamación participa desde el inicio de la lesión hasta las complicaciones trombóticas, participando también en la progresión de la placa²³³⁻²³⁵. Una vez los monocitos están adheridos al endotelio vascular, penetran la línea endotelial y entran a la capa íntima de la pared del vaso por diapédesis entre las células endoteliales. Este proceso requiere de un gradiente quimioatrayente como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) o las LDL modificadas. En la iniciación de la aterosclerosis tanto el NF- κ B como el HIF-1 juegan un papel importante. El NF- κ B regula tanto la transcripción de enzimas que modifican las LDL, como la expresión de la MCP-1. Además, las LDL modificadas activarán al factor de transcripción HIF-1²³⁶. En la capa íntima de los vasos, los monocitos maduran a macrófagos, los cuales aumentan la expresión de receptores y fagocitan lipoproteínas modificadas. Los ésteres de colesterol acumulados en el citoplasma activan a los macrófagos dando lugar a las células espumosas. Estas células son características de los estadios tempranos de la aterosclerosis. Los macrófagos producen factores de crecimiento y citocinas que amplifican la señal proinflamatoria. Los linfocitos T también migran a la capa íntima produciendo citocinas proinflamatorias que amplifican la actividad inflamatoria colaborando en la formación de la placa de ateroma. La placa de ateroma desarrolla canales microvasculares con función nutritiva, como resultado de la neovangiogénesis promoviendo el crecimiento de la placa. En la progresión del ateroma la placa aumenta de tamaño proyectándose al lumen arterial impidiendo el flujo de sangre²³⁷.

Los mecanismos involucrados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares asociados al SAHS, podrían ser debidos a la activación de estos factores de transcripción (NF- κ B, HIF-1) que promoverán la acumulación leucocitaria y la alteración de mediadores vasoactivos que pueden perjudicar la función de la célula endotelial y promover el proceso aterosclerótico^{73,238-240} (Figura 16).

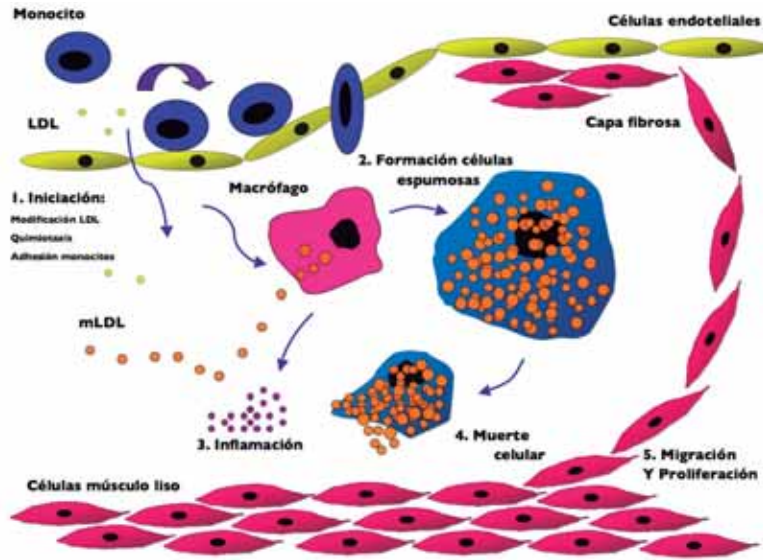


Figura 16. Proceso aterosclerótico.

1.5. MODELOS EXPERIMENTALES

Los modelos experimentales de hipoxia intermitente se han desarrollado para caracterizar los mecanismos involucrados en el desarrollo del SAHS y las patologías asociadas, los cuales intentan mimetizar el patrón de hipoxemia que se observa en pacientes con SAHS. Los pacientes con SAHS tienen apneas repetidas durante la noche. Cada apnea tiene una duración mínima de 10 s, sin embargo, la duración media de la apnea en los pacientes es aproximadamente de 20 s²⁴¹. El grado de hipoxia asociada varía considerablemente entre pacientes, pero cada apnea está asociada con desaturaciones de la oxihemoglobina arterial de al menos 4 % seguida por la restauración a niveles normales²³. Los diferentes modelos de hipoxia crónica recurrente que han sido desarrollados en animales y estudiados en humanos se muestran ampliamente en la Tabla 8.

Estudios en animales

En los modelos animales de hipoxia intermitente, generalmente, es inducida alternando el gas inspirado desde cortos periodos de hipoxia (20-60 s) a periodos de normoxia (45-90 s)^{96,99,242,243}. Durante los periodos de hipoxia, la fracción de oxígeno inspirado (F_{iO_2}) oscila desde 3 % al 10%. La hipoxia intermitente de corto periodo dura desde unas pocas horas, mientras que la hipoxia intermitente crónica continúa desde 5 a 8 horas por día hasta entre 14 y 35 días.

Estudios en humanos

Los estudios que se realizan en humanos incluyen periodos de hipoxia intermitente agudos o crónicos. Para producir hipoxias intermitentes de periodos cortos generalmente se utilizan 30 s de hipoxia o apneas voluntarias intercaladas con normoxia durante 20-60 min²⁴⁴⁻²⁴⁶. Para el estudio de la hipoxia intermitente crónica se realizan exposiciones individuales de una hora diaria de hipoxia intermitente (5 min de hipoxia alternada con 5 min de normoxia) durante 2 semanas²⁴⁷.

Comparación de los estudios en animales y en humanos de hipoxia intermitente

Los modelos animales de hipoxia intermitente generalmente mimetizan el SAHS mejor que los modelos humanos por varias razones. Puesto que los animales estudiados son más pequeños que los humanos, cambios en la SaO₂ son más rápidos y de mayor magnitud. En los humanos sanos se requieren periodos más largos de hipoxia para inducir una desaturación en la oxihemoglobina por lo que se requiere un mayor tiempo de estudio. A pesar de que los modelos experimentales de hipoxia intermitente sirven para demostrar las respuestas fisiopatológicas que se observan en los pacientes con SAHS, estos modelos están limitados por el hecho que algunos no incorporan la monitorización del sueño, no están acompañados por apneas o fragmentación del sueño, y no incluyen la exposición a la hipercapnia. La exposición a hipercapnia durante la hipoxia intermitente puede no ser crítica, porque el efecto de la hipoxia intermitente en la presión sanguínea diurna en ratas es similar a pesar de que el nivel de CO₂ esté incrementado o no lo esté²⁴⁸. Sin embargo, la hipoxia hipercápnica conduce a una mayor activación simpática que la hipoxia hipocápnica²⁴⁹. A pesar de estas limitaciones, los modelos de hipoxia intermitente son una herramienta útil para el estudio de los mecanismos implicados en el SAHS y sus patologías asociadas.

Los modelos animales desarrollados hasta la actualidad que demuestran una relación entre el SAHS y la hipertensión arterial corresponden fundamentalmente a los realizados por Phillipson y Fletcher. Phillipson y *col.* desarrollaron un modelo experimental en perros a los que provocaban apneas obstructivas. Al medir los cambios de presión arterial nocturnos y diurnos en el animal, observaron que estos eventos respiratorios inducían hipertensión arterial diurna sostenida, lo cual sugería causalidad²⁵⁰. Sin embargo, en este trabajo no se abordaron los mecanismos que asocian el SAHS a hipertensión arterial y fue realizado en un número escaso de animales. Los estudios realizados por Fletcher y *col.* en un modelo de ratas, se basaban en la hipótesis de que los episodios repetidos de hipoxia/normoxia eran la causa por la cual los pacientes con SAHS, mostraban cifras elevadas de tensión arterial²⁵¹. En este sentido, concluyeron que las hipoxias/normoxias incrementan la tensión arterial, debido a una actividad aumentada del eje renina-angiotensina-aldosterona y del sistema simpático. De todas maneras, en ninguno de estos estudios se simulaban todos los aspectos que acontecen durante las apneas tales como presiones pleurales negativas y no se estudiaron los mecanismos desencadenantes del aumento en la presión arterial.

En consecuencia, es de gran interés científico el desarrollo de un modelo animal donde las diversas variables puedan ser estrechamente controladas no sólo para analizar las consecuencias cardiovasculares finales del SAHS (hipertensión arterial, cardiopatía) sino también para estudiar los mecanismos celulares, moleculares e histológicos. Esto permitiría conocer realmente la entidad patológica y avanzar en su tratamiento etiopatogénico e incluso farmacológico.

Tabla 8. Modelos experimentales.

	SUJETOS	METODOLOGÍA	INTENSIDAD HIPÓXICA	DURACIÓN HIPOXIA
A) HIPOXIA INTERMITENTE AGUDA				
Modelos animales				
Altay y col. (2004)	Ratón Swiss-Webster ND4	Periodos de 12 x 30 s de apnea cada 5 min.; PCO ₂ no controlada	PO ₂ = 40 mmHg	1 h
Modelos humanos				
Xie y col. (2000)	Hombres sanos	Periodos 1 x 20 s de hipoxia-hipercapnia por minuto; N ₂ y CO ₂ añadido para producir un SaO ₂ = 80 % y PCO ₂ = +3 a +5 mmHg	SaO ₂ nadir 80 %	20 min
Cutler y col. (2004a,b)	Hombres y mujeres sanos	1 x 30 s apnea voluntaria por minuto; PCO ₂ no controlada	SaO ₂ nadir 80-85 %	20 min.
Leuenberger y col. (2005)	Hombres y mujeres sanos	1 x 20 s apnea voluntaria end-expiratoria por minuto; PCO ₂ no controlada	SaO ₂ nadir 83.1 ± 1.2 %	30 min.
Tamisier y col. (2005)	Hombres y mujeres sanos	6-10 respiraciones de 100 % N ₂ separado por 3-4 respiraciones de aire ambiente, produciendo 30-40 bajadas en SaO ₂ por hora; PCO ₂ no controlada.	SaO ₂ nadir ~ 85 %	2 h
B) HIPOXIA INTERMITENTE CRÓNICA				
Modelos animales				
Allahdadi y col. (2005)	Ratas Sprague-Dawley	20 ciclos de 5 % O ₂ – 5 % CO ₂ por hora separado por 21 % O ₂ – 0 % CO ₂	SaO ₂ nadir = ~ 70 %	7 h/día; 14 días
Brooks y col. (1997)	Perros	IAH variable. Entre 10-30 periodos de hipoxia por hora de sueño entre las noches 1-7 y de 50-60 acontecimientos después de 14 noches	Intensidad hipoxia no controlada	7 h/día; 14 días
Chen y col. (2005)	Ratas Sprague-Dawley	Periodos 1 x 60 s de hipoxia cada 2 min.; PCO ₂ no controlada	Nadir 4 – 6 % O ₂	8 h/día; 5 días/ semana durante 5 semanas
Dunleavy y col. (2005)	Ratas Wistar	Periodos 2 x 15 s de hipoxia –hipercapnia por minuto; N ₂ añadido para producir nadir 6-8 % O ₂ y pico 10-14 % CO ₂	Nadir PO ₂ = 55-65 mmHg y pico PCO ₂ = 64 mmHg	8 h/día; 21 días
Fletcher y col. (1992a,b,c,1995,1999,2002) Bao y col. (1997), Fletcher (2000)	Ratas Sprague-Dawley	Periodos de 2 x 12 s de hipoxia por minuto; N ₂ añadido para producir nadir 3-5 % O ₂ ; PCO ₂ no controlada	SaO ₂ nadir = ~ 70 % (rango 60-80 %)	8 h/día; 35 días
Greenberg y col. (1999)	Ratas Sprague-Dawley	Periodos 1 x 60 s de hipoxia cada 2 min.; N ₂ añadida para producir nadir 6.5-7 % O ₂ ; PCO ₂ no controlada	Intensidad hipoxia no controlada	8 h/día; 30 días
Julien y col. (2003)	Ratones C57BL/6j	Periodos 2 x 6-7 s de hipoxia por minuto; N ₂ añadido para producir nadir 3-5 % O ₂ ; PCO ₂ no controlada	SaO ₂ nadir 62-79 %	8 h/día; 14 días
Kanagy y col. (2001)	Ratas Sprague-Dawley	Periodos 90 s de hipoxia-hipercapnia cada 90 s; N ₂ y CO ₂ añadido para producir nadir 5 % O ₂ y pico 5 % CO ₂	Intensidad hipoxia no indicada	8 h/día; 11 días
Lai y col. (2006)	Ratas Sprague-Dawley	Periodos de 1 x 30 s de hipoxia cada 45 s; N ₂ añadido para producir nadir 2-6 % O ₂ ; PCO ₂ no controlada	Intensidad hipoxia no indicada	6 h/día; 30 días
Lefebvre y col. (2006)	Ratas Wistar	Periodos 1 x 40 s de hipoxia por minuto; aire-N ₂ mezclado usado para alcanzar 5 % O ₂ ; PCO ₂ no controlado	Intensidad hipoxia no indicada	8 h/día; 35 días
Peng & Prabhakar (2004)	Ratas Sprague-Dawley	Periodos 1 x 15 s de hipoxia cada 5 min.; N ₂ añadido para producir nadir 5 % O ₂ ; PCO ₂ no controlada	Intensidad hipoxia no indicada	8 h/día; 10 días
Phillips y col. (2004,2005)	Ratas Sprague-Dawley	Periodos 1 x 60 s de hipoxia cada 4 min.; N ₂ añadido para producir nadir 10 % =2; PCO ₂ no controlada	Intensidad hipoxia no indicada	12 h/día; 14 días
Tahawi y col. (2001)	Ratas Sprague-Dawley	Periodos 2 x 12 s de hipoxia por minuto; N ₂ añadido para producir nadir 2-3 % O ₂ ; PCO ₂ no controlada	Intensidad hipoxia no indicada	6-8 h/día; 35 días
Modelos humanos				
Foster y col. (2005)	Hombres sanos	Periodos 1 x 5 min. de hipoxia cada 10 min.; aire-N ₂ mezclado usado para alcanzar 12 % O ₂ ; PCO ₂ mantenido a niveles de reposo	SaO ₂ = ~ 90 %	1 h/día; 12 días

2. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

- Objetivo 1: Desarrollar un modelo animal que permita reproducir los fenómenos que acontecen durante las apneas obstructivas recurrentes, lo que permitirá estudiar los mecanismos implicados en el SAHS.
- Objetivo 2: Determinar si el SAHS desencadena un proceso inflamatorio sistémico.
- Objetivo 3: Evaluar el papel de la hipoxia/normoxia y/o el esfuerzo respiratorio en el desencadenamiento del proceso inflamatorio y en la disfunción endotelial.

2.1. ESTUDIO I.

Recurrent obstructive apneas trigger early systemic inflammation in a rat model of sleep apnea.

Nácher M, Serrano-Mollar A, Farré R, Panés J, Seguí J, Montserrat JM.

Respir Physiol Neurobiol 2007;155:93-6.

En pacientes con SAHS la comorbilidad asociada, como puede ser la obesidad, no permite estudiar adecuadamente los diversos factores implicados en la patología. En la actualidad los modelos animales más usados son los modelos de hipoxia/normoxia, los cuales no tienen en cuenta todos los factores que intervienen en la enfermedad. El SAHS está principalmente caracterizado por desaturaciones en la oxihemoglobina y esfuerzos respiratorios.

Teniendo en cuenta ambos factores, desarrollamos un modelo agudo de SAHS en rata que permitiese: 1) Reproducir fielmente los eventos respiratorios obstructivos con sus fenómenos fisiológicos asociados y 2) Analizar marcadores biológicos y cambios histológicos secundarios. Este modelo se basa en una válvula con un segmento colapsable aplicable en la VAS de las ratas, controlado por el ordenador, capaz de imitar las obstrucciones acontecidas en el SAHS. El segmento de la VAS nos permitió inducir hipopneas y apneas obstructivas con flujo y formas de onda de esfuerzo inspiratorio similares a los observados en pacientes con SAHS. Nuestros estudios preliminares demostraron que el modelo animal diseñado reproducía la mayoría de eventos respiratorios que acontecen en humanos.

Con estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue: determinar si los episodios repetidos de apneas recurrentes en un modelo de rata producen la activación de las células endoteliales y el reclutamiento de leucocitos en la microcirculación sistémica.

2.2. ESTUDIO 2.

Role of oxygen desaturation and respiratory effort in an acute animal model of Obstructive Sleep Apnea.

Maria Nácher, Ramon Farré, Josep M. Montserrat, Daniel Navajas, Oriol Bulbena, Anna Serrano-Mollar.

Thorax, en revisión.

Se ha descrito que tanto la hipoxemia como el esfuerzo respiratorio juegan un papel fundamental en el desencadenamiento de un proceso inflamatorio en pacientes con SAHS.

Asimismo, nuestro modelo agudo experimental permite aislar los diferentes factores que intervienen, pues al administrar oxígeno se anula la hipoxemia y queda como único elemento deletéreo la presión pleural negativa.

Sobre estas bases, los objetivos planteados en este trabajo fueron evaluar, en el modelo animal agudo, el papel diferencial que juegan las desaturaciones de oxígeno y los esfuerzos inspiratorios en el inicio de la inflamación sistémica y de la disfunción endotelial.

2.3. ESTUDIO 3.

Rat model of chronic recurrent airway obstructions to study the sleep apnea syndrome.

Farré R, Náchter M, Serrano-Mollar A, Gáldiz JB, Alvarez FJ, Navajas D, Montserrat JM.

Sleep 2007;30:930-3.

Nuestro modelo agudo animal de SAHS es realista en cuanto a que reproduce los eventos que ocurren en humanos, sin embargo encierra un problema fundamental: el SAHS es una enfermedad crónica y en consecuencia nuestro modelo no nos permite extrapolar completamente todos los hallazgos. Además, para abordar los cambios histológicos que se producen en los diferentes órganos diana se hace evidente la necesidad de disponer de un modelo crónico que permita: a) reproducir exactamente los eventos respiratorios; b) que sea no invasivo; c) que el animal lo pueda tolerar 6 h/día durante semanas; d) que permita que el animal duerma y controlar su sueño; e) que permita obtener diversas variables fisiológicas (presión arterial, etc.) f) que se pueda obtener plasma para el estudio de diversos mediadores biológicos durante las diferentes fases del estudio; y finalmente g) que permita efectuar estudios histológicos amplios, al final del estudio.

Teniendo en cuenta estos datos, el objetivo del presente estudio fue desarrollar un modelo crónico en ratas, con el fin de evaluar posibles mediadores implicados en el SAHS, a nivel de disfunción endotelial.

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales de experimentación utilizados fueron ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley (IFFA-CREDO, L'Abresle, France) de 200-250 g de peso al inicio del experimento. Los animales se estabularon en condiciones ambientales constantes de temperatura 21-22 °C, humedad relativa del 70 % y con ciclos de luz oscuridad de 12 h. Los animales se alimentaron con una dieta estándar de pienso AO4 (Panlab, Barcelona) y agua de la red de Barcelona *ad libitum*. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las normas reguladoras de la Unión Europea para modelos de experimentación animal (Directiva 86/609/ECC).

3.2. DESCRIPCIÓN DEL SEGMENTO COLAPSABLE DE LA VAS

El segmento colapsable de la VAS se ideó para inducir eventos obstructivos en ratas. Consistió en dos cámaras cilíndricas idénticas (1,8 mm de alto y 13 mm de diámetro; dimensiones internas) separadas por una membrana flexible circular (132 mm²). El grosor de la pared de la cámara cilíndrica fue de 1,5 mm. La membrana se cortó de un guante de látex de examen convencional (E300-M Safeskin-LPE, Kimberly-Clark, Zaventem, Bélgica). La base de una de las cámaras (a la izquierda en la figura 17) tiene un tubo de 9,5 mm de largo (l) con un diámetro interno (DI) de 1,3 mm para conectar a una fuente de presión externa (P_{ext}). Un tubo (l = 12 mm, DI = 1,3mm) en el centro de la base de la otra cámara (a la derecha en la figura 17) permite la conexión del segmento colapsable en la tráquea del animal. Otro tubo idéntico en esta pared de la cámara está abierto a la atmósfera y actúa como pneumotacógrafo. El diámetro exterior de estos tubos es de 2,5 mm. Un puerto de presión conectado a este tubo permite la medición del flujo de la respiración (V'). Para medir la presión traqueal (P_{tr}) se conecta un puerto de presión en el tubo que conecta el segmento colapsable a la tráquea (Figura 17).

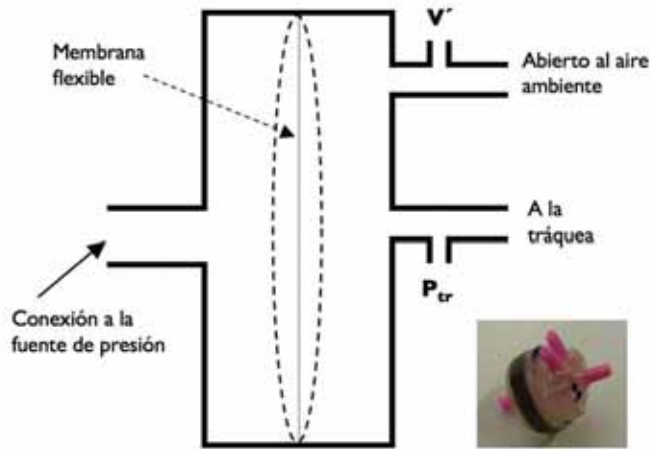


Figura 17. Diagrama del segmento colapsable de la VAS. V' y P_{tr} indican los puertos de presión que miden el flujo respiratorio y la presión traqueal.

La magnitud de la obstrucción dinámica impuesta por el segmento colapsable se controla aplicando una P_{ext} al segmento colapsable mediante una fuente generadora de presión controlada por ordenador (Figura 18). Una pequeña bomba de aire doméstica ($8 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$) (Nathura MK-701, 2,5 W; ECIS, Bressanvido, Italia) genera un flujo pulsante con una amplitud que es controlada por medio de un microordenador y personalizada por circuitos eléctricos. La salida de la bomba se conecta al segmento colapsable de la VAS mediante un tubo flexible ($l = 100 \text{ cm}$, $DI = 2 \text{ mm}$), lo que permite que la bomba se sitúe a una distancia conveniente del segmento colapsable. La salida de la bomba está conectada a un tubo ($l = 100 \text{ cm}$, $DI = 1 \text{ mm}$) que está abierto a la atmósfera (Figura 18). Este dispositivo permite la aplicación controlada de cualquier valor de P_{ext} entre 0 y 80 cm de H_2O .

Las presiones en los puertos del segmento colapsable (V' y P_{tr} en la figura 16) se midieron con transductores piezoresistentes (PC176, Honeywell, Freeport, IL, EE.UU.) conectados a los correspondientes puertos de presión (Figura 17) por cortos y estrechos tubos ($l = 25 \text{ cm}$, $DI = 1 \text{ mm}$). Estas señales se filtran analógicamente (Butterworth, ocho postes, 8 Hz), la muestra se obtiene a 100 Hz y se almacena en el mismo control del microordenador controlando la P_{ext} ejercida al segmento colapsable (Figura 18).

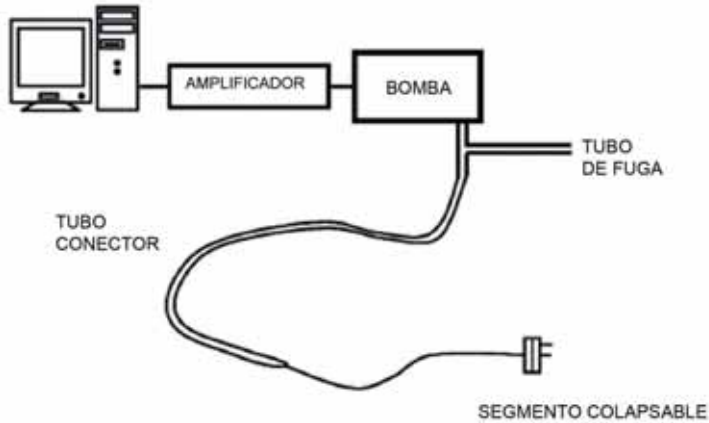


Figura 18. Diagrama del sistema controlado por ordenador para aplicar una presión externa en el segmento colapsable de la VAS.

3.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL SEGMENTO COLAPSABLE DE LA VAS

La estimación del flujo real V' desde la presión registrada en el puerto correspondiente del segmento colapsable requiere una caracterización y calibración previa de la presión-flujo en relación con el tubo que actúa como pneumotacógrafo. Con este fin, una fuente de flujo de aire se utiliza para aplicar diferentes valores de flujo constante inspiratorio y espiratorio a través del puerto traqueal del segmento colapsable ($P_{ext} = 0$). El flujo actual fue medido por valores de un pneumotacógrafo de referencia (Fleisch-000, Metabo, Epalinges, Suiza) situado en series entre la fuente de flujo y el puerto traqueal del segmento colapsable. La caída de presión en el pneumotacógrafo se midió con un transductor diferencial (Validyne MP-45, Northbrook, CA, EE.UU.). La relación entre el flujo y la presión en el puerto del segmento colapsable se caracterizó adecuando una ecuación de modelo parabólico a los datos. La calibración de las ecuaciones correspondientes a la inspiración y espiración se usaron posteriormente para calcular V' de la presión registrada en el puerto correspondiente del segmento colapsable.

Las propiedades mecánicas del segmento colapsable de la VAS se caracterizó en un banco de pruebas. Una fuente de presión negativa controlada conectada al puerto traqueal del segmento colapsable se utilizó para imponer diferentes niveles de P_{tr} negativa constante. La relación entre P_{tr} y V' se evaluó para valores de P_{tr} que van desde 0 a - 60 cm de H_2O y para valores de P_{ext} hasta 50 cm de H_2O . La capacidad del segmento colapsable de inducir obstrucciones estáticas y dinámicas similares a las que se encuentran en los pacientes con SAHS también se llevó a cabo en el banco. El puerto traqueal del segmento colapsable se conectó a un sistema simulando la bomba muscular respiratoria de una rata. Este sistema se basó en un ventilador mecánico de roedores (tipo 683, Harvard Apparatus, Marlborough, MA, EE.UU.). La vía de entrada de aire del ventilador y de su salida al animal fueron ambas conectadas al puerto traqueal del segmento colapsable. El ventilador se fijó a valores típicos

de volumen tidal de la rata (1 ml) y frecuencia respiratoria (100 respiraciones/seg)²⁵². El V' y la P_{tr} durante los ciclos ventilatorios fueron registrados para valores de la P_{ext} que van desde 0 a 50 cm de H_2O . Dado que el segmento colapsable fue realizado en el laboratorio, se investigó la variabilidad al realizar seis segmentos colapsables diferentes hechos en el laboratorio.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL

3.3.1. MODELO AGUDO

3.3.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El animal fue anestesiado con la administración intraperitoneal de Uretano al 10 % con una dosis de 1ml/100 g de peso corporal. Se le realizó una traqueotomía y se le insertó en la tráquea una cánula (2 mm DI) (Figura 19). Después de 15 min de respiración basal, el puerto traqueal del segmento colapsable de la VAS ($P_{ext} = 0$) se conectó a la cánula traqueal de la rata. El animal fue sometido a una serie de eventos obstructivos controlados inducidos por patrones de P_{ext} con amplitud, duración y periodicidad determinados.



Figura 19. Modelo agudo. A)Traqueotomía, tubo endotraqueal insertado a la tráquea y conectado al segmento colapsable.B) Sistema.

3.3.2. MODELO CRÓNICO

3.3.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El modelo crónico (Figura 20) consiste en: 1) una caja transparente cilíndrica de una longitud de 20 cm por un DI de 10 cm (A), 2) En la parte posterior (G y H) existe un embolo que permite reducir el habitáculo para que la rata quede inmovilizada (F). 3) En la parte anterior (C), existe un cono, comunicado con el segmento colapsable (D). En la base del cono existe una membrana (B) que permite la introducción de la cabeza de la rata sin fugas de aire dado

que esta membrana ciñe suavemente el cuello de la rata y además el embolo de la parte posterior (F) evita su retroceso, 4) El segmento colapsable está conectado a una válvula²⁵³ que a su vez está conectada a un sistema con capacidad de generar obstrucciones inspiratorias a la frecuencia y duración bajo control. 5) Los sensores (E) nos informan de los cambios de presión y CO₂ al final de la espiración. La posibilidad del animal de reinhalar su propio CO₂ espirado, se resuelve con un sistema que permite el paso de un flujo continuo de aire por el cono sincronizado eléctricamente con la válvula.

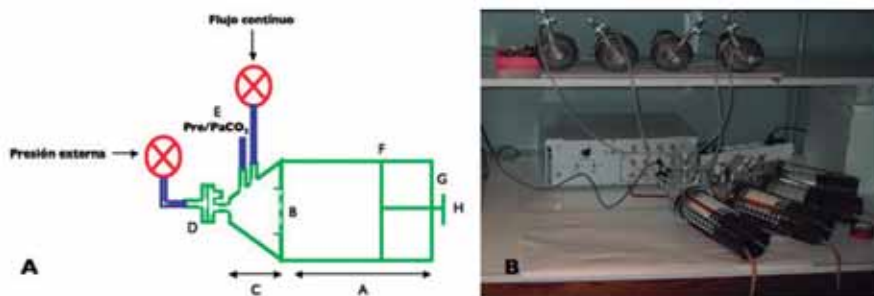


Figura 20. Modelo crónico. A) Diseño del modelo. B) Sistema.

3.4. GRUPOS EXPERIMENTALES

3.4.1. ESTUDIO I.

Experimento I.1

Para el estudio de las interacciones leucocito-célula endotelial se utilizó la técnica de microscopía intravital.

Se realizaron los siguientes grupos experimentales:

1. Grupo *Naive* (n=8): Animales control, solamente fueron manipulados para llevar a cabo la microscopía intravital.
2. Grupo *Sham* (n=8): Los animales fueron anestesiados, traqueotomizados, conectados al segmento colapsable y a las 3 h de experimento se manipularon como el grupo *Naive*.
3. Grupo *Apnea* (n=8): Igual que el grupo 2, pero fue sometido a obstrucciones recurrentes de 5 s/min durante 3 h.

A las 3 h de experimento, los animales fueron sometidos a anestesia, laparotomía transversal, con exteriorización del segmento de colon a estudiar. Para el marcaje de los leucocitos se inyectó por vía subcutáneo el fluorocromo Rodamina 6G. Una vez realizado el registro se sacrificaron.

Experimento 1.2

La evaluación de la inflamación se realizó mediante la determinación de la expresión de P-selectina en el endotelio vascular mediante la técnica de inmunohistoquímica.

Se realizaron los siguientes grupos experimentales:

4. Grupo *Naive* (n=8): Animales control.
5. Grupo *Sham* (n=8): Los animales fueron anestesiados, traqueotomizados, conectados al segmento colapsable durante 3 h.
6. Grupo *Apnea* (n=8): Igual que el grupo 2, pero fue sometido a obstrucciones recurrentes de 5 s/min durante 3 h.

A las 3 h de experimento se recogieron muestras de plasma y tejido (diafragma, pulmón, corazón, colon, íleo, mesenterio, hígado) que parte se guardó a - 80 °C y parte se fijó con formaldehído al 4 % para el posterior estudio histológico.

3.4.2. ESTUDIO 2

Para la consecución de los objetivos del estudio 2 se llevaron a cabo los siguientes grupos experimentales:

1. Grupo *Sham* (n=8): Los animales fueron sometidos a anestesia, traqueotomía y se les conectó al segmento colapsable pero sin obstrucciones recurrentes.
2. Grupo *Apnea* (n=8): Los animales fueron manipulados igual que el grupo *Sham* pero sometidos a obstrucciones de 15 s/min durante 3 h.
3. Grupo *Apnea + O₂* (n=8): Igual que en el grupo 2, pero el animal no sufrió desaturaciones de oxígeno ya que se le aplicó una atmósfera rica en O₂.
4. Grupo *Hipoxia/Normoxia* (n=8): Igual que en el grupo 1, sometido a hipoxia intermitente sin esfuerzo respiratorio. Periodos de 15 s de aire al 5 % de O₂ + periodos de 45 s de aire al 21 % de O₂/min durante 3 h.

El tiempo de exposición de los animales a la obstrucción fue 3 h. Una vez finalizado este periodo, se recogieron muestras de los diferentes grupos: plasma y tejido (diafragma, pulmón, corazón, aorta y músculo) . La respuesta inflamatoria se determinó mediante los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-1 β , y la expresión en la activación del NF- κ B. La disfunción endotelial se evaluó mediante la determinación plasmática de TxB₂ y de 6kPGF_{1 α} .

3.4.3. ESTUDIO 3

Para la consecución de los objetivos del estudio 3 se llevaron a cabo los siguientes grupos experimentales:

1. Grupo *Naive* (n=8): Animales no manipulados.
2. Grupo *Sham* (n=8): Animales manipulados pero no fueron sometidos a obstrucciones recurrentes.
3. Grupo *Apnea* (n=8): Igual que el grupo 2, pero con obstrucciones de 5 s/min, 6h/día, 5 días/semana, durante 4 semanas.

Este estudio preliminar se dividió en dos partes: 1) análisis mecánico del modelo en si mismo y 2) el análisis del modelo con la rata sometida a los diversos eventos respiratorios. Respecto al primero, se observó: el buen funcionamiento del sistema para permitir las oclusiones, el adecuado funcionamiento de los diversos sensores de presión, flujo y CO₂, y el adecuado funcionamiento de las diversas conexiones y del embolo. Respecto al segundo, mediante la valoración del modelo animal se comprobó que: la rata se instalaba perfectamente bien en el modelo quedando inmovilizada.

Tanto el grupo *Sham* como el grupo *Apnea* tuvieron una primera semana de adaptación al sistema previa al experimento. La adaptación consistió en ir aumentando 1 h/día el tiempo de exposición del animal al sistema. Tras 4 semanas de experimento se recogieron muestras de plasma y tejido (diafragma, pulmón, corazón, colon, íleo, mesenterio, hígado). Se evaluó el modelo mediante la variación del peso corporal de los animales y los niveles plasmáticos de corticosterona. La disfunción endotelial se estimó mediante la determinación de los niveles de TxB₂ y de 6kPGF_{1α} en plasma.

3.5. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En todos los grupos experimentales, con el animal anestesiado, se recogieron muestras de sangre y tejidos. Las muestras de sangre se recogieron con heparina y se mantuvieron a 4 °C hasta que fueron centrifugadas a 3000 rpm para obtener el plasma que se mantuvo congelado a - 80 °C hasta su procesamiento posterior. Parte del tejido se congeló inmediatamente después de su obtención con nieve carbónica y se mantuvo a - 80 °C hasta su procesamiento posterior. Además, otra parte del tejido se fijó en formaldehído tamponado al 4 % para realizar el estudio histológico.

3.6. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.6.1. MEDIADORES INFLAMATORIOS

3.6.1.1. CITOCINAS

3.6.1.1.1. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA, INTERLEUQUINA-1 BETA E INTERLEUQUINA-6

Tanto el TNF- α como la IL-1 β y IL-6 son citocinas implicadas en el proceso inflamatorio.

La cantidad total de TNF- α , IL-1 β y IL-6 se midió mediante Quantikine ELISA kits (R&D Biosystems, Abingdon, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6.1.2. FACTOR NUCLEAR KAPPA B

El factor nuclear NF- κ B regula la expresión de un gran número de genes implicados en la inflamación. Su determinación se basa en la detección de la subunidad p50-p65 en el núcleo celular.

Para medir la activación del NF- κ B se hizo una extracción de las proteínas nucleares del tejido mediante un kit de extracción de proteínas nucleares (Active Motif, Rixensart, Belgium). Los niveles de concentración nuclear p65 se determinaron por quimioluminiscencia mediante el kit TransAMTM NF- κ B p65 (Active Motif, Rixensart, Belgium), siguiendo el protocolo del fabricante para ambos kits.

3.6.2. PROTEÍNAS

Las proteínas se determinaron mediante el método colorimétrico de Bradford²⁵⁴, con un reactivo comercial de BioRad (Richmon, CA, USA). Este ensayo se basa en la reacción de una solución ácida del colorante azul de Coomassie en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. La concentración de proteínas en la muestra es directamente proporcional a la absorbancia observada a una longitud de onda $\lambda=595$ nm. Como recta patrón se utilizó una solución de albúmina cuyo punto más concentrado era de 4.75 mg/ml, a partir de esta concentración se realizaron 6 diluciones mitad.

3.6.3. CORTICOSTERONA

La determinación de la respuesta adrenocortical al estrés se midió mediante la hormona corticosterona. Los niveles de corticosterona circulante se determinaron mediante ELISA en muestras de sangre colectadas a lo largo del experimento (Cayman Chemical, Tallinn, Estonia).

3.6.4. MEDIADORES DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

3.6.4.1. TROMBOXANO B₂

La cantidad total de TxB₂, se midió mediante un ensayo inmunoenzimático de competición (EIA) de Cayman (Cayman Chemical, Tallinn, Estonia).

3.6.4.2. 6-KETO-PROSTAGLANDINA F_{1α}

Se midieron en plasma los valores de 6kPGF_{1α} mediante un kit de ELISA (Cayman Chemical, Tallinn, Estonia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.7. MICROSCOPIA INTRAVITAL: ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES LEUCOCITO-ENDOTELIO

Para estudiar las interacciones leucocito-endotelio que se producen *in vivo* (fundamentalmente los fenómenos de rodamiento y de adhesión leucocitaria) en la microcirculación cónica de los animales recurrimos a la microscopía intravital de fluorescencia.

Las técnicas de microscopía intravital permiten el estudio de las interacciones que los leucocitos establecen con el endotelio en un segmento venular (Figura 21). Los leucocitos que interactúan con la superficie endotelial pueden visualizarse directamente, ya que ven reducida su velocidad de forma marcada, con relación a la velocidad media del flujo sanguíneo en la vénula. Para realizar un estudio preciso de las interacciones leucocito-endotelio, primero efectuamos un registro de la vénula durante un minuto mediante una videocámara y, en un segundo tiempo, efectuamos el análisis detallado. Los parámetros de mayor interés son el número de leucocitos adheridos al endotelio (número de leucocitos inmóviles durante más de 30 s, en una porción de 100 μm de vénula), el flujo de leucocitos con interacciones de rodamiento (número de leucocitos que exhiben fenómenos de rodamiento, atravesando un punto determinado de la vénula, por minuto), la velocidad venular media y el *shear rate* (o fuerzas de dispersión, concepto que indica la oposición que efectúa el flujo sanguíneo a las interacciones leucocito-endotelio, y que está relacionado con el diámetro del vaso y la velocidad venular).

Las técnicas de microscopía intravital fueron desarrolladas, en un primer momento, para el estudio del mesenterio, ya que la microcirculación de este tejido puede ser visualizada fácilmente mediante transiluminación^{255,256}. Así, para el estudio del mesenterio se utiliza un microscopio convencional, no siendo necesaria la tinción de los leucocitos con un fluorocromo, ya que los leucocitos adheridos, en rodamiento o migrados al intersticio pueden ser fácilmente identificados. De igual forma, esta técnica permite también el estudio de la permeabilidad vascular, administrando a un animal albúmina marcada con fluoresceína por vía intravenosa. Además del mesenterio, las técnicas de microscopía intravital han sido también aplicadas al estudio de la microcirculación de otros órganos, como el cerebro²⁵⁷, hígado²⁵⁸,

músculo²⁵⁹, piel²⁵⁹, estómago²⁶⁰ y placas de Peyer del intestino delgado^{261,262}. No obstante, la microcirculación cólica no ha sido estudiada hasta hace pocos años, utilizando modelos animales de rata^{263,264}. Para adaptar las técnicas de microscopía intravital al estudio de la microcirculación cólica se tuvieron que realizar algunas modificaciones. Dado que el grosor de la pared del colon no permite el estudio de la microcirculación cólica por transiluminación, se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia y se marcaron los leucocitos administrando el fluorocromo rodamina 6G por vía subcutánea. A pesar de ello, la microscopía intravital del colon no permite visualizar los leucocitos que han emigrado al intersticio. Además, la exteriorización *in vivo* del colon debe de hacerse con mucho cuidado por el peligro de provocar una tracción excesiva del mesocolon y colapsar la microcirculación. Hay que conseguir la estabilidad de la preparación, intentando que la transmisión de los movimientos respiratorios no afecte al registro de las imágenes.

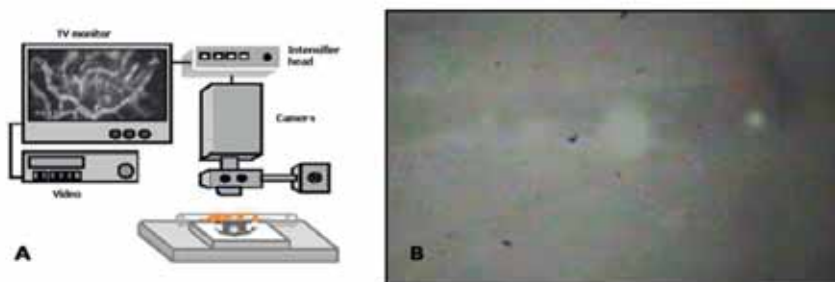


Figura 2.1. Evaluación de las interacciones leucocito-endotelio con microscopía intravital de fluorescencia. A) fotografía que muestra el microscopio invertido de fluorescencia, la cámara y el monitor: B) imagen que muestra la luz de una vénula postcapilar de la pared del colon con leucocitos en rodamiento y adheridos (puntos blancos).

3.8. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las muestras se procesaron según procedimientos estándar para su estudio mediante microscopía óptica. Inmediatamente después de la extracción las muestras se fijaron durante un mínimo de 24 h en formaldehído tamponado al 4 %. Tras la inclusión en parafina, las muestras se cortaron con un microtomo en secciones de 4-5 μm . Se hicieron técnicas inmunohistoquímicas, para el posterior análisis al microscopio.

3.8.1 TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Se valoró la inmunexpresión de P-selectina, como primera molécula de expresión que se secreta a la membrana del endotelio vascular en el inicio de un proceso inflamatorio mediante la técnica de inmunohistoquímica.

Se realizó sobre cortes de 4 μm de colon incluidos en parafina. Las secciones de tejido de colon fueron incubadas con un anticuerpo policlonal de rata anti P-selectina (Pharmingen, San

Diego, CA, EE.UU.), en una dilución 1:50, a 4 °C durante toda la noche. El segundo anticuerpo de conejo biotinilado anti IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.), diluido 1:200, fue incubado durante 1 h a temperatura ambiente. Las uniones inespecíficas se bloquearon con una solución de PBS al 10 % de suero de cabra durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se reveló mediante el sistema estreptoavidina-peroxidasa (Vectastain ABC reagent, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) utilizando una solución de cromogeno al 0.05 % de 3,3'-diaminobenzidina de Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EE.UU.) con un 0.03 % de H₂O₂ durante 8 min. Las muestras se contratiñieron con una tinción de hematoxilina de Harris. Se definió como tinción positiva el marcaje marrón en el endotelio vascular.

3.9. ESTUDIO ESTADÍSTICO

El estudio estadístico se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y seguidamente se determinó el nivel de significación estadística con un test T de Student, $p < 0.05$. Los datos están expresados con valor de la media \pm error estándar de la media (SEM).

4.1. ESTUDIO I.

Recurrent obstructive apneas trigger early systemic inflammation in a rat model of sleep apnea.

Nácher M, Serrano-Mollar A, Farré R, Panés J, Seguí J, Montserrat JM.

Respir Physiol Neurobiol 2007;155:93-6.

Este estudio investiga el posible proceso inflamatorio sistémico desencadenado tras apneas recurrentes. La evaluación de la inflamación sistémica se realizó mediante la técnica de microscopía intravital. Esta técnica nos permite el estudio *in vivo* de las interacciones leucocito-célula endotelial. Para corroborar los resultados obtenidos mediante la microscopía intravital se determinó la expresión de la molécula de adhesión P-selectina en el endotelio vascular mediante la técnica de inmunohistoquímica. Ambos estudios se realizaron en el colon como órgano distal.

Las obstrucciones recurrentes provocaron un incremento significativo en el flujo y número de leucocitos en fase de rodamiento y en el número de leucocitos adheridos. La expresión de P-selectina solo fue regulada en condiciones de obstrucciones recurrentes. La aplicación de obstrucciones recurrentes desencadenó un proceso inflamatorio sistémico. Esta observación se asoció con el aumento en la expresión de P-selectina en el endotelio vascular.

Este modelo experimental de obstrucciones recurrentes demuestra una activación rápida de la célula endotelial, sugiriendo el comienzo de una respuesta inflamatoria.

Short communication

Recurrent obstructive apneas trigger early systemic inflammation in a rat model of sleep apnea

Maria Náchér^a, Anna Serrano-Mollar^b, Ramón Farré^c, Julián Panés^d,
Joaquim Seguí^d, Josep M. Montserrat^{a,*}

^a Sleep Laboratory, Hospital Clinic Provincial-IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain

^b Department of Experimental Pathology, IIBB-CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain

^c Unitat Biofísica i Bioenginyeria, Facultat Medicina, Universitat Barcelona-IDIBAPS, Barcelona, Spain

^d Department of Gastroenterology, Hospital Clinic Provincial-IDIBAPS, Barcelona, Spain

Accepted 8 June 2006

Abstract

Obstructive sleep apnea (OSA) is associated with vascular disorders possibly due to systemic inflammation. To determine whether repeated episodes of OSA in a rat model lead to endothelial cell activation and systemic leukocyte recruitment in the microcirculation. Three experimental groups (apnea, sham and naive) were studied. The apnea group was instrumented and subjected to repeated obstruction for 3 h (rate 60/h, length 5 s) using a special device. The sham group was only instrumented and the naive group was used as a control. Leukocyte–endothelial cell interactions (intravital microscopy) and expression of P-selectin (immunohistochemistry) were determined in colonic venules. The apnea group induced a significant increase in the flux of leukocytes rolling, number of rolling leukocytes and number of adherent leukocytes when compared with the sham or naive groups. P-selectin was up-regulated only in the apnea group. This experimental model of recurrent obstruction demonstrates rapid endothelial cell activation, suggesting the onset of an inflammatory response.

© 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Obstructive apnea; Inflammation; Leukocyte–endothelial cell interaction; Animal model

1. Introduction

Patients with obstructive sleep apnea (OSA) suffer repeated episodes of increased upper airway resistance with partial or complete collapse that leads to profound disturbances in arterial blood gases and sleep architecture. Repeated inspiratory efforts occur during obstructive events until arousal ensues and airway patency is restored. OSA is a prevalent disorder whose clinical manifestation is sleepiness with an increase in the risk of accidents and deterioration in the quality of life (Caples et al., 2005). Moreover, OSA is considered to be a significant risk factor in vascular diseases, although the exact mechanisms involved have not been established. It has been suggested that the up-regulation of inflammatory mediators induced by recurrent obstructive apneas may lead to cardiovascular disease (Lavie, 2003).

Data obtained from patients with OSA suggest that this syndrome may induce an inflammatory response (Fletcher, 2000). However, confounders such as obesity make it difficult to undertake an in-depth study of the general mechanisms and of the various factors that impinge on the course of OSA. Therefore, an animal model mimicking the recurrent upper airway obstructions that characterize OSA would be useful in shedding some light on the mechanisms involved in the pathophysiology of this syndrome.

In this work, our aim was to ascertain whether recurrent upper airway obstructions in a rat model promote the following leukocyte–endothelial cell interactions, namely, leukocyte rolling, firm adhesion, and the subsequent transmigration of leukocytes through the vascular endothelium, resulting in systemic inflammation. To this end, the inflammatory effect of recurrent obstructive apneas was investigated using intravital microscopy to examine the interaction between the leukocytes and the vascular endothelium in the colon microcirculation. An immunohistochemical study of the colon vascular bed was also carried out to characterize the P-selectin expression as

* Corresponding author. Tel.: +34 93 2275746; fax: +34 93 2275746.

E-mail address: jmmontserrat@ub.edu (J.M. Montserrat).

a potential mediator of the primary interaction between the leukocytes and the endothelium.

2. Materials and methods

2.1. Population and study design

Experiments were performed on 24 male Sprague–Dawley rats (250–275 g). The study was approved by the Animal Research Ethical Committee of the University of Barcelona. Experimental animals were randomly distributed into three groups ($n=8$): apnea, sham and naive group. The apnea group was anesthetized (urethane 1.2 g/kg), a tracheotomy was performed and a cannula (2 mm i.d.) was inserted into the trachea. The inlet of the cannula was connected to an upper airway collapsible segment (Farré et al., 2003) and the animal was subjected to 60 obstructive apneas per hour with a duration of 5 s each for a period of 3 h. The sham group was instrumented in the same way as the apnea group but no obstruction was applied by the upper airway collapsible segment. The rats of the naive group (control) were simply anesthetized. At the end of this experimental procedure, $n=4$ were used for intravital microscopy studies and $n=4$ were sacrificed and colonic tissue samples were obtained and processed for immunohistochemical studies.

2.2. Model of recurrent obstructive apneas

Recurrent obstructive apneas in rats were applied by means of a previously described computer-controlled collapsible segment based on a Starling resistor placed at the upper airway of the animal (Farré et al., 2003). Briefly, the collapsible segment consisted of two identical cylindrical chambers separated by a circular flexible membrane. The base of one of the chambers had a tube for connection to a computer-driven source of external pressure which produced controlled obstruction of the segment. A tube at the center of the base of the other chamber allowed connection of the collapsible segment to the rat trachea. Another tube in this chamber wall was open to the atmosphere and acted as a pneumotachograph to monitor breathing flow. A pressure port in the tube connecting the collapsible segment to the trachea enabled us to measure tracheal pressure. Arterial oxygen saturation in the rat leg was monitored by pulse oximetry (504 Inc. Wauseda, WI, USA).

2.3. Fluorescence intravital microscopy study

Leukocyte–endothelial cell interactions in colonic submucosal and lamina propria venules were characterized by using intravital microscopic techniques, as previously described (Seguí et al., 2004). The rat abdomen was opened via a midline incision, and a segment of the distal colon was chosen for microscopic examination. Rats were then placed on an adjustable microscope stage, and the colon was extended over a nonautofluorescent coverslip that allowed observation of a 2 cm × 2 cm segment of tissue. An inverted microscope (Diaphot 300, Nikon, Tokyo, Japan) with a CF Fluor 40× objective lens (Nikon)

was used. A charge-coupled device (CCD) camera (model XC-77, Hamamatsu Photonics, Japan) with a C2400 CCD camera control unit and a C2400-68 intensifier head mounted on the microscope projected the image onto a monitor (Trinitron KX-14CP1, Sony, Tokyo, Japan). The images were recorded using a videocassette recorder (SR-S368E, JVC, Tokyo, Japan). Leukocytes were in vivo-labeled by s.c. injection of Rhodamine 6G (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) which fluorescence was visualized by epi-illumination at 510–560 nm, using a 590-nm emission filter. Venules ranging between 15 and 50 μm in diameter (D) were studied. The flux of rolling leukocytes, number of rolling leukocytes, and number of adherent leukocytes in 100 μm venule were determined off-line after playback of videotapes. Venular blood flow (Vbf) was calculated from the product of mean white blood cell velocity (free-flowing leukocytes (ffv)) and microvascular cross-sectional area, assuming cylindrical geometry, using the empirical relationship of $Vbf = ffv/1.6$. Venular wall shear rate (γ) was calculated based on the Newtonian definition, $\gamma = 8 (Vbf/D)$. In each animal, 3–6 venules were examined, and the values of rolling and adherent leukocytes, leukocyte rolling velocity and venular wall shear rate were calculated as the mean of each parameter in all venules examined (House and Lipowsky, 1987).

2.4. Immunohistochemistry study

Immunohistochemistry was used to examine the expression of P-selectin. Colon tissue sections were incubated with primary rabbit polyclonal antibody against rat P-selectin (Pharmingen, San Diego, CA, USA), working dilution 1–50, at 4 °C overnight. The secondary biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), diluted 1–200, was incubated for 1 h at room temperature. Reaction was developed with the immunoperoxidase technique (Vectastain ABC reagent, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) using as chromogen a 0.05% solution of 3–39 diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI, USA) with 0.03% H_2O_2 . Sections were counterstained with Harris hematoxylin. Positive staining was defined as a venule displaying a brown reaction product.

2.5. Statistics

Data are expressed as mean (S.E.) values. Statistical analysis was carried out by ANOVA. When differences were significant, an appropriate post hoc test including the Newman–Keuls test (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was performed. A p -value of <0.05 was considered significant.

3. Results

Fig. 1 shows the signals recorded during a typical obstructive apnea. During the event, flow was nil, tracheal pressure swings increased progressively and an associated marked fall in SaO_2 ensued.

Fig. 2A shows representative intravital microscopy pictures of colon vessels of the apnea, sham and naive groups. The apnea

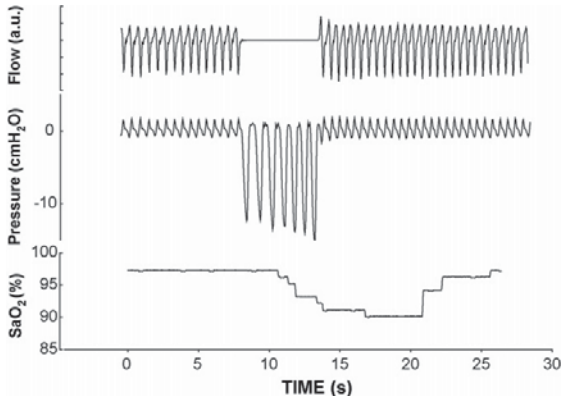


Fig. 1. Typical obstructive apnea event. During the apnea, flow (arbitrary units; positive during inspiration) is nil and inspiratory pressure swings increase. Arterial oxygen saturation falls and recovers as a consequence of the obstructive apnea.

group showed increased leukocyte–endothelial cell interactions compared to the naive or sham groups. Fig. 2B shows the leukocyte rolling flux (57.1 ± 15.9 , 6.1 ± 2.5 , 1.0 ± 0.2 cells/min) of the apnea, sham and naive groups, respectively; the number of rolling leukocytes (1.2 ± 0.4 , 0.0 ± 0.0 , 0.0 ± 0.0 cells/100 μm) and the number of adherent leukocytes (1.2 ± 0.4 , 0.1 ± 0.1 , 0.0 ± 0.0 cells/100 μm). All the three parameters were significantly increased ($p < 0.05$) in the apnea group when compared with the sham or naive groups. No differences in venular wall shear rate and venular blood flow were observed among groups. Fig. 2C shows examples of the immunohistochemistry images of P-selectin expression, which could only be observed in the obstructive apnea group.

4. Discussion

The present study shows that 3 h of exposure to recurrent obstructive apneas in rats induces an early leukocyte–endothelial cell interaction with firm adhesion in the venular endothelium. These findings provide evidence of a causal link between repet-

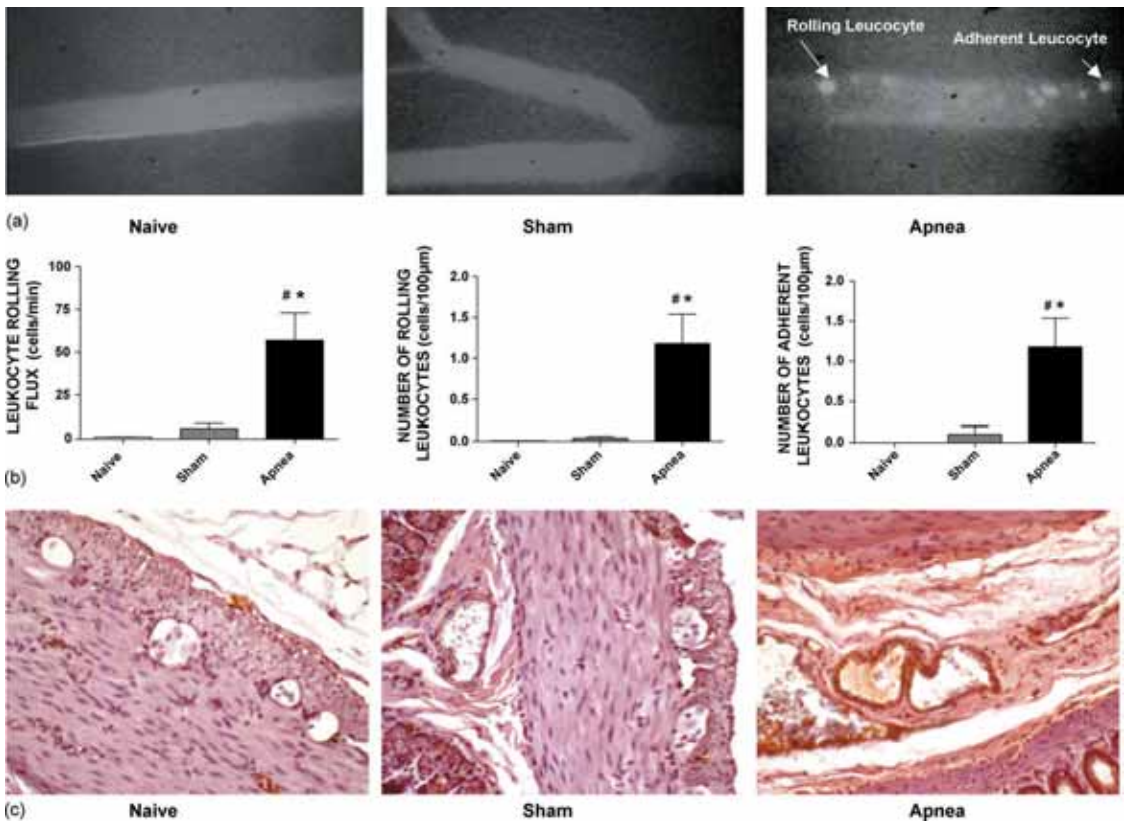


Fig. 2. (A) Shows an increase in the number of rolling and adherent leukocytes on the apnea group with respect to the sham or the naive groups. (B) Shows the main result of the intravital microscopy. In the colon, the apnea group showed significant differences compared to sham and naive groups with respect to: leukocytes rolling flux, number of rolling leukocytes and number of adherent leukocytes. Data are means \pm S.E.M. of four animals per group ($^{\#}p < 0.05$ vs. sham and $^*p < 0.05$ vs. naive). (C) Shows the immunohistochemistry of P-selectin expression on the endothelium in the three groups of rats. Observable expression only occurs in the obstructive group.

itive apneas and the onset of leukocyte adhesion, triggering a primary interaction between the leukocytes and the endothelium. The systemic inflammation could play a significant role in the etiology of vascular diseases such as atherosclerosis and hypertension (Hernandez-Presa et al., 1997).

Other animal models have been used to study the pathophysiology of OSA. Subjecting rodents to intermittent hypoxia by modifying the composition of the breathing gas has been the most commonly used model to assess the consequences of periodic oxygen desaturation in OSA (Fletcher, 2000). With the above approach, changes in systemic arterial pressure were detected despite the fact that the mechanisms of inflammatory processes due to obstructive events were not considered. In contrast, our model of recurrent obstructive apnea is more suitable for mimicking the events experienced by patients with OSA, who undergo intermittent hypoxia/hypercapnia events together with intense inspiratory efforts.

In the sequential adhesive cascade that mediates the trafficking of leukocytes from the blood to the inflammation sites, leukocyte activation precedes firm adhesion and is mediated by earlier interactions of leukocytes with selectins and chemoattractants. Data in the literature suggest that the inflammation detected could be attributed to the two main stimuli involved: hypoxia-reoxygenation and the strenuous inspiratory efforts (Vassilakopoulos et al., 2002; Prabhakar, 2001). Our model could be used to quantitatively correlate the conventional indices that characterize OSA severity (e.g., apnea/hypopnea index) with its corresponding biological effects.

In conclusion, we demonstrated that repetitive obstructive apneas akin to the ones in OSA induce a leukocyte–endothelial cell interaction, triggering a systemic inflammatory response.

Acknowledgements

This work was supported in part by Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2004-00684 and SAF 2005-0110), SEPAR, CARBUROS FUCAP, and Red Respira CO3/11 (Ministerio de Sanidad y Consumo).

References

- Caples, S.M., Gami, A.S., Somers, V.K., 2005. Obstructive sleep apnea. *Ann. Intern. Med.* 142, 187–197.
- Farré, R., Rotger, M., Montserrat, J.M., Calero, G., Navajas, D., 2003. Collapsible upper airway segment to study the obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 136, 199–209.
- Fletcher, E.C., 2000. Effect of episodic hypoxia on sympathetic activity and blood pressure. *Respir. Physiol.* 119, 189–197.
- Hernandez-Presa, M., Bustos, C., Ortego, M., Tunon, J., Renedo, G., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., 1997. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 95, 1532–1541.
- House, S.D., Lipowsky, H.H., 1987. Leukocyte-endothelium adhesion: microhemodynamics in mesentery of the cat. *Microvasc. Res.* 34, 363–379.
- Lavie, L., 2003. Obstructive sleep apnea syndrome, an oxidative stress disorder. *Sleep Med. Rev.* 7, 35–51.
- Prabhakar, N.R., 2001. Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 90, 1986–1994.
- Seguí, J., Gironella, M., Sans, M., Granell, S., Gil, F., Gimeno, M., Coronel, P., Pique, J.M., Panes, J., 2004. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J. Leukoc. Biol.* 76, 537–544.
- Vassilakopoulos, T., Katsaounou, P., Karatza, M.H., Kollintza, A., Zakyntinos, S., Roussos, C., 2002. Strenuous resistive breathing induces plasma cytokines: role of antioxidants and monocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1572–1578.

4.2. ESTUDIO 2.

Role of oxygen desaturation and respiratory effort in an acute animal model of Obstructive Sleep Apnea.

Maria Nácher, Ramon Farré, Josep M. Montserrat, Daniel Navajas, Oriol Bulbena, Anna Serrano-Mollar.

Thorax, en revisión.

Este estudio evalúa el papel diferencial que las desaturaciones de oxígeno y los esfuerzos inspiratorios juegan en la inducción de una inflamación sistémica y una disfunción endotelial en un modelo animal agudo.

El proceso inflamatorio se determinó midiendo los niveles plasmáticos de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α y IL-1 β al final del experimento. Además se determinó la activación del NF- κ B como mediador inflamatorio. La disfunción endotelial se evaluó mediante la cuantificación de TxB₂ y 6kPGF_{1 α} en plasma.

Se observó un aumento significativo en los niveles plasmáticos de TNF- α y IL-1 β en cada uno de los grupos experimentales comparado con el grupo control. La activación del NF- κ B en el pulmón se incrementó tras obstrucciones recurrentes y en condición de hipoxia/normoxia. En el tejido de diafragma, la activación del NF- κ B sólo fue significativa en condiciones de obstrucciones recurrentes. Se encontró un aumento significativo en la relación TxB₂/6kPGF_{1 α} en condiciones de obstrucciones recurrentes y de hipoxia/normoxia, lo que sugiere un acción vasoconstrictora dominante.

ROLE OF OXYGEN DESATURATION AND RESPIRATORY EFFORT IN AN ACUTE ANIMAL MODEL OF OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA.

Maria Nácher BSc^{1,2}, Ramon Farré PhD^{3,4}, Josep M. Montserrat MD^{1,4}, Daniel Navajas PhD^{3,4}, Oriol Bulbena PhD², Anna Serrano-Mollar PhD^{2,4}.

¹Sleep Lab, Hospital Clinic Provincial-IDIBAPS, Barcelona, Spain; ²Department of Experimental Pathology, IIBB-CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain; ³Unitat Biofísica i Bioenginyeria, Facultat Medicina, Universitat Barcelona-IDIBAPS, Barcelona, Spain; ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Enfermedades Respiratorias, Bunyola, Spain.

Running title: Hypoxia, normoxia, respiratory effort and obstructive apnea.

Subject Code: Sleep-disordered breathing: biological consequences.

Keywords: Obstructive apnea, inflammation, endothelial dysfunction, respiratory effort, animal model.

Word count: 2723

Mailing address: Dr. J.M Montserrat
Laboratori de la Son. Servei de Pneumologia
C/ Casanoves, 170
E-08036 Barcelona, Spain
Fax: 34-93-2275746; Phone: 34-93-2275746
E-mail: jmmontserrat@ub.edu



ABSTRACT

Background: Obstructive sleep apnea (OSA) is a common disorder that is a risk factor for cardiovascular disease. To avoid the common confounders found in such cases, an animal model mimicking the recurrent upper airway obstructions characterizing OSA is a useful way to investigate the mechanisms involved in the consequences of this syndrome. **Aim:** To assess the differential role that oxygen desaturations and inspiratory efforts play in the potential induction of systemic inflammation and endothelial dysfunction in an acute animal model. **Methods:** A computer-controlled collapsible segment was placed in the upper airway of an anaesthetized rat to induce recurrent airway obstructions. Four experimental groups were studied (n=8 each): 1) Sham: instrumented with no obstructions; 2) Apnea group: subjected to repetitive obstructions (15 s each, 60/h, for 3 h); 3) Apnea+O₂ group: subjected to the same obstructions and breathing an oxygen-enriched air to avoid periodic desaturations; and 4) Hypoxia/Normoxia group: subjected to intermittent hypoxia by modifying the composition of their breathing. Inflammatory, endothelial mediators were measured as outcomes, along with NF-κB in the lung and diaphragm. **Results:** Tumor necrosis factor-α and Interleukin-1β significantly increased in each of the groups compared with the Sham group. NF-κB binding activity in the lung was increased in the Apnea and Hypoxia/Normoxia groups, compared to the Sham animals, but not in the Apnea+O₂ group. In diaphragm tissue, NF-κB activation was only significant in the Apnea group compared to the Sham group. A significant difference was found in the ratio Thromboxane-B₂/6-keto-Prostaglandin-F_{1α} between the Apnea and Hypoxia/Normoxia groups compared to the Sham group, while this was not the case with the Apnea+O₂ group. **Conclusions:** Although respiratory effort contributes to inflammation, oxygen desaturations play a major role in the induction of systemic inflammation and, particularly, of endothelial dysfunction in OSA.



INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA) is the most common condition of sleep-disordered breathing, affecting between 5-15% of the population (1). It is characterized by intermittent episodes of partial or complete obstruction of the upper airway during sleep, causing disruption to normal ventilation and sleep architecture. It is typically associated with excessive daytime sleepiness, snoring and witnessed apneas. OSA is considered a cardiovascular risk factor (2). One of the most convincing cardiovascular consequences on records is the association between OSA and hypertension (3;4).

Inflammation and endothelial dysfunction (1) have been considered as possible mechanisms (5). Current evidence suggests that OSA is associated with a group of pro-inflammatory (6;7) and pro-thrombotic factors (8) that have been identified as being important in the development of cardiovascular disorders. However, the exact origin of these biological mediators is not clear. Associated comorbidity constitutes one of the most important limitations, although this can be avoided, at least partially, by working on an animal model (as we have previously described (9)) that mimics the recurrent upper airway obstructions characterizing OSA and makes it possible to study various factors that appear during OSA, such as heavy intrathoracic pressure (8) and/or intermittent hypoxemia.

It has been reported that OSA increases plasma cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) (10). In the vascular endothelium, TNF- α presents pro-coagulant activity and activates endothelial cells in order to produce IL-1 β ; it can also stimulate the secretion of adhesion molecules that take part in the adherence of leukocytes and platelets to the surface of the endothelium. Another pleiotropic effect of TNF- α is the synthesis of vasoconstriction and vasodilatation mediators such as thromboxane-A₂ (TxA₂) and prostacyclin (PGI₂) (11). These eicosanoids are mediators of inflammation and are produced by several inflammatory cells. The TxA₂ is a powerful starting agent of platelet aggregation, and it has been identified in the synthesis of platelets and other tissues. On the other hand, it is a potent vasoconstrictive and consequently reduces blood flow. PGI₂ has vasodilatory effects and acts naturally against platelet aggregation. An imbalance of vasoconstrictor and vasodilator mediators has been implicated in the pathogenesis of hypertension.

Recent studies exploring the link between OSA and vascular disease have focused on the role of the transcription factor nuclear kappa B (NF- κ B). In addition, it has been reported that circulating blood monocytes produce the inflammatory response in OSA patients, with NF- κ B activation triggered by chronic intermittent hypoxia (12;13). The pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β (14), constitute one of the signalling pathways that regulate NF- κ B activity; they activate the NF- κ B, which in turn produces TNF- α and IL-1 β , forming a short-looped positive feedback system. In order to know the source of these pro-inflammatory cytokines, we measured the NF- κ B in both the target tissues involved in recurrent obstructive apneas: the lung and the diaphragm.

However, the role of the individual factors those appear during OSA, such as oxygen desaturation and inspiratory effort, have not been elucidated. In the current investigation, we

have assessed the different roles that oxygen desaturation and inspiratory effort play in the potential induction of inflammatory response and triggering of endothelial dysfunction in an acute animal model of OSA.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Pathogen-free, 32 male Sprague-Dawley rats, weighing 350-375 g, were obtained from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). The rats were housed in a controlled environment and fed rodent chow (A04; Panlab, Barcelona, Spain) and tap water *ad libitum*. This study conformed to European Community (Directive 86/609/EEC) and Spanish guidelines for the use of experimental animals and it was approved by the institutional committees of animal care and research.

2.2 Model of recurrent obstructive apneas

Recurrent obstructive apneas were applied to rats by means of a previously described computer-controlled collapsible segment, based on a Starling resistor placed in the animal's upper airway (15). Briefly, the collapsible segment consisted of two identical cylindrical chambers separated by a circular flexible membrane. The base of one of the chambers had a tube connected to a computer-driven source of external pressure that produced controlled obstruction of the segment. A tube at the center of the base of the other chamber connected the collapsible segment to the rat trachea. Another tube in this chamber wall was open to the atmosphere and acted as a pneumotachograph to measure breathing flow. A pressure port in the tube connecting the collapsible segment to the trachea enabled us to measure tracheal pressure. Arterial oxygen saturation in the rat's leg was monitored by pulse oximetry (504 Inc Wauseda, WI, USA).

2.3 Experimental groups

Experimental animals were randomly divided into four groups (n=8 for each group): Sham, Apnea, Apnea+O₂ and Hypoxia/Normoxia groups. The animals were anesthetized (Urethane 1.2 g/kg, intraperitoneal), a tracheotomy was performed, a cannula (2 mm ID) was inserted into the trachea, and the inlet of the cannula was connected to an upper airway collapsible segment (9). In the Sham group, no obstructions were applied via the upper airway collapsible segment (Figure 1a). In the Apnea group, the animals were subjected to 60 obstructive apneas per hour, with a duration of 15 s/min for a period of 3 h; the respiratory effort produced was at least three times greater than the basal pressure (Figure 1b). The Apnea+O₂ group was

treated in the same way as the Apnea group, but a rich atmosphere of oxygen was applied, to avoid oxygen desaturations (Figure 1c). The Hypoxia/Normoxia group was instrumented by a special device, using a head cylinder, which induces hypoxia and normoxia periods at a rate of 60 per hour, the same rate as the apneas; cycles were applied for a period of 3 h, consisting of a hypoxic phase (ambient O₂ concentration of 5%) of 15 s, followed by a rapid return to an ambient O₂ of 21 % for 45 s (Figure 1d). At the end of the experiment the animals were killed by exsanguination from the abdominal aorta.

2.4 Biochemical assays in plasma

Blood was collected from the aorta, samples were put into microcentrifuge tubes containing EDTA, placed on ice and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The plasma was collected and frozen at - 80 °C until used.

TNF- α and IL-1 β concentration was measured by a commercial solid-phase sandwich enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) from R&D Systems (Minneapolis, MN, U.S.A.), following the manufacturer's protocol.

Circulating levels of TxB₂ and 6kPGF_{1 α} (stable metabolites of TxA₂ and PGI₂) were measured with commercially available high-sensitivity ELISA kits (Cayman Chemical, Tallinn, Estonia), following the manufacturer's protocol.

2.5 Nuclear protein extraction and determination of NF- κ B binding activity.

Samples of lung and diaphragm tissue were obtained and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at - 80 °C for further studies. For the measurement of NF- κ B activation, nuclear fractions were prepared from lung and diaphragm tissue using a Nuclear Extract Kit (Active Motif, Rixensart, Belgium), following the manufacturer's protocol.

Levels of nuclear p65 concentrations were determined by TransAMTM NF- κ B p65 Chemi kit (Active Motif, Rixensart, Belgium), following the manufacturer's protocol.

2.6 Statistics

Data are expressed as mean \pm SEM values, with 95% confidence intervals (CI). Statistical analysis was carried out by ANOVA. When differences were significant, an appropriate post hoc test, including the Newman-Keuls test (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA), was performed. A p value of < 0.05 was considered significant.



3. RESULTS

3.1 Inflammatory biochemical markers

The inflammatory response was reflected by an increase in TNF- α and IL-1 β . Both markers showed a significant increase in all the experimental groups, compared to the Sham group (Figure 2a, 2b). These data indicate that respiratory effort and recurrent hypoxia/normoxia induce systemic inflammation.

3.2 Nuclear factor- κ B binding activity

NF- κ B binding activity was increased in nuclear fractions from lungs in both the Apnea and the Hypoxia/Normoxia group compared to the Sham animals. This enhancement in NF- κ B activity was not observed in the Apnea+O₂ group (Figure 3a). Figure 3b shows NF- κ B activation in nuclear fractions from diaphragm tissue, and indicates that there was a significant increase only in the Apnea group, compared to the Sham group.

3.3 Vascular endothelial markers

As an indication of endothelial dysfunction, TxB₂ and 6kPGF_{1 α} were measured in plasma samples. The levels of TxB₂ showed a significant increase in both the Apnea and Hypoxia/Normoxia group, compared to the Sham group. However, the TxB₂ level in the Apnea+O₂ group did not show any significant increase compared to the Sham group (Figure 4a).

The levels of 6kPGF_{1 α} showed a significant decrease in both the Apnea and Hypoxia/Normoxia group, compared to the Sham group. This decrease in the 6kPGF_{1 α} levels was not found in the Apnea+O₂ group, compared to the Sham group (Figure 4b).

An increase in TxB₂ accompanied by a decrease in the 6kPGF_{1 α} – which translates into an increase of the TxB₂/6kPGF_{1 α} ratio, an index of a vasoconstrictor effect – was observed in the Apnea and Hypoxia/Normoxia experimental groups, compared to Sham animals. An oxygen-rich atmosphere reversed these changes.



4. DISCUSSION

In our study we have distinguished between the different stimuli that contribute to the pathology of OSA, in order to identify the importance of these stimuli in the induction of systemic inflammation and endothelial dysfunction. There is a growing body of evidence in clinical literature that indicates that OSA is associated with increased levels of pro-inflammatory cytokines and subsequent increased endothelial dysfunction, which could lead to cardiovascular disease (5;16). However, the mechanism that triggers the inflammatory process in OSA patients does not differentiate between hypoxia/normoxia and respiratory effort. Both of these could play an important role in the development of cardiovascular diseases. On the one hand, it has been reported in experimental models that hypoxia/normoxia without respiratory effort can trigger a vascular disease (17;18). On the other hand, the respiratory effort produced by intrathoracic pressure can also trigger a vascular disease (2). The data from our study show that 3 hours of recurrent obstructive apneas were associated with an increase in inflammatory mediators, in line with various studies of OSA patients, where increased levels of circulating TNF- α and IL-1 β have been identified (19;20). This increase occurs when the hypoxia/normoxia or respiratory effort occurs individually. It has also been reported that strenuous resistive breathing increases plasma cytokines such as TNF- α and IL-1 β (10). Furthermore, we have observed that apneas and isolated hypoxia/normoxia episodes induce endothelial dysfunction, while respiratory effort alone does not do this. Finally, we have found an activation of NF- κ B triggered by recurrent obstructive apneas, in the lung as well as in the diaphragm, where hypoxia/normoxia and respiratory effort occur in conjunction. Isolated hypoxia/normoxia in lung tissue also contributes to NF- κ B activation; however, respiratory effort does not activate the NF- κ B in any of these tissues.

Inflammatory mediators such as TNF- α and IL-1 β are regulated by NF- κ B, but they are also activators of the NF- κ B pathway. Thus, the activation of NF- κ B may be a molecular mechanism in OSA pathology. It has been observed that subjects with OSA have a selective activation of NF- κ B in monocytes, compared with control subjects (7;12;21;22). However, the studies related to OSA patients cannot determine the importance of different stimuli in the target organs involved in the inflammatory response. In OSA patients, the lung is the organ that experiences the most oxygen desaturation and intrathoracic pressure, and the diaphragm is also a target tissue, because of its involvement in the respiratory effort. Our experimental model allowed us to determine the importance of the different stimuli in the various organs. It is important to take into account that the respiratory effort in this experimental model has a normal oxygen concentration, whereas experimental models of resistive breathing are always linked with tissue hypoxia. These data suggest that oxygen desaturation plays the major role in the activation of NF- κ B in the lung, whereas in the diaphragm the activation of NF- κ B depends on both stimuli being present simultaneously. These results could be explained by the sensitivity of the lung to changes in oxygen concentration, as it is the first organ to be exposed to hypoxia/normoxia, which induces oxidative stress, triggering the activation of the NF- κ B pathway (23-25). In contrast, 3 h of hypoxia/normoxia in the diaphragm would not be sufficient to trigger NF- κ B activation. Therefore, it seems reasonable to assume that the activation of inflammatory pathways in the diaphragm is due to the joint presence of



the factors of hypoxia/normoxia and respiratory effort. Moreover, exaggerated swings in intrathoracic pressure damage the lung through the mechanical effects of an increase in respiratory effort, leading to large decreases in inspiratory intrathoracic pressure; these events, together with oxygen desaturation, also activate the NF- κ B inflammatory pathway. Oxidative stress may be considered the major stimulus for NF- κ B activation, which is caused by resistive breathing (26). Our results showed an absence of NF- κ B activation in the lung and diaphragm, because oxidative stress does not occur during respiratory effort. Therefore, the increased levels observed in TNF- α and IL-1 β as a result of respiratory effort alone would have no relation with NF- κ B activation in the lung or diaphragm. In this case, the source of this cytokine production is not clear. It has been reported that respiratory muscles exhibit a low level of constitutive expression of various cytokines (such as TNF- α and IL-1 β), which could be upregulated during resistive breathing induced by inspiratory resistive loading (27).

Additionally, OSA patients show an increase in vascular endothelial dysfunction (28;29) and injury markers (30). Dysfunctional endothelium is characterized by an imbalance in the production of vasoactive hormones, increased adherence of inflammatory mediators to endothelial cells and hypercoagulability, and it is a known risk factor for cardiovascular events (31). Given the frequent and unexplained association between systemic hypertension and OSA, the secretion of prostanoids during sleep has been investigated (32). PGI₂ has vasodilatory effects, whereas TxA₂ results in vasoconstriction. The ratio TxB₂/6kPGF_{1 α} is used as an index of vasoconstriction. Measurements of the circulating concentrations of the stable metabolites of TxB₂ and 6kPGF_{1 α} tested the hypothesis that changes in the venous plasma TxB₂/6kPGF_{1 α} ratio would correlate with changes in blood pressure. A higher TxB₂/6kPGF_{1 α} ratio in subjects with OSA, compared with controls, reflects a predominance of vasoconstrictor activity in these patients as the cause of pulmonary hypertension (32). Our results show an increase in the TxB₂/6kPGF_{1 α} ratio induced by recurrent obstructive apneas and hypoxia/normoxia. These findings suggest a vasoconstrictor effect in apnea and the hypoxia/normoxia condition.

In summary, it is demonstrated that, although respiratory effort contribute to inflammation, oxygen desaturations play a major role in the induction of an inflammatory process and the triggering of an endothelial dysfunction.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2004-00684 and SAF2005-0110), SEPAR, FUCAP.

The authors wish to thank Mr. Miguel A. Rodríguez and Ms. Marta Torres for the technical assistance.



REFERENCES

1. Dincer HE, O'Neill W. Deleterious effects of sleep-disordered breathing on the heart and vascular system. *Respiration* 2006; 73(1):124-130.
2. Caples SM, Garcia-Touchard A, Somers VK. Sleep-disordered breathing and cardiovascular risk. *Sleep* 2007; 30(3):291-303.
3. Park AM, Nagase H, Kumar SV, Suzuki YJ. Effects of intermittent hypoxia on the heart. *Antioxidants & Redox Signaling* 2007; 9(6):723-729.
4. Von Kanel R, Dimsdale JE. Hemostatic alterations in patients with obstructive sleep apnea and the implications for cardiovascular disease. *Chest* 2003; 124(5):1956-1967.
5. Kasasbeh E, Chi DS, Krishnaswamy G. Inflammatory aspects of sleep apnea and their cardiovascular consequences. *Southern Medical Journal* 2006; 99(1):58-67.
6. Entzian P, Linnemann K, Schlaak M, Zabel P. Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996; 153(3):1080-1086.
7. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005; 112(17):2660-2667.
8. Von Kanel R, Loredó JS, Ancoli-Israel S, Dimsdale JE. Association between sleep apnea severity and blood coagulability: treatment effects of nasal continuous positive airway pressure. *Sleep and Breathing* 2006; 10(3):139-146.
9. Farre R, Rotger M, Montserrat JM, Calero G, Navajas D. Collapsible upper airway segment to study the obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome in rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2003; 136(2-3):199-209.
10. Vassilakopoulos T, Katsaounou P, Karatza MH, Kollintza A, Zakynthinos S, Roussos C. Strenuous resistive breathing induces plasma cytokines - Role of antioxidants and monocytes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 166(12):1572-1578.
11. Tsai CY, Yu CL, Wu TH, Hsieh SC, Tsai YY. Proinflammatory cytokines enhance COX-I gene expression in cultured rat glomerular mesangial cells. *International Immunopharmacology* 2004; 4(1):47-56.
12. Greenberg H, Ye XB, Wilson D, Htoo AK, Hendersen T, Liu SF. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappa B in cardiovascular tissues *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 343(2):591-596.



13. Yamauchi M, Tamaki S, Tomoda K et al. Evidence for activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea. *Sleep and Breathing* 2006; 10(4):189-193.
14. Rossi A, Kapahi P, Natoli G et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I kappa B kinase. *Nature* 2000; 403(6765):103-108.
15. 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. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2007; 155(1):93-96.
16. Schulz R, Grebe M, Eisele HJ, Mayer K, Weissmann N, Seeger W. Obstructive sleep apnea-related cardiovascular disease. *Medizinische Klinik* 2006; 101(4):321-327.
17. Fletcher EC. Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia - Invited Review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *Journal of Applied Physiology* 2001; 90(4):1600-1605.
18. Prabhakar NR, Fields RD, Baker T, Fletcher EC. Intermittent hypoxia: cell to system. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2001; 281(3):L524-L528.
19. Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T et al. Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 2004; 126(5):1473-1479.
20. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005; 112(17):2660-2667.
21. Htoo AK, Greenberg H, Tongia S et al. Activation of nuclear factor kappa B in obstructive sleep apnea: a pathway leading to systemic inflammation. *Sleep and Breathing* 2006; 10(1):43-50.
22. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Predictors of elevated nuclear factor-kappa B-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006; 174(7):824-830.
23. Haddad JJ. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 316(4):969-977.
24. Lavie L. Sleep-disordered breathing and cerebrovascular disease: A mechanistic approach. *Neurologic Clinics* 2005; 23(4):1059-1075.
25. Maulik N, Das DK. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 2002; 33(8):1047-1060.
26. Williams A, Scharf SM. Obstructive sleep apnea, cardiovascular disease, and inflammation - is NF-kappa B the key? *Sleep and Breathing* 2007; 11(2):69-76.



27. Vassilakopoulos T, Roussos C, Zakynthinos S. The immune response to resistive breathing. *European Respiratory Journal* 2004; 24(6):1033-1043.
28. Ip MSM, Tse HF, Lam B, Tsang KWT, Lam WK. Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004; 169(3):348-353.
29. Nieto FJ, Herrington DM, Redline S, Benjamin EJ, Robbins JA. Sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004; 169(3):354-360.
30. Lavie L, Kraiczi H, Hefetz A et al. Plasma vascular endothelial growth factor in sleep apnea syndrome - Effects of nasal continuous positive air pressure treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 165(12):1624-1628.
31. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109(2):159-165.
32. Krieger J, Benzoni D, Sforza E, Sassard J. Urinary-Excretion of Prostanoids During Sleep in Obstructive Sleep-Apnea Patients. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1991; 18(8):551-555.



FIGURES

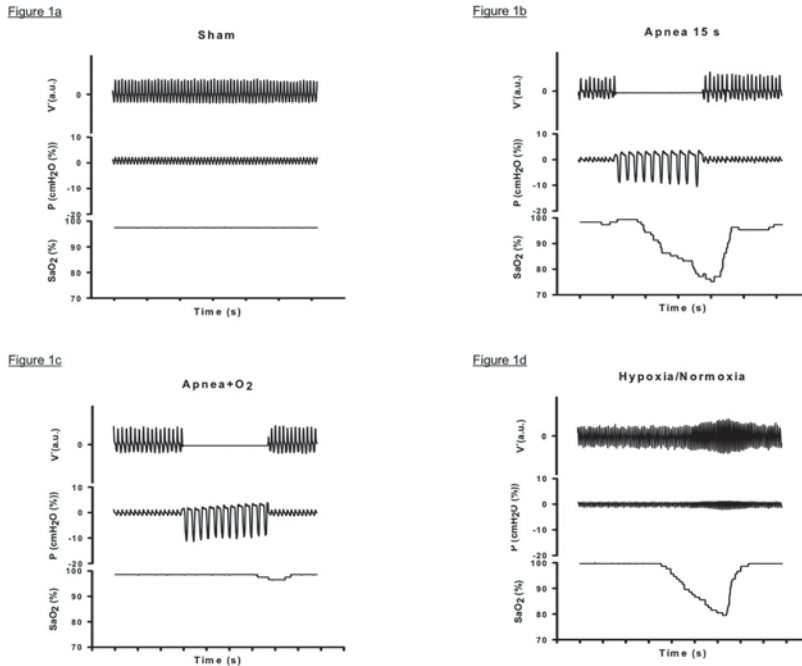


Figure 1

Examples of the signals recorded during the experiment. Figure 1a shows sham conditions; flow, pressure and the rat's arterial oxygen saturation (SaO₂) exhibited normal values. Figure 1b shows that flow was nil during the apnea, owing to valve closure; pressure swings in the trachea were markedly increased as a result of breathing effort and the SaO₂ exhibited a transient decrease. Figure 1c shows that flow was nil during the apnea+O₂, owing to valve closure; pressure swings in the trachea were markedly increased as a result of breathing effort but the SaO₂ showed no change. Figure 1d shows that during the hypoxia, there were no pressure swings in the trachea as there was no breathing effort, while the SaO₂ exhibited a transient decrease.

Figure 2a

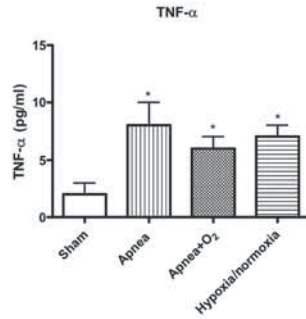


Figure 2b

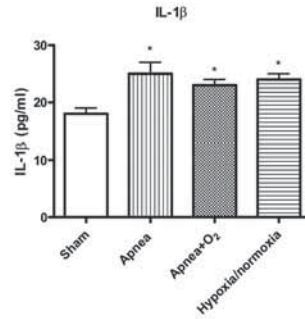


Figure 2

(a) Plasma levels of TNF- α after 3 h of apnea, hypoxia/normoxia and apnea+O₂. TNF- α levels were increased significantly in all the groups compared to the Sham group. (b) Plasma levels of IL-1 β after 3 h of apnea, hypoxia/normoxia and apnea+O₂. IL-1 β levels were increased significantly all the groups compared to the Sham group. Data are means \pm SEM of 8 animals per group (* p <0.05 vs Sham group).

Figure 3a

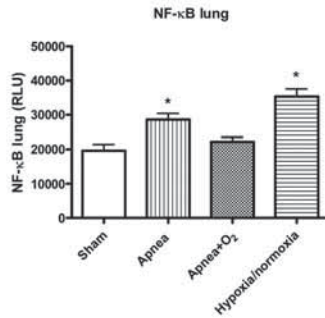


Figure 3b

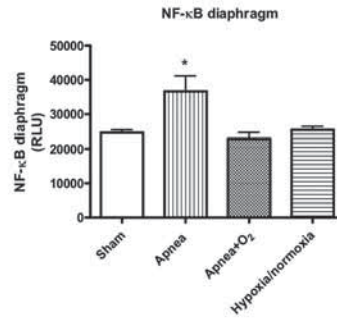


Figure 3

(a) NF- κ B activation in nuclear fractions in lung tissue. There was a significant increase in both the Apnea and the Hypoxia/Normoxia group, compared to the Sham group. (b) NF- κ B activation in nuclear fractions in diaphragm tissue. The only significant increase was that between the Apnea group and the Sham group. Data are means \pm SEM of 8 animals per group (* p <0.05 vs Sham group).



Figure 4a

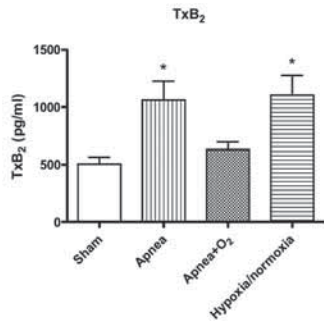


Figure 4b

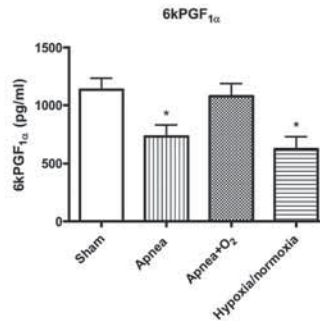


Figure 4

(a) Plasma levels of TxB₂ after 3 h of apnea, hypoxia/normoxia and apnea+O₂. Levels of TxB₂ increased significantly in the Apnea and Hypoxia/Normoxia groups, compared to the Sham group. (b) Plasma levels of 6kPGF_{1α} after 3 h of apnea, hypoxia/normoxia and apnea+O₂. Levels of 6kPGF_{1α} decreased significantly in the Apnea and Hypoxia/Normoxia groups, compared to the Sham group. Data are means ± SEM of 8 animals per group (*p<0.05 vs Sham group).

4.3. ESTUDIO 3.

Rat model of chronic recurrent airway obstructions to study the sleep apnea syndrome.

Farré R, Nácher M, Serrano-Mollar A, Gáldiz JB, Alvarez FJ, Navajas D, Montserrat JM.

Sleep 2007;30:930-3.

En este trabajo se evaluó un modelo crónico de rata de obstrucciones recurrentes en la VAS para estudiar el SAHS.

El flujo respiratorio, la presión, la concentración de CO₂ en aire mostraron que el modelo mimetizaba los eventos respiratorios (apneas obstructivas, esfuerzos respiratorios aumentados y caídas en la saturación de oxígeno). El estrés del animal generado por el sistema, fue evaluado mediante el peso corporal y los niveles de corticosterona en plasma a lo largo de todo el experimento. Los valores no fueron significativos entre el grupo Apnea y grupo Sham. Esto apoya el concepto que este nuevo modelo no introduce una carga de estrés significativa en el animal después de la aclimatación al sistema.

En lo que se refiere a mediadores de disfunción endotelial, hubieron diferencias significativas en condiciones de obstrucciones recurrentes en la relación TxB₂/6kPGF_{1α} en plasma, lo que determina una acción dominante vasoconstrictora en condiciones de obstrucciones recurrentes.

Rat Model of Chronic Recurrent Airway Obstructions to Study the Sleep Apnea Syndrome

Ramon Farré PhD^{1,5}; Maria Nácher BSc²; Anna Serrano-Mollar PhD³; Juan B Gáldiz MD⁴; Francisco J Alvarez PhD⁴; Daniel Navajas PhD^{1,5}; Josep M. Montserrat MD²

¹Unitat de Biofísica i Bioenginyeria, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona-IDIBAPS, Barcelona, Spain; ²Sleep Laboratory, Servei de Pneumologia i Al·lèrgia Respiratòria, Hospital Clinic-IDIBAPS, Barcelona, Spain; ³Department of Experimental Pathology, IIBB-CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain; ⁴Unidad de Investigación, Hospital de Cruces, Bilbao, Spain; ⁵Institut de Bioenginyeria de Catalunya, Barcelona, Spain

Study Objectives: To implement a chronic rat model of recurrent airway obstructions to study the obstructive sleep apnea (OSA) syndrome.

Design: Prospective controlled animal study.

Setting: University laboratory.

Patients or Participants: 24 male Sprague-Dawley rats (250-300 g).

Interventions: The rats were placed in a setup consisting of a body chamber and a head chamber separated by a neck collar specially designed to apply recurrent airway obstructions with OSA patterns. Rats in the Obstruction group (n=8) were subjected to 5-s obstructions at a rate of 60 per hour, 6 h/day during 4 weeks. Sham rats (n=8) were placed in the setup but no obstructions were applied. Naive rats (n=8) were subjected to no intervention.

Measurements and Results: Breathing flow, pressure, CO₂ air concentration, and SpO₂ showed that the model mimicked OSA respiratory events (obstructive apneas, increased respiratory efforts, and oxygen saturation

dips). Animal stress, assessed by body weight and plasma corticosterone, was not significantly different across Obstruction and Sham groups. This supports the concept that this novel model does not introduce a significant burden of stress in the rat after acclimatization to the chamber. Thromboxane-B2/6-keto-Prostaglandin-F1 α ratio in plasma, which is an index of vasoconstriction, was significantly increased in the rats subjected to obstructions.

Conclusions: The designed animal model of chronic recurrent airway obstructions is feasible and potentially useful to study the mechanisms involved in the cardiovascular consequences of OSA.

Keywords: Obstructive sleep apnea, animal model, airway obstruction.

Citation: Farré R; Nácher M; Serrano-Mollar A et al. Rat model of chronic recurrent airway obstructions to study the sleep apnea syndrome. *SLEEP* 2007;30(7):930-933.

INTRODUCTION

THE OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA (OSA) SYNDROME IS A VERY PREVALENT RESPIRATORY SLEEP DISTURBANCE THAT INDUCES EXCESSIVE SLEEPINESS LEADING TO an increased risk of accidents and deterioration in quality of life. OSA is also an important risk factor for cardiovascular diseases,¹ although the exact mechanisms involved are not well known despite the considerable effort made in recent years. Given the concurrence of a number of confounding variables, such as those characterizing the metabolic syndrome, it is difficult to draw precise and definitive conclusions from patient studies. Patient data also make it difficult to investigate the detailed mechanisms causing the consequences of OSA. Specifically, the relative roles played in the pathophysiology of sleep apnea by fluctuations in oxygen, carbon dioxide, behavioral state, respiratory drive, ventilatory effort, and upper airway intraluminal pressures are not known. To advance our understanding of which patients with sleep apnea are at greater risk for morbidities and to target treatment to relevant perturbances, it is essential that we understand the interactions of physiological variables.

Disclosure Statement

This was not an industry supported study. The authors have reported no financial conflicts of interest.

Submitted for publication January, 2007

Accepted for publication March, 2007

Address correspondence to: Prof. Ramon Farré, Unitat de Biofísica i Bioenginyeria, Facultat de Medicina, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain; Tel: +34 934024515; Fax: +34 934024516; E-mail: rfarré@ub.edu

Accordingly, animal models, which avoid comorbidities and allow invasive measurements under well-controlled experimental conditions, are a useful tool to investigate the pathophysiological mechanisms determining the consequences of OSA. Although a number of animal models have been proposed to this end,^{2,3} no model has been so far described to noninvasively apply a chronic pattern of controlled airway obstructions mimicking the ones experienced by OSA patients. The aim of this work was, therefore, to develop and test the feasibility of such a model for OSA research.

METHODS

Experimental Setup

The rat model proposed to apply recurrent airway obstructions is based on a setup consisting of 2 chambers separated by a latex neck collar (Figure 1, top). The body chamber was a transparent plastic cylinder (6.5 cm in diameter) with a dense distribution of holes (1 cm in diameter) in the walls to allow air circulation and maintenance of temperature and humidity. The position of the rear base of the cylinder (which incorporates a hole for the rat tail) was adjustable to restrain the rat movement. The neck collar was selected to almost eliminate air leaks between the body and head chambers while ensuring that no excessive pressure was applied on the neck. The transparent head chamber was conical (Figure 1, top), with dimensions designed to reduce its air volume when the rat was in place.

The rat breathed room air through an orifice at the vertex of the conical head chamber. A valve to allow closure of the orifice was placed at the entrance of the head chamber (Figure 1, top). The valve, which was described in detail elsewhere,⁴ allowed the

Criticare Systems, Inc, Waukesha, WI). Signals were sampled at 100 Hz and stored in a conventional computer-based data acquisition system.

Model Evaluation

The study, which was approved by the Animal Research Ethical Committee of the University of Barcelona, was carried out on 24 Sprague-Dawley male rats (250-300 g). The animals were randomized into 3 groups (n=8 each): Obstruction, Sham, and Naive.

Rats in the Obstruction and Sham groups were progressively adapted to the experimental setting during the week prior to the start of the experiment. To this end, the time that rats were placed in the experimental device (without airway obstructions) was increased each day up to 6 h on the last day. At the end of the adaptation period, the rats in the Obstruction group were subjected to 5-s obstructions at a rate of 60 per hour, 6 h/day for 4 weeks. A 5-s duration of obstructions was chosen because these resulted in transient SpO_2 reductions to $85\% \pm 1\%$ (10-s and 15-s obstructions transiently decreased SpO_2 to $83\% \pm 2\%$ and $75\% \pm 2\%$, respectively). Sham rats were subjected to the same experimental procedure, but no airway obstructions were applied. Naive rats were subjected to no intervention.

To assess the level of stress induced in the animals, the body weight and the plasma concentration of corticosterone, which is a conventional index of stress,⁵ were measured every 3 days for the 4 weeks of the study in all the rats. Plasma corticosterone was measured by ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) from 200 μ l of blood obtained from the saphena. At the end of the study, and before the animal was sacrificed, a blood sample was obtained from the aorta to measure the plasma levels of Thromboxane- B_2 (TxB_2) and 6-keto-Prostaglandin- $F_{1\alpha}$ ($6kPGF_{1\alpha}$) by ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). The ratio $TxB_2/6kPGF_{1\alpha}$ was used as an index of vasoconstriction.⁶

Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was carried out by ANOVA. Two-way ANOVA tests were used to ascertain whether body weight and plasma corticosterone varied with time and/or group (Obstruction, Sham, and Naive). When the differences were significant, a Bonferroni post-test (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) was performed. A one-way ANOVA test was employed to assess the differences between groups in $TxB_2/6kPGF_{1\alpha}$. When the differences were significant, a Newman-Keuls post-test was performed. The differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Figure 1, bottom, shows an example of the signals recorded during one of the airway obstructions applied to the rats. During the 5-s period of obstruction, flow through the valve was nil owing to its closure. As a result of the breathing efforts of the rat against the closed valve, the swings in air pressure markedly increased in the head chamber. The CO_2 concentration of the air in the head chamber consistently increased as a result of the occlusion. As expected, after some delay from the start of the occlusion, SpO_2 exhibited a transient decrease.

Along the 4 weeks of the study, Naive rats showed significantly greater weight gain ($46\% \pm 5\%$) than rats in the Obstruction and

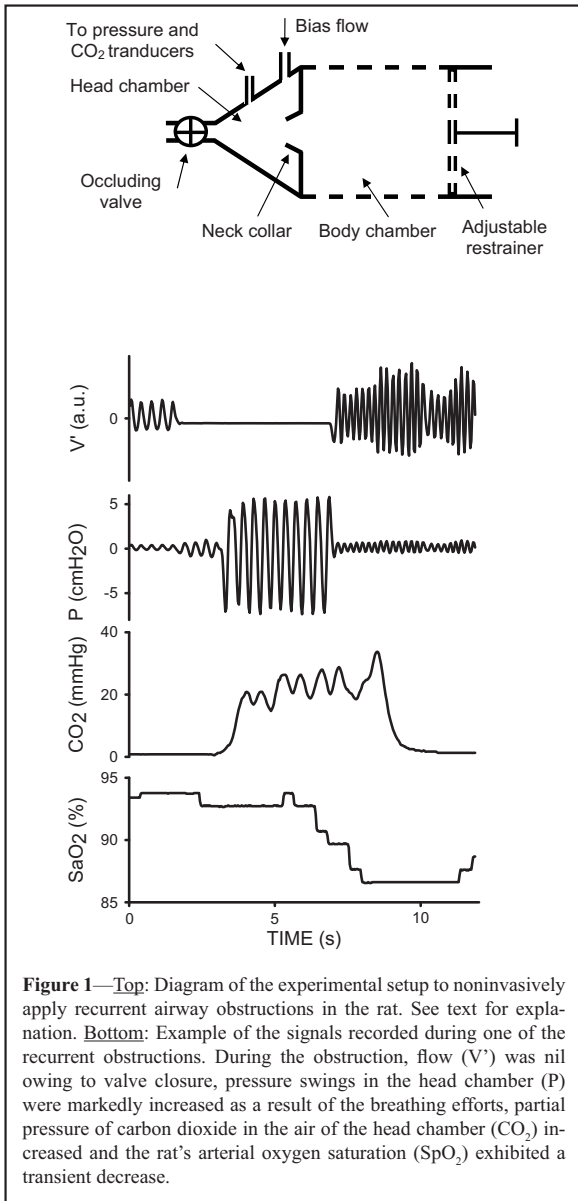


Figure 1—Top: Diagram of the experimental setup to noninvasively apply recurrent airway obstructions in the rat. See text for explanation. Bottom: Example of the signals recorded during one of the recurrent obstructions. During the obstruction, flow (V') was nil owing to valve closure, pressure swings in the head chamber (P) were markedly increased as a result of the breathing efforts, partial pressure of carbon dioxide in the air of the head chamber (CO_2) increased and the rat's arterial oxygen saturation (SpO_2) exhibited a transient decrease.

application of a controlled pattern of obstruction and incorporated a built-in pneumotachograph to monitor breathing flow. A bias airflow source electronically synchronized with the valve was connected to the head chamber to rinse it with room air. A flow of 2 ml/s entered the rear part of the head chamber during the time that the valve was open. When the valve was closed the bias flow was interrupted, keeping the head chamber closed and imposing a virtual airway obstruction to the rat breathing.

A transducer (Honeywell 176 PC; Microswitch, Boston, MA, USA) measuring pressure in the head chamber was used to assess breathing effort. The CO_2 concentration in the air of the head chamber was intermittently monitored (Tonometrics, Datex Engstrom, Helsinki, Finland). The arterial oxygen saturation (SpO_2) was periodically measured by pulse oximetry at the rat tail (504;

Sham groups (27%±3% and 28%±4%, respectively); there was no significant difference between Obstructive and Sham rats. Plasma corticosterone was significantly higher in the Obstructive and Sham rats than in the Naive group, but there was no significant difference between the Obstruction and the Sham groups. In these 2 groups of instrumented rats, corticosterone levels recovered the baseline values at the end of the 4-week period: 29.7±8.1 µg/ml at day 1 and 30.2±8.5 µg/ml at day 28 for the Obstruction group, and 35.4±8.9 µg/ml at day 1 and 32.7±7.2 µg/ml at day 28 for the Sham group. TxB₂ was found to increase and 6kPGF_{1α} remained unchanged in the instrumented rats. The ratio TxB₂/6kPGF_{1α} was significantly greater in the Obstruction group (3.13±0.42) than in the Sham (1.16±0.39) and Naive (0.42±0.07) groups; the difference between the Sham and Naive groups was not significant.

DISCUSSION

The novel model designed in this work allows the rat to be chronically subjected to a pattern of respiratory events realistically mimicking the ones that characterize OSA. Indeed, the animal experienced intermittent airway obstructions resulting in increased breathing efforts and oxygen desaturations.

A number of animal models have been employed to date to investigate the mid- and long-term effects of OSA. A dog model based on the implant of an obstruction valve at the tracheal level was used to study systemic hypertension and breathing control in OSA.² However, the relatively low availability of gene expression assays for this species in comparison with rodents have enhanced the interest in murine models. The most widely used model to investigate the effects of the respiratory disturbances in OSA consists in subjecting rodents to a hypoxia/normoxia pattern by breathing air with variable O₂ concentration.³ This approach has been successfully employed to study the changes in systemic arterial pressure and rat behavior and the presence of metabolic abnormalities and cardiovascular consequences.^{7,8} Nevertheless, the model based on changing the air concentration does not allow us to study the potential consequences of strenuous breathing against an obstructed airway. This mechanical stimulus actually experienced by OSA patients acts as an immune challenge⁹ resulting in inflammatory and metabolic responses that could play a significant role in determining the consequences of OSA. However, the only study that investigated the systemic effects of recurrent airway obstructions mimicking OSA in rats required an invasive setting, with the result that only short term effects could be studied.¹⁰

To avoid manipulation of the airway of the animal, i.e., to apply a noninvasive procedure, the described model imposes airway obstruction indirectly. Virtual airway occlusion is achieved by occluding the head chamber, which was designed to reduce air volume and to provide air sealing at the neck collar. Because the airway of the animal is not actually occluded, the rat is able to breathe the very small airflow associated with the pressure changes induced by muscle effort exerted on the low compliance of the gas in the chamber. This low amplitude breathing flow accounts for the increase in CO₂ concentration in the head chamber during valve obstruction (Figure 1, top). The restriction of movement imposed on the rat during the occlusions is a potential source of stress.⁵ Although the rats were familiarized with the setting before the application of the obstructive challenge, some stress remained as evidenced by the differences observed in weight gain

and plasma corticosterone. Nevertheless, the fact that the level of corticosterone at the end of the experiment resembled that of the baseline and the observation that the animals exhibited no discomfort in the setting, suggest that the stress induced by restraint was moderate.

The use of a Sham group, which takes into account the restraining effect as well as the whole experimental procedure, allows us to analyze the effects induced by the airway obstructions exclusively. The fact that the ratio TxB₂/6kPGF_{1α} was significantly greater in the Obstruction than in both the Sham and Naive rats, together with the absence of significance in the difference between Obstruction and Sham suggests that the vasoconstriction response observed was specifically triggered by the stimulus of recurrent airway obstructions. This result should not be interpreted simply on the basis of a vasoconstriction/vasodilation imbalance. The fact that TxB₂ is mainly produced by platelets suggests that, in addition to the vasoconstriction pattern, there is an involvement of platelet activation that could be related to common cardiovascular complications in patients with OSA.

The chronic model described can be readily applied to the investigation of the consequences of the respiratory events in OSA. Indeed, dose-response studies can be carried out by modifying the frequency and/or the duration of the obstructions, the number of hours of challenge per day and the total duration of the study. Implementation of this novel research tool in a series of animal studies is expected to provide new data regarding the interactions of each physiological variable across obstructive apneic events. For example, this system would allow the independent study of the modification of one physiological perturbation within or across an apnea and its resolution without significantly altering the other physiological parameters. In conclusion, the described animal model provides a useful tool for investigating the mechanisms involved in the mid- and long-term consequences of OSA.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2005-00110, SAF2004-00684), Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS-PI040929), SEPAR, Carburos Metálicos, FUCAP and Ciberes (ISCiii-CB06/06/0025 and ISCiii-CB06/06/0026).

The authors wish to thank Dr. David Gozal for his helpful suggestions and Mr. Miguel A. Rodríguez for his technical assistance.

REFERENCES

1. Caples SM, Garcia-Touchard A, Somers VK. Sleep disordered breathing and cardiovascular risk. *Sleep* 2007;30:291-304.
2. Kimoff RJ, Brooks D, Horner RL, et al. Ventilatory and arousal responses to hypoxia and hypercapnia in a canine model of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:886-94.
3. Fletcher EC. Invited review: physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 2001;90:1600-5.
4. Farre R, Rotger M, Montserrat JM, Calero G, Navajas D. Collapsible upper airway segment to study the obstructive sleep apnea syndrome in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 2003;36:199-209.
5. Marin MT, Cruz FC, Planeta CS. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav* 2007;90:29-35.

6. Bolla M, You D, Loufrani L, et al. Cyclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 2004;43:1264-9.
7. 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;167:1540-7.
8. Campen MJ, Shimoda LA, O'Donnell CP. Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* 2005;99:2028-35.
9. Vassilakopoulos T, Roussos C, Zakynthinos S. The immune response to resistive breathing. *Eur Respir J* 2004;24:1033-43.
10. 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;155:93-6.

El SAHS es el trastorno respiratorio del sueño más común. Se caracteriza por un colapso recurrente de la VAS que da lugar al cese total (apnea) o parcial (hipopnea) de la ventilación nasobucal. Estos episodios recurrentes provocan la fragmentación del sueño, desaturaciones en la oxihemoglobina, y excesiva somnolencia diurna. El SAHS induce severos efectos mecánicos intratorácicos con presiones negativas que pueden llegar a - 60 cm de H₂O o más durante los eventos respiratorios. Además, también da lugar a periodos de hipoxia/normoxia intermitente secundarios a las apneas/hipopneas. Estos cambios gasométricos pueden ocasionar estrés oxidativo, incremento en la activación simpática, inflamación y disfunción endotelial. Algunas de estas anomalías fisiológicas o bioquímicas están implicadas en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares.

Datos epidemiológicos implican al SAHS en el desarrollo de varias enfermedades cardiovasculares, especialmente la hipertensión sistémica. Se ha observado que la terapia con CPAP aminora las desaturaciones de oxígeno y el esfuerzo respiratorio, disminuyendo la morbilidad y mortalidad cardiovascular^{265,266}. Sin embargo, no son bien conocidos los mecanismos implicados. Un mejor entendimiento de la respuesta celular a la hipoxia/normoxia intermitente y a las grandes presiones negativas intratorácicas, factores fundamentales que acontecen durante las apneas, nos puede llevar a comprender mejor las vías fisiopatológicas del SAHS especialmente en relación a los trastornos cardiovasculares.

Debido a la comorbilidad asociada al SAHS, especialmente la obesidad, la diabetes y el tabaco²⁶⁷, no se han podido clarificar en los pacientes los elementos precisos implicados en la patología. En consecuencia, tiene un gran interés científico el desarrollo de modelos experimentales, donde las diversas variables implicadas pueden estar controladas. Hasta el momento, un gran número de modelos animales han sido empleados para investigar los efectos a medio y largo plazo del SAHS. El modelo más comúnmente usado para investigar los efectos de los trastornos respiratorios en el SAHS consiste en un modelo de rata de hipoxia/normoxia, modificando la concentración de O₂ en el aire²⁵¹. Este tipo de modelo ha sido empleado para evaluar las consecuencias de las desaturaciones de oxígeno periódicas en el SAHS como también el comportamiento del animal, los cambios de la presión arterial sistémica, la presencia de anomalías metabólicas y las consecuencias cardiovasculares²⁵¹. Sin embargo, el modelo descrito no permite estudiar las consecuencias potenciales de una respiración vigorosa contra una VAS obstruida. En este sentido, algunos estudios sugieren que el esfuerzo respiratorio experimentado en los pacientes con SAHS podría también jugar un papel significativo en el desarrollo de las consecuencias del SAHS²⁶⁸.

Los estudios que integran esta tesis doctoral han estado dirigidos a sentar las bases para evaluar las consecuencias de las apneas recurrentes. Por tanto, en la presente tesis, se propuso desarrollar un modelo experimental donde confluyeran o se pudiesen separar

ambos estímulos, la hipoxia/normoxia y el esfuerzo respiratorio, con el fin de determinar la implicación de cada uno de ellos por separado, o juntos. Por ello, gran parte del trabajo realizado en esta tesis se centró en la puesta a punto de dos modelos de SAHS en rata: un modelo agudo y otro modelo crónico, de forma que simularan los diferentes factores que acontecen durante las apneas en humanos. En primer lugar, se desarrolló un modelo animal agudo (3 h) de eventos respiratorios (5 s/min o 15 s/min durante 3h) en el que se evaluaron las diferentes variables implicadas, concretamente los cambios gasométricos y los esfuerzos respiratorios. Se registró el flujo ventilatorio y las presiones intratraqueales. En condiciones de obstrucción, la presión intratraqueal se triplicó, de forma que el animal realizaba un esfuerzo respiratorio muy notorio mientras se producía una caída en la SaO_2 en sangre arterial. Todos los valores se normalizaban al finalizar la obstrucción. Se analizó el posible proceso inflamatorio sistémico así como la disfunción endotelial desencadenada tras los eventos recurrentes. En segundo lugar, se desarrolló un modelo experimental crónico de mayor duración (5 semanas) de apneas recurrentes (5 s/min durante 6 h/día) para conocer si los posibles cambios agudos persistirían a lo largo de las semanas o habría un proceso de adaptación. Esta hipótesis se basa en el hecho de que el SAHS es una entidad crónica y de ahí la posible adaptación a los cambios iniciales. Y que esta posible adaptación tendría un efecto protector.

En el primer trabajo realizado, llevado a cabo en el modelo agudo, se observó que las apneas recurrentes inducían un aumento de las interacciones leucocito-endotelio en las vénulas cólicas, reflejado, sobre todo, por el aumento del flujo de leucocitos en rodamiento y en el número de leucocitos adheridos al endotelio venular. Este resultado se complementó con el hallazgo de un incremento de la expresión de P-selectina en las vénulas del colon. Los resultados de este estudio muestran un inicio de un proceso inflamatorio tras 3 h de apneas recurrentes. Además, estos datos concuerdan con los ya publicados en que los pacientes con SAHS presentan elevados niveles circulantes de P-selectina soluble^{163,164,269,270}. También se han descrito niveles circulantes elevados de otros mediadores inflamatorios en pacientes con SAHS, como la PCR^{70,71,271}, citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α , IL-6 y IL-1 β ²⁷², y otras moléculas de adhesión como la ICAM-1, la VCAM-1 y la E-selectina^{74,184}. Nuestro trabajo aporta el hecho de que la reacción inflamatoria acontece sólo tras 3 h de apneas recurrentes y ello muestra la magnitud de los efectos deletéreos de las repetidas obstrucciones de la VAS.

Posteriormente, en un segundo estudio, se analizó el papel de la hipoxia/normoxia y de los esfuerzos respiratorios, cada uno por separado, y ambos juntos (apneas recurrentes) en el desarrollo de la inflamación inducida. Los datos de nuestro estudio mostraron niveles circulantes elevados de TNF- α y IL-1 β después de 3 h de exposición a desaturaciones de oxígeno o a esfuerzos respiratorios. Esto vino acompañado de una activación del NF- κ B en tejido de pulmón y diafragma en condiciones de apneas recurrentes. Dicha activación tuvo lugar también en el pulmón en condiciones de hipoxia/normoxia recurrente. Por el contrario, no se apreció activación en los niveles nucleares de NF- κ B en ninguno de los dos tejidos tras esfuerzos respiratorios, ni en el diafragma en condición de hipoxia/normoxia recurrente. Además, se observaron niveles plasmáticos aumentados del vasoconstrictor TxB2 en el grupo Apnea y grupo Hipoxia/Normoxia comparado con el grupo control, acompañado de una disminución en los niveles plasmáticos de $6\text{kPGF}_{1\alpha}$ en los mismos grupos comparado con el grupo control. Nuestros resultados indican que ambos estímulos

son importantes durante las etapas iniciales del SAHS en la liberación de estas citocinas pro-inflamatorias. Estas observaciones concuerdan con los primeros estudios realizados en otros modelos experimentales, en los que los animales sometidos al estímulo de hipoxia/normoxia intermitente muestran incrementos en marcadores inflamatorios²⁷³. Como se ha mencionado en pacientes con SAHS las apneas obstructivas recurrentes también están asociadas con un aumento de ambos mediadores inflamatorios^{30,274}. Sin embargo, los mecanismos por los que se incrementan los niveles de marcadores inflamatorios en pacientes con SAHS no están claros. Estos incrementos podrían ser debidos al estrés oxidativo generado ya que incrementos en la generación de RLO por la hipoxia/normoxia recurrente podrían desencadenar la expresión de múltiples genes pro-inflamatorios vía la activación del factor de transcripción redox-sensible NF- κ B. Algunos estudios en pacientes con SAHS prueban la evidencia de un aumento de RLO y describen una activación selectiva de NF- κ B en neutrófilos o monocitos comparado con sujetos control^{30,186,275-277}. Sin embargo, los estudios en humanos no pueden determinar la importancia de estímulos diferentes en los órganos diana que están implicados en la respuesta inflamatoria. En pacientes con SAHS el pulmón es el órgano principal que sufre la desaturación de oxígeno y la presión intratorácica mientras que el diafragma es el tejido muscular más implicado por su esfuerzo respiratorio. Nuestro modelo experimental nos permitió determinar en los diferentes órganos la importancia de ambos estímulos. De este modo, los datos de la presente investigación mostraron, tanto en el pulmón, como en el diafragma, una activación de NF- κ B provocada por las apneas recurrentes, donde ambos estímulos estaban presentes. En el tejido pulmonar la hipoxia/normoxia también contribuyó en la activación del NF- κ B. Sin embargo, el esfuerzo respiratorio no activó el NF- κ B en cualquiera de estos tejidos, lo que sugiere que la hipoxia/normoxia juega el papel principal en la activación del NF- κ B en el pulmón mientras que en el diafragma la activación del NF- κ B depende de la confluencia de ambos estímulos. Estos resultados podrían ser explicados por la sensibilidad del pulmón a la variación en la concentración de oxígeno ya que es el primer órgano que está expuesto a la hipoxia/normoxia, la cual induce la respuesta oxidativa que provoca la activación del NF- κ B^{55,114,278}. Por otro lado, es importante destacar que el grupo de animales sometidos a esfuerzo respiratorio mantuvieron la SaO₂ al 98 %, por lo que el diafragma no sufrió ninguna condición de hipoxia. Este hecho nunca tiene lugar en pacientes con SAHS ya que los esfuerzos respiratorios siempre van acompañados de hipoxia tisular. En estudios en humanos, se ha descrito que el esfuerzo respiratorio acompañado por periodos de hipoxia/normoxia también provoca activación de NF- κ B en monocitos presentes en sangre, pero no aclaran la posible fuente generadora de citocinas. Se ha sugerido que los monocitos son la mayor, pero no la única, fuente de mediadores inflamatorios²⁷⁹. Otros estudios muestran que el esfuerzo respiratorio genera estrés oxidativo²⁸⁰ y la inducción de citocinas en el diafragma²⁸¹, secundario al aumento de la activación muscular. La producción de citocinas en el diafragma puede estar mediado por el daño de la fibra muscular diafragmática que ocurre por contracciones forzosas, o contribuyendo con el proceso de reparación esperado²⁸¹. Se cree que en los músculos respiratorios las citocinas están constitutivamente expresadas, y son reguladas durante la contracción muscular, provocada tras un esfuerzo respiratorio; esto explicaría el porqué el esfuerzo respiratorio produce un incremento en los niveles de citocinas pro-inflamatorias y no una activación del NF- κ B.

En cuanto a los mediadores vasoactivos nuestros resultados mostraron un desequilibrio en la producción de los prostanoides TxB₂ y 6kPGF_{1 α} , generando un aumento en la relación

$\text{TxB}_2/6\text{kPGF}_{1\alpha}$ inducida tras las apneas e hipoxia/normoxia recurrente, sugiriendo un predominio de la acción vasoconstrictora tanto en condición de apnea como en hipoxia/normoxia recurrente. Estos resultados se correlacionan con los datos obtenidos en pacientes con SAHS^{196,197}. Las medidas de las concentraciones circulantes de metabolitos estables de TxB_2 y $6\text{kPGF}_{1\alpha}$, probaron que cambios en el plasma venoso en la relación $\text{TxB}_2/6\text{kPGF}_{1\alpha}$ tienen correlación con cambios en la tensión arterial²⁸². En resumen todos los resultados de este segundo estudio demuestran que la hipoxia/normoxia intermitente tiene un papel clave en el desencadenamiento del proceso inflamatorio y de la disfunción endotelial caracterizado en la patología del SAHS.

Para simular los procesos que acontecen en los pacientes con SAHS, se planteó la necesidad de disponer de un modelo experimental crónico. Por ello, el objetivo del tercer estudio fue el desarrollo de este modelo crónico de SAHS, el cual se validó mediante el registro de las variables de flujo y presión intratraqueal. Estudiando si el animal se adecuaba al sistema y observando que toleraba 6 horas/día de apneas recurrentes durante 4 semanas. Los resultados del tercer estudio demostraron que el modelo es apto para el estudio a largo plazo de los procesos desencadenados por las apneas recurrentes. Los animales no mostraron un estrés excesivo generado por el sistema ni un estrés adicional generado por las apneas recurrentes. Aunque se observaron diferencias en la variación del peso corporal y en los niveles plasmáticos de corticosterona al inicio del experimento, estos valores no fueron significativos entre los tres grupos experimentales al final del experimento, lo que indicaba una adaptación de los animales al sistema. Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo en los niveles plasmáticos de TxB_2 en el grupo sometido a apneas recurrentes. Estos hallazgos apoyan los estudios realizados en pacientes con SAHS, cuyos valores plasmáticos de TxB_2 y $6\text{kPGF}_{1\alpha}$ también se encuentran alterados y que se normalizan mediante la terapia con CPAP mostrando una mejoría en la disfunción endotelial^{282,283}.

La importancia de esta tesis recae principalmente en el desarrollo de nuevos modelos experimentales útiles para el estudio de la fisiopatología y de los mecanismos implicados en el SAHS. Una mejor comprensión de los mecanismos que promueven las consecuencias vasculares asociadas al SAHS permitirá el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas.

Las conclusiones de la presente tesis son las siguientes:

- El modelo animal agudo de apneas recurrentes desarrollado es apto para estudios a corto plazo.
- La aplicación de 3 h de apneas recurrentes de 5 s/min inician un proceso inflamatorio sistémico evidente, caracterizado por un aumento en el flujo de leucocitos en fase de rodamiento así como en el número de leucocitos adheridos en la circulación colónica. El proceso inflamatorio está mediado por un aumento en la expresión de P-selectina en el endotelio vascular de las vénulas del colon.
- La aplicación de períodos de 15 s/min de apneas, hipoxia/normoxia y esfuerzo respiratorio recurrentes durante 3 h, desencadenan un proceso inflamatorio sistémico mediado por un aumento en los niveles plasmáticos de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α y IL-1 β .
- El esfuerzo respiratorio realizado durante 3 h, por sí sólo, no es suficiente para dar lugar a la activación de factores de transcripción, como el NF- κ B, ni modificar los niveles de moléculas vasoactivas, como el vasoconstrictor TxA₂ y el vasodilatador PGI₂.
- La aplicación tanto de apneas como de hipoxia/normoxia recurrentes desencadenan una disfunción endotelial, causada por un aumento en la concentración del TxA₂ y una disminución en la concentración del PGI₂.
- El modelo animal crónico de apneas recurrentes descrito proporciona un instrumento útil para investigar los mecanismos fisiopatológicos implicados en el SAHS.

1. MS, A. *Sleep Medicine* (Oxford University Press, New York, 1999).
2. Everson, C. A., Bergmann, B. M. & Rechtschaffen, A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep* 12, 13-21 (1989).
3. Rechtschaffen, A., Bergmann, B. M., Everson, C. A., Kushida, C. A. & Gilliland, M. A. Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep* 12, 68-87 (1989).
4. Aldrich. *Sleep Medicine* (Oxford University Press, New York, 1999).
5. Hudgel, D. W., Martin, R. J., Johnson, B. & Hill, P. Mechanics of the respiratory system and breathing pattern during sleep in normal humans. *J Appl Physiol* 56, 133-7 (1984).
6. Wiegand, L., Zwillich, C. W. & White, D. P. Collapsibility of the human upper airway during normal sleep. *J Appl Physiol* 66, 1800-8 (1989).
7. Skatvedt, O. Localization of site of obstruction in snorers and patients with obstructive sleep apnea syndrome: a comparison of fiberoptic nasopharyngoscopy and pressure measurements. *Acta Otolaryngol* 113, 206-9 (1993).
8. Hoffstein, V. Apnea and snoring: state of the art and future directions. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 56, 205-36 (2002).
9. Hoffstein, V. Is snoring dangerous to your health? *Sleep* 19, 506-16 (1996).
10. Hoffstein, V. Blood pressure, snoring, obesity, and nocturnal hypoxaemia. *Lancet* 344, 643-5 (1994).
11. Hoffstein, V., Rubinstein, I., Mateika, S. & Slutsky, A. S. Determinants of blood pressure in snorers. *Lancet* 2, 992-4 (1988).
12. Stradling, J. R. & Crosby, J. H. Relation between systemic hypertension and sleep hypoxaemia or snoring: analysis in 748 men drawn from general practice. *Bmj* 300, 75-8 (1990).
13. Waller, P. C. & Bhopal, R. S. Is snoring a cause of vascular disease? An epidemiological review. *Lancet* 1, 143-6 (1989).

14. Guilleminault, C., Stoohs, R., Clerk, A., Cetel, M. & Maistros, P. A cause of excessive daytime sleepiness. The upper airway resistance syndrome. *Chest* 104, 781-7 (1993).
15. Guilleminault, C., Stoohs, R. & Duncan, S. Snoring (I). Daytime sleepiness in regular heavy snorers. *Chest* 99, 40-8 (1991).
16. Gleeson, K., Zwillich, C.W. & White, D. P. The influence of increasing ventilatory effort on arousal from sleep. *Am Rev Respir Dis* 142, 295-300 (1990).
17. Sajkov, D. et al. Daytime pulmonary hemodynamics in patients with obstructive sleep apnea without lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 1518-26 (1999).
18. Montserrat, J. M. et al. [Treatment of sleep apnea-hypopnea syndrome]. *Arch Bronconeumol* 34, 204-6 (1998).
19. Stradling, J. R. & Phillipson, E. A. Breathing disorders during sleep. *Q J Med* 58, 3-18 (1986).
20. Young, T., Peppard, P. E. & Gottlieb, D. J. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 1217-39 (2002).
21. Lavie, L., Dyugovskaya, L. & Lavie, P. Sleep-apnea-related intermittent hypoxia and atherogenesis: adhesion molecules and monocytes/endothelial cells interactions. *Atherosclerosis* 183, 183-4 (2005).
22. Stierer, T. & Punjabi, N. M. Demographics and diagnosis of obstructive sleep apnea. *Anesthesiol Clin North America* 23, 405-20, v (2005).
23. Medicine, A. A. o. S. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep* 22, 667-89 (1999).
24. Bixler, E. O. et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 608-13 (2001).
25. Bixler, E. O., Vgontzas, A. N., Ten Have, T., Tyson, K. & Kales, A. Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 144-8 (1998).
26. Davies, R. J. & Stradling, J. R. The epidemiology of sleep apnoea. *Thorax* 51 Suppl 2, S65-70 (1996).
27. Duran, J., Esnaola, S., Rubio, R. & Iztueta, A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 685-9 (2001).
28. Young, T. et al. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 328, 1230-5 (1993).

29. Fogel, R. B., Malhotra, A. & White, D. P. Sleep. 2: pathophysiology of obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *Thorax* 59, 159-63 (2004).
30. Ryan, S., Taylor, C. T. & McNicholas, W. T. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 112, 2660-7 (2005).
31. White, D. P. The pathogenesis of obstructive sleep apnea: advances in the past 100 years. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 1-6 (2006).
32. Tangel, D. J., Mezzanotte, W. S. & White, D. P. Influence of sleep on tensor palatini EMG and upper airway resistance in normal men. *J Appl Physiol* 70, 2574-81 (1991).
33. Horner, R. L. et al. Sites and sizes of fat deposits around the pharynx in obese patients with obstructive sleep apnoea and weight matched controls. *Eur Respir J* 2, 613-22 (1989).
34. Hudgel, D. W. Mechanisms of obstructive sleep apnea. *Chest* 101, 541-9 (1992).
35. Shelton, K. E., Gay, S. B., Hollowell, D. E., Woodson, H. & Suratt, P. M. Mandible enclosure of upper airway and weight in obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis* 148, 195-200 (1993).
36. McNicholas, W. T. Implications of pathophysiology for management of the obstructive sleep apnoea syndrome. *Monaldi Arch Chest Dis* 53, 524-9 (1998).
37. Schwab, R. J. Upper airway imaging. *Clin Chest Med* 19, 33-54 (1998).
38. Redline, S., Tosteson, T., Tishler, P. V., Carskadon, M. A. & Millman, R. P. Studies in the genetics of obstructive sleep apnea. Familial aggregation of symptoms associated with sleep-related breathing disturbances. *Am Rev Respir Dis* 145, 440-4 (1992).
39. He, J., Kryger, M. H., Zorick, F. J., Conway, W. & Roth, T. Mortality and apnea index in obstructive sleep apnea. Experience in 385 male patients. *Chest* 94, 9-14 (1988).
40. Partinen, M., Jamieson, A. & Guilleminault, C. Long-term outcome for obstructive sleep apnea syndrome patients. Mortality. *Chest* 94, 1200-4 (1988).
41. Hensley, M. & Ray, C. Sleep apnoea. *Clin Evid*, 2401-15 (2004).
42. George, C. F. Reduction in motor vehicle collisions following treatment of sleep apnoea with nasal CPAP. *Thorax* 56, 508-12 (2001).
43. Teran-Santos, J., Jimenez-Gomez, A. & Cordero-Guevara, J. The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. Cooperative Group Burgos-Santander. *N Engl J Med* 340, 847-51 (1999).

44. Chiner, E., Arriero, J. M., Signes-Costa, J., Marco, J. & Fuentes, I. [Validation of the Spanish version of the Epworth Sleepiness Scale in patients with a sleep apnea syndrome]. *Arch Bronconeumol* 35, 422-7 (1999).
45. Ferrer, M. et al. [Measurement of the perceived impact of sleep problems: the Spanish version of the functional outcomes sleep questionnaire and the Epworth sleepiness scale]. *Med Clin (Barc)* 113, 250-5 (1999).
46. ATS. Standards and indications for cardiopulmonary sleep studies in children. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 866-78 (1996).
47. Lim, J., Lasserson, T. J., Fleetham, J. & Wright, J. Oral appliances for obstructive sleep apnoea. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004435 (2006).
48. White, J., Cates, C. & Wright, J. Continuous positive airways pressure for obstructive sleep apnoea. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001106 (2002).
49. Ballester, E. et al. Evidence of the effectiveness of continuous positive airway pressure in the treatment of sleep apnea/hypopnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 495-501 (1999).
50. Patel, S. R., White, D. P., Malhotra, A., Stanchina, M. L. & Ayas, N. T. Continuous positive airway pressure therapy for treating sleepiness in a diverse population with obstructive sleep apnea: results of a meta-analysis. *Arch Intern Med* 163, 565-71 (2003).
51. McArdle, N. et al. Long-term use of CPAP therapy for sleep apnea/hypopnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 1108-14 (1999).
52. Von Kanel, R., Loreda, J. S., Ancoli-Israel, S. & Dimsdale, J. E. Association between sleep apnea severity and blood coagulability: Treatment effects of nasal continuous positive airway pressure. *Sleep Breath* 10, 139-46 (2006).
53. Lavie, P. et al. Mortality in sleep apnea patients: a multivariate analysis of risk factors. *Sleep* 18, 149-57 (1995).
54. Leung, R. S. & Bradley, T. D. Sleep apnea and cardiovascular disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 2147-65 (2001).
55. Lavie, L. Sleep-disordered breathing and cerebrovascular disease: a mechanistic approach. *Neurol Clin* 23, 1059-75 (2005).
56. Lavie, L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 7, 35-51 (2003).
57. Prabhakar, N. R. Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 90, 1986-94 (2001).

58. Somers, V. K., Dyken, M. E., Clary, M. P. & Abboud, F. M. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 96, 1897-904 (1995).
59. Balfors, E. M. & Franklin, K. A. Impairment of cerebral perfusion during obstructive sleep apneas. *Am J Respir Crit Care Med* 150, 1587-91 (1994).
60. Fischer, A. Q., Chaudhary, B. A., Taormina, M. A. & Akhtar, B. Intracranial hemodynamics in sleep apnea. *Chest* 102, 1402-6 (1992).
61. Netzer, N., Werner, P., Jochums, I., Lehmann, M. & Strohl, K. P. Blood flow of the middle cerebral artery with sleep-disordered breathing: correlation with obstructive hypopneas. *Stroke* 29, 87-93 (1998).
62. Narkiewicz, K. et al. Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 97, 943-5 (1998).
63. Kato, M. et al. Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 102, 2607-10 (2000).
64. Phillips, B. G. et al. Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure. *J Hypertens* 17, 61-6 (1999).
65. Saarelainen, S., Seppala, E., Laasonen, K. & Hasan, J. Circulating endothelin-1 in obstructive sleep apnea. *Endothelium* 5, 115-8 (1997).
66. Ip, M. S. et al. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 2166-71 (2000).
67. Schulz, R. et al. Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax* 55, 1046-51 (2000).
68. Diomedi, M., Placidi, F., Cupini, L. M., Bernardi, G. & Silvestrini, M. Cerebral hemodynamic changes in sleep apnea syndrome and effect of continuous positive airway pressure treatment. *Neurology* 51, 1051-6 (1998).
69. Friedlander, A. H., Yueh, R. & Littner, M. R. The prevalence of calcified carotid artery atheromas in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Oral Maxillofac Surg* 56, 950-4 (1998).
70. Shamsuzzaman, A. S. et al. Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 105, 2462-4 (2002).
71. Yokoe, T. et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 107, 1129-34 (2003).

72. Chin, K. et al. Effects of nasal continuous positive airway pressure on soluble cell adhesion molecules in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Med* 109, 562-7 (2000).
73. Dyugovskaya, L., Lavie, P. & Lavie, L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 934-9 (2002).
74. El-Solh, A. A. et al. Adhesion molecules in patients with coronary artery disease and moderate-to-severe obstructive sleep apnea. *Chest* 121, 1541-7 (2002).
75. Shahar, E. et al. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 19-25 (2001).
76. Malone, S. et al. Obstructive sleep apnoea in patients with dilated cardiomyopathy: effects of continuous positive airway pressure. *Lancet* 338, 1480-4 (1991).
77. Alchanatis, M. et al. Daytime pulmonary hypertension in patients with obstructive sleep apnea: the effect of continuous positive airway pressure on pulmonary hemodynamics. *Respiration* 68, 566-72 (2001).
78. Sanner, B. M., Doberauer, C., Konermann, M., Sturm, A. & Zidek, W. Pulmonary hypertension in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Arch Intern Med* 157, 2483-7 (1997).
79. Arnulf, I. et al. Obstructive sleep apnea and venous thromboembolism. *Jama* 287, 2655-6 (2002).
80. Xie, A., Skatrud, J. B., Puleo, D. S. & Morgan, B. J. Exposure to hypoxia produces long-lasting sympathetic activation in humans. *J Appl Physiol* 91, 1555-62 (2001).
81. Cutler, M. J., Swift, N. M., Keller, D. M., Wasmund, W. L. & Smith, M. L. Hypoxia-mediated prolonged elevation of sympathetic nerve activity after periods of intermittent hypoxic apnea. *J Appl Physiol* 96, 754-61 (2004).
82. Greenberg, H. E., Sica, A., Batson, D. & Scharf, S. M. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol* 86, 298-305 (1999).
83. Fletcher, E. C., Orolinova, N. & Bader, M. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: the renin-angiotensin system. *J Appl Physiol* 92, 627-33 (2002).
84. Cortelli, P. et al. Cardiovascular autonomic dysfunction in normotensive awake subjects with obstructive sleep apnoea syndrome. *Clin Auton Res* 4, 57-62 (1994).
85. Lai, C. J., Yang, C. C., Hsu, Y. Y., Lin, Y. N. & Kuo, T. B. Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats. *J Appl Physiol* 100, 1974-82 (2006).

86. Perazella, M.A. & Setaro, J. F. Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. *J Nucl Cardiol* 10, 184-96 (2003).
87. Kraiczi, H., Hedner, J., Peker, Y. & Carlson, J. Increased vasoconstrictor sensitivity in obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol* 89, 493-8 (2000).
88. Millman, R. P., Redline, S., Carlisle, C. C., Assaf, A. R. & Levinson, P. D. Daytime hypertension in obstructive sleep apnea. Prevalence and contributing risk factors. *Chest* 99, 861-6 (1991).
89. Moller, D. S., Lind, P., Strunge, B. & Pedersen, E. B. Abnormal vasoactive hormones and 24-hour blood pressure in obstructive sleep apnea. *Am J Hypertens* 16, 274-80 (2003).
90. Greenberg, D. A., Chan, J. & Sampson, H. A. Endothelins and the nervous system. *Neurology* 42, 25-31 (1992).
91. Grimpen, F. et al. Endothelin-1 plasma levels are not elevated in patients with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 15, 320-5 (2000).
92. Jordan, W. et al. Obstructive sleep apnea: Plasma endothelin-1 precursor but not endothelin-1 levels are elevated and decline with nasal continuous positive airway pressure. *Peptides* 26, 1654-60 (2005).
93. Narkiewicz, K. et al. Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. *Circulation* 99, 1183-9 (1999).
94. Mills, P. J., Kennedy, B. P., Loreda, J. S., Dimsdale, J. E. & Ziegler, M. G. Effects of nasal continuous positive airway pressure and oxygen supplementation on norepinephrine kinetics and cardiovascular responses in obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol* 100, 343-8 (2006).
95. Grote, L., Kraiczi, H. & Hedner, J. Reduced alpha- and beta(2)-adrenergic vascular response in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 1480-7 (2000).
96. Phillips, S. A., Olson, E. B., Lombard, J. H. & Morgan, B. J. Chronic intermittent hypoxia alters NE reactivity and mechanics of skeletal muscle resistance arteries. *J Appl Physiol* 100, 1117-23 (2006).
97. Fletcher, E. C. Effect of episodic hypoxia on sympathetic activity and blood pressure. *Respir Physiol* 119, 189-97 (2000).
98. Fletcher, E. C., Bao, G. & Li, R. Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertension* 34, 309-14 (1999).
99. Fletcher, E. C. et al. Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J Appl Physiol* 72, 1978-84 (1992).

100. Fletcher, E. C., Lesske, J., Qian, W., Miller, C. C., 3rd & Unger, T. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension* 19, 555-61 (1992).
101. Davies, K. J. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* 48, 41-7 (1999).
102. Gutteridge, J. M. & Halliwell, B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol* 2, 195-256 (1989).
103. Sies, H. & Cadenas, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311, 617-31 (1985).
104. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97-112 (1995).
105. Beckman, K. B. & Ames, B. N. Mitochondrial aging: open questions. *Ann NY Acad Sci* 854, 118-27 (1998).
106. Fenster, B. E., Tsao, P. S. & Rockson, S. G. Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress. *Am Heart J* 146, 218-26 (2003).
107. Suzuki, Y. J., Jain, V., Park, A. M. & Day, R. M. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 40, 1683-92 (2006).
108. Barcelo, A. et al. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur Respir J* 16, 644-7 (2000).
109. Lavie, L., Vishnevsky, A. & Lavie, P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 27, 123-8 (2004).
110. Schulz, R. et al. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 566-70 (2000).
111. Minoguchi, K. et al. Association between lipid peroxidation and inflammation in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 28, 378-85 (2006).
112. Reddy, M. C., Koneru, B., Soni, S. & Patel, D. 31P nuclear magnetic resonance study of phospholipids in ischemia/reperfusion injury in a rat fatty liver model. *Transplantation* 61, 1151-5 (1996).
113. Vendemiale, G. et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 33, 808-15 (2001).
114. Maulik, N. & Das, D. K. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med* 33, 1047-60 (2002).

115. Libby, P. & Ridker, P. M. Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation* 100, 1148-50 (1999).
116. Rader, D.J. Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med* 343, 1179-82 (2000).
117. Rifai, N. & Ridker, P.M. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem* 47, 403-11 (2001).
118. Whicher, J., Biasucci, L. & Rifai, N. Inflammation, the acute phase response and atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 37, 495-503 (1999).
119. Koenig, W. et al. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 99, 237-42 (1999).
120. Lagrand, W. K. et al. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? *Circulation* 100, 96-102 (1999).
121. Frohlich, M. et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care* 23, 1835-9 (2000).
122. Visser, M., Bouter, L. M., McQuillan, G. M., Wener, M. H. & Harris, T. B. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *Jama* 282, 2131-5 (1999).
123. Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D., Emeis, J. J. & Coppel, S. W. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 972-8 (1999).
124. Barcelo, A. et al. Effects of obesity on C-reactive protein level and metabolic disturbances in male patients with obstructive sleep apnea. *Am J Med* 117, 118-21 (2004).
125. Thornton, A. J., Strieter, R. M., Lindley, I., Baggiolini, M. & Kunkel, S. L. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol* 144, 2609-13 (1990).
126. Pober, J. S. Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Physiology and pathology. Am J Pathol* 133, 426-33 (1988).
127. Krueger, J. M. et al. Somnogenic cytokines and models concerning their effects on sleep. *Yale J Biol Med* 63, 157-72 (1990).
128. Krueger, J. M. et al. Cytokines in sleep regulation. *Adv Neuroimmunol* 5, 171-88 (1995).
129. Vgontzas, A. N., Bixler, E. O. & Chrousos, G. P. Metabolic disturbances in obesity versus sleep apnoea: the importance of visceral obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 254, 32-44 (2003).

130. Dinarello, C.A. Biology of interleukin 1. *Faseb J* 2, 108-115 (1988).
131. Krueger, J. M. et al. Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 856, 148-59 (1998).
132. Krueger, J. M., Walter, J., Dinarello, C. A., Wolff, S. M. & Chedid, L. Sleep-promoting effects of endogenous pyrogen (interleukin-1). *Am J Physiol* 246, R994-9 (1984).
133. Lancel, M., Mathias, S., Faulhaber, J. & Schiffelholz, T. Effect of interleukin-1 beta on EEG power density during sleep depends on circadian phase. *Am J Physiol* 270, R830-7 (1996).
134. Opp, M. R., Toth, L.A. & Tolley, E.A. EEG delta power and auditory arousal in rested and sleep-deprived rabbits. *Am J Physiol* 272, R648-55 (1997).
135. Gemma, C., Imeri, L., de Simoni, M. G. & Mancina, M. Interleukin-1 induces changes in sleep, brain temperature, and serotonergic metabolism. *Am J Physiol* 272, R601-6 (1997).
136. Obal, F., Jr. et al. Interleukin 1 alpha and an interleukin 1 beta fragment are somnogenic. *Am J Physiol* 259, R439-46 (1990).
137. Imeri, L., Opp, M. R. & Krueger, J. M. An IL-1 receptor and an IL-1 receptor antagonist attenuate muramyl dipeptide- and IL-1-induced sleep and fever. *Am J Physiol* 265, R907-13 (1993).
138. Opp, M. R., Postlethwaite, A. E., Seyer, J. M. & Krueger, J. M. Interleukin 1 receptor antagonist blocks somnogenic and pyrogenic responses to an interleukin 1 fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3726-30 (1992).
139. Gudewill, S. et al. Nocturnal plasma levels of cytokines in healthy men. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 242, 53-6 (1992).
140. Moldofsky, H., Lue, F. A., Eisen, J., Keystone, E. & Gorczyński, R. M. The relationship of interleukin-1 and immune functions to sleep in humans. *Psychosom Med* 48, 309-18 (1986).
141. Opp, M. R. & Krueger, J. M. Interleukin-1 is involved in responses to sleep deprivation in the rabbit. *Brain Res* 639, 57-65 (1994).
142. Opp, M. R. Cytokines and sleep. *Sleep Med Rev* 9, 355-64 (2005).
143. Santana, A. V., E; Alfonso, P; Aguilar, J.A. Citocinas. Clínica y laboratorio. *Quím Clín* 19 (2000).
144. Bullo, M. et al. TNFalpha expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 652-8 (2002).

145. Takahashi, S., Kapas, L., Fang, J. & Krueger, J. M. Somnogenic relationships between tumor necrosis factor and interleukin-1. *Am J Physiol* 276, R1132-40 (1999).
146. Darko, D. F. et al. Sleep electroencephalogram delta-frequency amplitude, night plasma levels of tumor necrosis factor alpha, and human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12080-4 (1995).
147. Papanicolaou, D. A., Wilder, R. L., Manolagas, S. C. & Chrousos, G. P. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 128, 127-37 (1998).
148. Borish, L. C. & Steinke, J. W. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111, S460-75 (2003).
149. Meier-Ewert, H. K. et al. Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem* 47, 426-30 (2001).
150. Helle, M., Brakenhoff, J. P., De Groot, E. R. & Aarden, L. A. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur J Immunol* 18, 957-9 (1988).
151. Papanicolaou, D. A. & Vgontzas, A. N. Interleukin-6: the endocrine cytokine. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 1331-3 (2000).
152. Bauer, J. et al. Interleukin-6 serum levels in healthy persons correspond to the sleep-wake cycle. *Clin Investig* 72, 315 (1994).
153. De Simoni, M. G. et al. Modulation of systemic interleukin-6 induction by central interleukin-1. *Am J Physiol* 265, R739-42 (1993).
154. Entzian, P., Linnemann, K., Schlaak, M. & Zabel, P. Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 1080-6 (1996).
155. Vgontzas, A. N. et al. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1313-6 (1997).
156. Crockett-Torabi, E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol* 63, 1-14 (1998).
157. Eppihimer, M. J., Wolitzky, B., Anderson, D. C., Labow, M. A. & Granger, D. N. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins *in vivo*. *Circ Res* 79, 560-9 (1996).
158. Vestweber, D. & Blanks, J. E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 79, 181-213 (1999).
159. Panes, J. & Pique, J. M. [Leukocyte-endothelium interaction: inflammation and gastric damage]. *Gastroenterol Hepatol* 20 Suppl 2, 22-32 (1997).

160. Myers, C. L., Wertheimer, S. J., Schembri-King, J., Parks, T. & Wallace, R. W. Induction of ICAM-1 by TNF-alpha, IL-1 beta, and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *Am J Physiol* 263, C767-72 (1992).
161. Smith, W. B., Gamble, J. R., Clark-Lewis, I. & Vadas, M. A. Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 72, 65-72 (1991).
162. Salerno, F. G. et al. Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. *Respir Med* 98, 25-8 (2004).
163. Kamio, K. et al. [Platelet activation in obstructive sleep apnea syndrome]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 40, 473-7 (2002).
164. Robinson, G. V., Pepperell, J. C., Segal, H. C., Davies, R. J. & Stradling, J. R. Circulating cardiovascular risk factors in obstructive sleep apnoea: data from randomised controlled trials. *Thorax* 59, 777-82 (2004).
165. Patel, K. D., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M., McEver, R. P. & McIntyre, T. M. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 112, 749-59 (1991).
166. Stocker, C. J. et al. TNF-alpha, IL-4, and IFN-gamma regulate differential expression of P- and E-selectin expression by porcine aortic endothelial cells. *J Immunol* 164, 3309-15 (2000).
167. Lundberg, A. H. et al. Quantitative measurement of P- and E-selectin adhesion molecules in acute pancreatitis: correlation with distant organ injury. *Ann Surg* 231, 213-22 (2000).
168. Jaeschke, H., Smith, C. W., Clemens, M. G., Ganey, P. E. & Roth, R. A. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 139, 213-26 (1996).
169. Ohga, E. & Matsuse, T. [The relationship between adhesion molecules and hypoxia]. *Nippon Rinsho* 58, 1587-91 (2000).
170. El Solh, A. A., Akinnusi, M. E., Baddoura, F. H. & Mankowski, C. R. Endothelial cell apoptosis in obstructive sleep apnea: a link to endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 1186-91 (2007).
171. Lee, S. R. & Lo, E. H. Induction of caspase-mediated cell death by matrix metalloproteinases in cerebral endothelial cells after hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 720-7 (2004).
172. Park, K. H., Rubin, L. E., Gross, S. S. & Levi, R. Nitric oxide is a mediator of hypoxic coronary vasodilatation. Relation to adenosine and cyclooxygenase-derived metabolites. *Circ Res* 71, 992-1001 (1992).

173. Aardal, S. [The physiological and pathophysiological significance of endothelins]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 114, 2120-4 (1994).
174. Clemens, M. G. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 30, 1-5 (1999).
175. Liu, P., Yin, K., Nagele, R. & Wong, P. Y. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 284, 1139-46 (1998).
176. Chen, F., Castranova, V., Shi, X. & Demers, L. M. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 45, 7-17 (1999).
177. Kopp, E. B. & Ghosh, S. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 58, 1-27 (1995).
178. Rahman, I. & MacNee, W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 53, 601-12 (1998).
179. Richter, C. et al. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271, 67-74 (1995).
180. Zingarelli, B. Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med* 33, S414-6 (2005).
181. Regnier, C. H. et al. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90, 373-83 (1997).
182. Blackwell, T. S. & Christman, J. W. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 3-9 (1997).
183. Piacentini, L. & Karliner, J. S. Altered gene expression during hypoxia and reoxygenation of the heart. *Pharmacol Ther* 83, 21-37 (1999).
184. Ohga, E. et al. Increased levels of circulating ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in obstructive sleep apnea syndrome. *J Appl Physiol* 87, 10-4 (1999).
185. Ohga, E. et al. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J Appl Physiol* 94, 179-84 (2003).
186. Greenberg, H. et al. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 591-6 (2006).
187. Semenza, G. L. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res* 1, 159-62 (2000).
188. Semenza, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88, 1474-80 (2000).

189. Semenza, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 59, 47-53 (2000).
190. Pouyssegur, J. & Mechta-Grigoriou, F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem* 387, 1337-46 (2006).
191. Schulz, R., Hummel, C., Heinemann, S., Seeger, W. & Grimminger, F. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 67-70 (2002).
192. Svatikova, A. et al. Plasma brain natriuretic peptide in obstructive sleep apnea. *Am J Cardiol* 94, 529-32 (2004).
193. Brzecka, A. Brain preconditioning and obstructive sleep apnea syndrome. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 65, 213-20 (2005).
194. Budhiraja, R., Tuder, R. M. & Hassoun, P. M. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 109, 159-65 (2004).
195. Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 31, S221-30 (2003).
196. Ip, M. S., Tse, H. F., Lam, B., Tsang, K. W. & Lam, W. K. Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 348-53 (2004).
197. Nieto, F. J., Herrington, D. M., Redline, S., Benjamin, E. J. & Robbins, J. A. Sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 354-60 (2004).
198. Davignon, J. & Ganz, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109, III27-32 (2004).
199. Budhiraja, R. & Quan, S. F. Sleep-disordered breathing and cardiovascular health. *Curr Opin Pulm Med* 11, 501-6 (2005).
200. Budhiraja, R., Sharief, I. & Quan, S. F. Sleep disordered breathing and hypertension. *J Clin Sleep Med* 1, 401-4 (2005).
201. Lattimore, J. L., Wilcox, I., Skilton, M., Langenfeld, M. & Celermajer, D. S. Treatment of obstructive sleep apnoea leads to improved microvascular endothelial function in the systemic circulation. *Thorax* 61, 491-5 (2006).
202. Grebe, M. et al. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 897-901 (2006).
203. Foster, G. E., Hanly, P. J., Ostrowski, M. & Poulin, M. J. Effects of continuous positive airway pressure on cerebral vascular response to hypoxia in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 720-5 (2007).

204. Mutin, M. et al. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 93, 2951-8 (1999).
205. Makin, A. J., Blann, A. D., Chung, N. A., Silverman, S. H. & Lip, G. Y. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. *Eur Heart J* 25, 371-6 (2004).
206. Valgimigli, M. et al. Serum from patients with acute coronary syndromes displays a proapoptotic effect on human endothelial cells: a possible link to pan-coronary syndromes. *Circulation* 107, 264-70 (2003).
207. Phillips, B. G. et al. Recent weight gain in patients with newly diagnosed obstructive sleep apnea. *J Hypertens* 17, 1297-300 (1999).
208. Singhal, A. et al. Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease? *Circulation* 106, 1919-24 (2002).
209. Sierra-Honigmann, M. R. et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281, 1683-6 (1998).
210. Bouloumie, A., Drexler, H. C., Lafontan, M. & Busse, R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83, 1059-66 (1998).
211. Oda, A., Taniguchi, T. & Yokoyama, M. Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration. *Kobe J Med Sci* 47, 141-50 (2001).
212. Luo, J. D., Zhang, G. S. & Chen, M. S. Leptin and cardiovascular diseases. *Timely Top Med Cardiovasc Dis* 9, E34 (2005).
213. Parhami, F., Tintut, Y., Ballard, A., Fogelman, A. M. & Demer, L. L. Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res* 88, 954-60 (2001).
214. Bouloumie, A., Marumo, T., Lafontan, M. & Busse, R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *Faseb J* 13, 1231-8 (1999).
215. Chin, K. et al. Changes in intra-abdominal visceral fat and serum leptin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome following nasal continuous positive airway pressure therapy. *Circulation* 100, 706-12 (1999).
216. Harsch, I. A. et al. Leptin and ghrelin levels in patients with obstructive sleep apnoea: effect of CPAP treatment. *Eur Respir J* 22, 251-7 (2003).
217. Vane, J. R., Anggard, E. E. & Botting, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323, 27-36 (1990).

218. Howard, P. G., Plumpton, C. & Davenport, A. P. Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertens* 10, 1379-86 (1992).
219. Kanagy, N. L., Walker, B. R. & Nelin, L. D. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 37, 511-5 (2001).
220. Zamarron-Sanz, C., Ricoy-Galbaldon, J., Gude-Sampedro, F. & Riveiro-Riveiro, A. Plasma levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnea. *Arch Med Res* 37, 552-5 (2006).
221. Gjorup, P. H. et al. Abnormally increased endothelin-1 in plasma during the night in obstructive sleep apnea: relation to blood pressure and severity of disease. *Am J Hypertens* 20, 44-52 (2007).
222. Wu, K. J. et al. [Detection of thromboxane B2, 6-keto-prostaglandin F1alpha and anticardiolipin antibody in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 27, 320-3 (2004).
223. Rich, S., Hart, K., Kieras, K. & Brundage, B. H. Thromboxane synthetase inhibition in primary pulmonary hypertension. *Chest* 91, 356-60 (1987).
224. Anderson, T. J. et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 26, 1235-41 (1995).
225. Joannides, R. et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries *in vivo*. *Circulation* 91, 1314-9 (1995).
226. Geraci, M. W. et al. Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 103, 1509-15 (1999).
227. Hoshikawa, Y. et al. Prostacyclin receptor-dependent modulation of pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 314-8 (2001).
228. Tuder, R. M. et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 1925-32 (1999).
229. Christman, B. W. et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327, 70-5 (1992).
230. Humbert, M. et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43, 13S-24S (2004).
231. Vanhoutte, P. M. [Endothelial dysfunction and vascular pathology]. *Bull Mem Acad R Med Belg* 161, 529-36; discussion 536-7 (2006).

232. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-41 (2000).
233. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-74 (2002).
234. Libby, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 83, 456S-460S (2006).
235. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-26 (1999).
236. Shatrov, V. A., Sumbayev, V. V., Zhou, J. & Brune, B. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms. *Blood* 101, 4847-9 (2003).
237. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-9 (1993).
238. Lanfranchi, P. A. & Somers, V. K. Sleep-disordered breathing in heart failure: characteristics and implications. *Respir Physiol Neurobiol* 136, 153-65 (2003).
239. Lattimore, J. D., Celermajer, D. S. & Wilcox, I. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 41, 1429-37 (2003).
240. Von Kanel, R. & Dimsdale, J. E. Hemostatic alterations in patients with obstructive sleep apnea and the implications for cardiovascular disease. *Chest* 124, 1956-67 (2003).
241. O'Connor, C., Thornley, K. S. & Hanly, P. J. Gender differences in the polysomnographic features of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 1465-72 (2000).
242. Peng, Y. J. & Prabhakar, N. R. Effect of two paradigms of chronic intermittent hypoxia on carotid body sensory activity. *J Appl Physiol* 96, 1236-42; discussion 1196 (2004).
243. Phillips, S. A., Olson, E. B., Morgan, B. J. & Lombard, J. H. Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H388-93 (2004).
244. Cutler, M. J. et al. Periods of intermittent hypoxic apnea can alter chemoreflex control of sympathetic nerve activity in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H2054-60 (2004).
245. Tamisier, R., Anand, A., Nieto, L. M., Cunningham, D. & Weiss, J. W. Arterial pressure and muscle sympathetic nerve activity are increased after two hours of sustained but not cyclic hypoxia in healthy humans. *J Appl Physiol* 98, 343-9 (2005).
246. Xie, A. et al. Neurocirculatory consequences of intermittent asphyxia in humans. *J Appl Physiol* 89, 1333-9 (2000).

247. Foster, G. E., McKenzie, D. C., Milsom, W. K. & Sheel, A. W. Effects of two protocols of intermittent hypoxia on human ventilatory, cardiovascular and cerebral responses to hypoxia. *J Physiol* 567, 689-99 (2005).
248. Fletcher, E. C., Bao, G. & Miller, C. C., 3rd. Effect of recurrent episodic hypocapnic, eucapnic, and hypercapnic hypoxia on systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 78, 1516-21 (1995).
249. Tamsier, R., Nieto, L., Anand, A., Cunnington, D. & Weiss, J. W. Sustained muscle sympathetic activity after hypercapnic but not hypocapnic hypoxia in normal humans. *Respir Physiol Neurobiol* 141, 145-55 (2004).
250. Brooks, D., Horner, R. L., Kozar, L. F., Render-Teixeira, C. L. & Phillipson, E. A. Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *J Clin Invest* 99, 106-9 (1997).
251. Fletcher, E. C. & Bao, G. The rat as a model of chronic recurrent episodic hypoxia and effect upon systemic blood pressure. *Sleep* 19, S210-2 (1996).
252. Strohl, K. P. et al. Ventilation and metabolism among rat strains. *J Appl Physiol* 82, 317-23 (1997).
253. Farre, R., Rotger, M., Montserrat, J. M., Calero, G. & Navajas, D. Collapsible upper airway segment to study the obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 136, 199-209 (2003).
254. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54 (1976).
255. Davenpeck, K. L., Steeber, D. A., Tedder, T. F. & Bochner, B. S. P- and L-selectin mediate distinct but overlapping functions in endotoxin-induced leukocyte-endothelial interactions in the rat mesenteric microcirculation. *J Immunol* 159, 1977-86 (1997).
256. Kubes, P., Jutila, M. & Payne, D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 95, 2510-9 (1995).
257. Goussev, A. V., Zhang, Z., Anderson, D. C. & Chopp, M. P-selectin antibody reduces hemorrhage and infarct volume resulting from MCA occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 161, 16-22 (1998).
258. Carvalho-Tavares, J., Fox-Robichaud, A. & Kubes, P. Assessment of the mechanism of juxtacrine activation and adhesion of leukocytes in liver microcirculation. *Am J Physiol* 276, G828-34 (1999).
259. Hickey, M. J. et al. Varying roles of E-selectin and P-selectin in different microvascular beds in response to antigen. *J Immunol* 162, 1137-43 (1999).

260. Elizalde, J. I. et al. Platelet activation In mice and human *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Invest* 100, 996-1005 (1997).
261. Miura, S. et al. Intravital demonstration of sequential migration process of lymphocyte subpopulations in rat Peyer's patches. *Gastroenterology* 109, 1113-23 (1995).
262. Tsuzuki, Y. et al. Enhanced lymphocyte interaction in postcapillary venules of Peyer's patches during fat absorption in rats. *Gastroenterology* 112, 813-25 (1997).
263. Sans, M. et al. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 116, 874-83 (1999).
264. Sans, M. et al. Differential role of selectins in experimental colitis. *Gastroenterology* 120, 1162-72 (2001).
265. Jain, V. Clinical perspective of obstructive sleep apnea-induced cardiovascular complications. *Antioxid Redox Signal* 9, 701-10 (2007).
266. Weaver, T. E. & Chasens, E. R. Continuous positive airway pressure treatment for sleep apnea in older adults. *Sleep Med Rev* 11, 99-111 (2007).
267. Shamsuzzaman, A. S., Gersh, B. J. & Somers, V. K. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *Jama* 290, 1906-14 (2003).
268. Vassilakopoulos, T. & Hussain, S. N. Ventilatory muscle activation and inflammation: cytokines, reactive oxygen species, and nitric oxide. *J Appl Physiol* 102, 1687-95 (2007).
269. Gozal, D. & Kheirandish-Gozal, L. Cardiovascular Morbidity in Obstructive Sleep Apnea: Oxidative Stress, Inflammation, and Much More. *Am J Respir Crit Care Med* (2007).
270. Minoguchi, K. et al. Silent brain infarction and platelet activation in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 612-7 (2007).
271. Larkin, E. K. et al. Variation of C-reactive protein levels in adolescents: association with sleep-disordered breathing and sleep duration. *Circulation* 111, 1978-84 (2005).
272. Mehra, R. et al. Soluble interleukin 6 receptor: A novel marker of moderate to severe sleep-related breathing disorder. *Arch Intern Med* 166, 1725-31 (2006).
273. Foster, G. E., Poulin, M. J. & Hanly, P. J. Intermittent hypoxia and vascular function: implications for obstructive sleep apnoea. *Exp Physiol* 92, 51-65 (2007).
274. Minoguchi, K. et al. Elevated production of tumor necrosis factor- α by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 126, 1473-9 (2004).
275. Htoo, A. K. et al. Activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea: a pathway leading to systemic inflammation. *Sleep Breath* 10, 43-50 (2006).

276. Ryan, S., Taylor, C. T. & McNicholas, W. T. Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 824-30 (2006).
277. Yamauchi, M. et al. Evidence for activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 10, 189-93 (2006).
278. Haddad, J. J. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 969-77 (2004).
279. Van Furth, R. Human monocytes and cytokines. *Res Immunol* 149, 719-20 (1998).
280. Barreiro, E. et al. Respiratory loading intensity and diaphragm oxidative stress: N-acetylcysteine effects. *J Appl Physiol* 100, 555-63 (2006).
281. Vassilakopoulos, T., Roussos, C. & Zakynthinos, S. The immune response to resistive breathing. *Eur Respir J* 24, 1033-43 (2004).
282. Krieger, J., Benzoni, D., Sforza, E. & Sassard, J. Urinary excretion of prostanoids during sleep in obstructive sleep apnoea patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 18, 551-5 (1991).
283. Kimura, H. et al. Compensatory excretion of prostacyclin and thromboxane metabolites in obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med* 37, 127-33 (1998).

ANEXO I

Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS). Parte I.

J.M. Montserrat, L. Hernández, M. Nácher, F. Barbé.

ANEXO II

Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS). Parte II.

María Nácher, Anna Serrano-Mollar, Josep Maria Montserrat.

Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS)

J.M. Montserrat^a, L. Hernández^a, M. Nacher^a y F. Barbé^b

^aUnidad del Sueño. Servicio de Neumología. Hospital Clínic. IDIBAPS. Barcelona. España.

^bServicio de Neumología. Hospital Universitario Son Dureta. IUNICS. Palma de Mallorca. Mallorca. España.

Introducción

El síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS) se define como la aparición de episodios de cese total o parcial del flujo aéreo en la boca y la nariz con síntomas secundarios. Hasta la fecha, los estudios se han centrado en aspectos de diagnóstico o tratamiento. Sin embargo, en la actualidad es ineludible abordar nuevos retos como la inflamación, el SAHS y su implicación vascular o el estudio de la vía aérea superior (VAS), que es el nudo etiológico. Además, hay que considerar que existen en el SAHS unos genes que determinan la presencia de una serie de factores de riesgo, lo que explicaría que un 15-20% de la población tenga un índice de apneas-hipopneas superior a 10. El hecho de que la enfermedad acontezca en un 4-6% podría explicarse por una serie de genes que variarían la expresión de mediadores responsables de los síntomas (fig. 1). Por otra parte, que la obstrucción de la VAS se produzca por la noche y no durante el día induce a pensar en la ausencia de unos mecanismos durante la noche para mantener abierta la VAS. En esta revisión se aborda la inflamación en generar el SAHS, la inflamación y la enfermedad vascular y además se profundiza en aspectos de la VAS.

La inflamación

La inflamación es una reacción inespecífica del tejido conjuntivo vascular que actúa como respuesta protectora del organismo frente a diversas noxas¹⁻³. Consta de 3 eslabones: *a*) al inicio, cambios del flujo vascular; *b*) adhesión de células al endotelio y su paso a los tejidos, y *c*) en los tejidos los linfocitos se activan y son responsables de la inmunidad celular. Los 2 primeros puntos corresponderían a la respuesta aguda, que comporta edema y migración de leucocitos, y el tercero, a la respuesta tardía, que opera a través de macrófagos y linfocitos. En ocasiones se produce con fibrosis y/o necrosis del tejido. Los 3 eslabones interaccionan constantemente.

Eslabón 1

Frente a una noxa que ha franqueado la barrera epitelial (primera barrera), los elementos correspondientes a la inmunidad natural, que existe perennemente (neutrófilos, macrófagos, linfocitos citolíticos naturales, el complemento, la proteína C reactiva y las citocinas —factor de necrosis tumoral, interleucina (IL) 12 e interferón—) se activan liberando sustancias que dan lugar a los procesos básicos de este eslabón: edema, vasodilatación y la llegada de neutrófilos. Estos cambios están mediados por aminas vasoactivas (histamina, serotonina y derivados de la agregación plaquetaria), proteasas plasmáticas (cininas, coagulación, complemento) y los lípidos bioactivos (prostaglandinas y leucotrienos), que, además de colaborar en la reacción vascular inicial, la amplifican e intervienen en casi todo el proceso inflamatorio. A continuación se detallan las funciones de estos mediadores.

El sistema cinina (calicreína y bradícina) actúa en la superficie de los tejidos. Tiene una función similar a

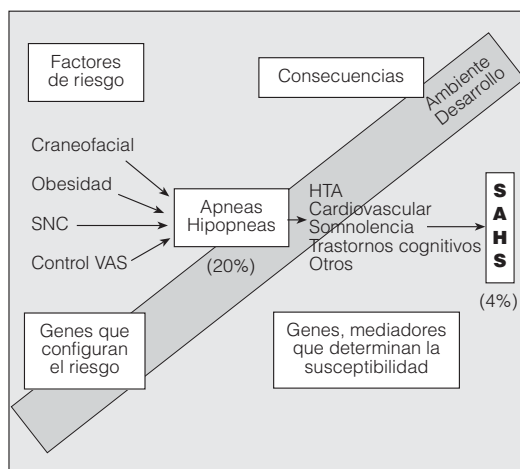


Fig. 1. Esquema que muestra 2 conceptos. Por un lado, una serie de factores de riesgo determinan la presencia o no de apneas. Por otro, las apneas van a producir clínica en función de una serie de factores que expresarán o no una serie de mediadores. HTA: hipertensión arterial; SNC: sistema nervioso central; SAHS: síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño; VAS: vía aérea superior.

Este estudio ha recibido las siguientes subvenciones: SAF2004-00684, V-2003-RED-C11-FO, BAE 97/5490 y ABEMAR.

Correspondencia: Dr. J.M. Montserrat.
Unidad del Sueño. Servicio de Neumología. Hospital Clínic.
Villarreal, 170. 08036 Barcelona. España.
Correo electrónico: jmmontserrat@ub.edu

las aminas vasoactivas y aumenta la permeabilidad. El sistema de la coagulación potencia las cininas y el complemento. El complemento proteínas plasmáticas que favorecen la fagocitosis, la destrucción de toxas y la liberación de sustancias por parte de los mastocitos. Estos últimos liberan histamina, lípidos bioactivos (véase más adelante) y citocinas al desgranularse. Tras una segunda exposición a un determinado antígeno mediante la intervención de inmunoglobulina E y eosinófilos, los mastocitos se desgranulan (respuesta alérgica aguda). Los eosinófilos amplifican y perpetúan la reacción (respuesta tardía). Los lípidos bioactivos se liberan del ácido araquidónico de la pared celular. Se pueden activar 2 vías enzimáticas, la de las ciclooxigenasas 1 y 2, que producen prostaglandinas y tromboxano, y la vía lipogenasa, que origina leucotrienos. Las prostaglandinas intervienen sobre aspectos vasoactivos. Los leucotrienos contraen el músculo liso bronquial, favorecen la quimiotaxis y aumentan la permeabilidad vascular. Otro lípido bioactivo importante es el factor activador de plaquetas, derivado de la membrana celular de las plaquetas, leucocitos y células endoteliales. Interviene de forma decisiva en multitud de eslabones de la respuesta inflamatoria. Provoca agregación plaquetaria, leucocitosis, contracción del músculo liso y aumento de la permeabilidad capilar. Favorece la quimiotaxis y la génesis de radicales libres.

Eslabón 2

Una vez activados los elementos que corresponden a la respuesta inicial, se produce el rodamiento de diversas estirpes celulares en el endotelio y se generan diversas moléculas que favorecen su adhesión y migración a los tejidos. Son las moléculas de adhesión. Las selectinas favorecen la adhesión de neutrófilos, las moléculas de adhesión vascular favorecen a los monocitos, que se van a convertir en macrófagos, y la molécula de adhesión a las células vasculares favorece a los linfocitos. La migración se ve facilitada por una mayor separación entre las células endoteliales a través de la histamina, leucotrienos, cambios en el citoesqueleto y por lesiones directas. Asimismo, el endotelio genera mediadores vasoactivos (óxido nítrico, prostaciclina, endotelina 1 y tromboxano) que regulan el tono vascular.

Eslabón 3

En los tejidos los neutrófilos y macrófagos emigrados tienen una acción bactericida mediante la liberación de diversas sustancias (véase más adelante) y además activan los linfocitos T que desarrollan su actividad citolítica (CD8) y activadora (CD4). Los macrófagos, a través de citocinas, entre otros elementos, favorecen la acción de las moléculas de adhesión y, en consecuencia, una mayor incorporación de macrófagos y neutrófilos. Los linfocitos CD8 atacan la membrana de la noxa y causan lisis osmótica. Los linfocitos CD4, a través de la producción de factor de necrosis tumoral, interferón y otras citocinas, dan lugar a un reclutamiento de leucocitos, la activación de fagocitos y la consiguiente destruc-

ción de la noxa. Toda esta reacción celular persigue destruir todo tipo de noxa, aunque en ocasiones se lesionan los tejidos sanos adyacentes. Los mediadores implicados son:

Las citocinas son los mensajeros intracelulares. Su actividad es amplísima; tienen función hematopoyética (IL-3 e IL-13), intervienen en el proceso inflamatorio inicial (factor de necrosis tumoral, IL-1, IL-6, IL-12 e interferón) y también en el tardío (IL-2, IL-4 e interferón). Respecto a la inflamación se dividen en proinflamatorias (p. ej., IL-6) y antiinflamatorias (p. ej., IL-10). La mieloperoxidasa, los gránulos azurófilos, la lactoferrina y los radicales libres son productos liberados por los neutrófilos y macrófagos para su actividad lítica. Los radicales libres tienen una actividad muy amplia. Si se vierten al medio extracelular, dañan las estructuras vecinas. Los antioxidantes controlan su génesis y liberación. Los radicales libres son un elemento fundamental en la génesis de las lesiones cardiovasculares inducidas por el SAHS. La liberación de radicales libres junto a la presencia de otras sustancias como lípidos y células espumosas podría dar lugar a inflamación de los vasos, fibrosis tisular, lesiones vasculares y arteriosclerosis.

El proceso inflamatorio puede ser incluso nocivo cuando es exagerado. Frente a diversos estímulos —que en el caso del SAHS podrían ser hipoxias transitorias, reacciones neurovegetativas o incluso presiones pleurales negativas— se generan mediadores que pueden alterar la transcripción y provocar una respuesta como la descrita previamente: inflamación, disfunción endotelial, oxidación de lipoproteínas e incluso, frente a células espumosas, enfermedad vascular. La respuesta inflamatoria debe ser equilibrada para no ser nociva o insuficiente. El análisis de los diferentes mediadores descritos estima la presencia o no de inflamación y el tipo predominante.

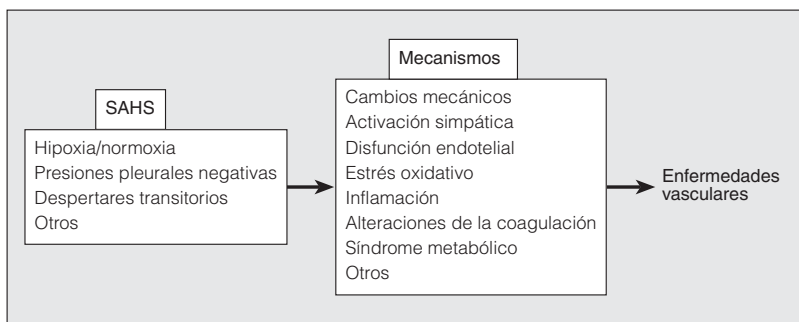
SAHS e inflamación

La relación entre el SAHS y la enfermedad cardiovascular puede producirse: *a*) por los cambios de las presiones intratorácicas, y *b*) por los cambios inflamatorios, tal como se muestra en la figura 2. Los cambios inflamatorios son complejos, con interrelaciones, y a efectos didácticos se han clasificado muy rígidamente.

Cambios mecánicos

Obedecen a la interacción entre la obstrucción de la VAS y las presiones intratorácicas muy negativas, que pueden llegar a ser de $-100 \text{ cmH}_2\text{O}$. Se produce un aumento del gradiente transmiocárdico y, en consecuencia, aumenta de un modo considerable la poscarga. Estas presiones negativas dan lugar a un aumento del retorno venoso, que desplaza el *septum* hacia la izquierda, con el consiguiente deterioro de la función del ventrículo izquierdo. En resumen, la combinación del aumento de la poscarga por las presiones negativas, y también por la hipertensión que se genera, el desplazamiento del *septum* y, por último, la hipoxemia que se crea da lugar a una disfunción cardíaca que reverte totalmente con presión positiva continua de la vía aérea (CPAP)^{4,5}.

Fig. 2. Esquema de los mecanismos por los cuales el síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño (SAHS) puede dar lugar a enfermedades cardiovasculares. Los acontecimientos nocturnos originan reacciones diversas, entre ellas la inflamatoria, responsables de la posible afectación vascular.



Anomalías neurovegetativas

En sujetos sanos la actividad simpática durante la noche, la presión arterial y la frecuencia cardíaca disminuyen; en la fase REM, aumentan. Los quimio y barorreceptores controlan los cambios gasométricos y de la presión arterial a través, entre otros, de la activación o reducción de la actividad de los sistemas simpático y parasimpático. Los pacientes con SAHS, por la hipoxemia y el resto de acontecimientos que ocurren durante las apneas, muestran durante la noche y durante el día un incremento de la actividad simpática que incrementa la presión arterial. En comparación con personas sanas, presentan taquicardia, reducción de la variabilidad cardíaca y aumento de la variabilidad de la presión arterial. Todos estos cambios representan un factor de riesgo acusado de daño vascular⁶.

Disfunción endotelial

El endotelio regula el tono vascular mediante una serie de mediadores (endotelina 1 y tromboxano como vasoconstrictores, y prostaciclina y óxido nítrico como vasodilatadores). Frente a diversos estímulos como los que componen los factores de riesgo cardiovascular (diabetes, tabaco, lípidos) o aquellos que acontecen en el SAHS, tales como hipoxia e hipercapnia, entre otros, se produce una respuesta endotelial anómala que da lugar a vasoconstricción, reducción de la capacidad de vasodilatación y una reacción inflamatoria. Se facilita la arteriosclerosis^{3,7}, se incrementan las moléculas de adhesión y todo ello puede revertir con CPAP⁸. En el SAHS los episodios de hipoxia a través del factor de inducción de hipoxia dan lugar a un aumento del factor de crecimiento endotelial vascular, que es un elemento que incrementa la vascularización y, en consecuencia, protege. El equilibrio entre los factores previos o la intensidad del estímulo determinará si la respuesta endotelial vasoconstrictora y arteriosclerótica va a desarrollarse con la consiguiente aparición de enfermedad vascular.

Estrés oxidativo

Un radical libre es cualquier molécula con uno o más electrones desapareados. La oxidación es el proceso mediante el cual los átomos traspasan electrones a otro átomo.

Los radicales libres recorren el organismo para obtener un electrón que los estabilice⁹. Al obtenerlo de una molécula normal convierten a ésta, a su vez, en un radical libre, pero también se considera que la lesionan. Se desencadena una reacción en cadena que daña el organismo. Los radicales libres no son intrínsecamente perjudiciales, pues son necesarios en nuestro cuerpo para luchar contra diversas toxas. Los neutrófilos los producen para atacar los microorganismos y ya en la respiración celular se produce adenosintrifostato y un porcentaje pequeño de radicales libres. Los antioxidantes los regulan. En personas con SAHS se pueden producir cantidades muy notables de radicales libres que los antioxidantes no pueden compensar⁹. Se produce entonces lesión celular. En el SAHS los radicales libres se originan en las mitocondrias, los fagocitos y el tejido vascular. Los fenómenos que ocurren durante las apneas darán lugar a un aumento de oxidasas, probable disfunción mitocondrial que impulsa un importante incremento de radicales libres y otros mediadores. Éstos dan lugar a una activación de los factores de transcripción, que inducirán anomalías en la expresión génica, con la formación de factores inflamatorios responsables de una cascada inflamatoria global tal como se ha descrito previamente⁹. Se activan los linfocitos, monocitos, neutrófilos, células endoteliales, las moléculas de adhesión y, además, la angiogénesis, con las consecuencias antes descritas (fig. 3)⁹.

Inflamación

Se ha demostrado que la inflamación sistémica tiene responsabilidad en la patogenia de la insuficiencia cardíaca¹⁰. Por la hipoxia y la desestructuración del sueño entre otros, los pacientes con SAHS experimentan una inflamación sistémica con incremento de la proteína C reactiva, factor de necrosis tumoral y citocinas que activan la vía inflamatoria descrita¹¹⁻¹³. Se generan moléculas de adhesión que, junto a la cadena inflamatoria, pueden favorecer el desencadenamiento de la arteriosclerosis³. La homocisteína es un aminoácido que se genera a partir de las proteínas de la dieta. Las concentraciones sanguíneas elevadas de homocisteína son de origen genético o aparecen por déficit de ácido fólico o folato. La homocisteína es un factor de riesgo para la arterioscle-

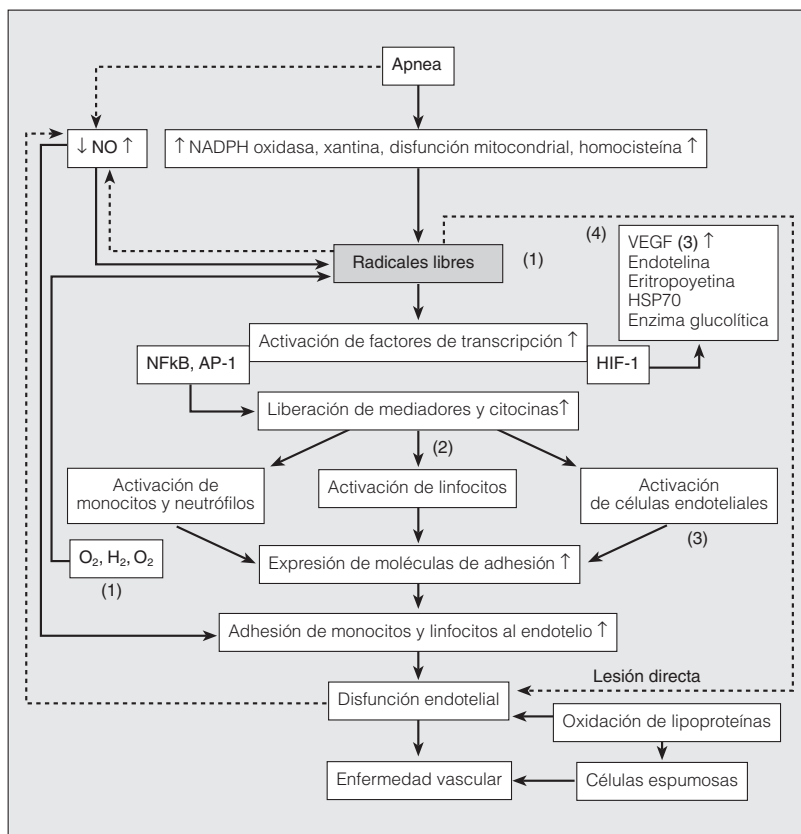


Fig. 3. Diversos mecanismos que intervienen en la respuesta celular y molecular para que el síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño (SAHS) pueda producir enfermedad vascular. Diversos acontecimientos que tienen lugar durante las apneas dan lugar al incremento de radicales libres, se producen anomalías en la transcripción de diversos mediadores, así como una reacción inflamatoria generalizada y daño vascular. NFκB: factor nuclear κB; HIF: factor de inducción de hipoxia; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; NADPH: nicotinamida adenindinucleótido; AP: proteína activadora. 1: estrés oxidativo; 2: inflamación; 3: disfunción endotelial; 4: angiogénesis.

rosis. Respecto a la enfermedad coronaria, las concentraciones elevadas de homocisteína en sangre inducen un riesgo similar al del tabaquismo o al de la hiperlipemia. Se supone que actúa provocando disfunción endotelial, estrés oxidativo, aumento de la agregación plaquetaria y proliferación de la musculatura lisa. En el SAHS todos los elementos que acontecen durante las apneas por un mecanismo no claro inducen el incremento de homocisteína¹⁴.

Síndrome metabólico asociado al SAHS

El síndrome metabólico se define cuando un sujeto tiene al menos 3 criterios de los 5 siguientes: aumento del diámetro de la cintura, hipertensión, hiperglucemia, reducción del colesterol de alta densidad y aumento de los triglicéridos. Se pueden asociar además inflamación, disfunción endotelial, microalbuminuria, resistencia a la insulina y activación simpática. Los pacientes con SAHS poseen la mayoría de los factores citados previamente y un 40% de ellos tienen criterios de síndrome metabólico^{15,16}. Otro elemento relacionado con la obesidad es la leptina, una hormona derivada del tejido adiposo que reduce el apetito y se genera frente a cantida-

des elevadas de grasa. Produce agregación plaquetaria y actúa sobre otros elementos de riesgo cardiovascular. En el SAHS las concentraciones de leptina están elevadas en comparación con los obesos sin SAHS, lo cual indica resistencia y, en consecuencia, una tendencia a engordar¹⁷. Se ha señalado que el SAHS podría inducir síndrome metabólico a través de la hipoxemia, toda una cadena inflamatoria y estrés oxidativo, entre otros, que mejora con CPAP¹⁸. Sin embargo, la comorbilidad asociada representa un factor de confusión definitivo hasta el momento¹⁶. En la actualidad, al igual que sucedió con hipertensión y SAHS, no está clara la relación de causalidad del SAHS con el desarrollo del síndrome metabólico. Los estudios se hallan en una fase inicial.

Alteraciones de la coagulación

La agregación plaquetaria, las concentraciones de fibrinógeno e incluso la viscosidad sanguínea están elevadas en el SAHS¹⁹. Esta circunstancia se atribuye al aumento de la actividad simpática que se origina durante las apneas. Se ha comprobado que los trastornos de la coagulación se reducen con CPAP¹⁹. En consecuencia, en el futuro habrá que considerar los efectos nocivos del

SAHS y la eficacia de la CPAP, no sólo respecto a la somnolencia y los síntomas clínicos, sino mediante otros parámetros como los que se han descrito. Se precisan trabajos más concluyentes con un elevado número de pacientes para aplicar estos conceptos, que sin duda, en nuestra opinión, van a ser trascendentes para una nueva visión del SAHS.

Inflamación y vía aérea superior

En la última década han aparecido datos que revelan la presencia de marcadores de inflamación en la VAS y que apuntan a que la inflamación podría tener un papel en la fisiopatología del SAHS²⁰⁻²³. En estos pacientes es frecuente el hallazgo macroscópico de inflamación local de la úvula, el aumento del tamaño y el enrojecimiento de la úvula y del paladar blando. Se postula que estos cambios inflamatorios locales son debidos a la vibración generada por el ronquido²⁰. Pero no solamente se han encontrado cambios inflamatorios en las estructuras susceptibles a la vibración del ronquido, sino que los pacientes con SAHS, en ausencia de otros procesos que lo justifiquen, tienen inflamación nasal²¹, indicios de inflamación en la vía aérea²² y aumento de neutrófilos en el esputo inducido²³, así como inflamación en el parénquima pulmonar de un modelo animal de síndrome de apneas en rata²⁴. Todo ello indicaría que las presiones generadas a lo largo de todo el sistema respiratorio durante las obstrucciones de la VAS pueden contribuir a la aparición de inflamación en los pacientes con SAHS. Los estudios histológicos de la VAS en el SAHS se han realizado sobre muestras de uvulopalatofaringoplastia provenientes de pacientes con SAHS, roncadors sin apneas y controles sometidos a otras intervenciones quirúrgicas del área otorrinolaringológica, o bien de muestras de necropsias. Uno de los primeros cambios histológicos descritos en el SAHS fue la presencia de un importante edema subepitelial²⁵. El edema, una de las manifestaciones histopatológicas de inflamación local, está asociado a un aumento de la permeabilidad vascular, por lo que algunos estudios lo han relacionado con congestión y dilatación vascular²⁶. Otras veces, la extravasación de líquido hacia la matriz extracelular puede manifestarse como un aumento del grosor de la lámina propia, indicativo de edema intersticial²⁷. Junto con el edema, se han señalado otras alteraciones histopatológicas en la VAS de pacientes con SAHS, en las que la inflamación parece tener algún papel. Sekosan et al²⁷ describieron la aparición de un extenso infiltrado inflamatorio leucocitario con predominio de células plasmáticas en la lámina propia. Paulsen et al²⁰ detectaron infiltrado inflamatorio en la lámina propia, en este caso con predominio de células T (CD3+), junto con una reducción de la densidad y altura de las estructuras papilares del tejido conectivo que se introducen hacia el epitelio, cuya función es el anclaje estructural y el soporte nutricional. En este estudio los pacientes con SAHS tienen diferencias en el patrón de expresión de algunas citoqueratinas y acantosis en el epitelio. Woodson et al²⁶ también encontraron cambios estructurales como la acantosis en el epitelio, con hipertrofia en las glándulas mucosas, pero

al mismo tiempo observaron atrofia focal de fibras musculares y cambios degenerativos en nervios periféricos. En este sentido, Boyd et al²⁸ han descrito un aumento en las terminaciones nerviosas musculares, con evidencia de denervación acompañada de un infiltrado inflamatorio con predominio de células T (CD4+ y CD25+). Por otro lado, Friberg et al²⁹ revelaron la presencia de numerosas terminaciones nerviosas anómalas de aspecto varicoso en la lámina propia, y finalmente Hernández et al³⁰ han correlacionado positivamente la densidad de fibras nerviosas y la infiltración por leucocitos (CD45+) en la mucosa de la úvula de pacientes con SAHS. Todo ello hace pensar en la presencia de una neuropatía, probablemente mediada por inflamación, responsable de los déficit sensoriales detectados en la VAS del SAHS³¹ y de la disfunción muscular de la VAS, que contribuyen al proceso de obstrucción. Algunas de estas alteraciones también se han identificado en pacientes roncadors sin apneas, aunque en menor grado, pero no en individuos controles no roncadors^{26,29}. Cabría pensar que, en fases iniciales, la vibración del ronquido provocaría modificaciones estructurales e inflamación local en la VAS que iría progresando paulatinamente. La inflamación local *per se* condicionaría el compromiso anatómico, lo que facilitaría la obstrucción. Aparte del compromiso estructural, la inflamación local desempeñaría un papel en la disfunción neuromuscular de la VAS alterando los reflejos nerviosos y la función de los músculos que controlan el calibre de la vía aérea³². Una vez que los acontecimientos respiratorios obstructivos están presentes, los cambios en las presiones de la vía aérea y la hipoxemia contribuirían a amplificar la inflamación en otras zonas del sistema respiratorio, incluso a nivel sistémico. Se estaría frente a un círculo vicioso en el que a mayor inflamación, mayor disfunción y más obstrucción, que finalmente genera más inflamación. En todo este proceso, la inflamación sería una consecuencia de los fenómenos que acontecen durante los acontecimientos respiratorios. No obstante, es difícil disponer de datos histológicos que demuestren la remisión de estas alteraciones después de un tratamiento efectivo, como la CPAP. Tampoco se puede descartar que se trate de una enfermedad con base inflamatoria que en algún momento se active provocando toda la cascada de alteraciones locales antes descritas. Posiblemente nos encontremos frente a un nuevo campo para definir mejor los mecanismos subyacentes en la fisiopatología del SAHS.

Características mecánicas de los músculos de la vía aérea superior

En la VAS existe un gran número de músculos, con acciones a menudo complementarias y sinérgicas, que pueden modificar el tamaño y la configuración de la faringe. Los principales músculos dilatadores de la faringe son el *tensor palatini*, el *geniohioideo*, el *esternohioideo* y, sobre todo, el *geniogloso* (GG). Durante la vigilia, el tono muscular basal de los músculos de la VAS mantiene la permeabilidad de la luz y el flujo aéreo. En los enfermos con SAHS, el tono basal diurno del GG está aumentado respecto a los sujetos sanos y es

proporcional al grado de resistencia al flujo aéreo intraluminal³³. Durante el sueño, al igual que todos los músculos de la VAS, el GG disminuye su grado de actividad basal y también su capacidad de respuesta ante la presión negativa dentro de la luz faríngea generada en cada contracción diafragmática³⁴. De esta forma favorece el colapso de la VAS y la aparición de apneas. Una vez establecida la apnea, el GG incrementa progresivamente su actividad electromiográfica hasta alcanzar un pico, que coincide con la reapertura de la luz faríngea y el restablecimiento del flujo aéreo. Estas observaciones apuntan a que el GG está implicado tanto en la aparición como en la resolución de las apneas. Según Petrof et al³⁵, la hiperactividad muscular mantenida podría inducir cambios adaptativos en los músculos de la VAS, especialmente en el GG. Para poder generar más fuerza, sus fibras musculares deberían hipertrofiarse y, asimismo, aumentar el porcentaje relativo de fibras tipo II, menos resistentes que las de tipo I, pero capaces de generar más fuerza, imprescindible para vencer el colapso de la vía aérea durante las apneas. Estos cambios adaptativos provocarían, no obstante, efectos secundarios indeseables, a saber: la hipertrofia muscular ocupa más espacio, lo cual comprometería la luz faríngea; además, la mayor fuerza generada por las fibras tipo II y su hiperactividad mantenida acabarían por dañar algunas fibras musculares que serían sustituidas por tejido fibroso. Este tejido también ocupa espacio y disminuye la eficacia de la contracción muscular. Todo ello comprometería aún más la luz faríngea, lo que favorecería la tendencia al colapso. En esta línea, Sérès et al³⁶ demostraron que el GG de los enfermos con SAHS tiene una mayor proporción de fibras tipo IIA (respecto a las IIB) que el de los roncadores simples, y que en ellos el músculo de la úvula tiende a fatigarse más y a tener más fibras tipo II que el de los roncadores simples³⁷. Aunque estos resultados tienden a confirmar la teoría de Petrof et al³⁵, hay que tener en cuenta, como limitaciones de estos estudios, que el grupo control estuvo formado por roncadores y que los estudios electrofisiológicos se efectuaron en biopsias de úvula, músculo que no ha demostrado estar especialmente implicado en la fisiopatología del síndrome de apneas obstructivas del sueño.

Tratando de evitar estas limitaciones Carrera et al³⁸ han evaluado, *in vitro*, las propiedades contráctiles e histoquímicas del GG, el principal músculo dilatador de la faringe. Para ello se estudió a un grupo de pacientes con SAHS en el momento del diagnóstico, antes de iniciar ningún tratamiento, un grupo control de sujetos sanos (no roncadores) sin SAHS y un tercer grupo de enfermos con síndrome de apneas obstructivas del sueño tratados con CPAP durante, al menos, un año. Este tercer grupo permitiría estudiar el efecto de la CPAP sobre las propiedades del músculo GG. Las principales observaciones de este trabajo fueron: a) la fatigabilidad *in vitro* del GG está aumentada en los enfermos con SAHS; b) la causa sería una mayor proporción de fibras tipo II, más potentes pero menos resistentes que las tipo I, y c) la estructura y la función del GG se normalizan después de un año de tratamiento con CPAP. El hecho de que las alteraciones electrofisiológicas e histológicas observa-

das sean corregibles con CPAP induce a pensar que son una consecuencia de los episodios de colapso de la VAS, no su causa, lo que apoyaría la hipótesis integradora de Petrof et al³⁵ antes comentada. Sin embargo, la obesidad, que es una característica clínica común del SAHS, podría influir tanto en la estructura como en la función de los músculos de la vía aérea. Con el objetivo de evaluar el impacto de la obesidad sobre la estructura y función del GG en pacientes con SAHS, Carrera et al³⁹ ampliaron su estudio inicial mediante la inclusión de más sujetos. Se estudió a los mismos grupos que en el estudio inicial (pacientes en el momento del diagnóstico, controles y otro grupo de pacientes después de un año de tratamiento con CPAP), pero además cada grupo estaba dividido en 2 subgrupos: obesos y no obesos. Los hallazgos de este nuevo estudio fueron: a) se confirmó que, en el momento del diagnóstico, los pacientes con SAHS presentaban un porcentaje más elevado de fibras de tipo II que los controles, independientemente de la obesidad; b) la obesidad no influye en la fuerza máxima de contracción, y c) las características de fatigabilidad del GG eran muy diferentes en los 2 grupos con SAHS estudiados: en los pacientes con SAHS no obesos, el GG mostró una resistencia a la fatiga disminuida, la cual se normalizó totalmente después del tratamiento con CPAP. En los pacientes obesos, no hubo diferencia en fatigabilidad del GG respecto a la observada en controles obesos. Estos resultados indicarían que la obesidad (en ausencia de SAHS) no supone una mayor carga de trabajo sobre el GG ni influye por sí misma en la estructura del GG. La observación más relevante y sorprendente del estudio de Carrera et al³⁹ es que la resistencia del GG está disminuida en los sujetos no obesos con SAHS, al contrario de lo que ocurre en los obesos (fig. 4), y que este efecto en los pacientes no obesos con SAHS es reversible con el tratamiento prolongado con CPAP³⁹. Dado que estos 2 grupos de pacientes comparten la misma distribución anormal de fibra, este hecho no puede explicarse por diferencias estructurales. Por ello, tiene que estar relacionado, necesariamente, con diferencias en los mecanismos celulares involucrados en los procesos de contracción muscular y generación de fuerza, como la liberación y toma de calcio y adenosintrifosfato, así como la síntesis y liberación de fosfocreatina, entre otros. El hecho de que la resistencia del GG sea anormal y corregible con CPAP sólo en pacientes con SAHS no obesos puede tener implicaciones clínicas. Sobre la base de estas diferencias mecánicas entre pacientes obesos y no obesos se pueden plantear, al menos teóricamente, diferentes estrategias terapéuticas. Por ejemplo, el conocimiento de los mecanismos celulares que regulan la capacidad de resistencia puede llevar a tratamientos farmacológicos mejor orientados a este objetivo. Por otra parte, el hecho de que la CPAP normalice la resistencia del GG en pacientes no obesos podría permitir, en teoría, plantear la posibilidad de tratar a los pacientes con síndrome de apneas del sueño mediante CPAP de forma intermitente. Este planteamiento puede tener un impacto clínico importante, ya que en algunos laboratorios el 50% de los pacientes con SAHS no son obesos. En resumen, los músculos de la

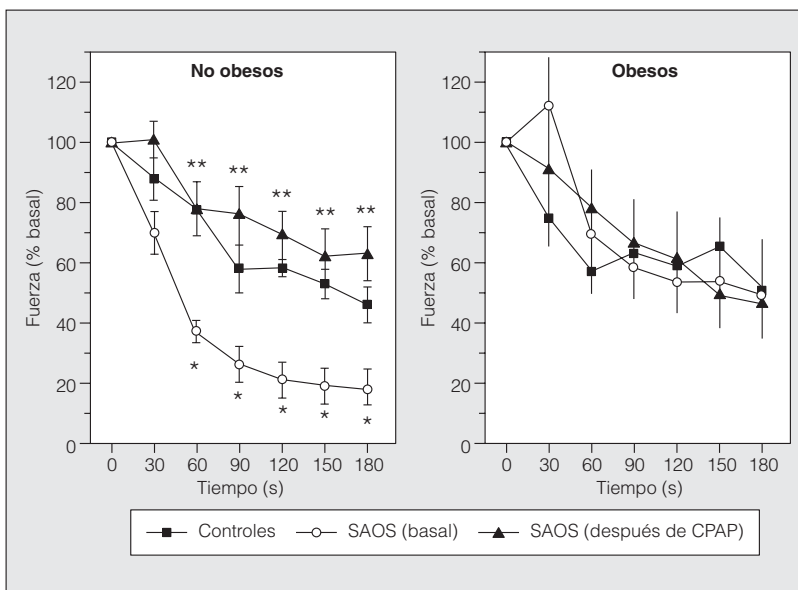


Fig. 4. Evolución a lo largo del tiempo de la fuerza del geniogloso (media \pm desviación estándar) como respuesta a una estimulación eléctrica repetida (40 Hz) en sujetos no obesos y obesos. CPAP: presión positiva continua de la vía aérea; SAOS: síndrome de apneas obstructivas del sueño; * $p < 0,05$ entre obesos sin tratamiento y controles; ** $p < 0,05$ entre pacientes antes y después de CPAP. (Modificada de Carrera et al³⁹.)

VAS de los pacientes con SAS presentan una alteración en la distribución del tipo de fibras musculares, con un predominio de las fibras tipo II, más potentes pero menos resistentes que las tipo I. La obesidad influye en la mecánica de la vía aérea de forma que las alteraciones contractiles del GG sólo se aprecian en pacientes no obesos.

El SAHS es una enfermedad muy común que, aparte de los síntomas clásicos como la somnolencia, tiene otras implicaciones notorias en, por ejemplo, el síndrome metabólico o las enfermedades cardiovasculares, mediada, entre otros, por la inflamación. Es de esperar que el conocimiento de los mecanismos implicados en la VAS del SAHS permita tratamientos etiológicos más definitivos y menos engorrosos. Es posible que, en pocos años, una muestra de sangre para medir una serie de biomarcadores sea muy útil a efectos de valoración, seguimiento e incluso diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Sanders, 2003.
- Alberts B. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: GS Garland Science, 2002.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
- Bradley TD, Floras JS. Sleep apnea and heart failure: Part II: central sleep apnea. *Circulation* 2003;107(13):1822-6.
- Tkacova R, Rankin F, Fitzgerald FS, Floras JS, Bradley TD. Effects of continuous positive airway pressure on obstructive sleep apnea and left ventricular afterload in patients with heart failure. *Circulation* 1998;98:2269-75.
- Smith RP, Veale D, Pepin JL, Levy P. Obstructive sleep apnea and the autonomic nervous system. *Sleep Medicine Reviews* 1998;2:69-92.
- Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002;106:640-2.
- Lavie L, Kraiczi H, Hefetz A, Ghandour H, Perelman A, Hedner J, et al. Plasma vascular endothelial growth factor in sleep apnea syndrome: effects of nasal continuous positive air pressure treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1624-8.
- Lavie L. Obstructive sleep apnea syndrome-an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 2003;7:35-51.
- Lisman KA, Stetson SJ, Koerner MM, Farmer JA, Torre-Amione G. The role of inflammation in the pathogenesis of heart failure. *Curr Cardiol Rep* 2002;4:200-5.
- Barceló A, Barbé F, Llompert E, Mayorals LR, Ladaría A, Bosch M, et al. Effects of obesity on C-reactive protein level and metabolic disturbances in male patients with obstructive sleep apnea. *Am J Med* 2004;117:118-21.
- Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 2003;107:1129-34.
- 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 CPAP. *Chest* 2003;124:1386-92.
- Lavie L, Perelman A, Lavie P. Plasma homocysteine levels in obstructive sleep apnea: association with cardiovascular morbidity. *Chest* 2001;120:900-8.
- Punjabi NM. Improvement of metabolic function in sleep apnea: the power of positive pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:139-40.
- Gami AS, Somers VK. Obstructive sleep apnea, metabolic syndrome, and cardiovascular outcomes. *Eur Heart J* 2004;25:709-11.
- Phillips BG, Kato M, Narkiewicz K, Choe I, Somers VK. Increases in leptin levels, sympathetic drive, and weight gain in obstructive sleep apnea. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H234-H7.
- Harsch IA, Schahin SP, Radespiel-Troger M, Weintz O, Jahreis H, Fuchs FS, et al. Continuous positive airway pressure treatment rapidly improves insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:156-62.

19. Olson LJ, Olson EJ, Somers VK. Obstructive sleep apnea and platelet activation: another potential link between sleep-disordered breathing and cardiovascular disease. *Chest* 2004;126:339-41.
20. Paulsen FP, Steven P, Tsokos M, Jungmann K, Muller A, Verse T, et al. Upper airway epithelial structural changes in obstructive sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 501-9.
21. Rubinstein I. Nasal inflammation in patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope* 1995;175-7.
22. 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;122:1162-7.
23. Salerno FG, Carpagnano E, Guido P, Bonsignore MR, Roberti A, Aliani M, et al. Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. *Respir Med* 2004;98:25-8.
24. Calero G, Serrano-Mollar A, Farre R, Closa D, Navajas D, Montserrat JM. Lung Inflammation in a rat model of obstructive sleep apnea. Role of strenuous breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;169:A432.
25. Saul S, Kimmelman CP, Brooks JS, et al. Histopathology of sleep apnea. *Trans Am Laryngol Assoc* 1988;109:222-225.
26. Woodson BT, Garancis JC, Toohill RJ. Histopathologic changes in snoring and obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope* 1991;101(12 Pt 1):1318-22.
27. Sekosan M, Zakkari M, Wenig BL, Olopade CO, Rubinstein I. Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope* 1996;106:1018-20.
28. 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.
29. 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.
30. Hernández L, Payne RJ, Naor N, Kimoff RJ. Relationship between nerve tissue and inflammatory cell infiltration in the upper airway (UA) of obstructive sleep apnea (OSA) patients. *Eur Respir J* 2004;24 (Suppl).
31. 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;164:250-5.
32. Hatipoglu U, Rubinstein I. Inflammation and obstructive sleep apnea syndrome pathogenesis: a working hypothesis. *Respiration* 2003;70:665-71.
33. Mezzanotte WS, Tangel DJ, White DP. Waking genioglossal electromyogram in sleep apnea patients versus normal controls (a neuromuscular compensatory mechanism). *J Clin Invest* 1992;89: 1571-79.
34. Wheatley JR, Mezzanotte WS, Tangel DJ, White DP. Influence of sleep on genioglossus muscle activation by negative pressure in normal men. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:597-605.
35. Petrof BJ, Hendricks JC, Pack AI. Does upper airway muscle injury trigger a vicious cycle in obstructive sleep apnea? A Hypothesis. *Sleep* 1996;19:465-71.
36. Sériès F, Simoneau JA, St. Pierre S, Marc I. Characteristics of the genioglossus and musculus uvulae in sleep apnea hypopnea syndrome and in snorers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1870-74.
37. Sériès F, Côté C, Simoneau J-A, Gélinas Y, St. Pierre S, Leclerc J, et al. Physiologic, metabolic, and muscle fiber type characteristics of musculus uvulae in sleep apnea hypopnea syndrome and in snorers. *J Clin Invest* 1995;95:20-5.
38. Carrera M, Barbé F, Sauleda J, Tomás M, Gómez C, Agustí AG. Patients with obstructive sleep apnea exhibit genioglossus dysfunction that is normalized after treatment with continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1960-6.
39. Carrera M, Barbé F, Sauleda J, Tomás M, Gómez C, Santos C, et al. Effects of obesity upon genioglossus structure and function in obstructive sleep apnea. *Eur Respir J* 2004;23:425-9.

Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS)

María Nácher^a, Anna Serrano-Mollar^b y Josep Maria Montserrat^a

^aUnitat Multidisciplinària de la Son. Servei de Pneumologia, Hospital Clínic. IDIBAPS. Barcelona. España.

^bDepartment of Experimental Pathology. IIBB-CSIC-IDIBAPS. Barcelona. España.

El síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS) se define como la aparición de episodios de cese total o parcial del flujo aéreo en la boca y la nariz (apnea obstructiva del sueño), con síntomas secundarios. Hasta la fecha los estudios del SAHS se han centrado en aspectos de diagnóstico, tratamiento o epidemiológicos. Sin embargo, en la actualidad es ineludible abordar nuevos retos, como el estudio de la vía aérea superior (VAS), donde se generan la obstrucción y las consecuencias secundarias, especialmente las cardiovasculares. La obstrucción de la VAS se produce por la noche y no durante el día, lo cual indica la ausencia de unos mecanismos que durante la noche no la mantienen abierta. El SAHS hay que considerarlo, en parte, en clave genética. Una serie de genes determinan o favorecen la presencia de varios factores de riesgo (obesidad, control de la ventilación, morfología facial, etc.) que explicarían que un 15-20% de la población tenga un índice de apneas-hipopneas mayor de 10. Habría además otros genes responsables del fenotipo, que serían la causa de que las obstrucciones induzcan síntomas. En esta revisión se analizarán consideraciones generales sobre la inflamación, aspectos de la VAS y las relaciones del SAHS especialmente con las entidades cardiovasculares y, en concreto, con la actividad de los radicales libres.

Palabras clave: Apneas durante el sueño. Mediadores celulares. Mecanismos. Enfermedad vascular.

New pathogenic features in sleep apnea-hypopnea syndrome (SAHS)

Sleep apnea-hypopnea syndrome (SAHS) is defined as episodes of partial or complete cessation of airflow in the mouth and nose (obstructive sleep apnea) with secondary symptoms. To date, studies of SAHS have centered on diagnosis, treatment, and epidemiological features. However, new challenges such as study of the upper airway, where the obstruction occurs, and secondary effects, especially cardiovascular effects, must be met. Upper airway obstruction is produced at night and not during the day, suggesting the absence of mechanisms keeping the airway open at night. In part, SAHS must be considered a genetic disorder. A series of genes determine or favor the presence of several risk factors (obesity, ventilatory control, facial morphology, etc.) that may help to explain the finding that 15-20% of the population has an apnea-hypopnea index >10. There are also other genes giving rise to the phenotype, causing the obstructions to induce symptoms. The present review analyzes general considerations on inflammation and aspects of the upper airway, and lastly discusses associations with SAHS, especially with cardiovascular entities, and specifically free radical activity.

Key words: Sleep apnea. Cellular mediators. Mechanisms. Vascular disease.

Introducción

La inflamación es una reacción inespecífica del tejido conjuntivo vascular que actúa como respuesta protectora del organismo frente a diversas noxas^{1,2}. Consta de una reacción inicial o aguda (eslabones 1 y 2) y de una reacción tardía (eslabón 3):

—*Eslabón 1.* Frente a una noxa, los elementos correspondientes a la inmunidad natural, que existen perennemente en sangre (neutrófilos, células citolíticas, com-

plemento, entre otros), se activan y liberan sustancias que dan lugar a los procesos básicos de este eslabón: edema, vasodilatación y llegada de neutrófilos.

—*Eslabón 2.* Una vez activados los diferentes elementos que corresponden a la respuesta inicial, se produce el rodamiento de diversas estirpes celulares en el endotelio y se generan diversas moléculas que favorecen su adhesión y migración a los tejidos; son las llamadas moléculas de adhesión, que permiten y favorecen el paso de leucocitos a la membrana basal y tejidos. Asimismo, el endotelio genera mediadores vasoactivos (óxido nítrico, prostaciclina, endotelina-1 y tromboxano), que regulan el tono vascular.

—*Eslabón 3.* En los tejidos los neutrófilos y macrófagos emigrados tienen múltiples acciones, ya sean bactericidas o de liberación de sustancias que, a su vez, pueden inducir lesiones vasculares a través de la dificultad

Trabajo subvencionado por SAF2004-00684, SEPAR, FUCAP y Air-Products.

Correspondencia: Dr. J.M. Montserrat.
Unitat del Son. Servei de Pneumologia. Hospital Clínic.
Villarroel, 170. 08036 Barcelona. España.
Correo electrónico: jmmontserrat@ub.edu

para generar mediadores vasoactivos como el óxido nítrico y la generación de múltiples mediadores que activan diversas vías de la inflamación, se retroalimentan e implican a sistemas celulares muy diversos (linfocitos, entre otros).

En el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS), uno de los elementos patogénicos más importante en la cascada inflamatoria es la producción de radicales libres.

Vía aérea

En la última década han aparecido datos en pacientes con SAHS que revelan la presencia de marcadores de inflamación en la vía aérea superior (VAS) e indican que la inflamación podría tener un papel en la fisiopatología del SAHS³⁻⁹. En estos pacientes es frecuente el hallazgo macroscópico de inflamación local, aumento del tamaño y enrojecimiento de la úvula y del paladar blando. Se postula que estos cambios inflamatorios locales se deben a la vibración generada por el ronquido. Pero no sólo se han encontrado cambios inflamatorios en las estructuras susceptibles a la vibración del ronquido, sino que los pacientes con SAHS, en ausencia de otros procesos que lo justifiquen, tienen inflamación nasal⁴, indicios de inflamación en la vía aérea^{3,5}, aumento de neutrófilos en el esputo inducido e incluso inflamación en el parénquima pulmonar⁵, lo que también se ha observado en un modelo de SAHS en rata⁷. Se ha señalado que, además del ronquido, las presiones muy negativas generadas a lo largo de todo el sistema respiratorio durante las obstrucciones podrían contribuir a la aparición de inflamación³. Los estudios histológicos de la VAS en el SAHS han descrito la presencia de un importante edema subepitelial y un aumento del grosor de la lámina propia^{3,8}. Conjuntamente con el edema, se han señalado otras alteraciones histopatológicas en la VAS de pacientes con SAHS, donde la inflamación parece tener un papel. Sekosan et al⁹ describieron la aparición de un extenso infiltrado inflamatorio leucocitario con predominio de células plasmáticas en la lámina propia. Por su parte, Paulsen et al³ detectaron un infiltrado inflamatorio en la lámina propia, en este caso con predominio de células T (CD3+), junto con una reducción de la densidad y altura de las estructuras papilares del tejido conectivo que se introducen hacia el epitelio y cuya función es el anclaje estructural y soporte nutricional. En este estudio, los pacientes con SAHS presentaron diferencias en el patrón de expresión de algunas citoqueratinas y acantosis en el epitelio. También se encontraron cambios estructurales, como la acantosis en el epitelio, hipertrofia en las glándulas mucosas, atrofia focal de fibras musculares y cambios degenerativos en nervios periféricos. En este sentido, también se han descrito anomalías en las terminaciones nerviosas musculares, con evidencia de denervación, acompañada de un infiltrado inflamatorio con predominio de células T (CD4+ y CD25+) y numerosas terminaciones nerviosas anómalas de aspecto varicoso en la lámina propia.

Todo ello hace pensar en la presencia de una neuropatía, probablemente mediada por inflamación, que se-

ría responsable de los déficit sensoriales que se observan en la VAS del SAHS y de la disfunción muscular de la VAS, que contribuirán al proceso de obstrucción. Algunas de estas alteraciones también se han identificado en pacientes sin apneas que roncan, aunque en un grado menor, pero no en individuos controles que no roncan. Cabría pensar entonces que en las fases iniciales la vibración del ronquido provocaría inflamación local en la VAS, que iría progresando paulatinamente. Aparte del compromiso estructural que presentan estos pacientes, la inflamación local desempeñaría un papel en la disfunción neuromuscular de la VAS alterando los reflejos y la función de los músculos que controlan el calibre de la vía aérea. Una vez que los eventos respiratorios obstructivos están presentes, los cambios en las presiones de la vía aérea y la hipoxemia contribuirían a amplificar la inflamación a otras zonas del aparato respiratorio, incluso a nivel sistémico. Se entraría en un círculo vicioso, en el que a más inflamación, mayor disfunción, más obstrucción y más presiones negativas, que finalmente generarían más inflamación.

SAHS, disfunción vascular e inflamación

La relación entre el SAHS y la enfermedad cardiovascular puede producirse por diversos factores: cambios mecánicos, neurovegetativos e inflamatorios.

Cambios mecánicos

Las presiones intratorácicas muy negativas, que pueden llegar a -100 cmH₂O, provocan un aumento del gradiente transmiciárdico y, en consecuencia, aumenta de un modo considerable la poscarga. Estas presiones negativas dan lugar a un aumento del retorno venoso, que desplaza el septo hacia la izquierda, con el consiguiente deterioro de la función del ventrículo izquierdo. Así pues, la combinación del aumento de la poscarga por las presiones negativas y también por la hipertensión que se genera, el desplazamiento del septo y, finalmente, la hipoxemia que se crea dan lugar a una disfunción cardíaca que revierte totalmente con presión positiva continua de la vía aérea^{10,11}.

Anomalías neurovegetativas

En personas sanas, durante la noche la actividad simpática, la presión arterial y la frecuencia cardíaca disminuyen; en la fase REM, aumentan. Los quimio y barorreceptores controlan los cambios gasométricos y de la presión arterial a través, entre otros, de la activación o reducción de la actividad del sistema simpático y parasimpático. Los pacientes con SAHS, por la hipoxemia y el resto de eventos que ocurren durante las apneas, muestran un incremento notorio de la actividad simpática durante la noche y durante el día que incrementa la presión arterial. En comparación con individuos sanos, presentan taquicardia, reducción de la variabilidad cardíaca y aumento de la variabilidad de la presión arterial. Todos estos cambios representan un factor de riesgo acusado de daño vascular¹².

TABLA I
Características de los radicales libres fisiológicos que intervienen en reacciones celulares

<p>Aspectos fisiológicos En cantidades pequeñas o cuando están neutralizados por antioxidantes, los radicales libres intervienen en la producción de adenosintrifosfato y también en la lisis de bacterias, entre otras funciones</p> <p>Aspectos patológicos El exceso de radicales o el hecho de que no estén neutralizados[†] provoca estrés oxidativo, que a su vez provoca daño celular</p>

[†]Energía celular: adenosintrifosfato, procede del metabolismo aeróbico (O₂) y/o anaerobio; hay mecanismos de compensación frente a la hipoxia; durante períodos de hipoxia/normoxia (situación muy especial), se produce una gran disfunción celular que aumenta los radicales libres, los cuales sobrepasan la actividad de los antioxidantes y entonces se produce estrés oxidativo.

Cambios inflamatorios e incremento de radicales libres

En el SAHS uno de los elementos que se han considerado más importantes para el inicio de una reacción inflamatoria sistémica es la excesiva producción de radicales libres¹³⁻¹⁵. Éstos son moléculas con uno o más electrones desapareados, que tienen una función fisiológica en el sentido de intervenir en el metabolismo celular para la obtención de energía. Intervienen en la formación de adenosintrifosfato y H₂O. También auxilian a los neutrófilos para la lisis de toxas (tabla I). En la figura 1 se resumen las diversas reacciones para la producción de radicales libres. Dado que en sí mismos son tóxicos, cuando se produce un aumento de radicales libres, hay unos mecanismos de defensa (antioxidantes) (fig. 2) que los neutralizan. Cuando, por un exceso de radicales libres, éstos no son neutralizados, se liberan y se desencadena un proceso de estrés oxidativo que inducirá daño celular (fig. 3).

Los radicales libres circulan por el organismo intentando robar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido robar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre, al quedar con un electrón desapareado; de este modo se inicia una verdadera reacción en cadena que destruye o deteriora células. En la figura 4 se muestran los tres sistemas generadores de radicales libres. Durante la apnea, como consecuencia de la hipoxia/normoxia, que puede considerarse una situación muy particular, se afectan las vías metabólicas celulares y se producen intensas disfunciones celulares que provocan un elevado número de radicales libres, con lo que se desencadena estrés oxidativo.

Efectos nocivos

En la figura 3 se muestra un esquema general de las vías que se activarán como consecuencia del estrés oxidativo. Se desencadenarán cascadas de transducción de señales, que estimularán la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), del factor activador de las plaquetas y de diferentes interleucinas (IL). Pueden actuar de una manera directa sobre el tejido afectado y producir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad,

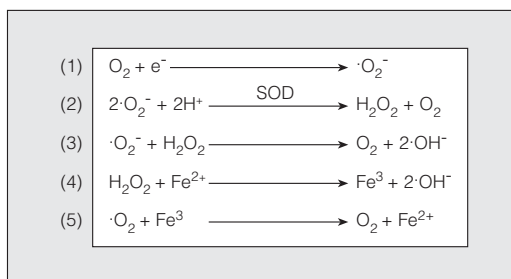


Fig. 1. Reacciones de generación de los 3 principales radicales libres de oxígeno: el ion superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH⁻). El oxígeno molecular puede aceptar un electrón y generar así el radical superóxido (1). La interacción entre 2 radicales superóxido, catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), conduce a la formación de peróxido de hidrógeno (2). El radical hidroxilo se forma por la interacción, mediada por hierro, entre el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido (3), o bien por la interacción directa del peróxido de hidrógeno con iones Fe²⁺ (4). En presencia de superóxido, el Fe³⁺ unido a la ferritina se libera como Fe²⁺, con lo que aumenta la disponibilidad de Fe²⁺ para estas reacciones (5). Dado que la SOD y los iones hierro están fácilmente disponibles y en abundancia en los sistemas biológicos, las reacciones (2, 4 y 5) se producen de forma simultánea. En consecuencia, la formación del radical superóxido comporta la rápida producción de peróxido de hidrógeno y del radical hidroxilo.

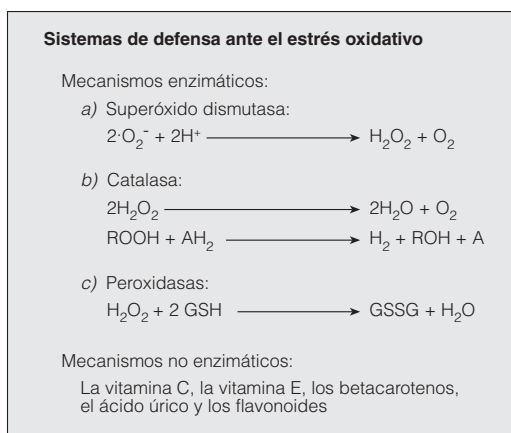


Fig. 2. Los sistemas de defensa del organismo frente al estrés oxidativo (antioxidantes) se dividen en enzimáticos y no enzimáticos. En los mecanismos enzimáticos, las enzimas implicadas se agrupan en 3 grupos: superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas. Hay también una serie de sistemas de defensa no enzimáticos que se componen de sustancias con capacidad de reaccionar directamente con los radicales libres, o bien con productos de éstos sin necesidad de ninguna enzima. Entre estos antioxidantes se encuentran las vitaminas C y E, los betacarotenos, el ácido úrico y los flavonoides.

la pérdida de viabilidad del óxido nítrico y la respuesta inflamatoria vascular, que desempeñan un papel crítico en la patogenia de la disfunción endotelial. Tal como se muestra en las figuras 3, 5 y 6, se activan factores de transcripción sensibles a redox que intervienen en el SAHS, como el factor nuclear κB (NF-κB) y el factor inducible por hipoxia (HIF-1)¹⁶⁻¹⁸, que podrán desencadenar lesión endotelial¹³⁻¹⁵.

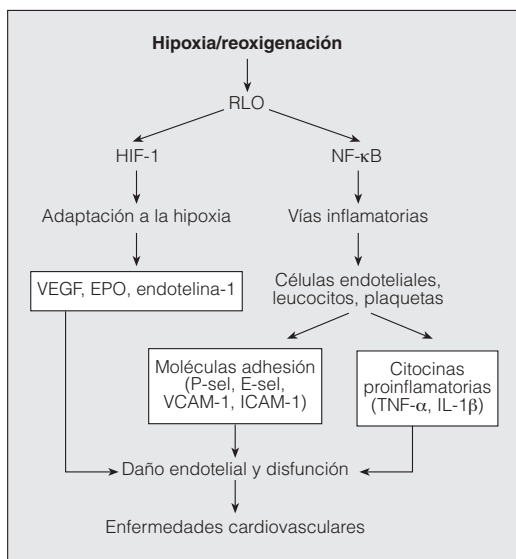


Fig. 3. Esquema de los mecanismos que intervienen en la apnea obstructiva del sueño y desencadenan enfermedades cardiovasculares. En respuesta a la hipoxia/reoxigenación, la liberación de radicales libres de oxígeno (RLO) da lugar a la activación de los factores de transcripción. El factor de transcripción κB (NF- κB) da lugar a la transcripción de diferentes citocinas inflamatorias, y el factor inducible por hipoxia (HIF-1) da lugar a la transcripción de factores de crecimiento y otras citocinas en relación con la hipoxemia. Conjuntamente los productos génicos obtenidos de estos 2 factores de transcripción generarán un daño endotelial y su posterior disfunción, lo que producirá enfermedades cardiovasculares. EPO: eritropoyetina; E-sel: E-selectina; ICAM-1: moléculas de adhesión intercelular-1; IL: interleucina; P-sel: P-selectina; TNF: factor de necrosis tumoral; VCAM-1: moléculas de adhesión vascular-1; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

Sistemas de defensa ante el estrés oxidativo (antioxidantes)

Se resumen en la figura 2. Se dividen en enzimáticos y no enzimáticos. En los mecanismos enzimáticos, las enzimas que participan en la defensa contra la toxicidad del oxígeno pueden dividirse en 3 grupos: superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. Además hay una serie de sistemas de defensa no enzimáticos. Las células disponen de un número elevado de sustancias con la capacidad de reaccionar directamente con los radicales libres o bien con productos de éstos sin necesidad de ninguna enzima. Entre estos antioxidantes se encuentran las vitaminas C y E, los betacarotenos, el ácido úrico y los flavonoides¹⁹.

Apnea obstructiva del sueño y vías de señalización molecular de los factores de transcripción

Factor nuclear- κB (NF- κB)

Se muestra en las figuras 3 y 5 con más detalle. El NF- κB es un factor de transcripción que regula la expresión de diferentes genes, incluidas citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y algunas proteínas²⁰. Desempeña un papel muy

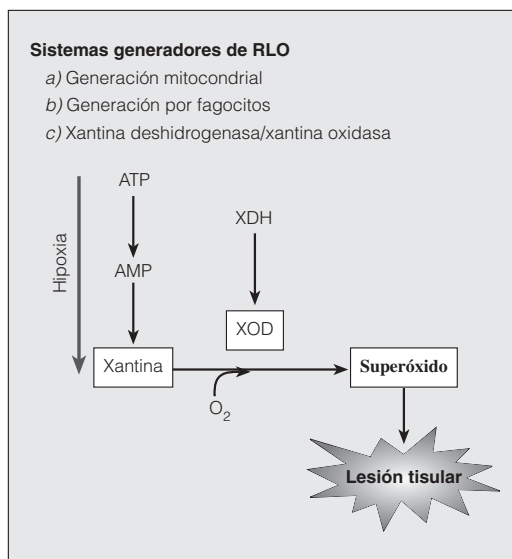


Fig. 4. Generación de radicales libres de oxígeno (RLO). Durante el proceso de hipoxia, la falta de aporte de oxígeno al tejido hace que se detenga el transporte de electrones en la mitocondria y, como consecuencia, disminuyen los valores energéticos en las células. Se producen cambios en los sistemas xantina deshidrogenasa (XDH)/xantina oxidasa (XOD), que después, frente a la hipoxia, sufren cambios que llevan a la formación de radicales libres. AMP: adenosinmonofosfato; ATP: adenosintrifosfato.

importante en las respuestas celulares a diferentes tipos de agresiones, ya que regula la expresión inducible de genes que intervienen en la respuesta inmunitaria y el proceso inflamatorio²¹. En las células no estimuladas, el NF- κB se encuentra en el citoplasma en forma inactiva, asociado a una proteína que lo inhibe, llamada proteína inhibidora κB (I κB), que impide la translocación del NF- κB al núcleo cuando no hay señal de activación.

Cuando la célula recibe una señal de activación, la I κB es fosforilada y degradada rápidamente por enzimas proteolíticas²²⁻²⁴. La activación del NF- κB representa el último eslabón de la vía de señales de transducción desde la superficie celular hasta el núcleo, donde se producen las anomalías de transcripción. Hay una gran variedad de estímulos extracelulares que pueden disparar la activación del NF- κB e inducir alteraciones proliferativas de la vasculatura, incluida la aterosclerosis²⁵⁻²⁷.

Estudios clínicos muestran que los pacientes con apnea obstructiva del sueño (AOS) tienen elevadas concentraciones plasmáticas de mediadores inflamatorios, tales como citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-18), quimiocinas (IL-8, MCP-1 –proteína quimiotáctica de los monocitos-1–) y moléculas de adhesión (moléculas de adhesión intercelular y vascular –ICAM-1 y VCAM-1–, E-selectina, P-selectina y L-selectina), así como un incremento de la expresión de contrarreceptores de moléculas de adhesión como el CD15 y CD11c en mo-

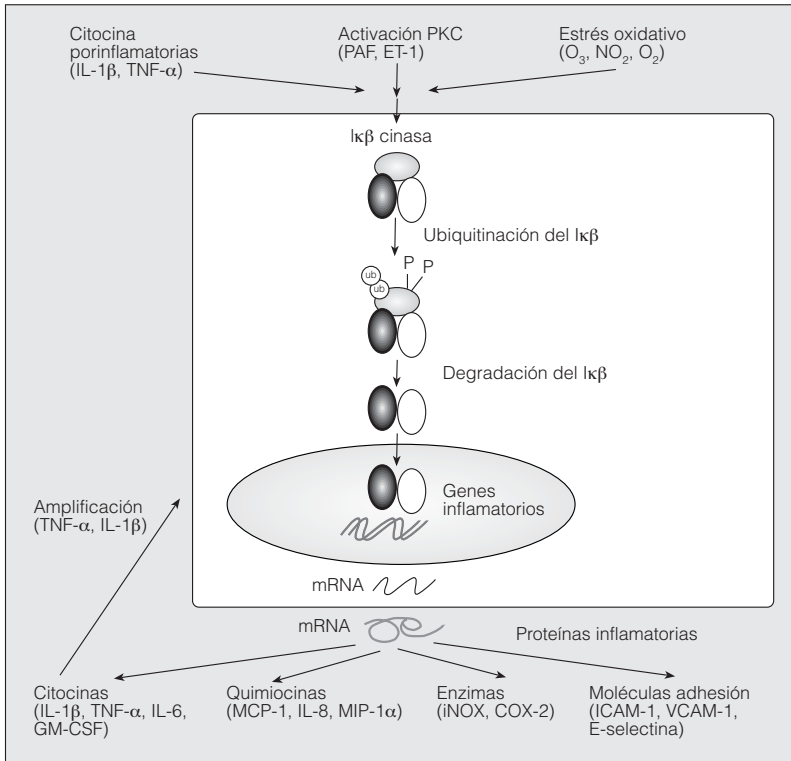


Fig. 5. Esquema representativo de la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y de los genes que regula. Bajo un estímulo extracelular, como pueden ser citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o la interleucina (IL) 1 y sobre todo el estrés oxidativo, se activa el complejo I κ B cinasa (IKK). Este complejo media la fosforilación de la I κ B, lo que da lugar a su ubiquitinación y degradación, dejando el dímero de NF- κ B libre para translocar al núcleo, donde activará genes diana específicos a través de uniones selectivas a la secuencia consenso del NF- κ B. Se producen diversas proteínas implicadas en la inflamación. ARNm: ARN mensajero; COX-2: ciclooxigenasa-2; ET-1: endotelina-1; GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas y microcíticas; ICAM: moléculas de adhesión intercelular; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; MCP-1: proteína quimiotáctica de los monocitos-1; MIP-1 α : proteína inflamatoria de macrófagos-1 α ; PAF: factor activador de plaquetas; PKC: proteincinasa C; VCAM: moléculas de adhesión vascular.

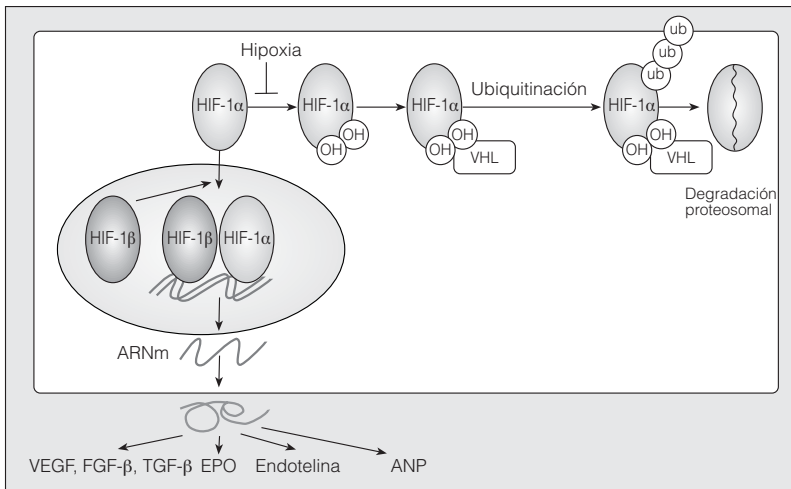


Fig. 6. Esquema representativo de la activación del factor inducible por hipoxia (HIF-1) y de los genes que regula. El HIF-1 está constituido por 2 subunidades, la alfa y la beta. En condiciones de normoxia, el HIF-1 α es hidroxilado y posteriormente es reconocido por la proteína de Von Hippel-Lindau (VHL), la cual a su vez es señal para formar un complejo de ubiquitinación, que es indicativa de degradación por proteosomas. Sin embargo, en condiciones de hipoxia las hidroxilasas dejan de modificar al HIF-1 α y éste se acopla al HIF-1 β para ser translocado al núcleo, donde funciona como factor de transcripción. ANP: péptido natriurético auricular; ARNm: ARN mensajero; EPO: eritropoyetina; FGF: factor de crecimiento fibroblástico; TGF: factor transformador del crecimiento; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

nocitos²⁸⁻³⁰. El hecho de que la AOS esté precedida o asociada a una respuesta inflamatoria, en la que muchos de los mediadores regulados por el NF- κ B se hallan alterados, hace pensar que la activación de este factor nuclear puede ser uno de los mecanismos importantes en la patogenia de esta enfermedad o

en sus consecuencias sistémicas. Asimismo, recientemente se ha observado que pacientes con AOS tienen el NF- κ B activado en monocitos³¹, lo que, como se verá, va a tener mucha importancia en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares asociadas al SAHS.

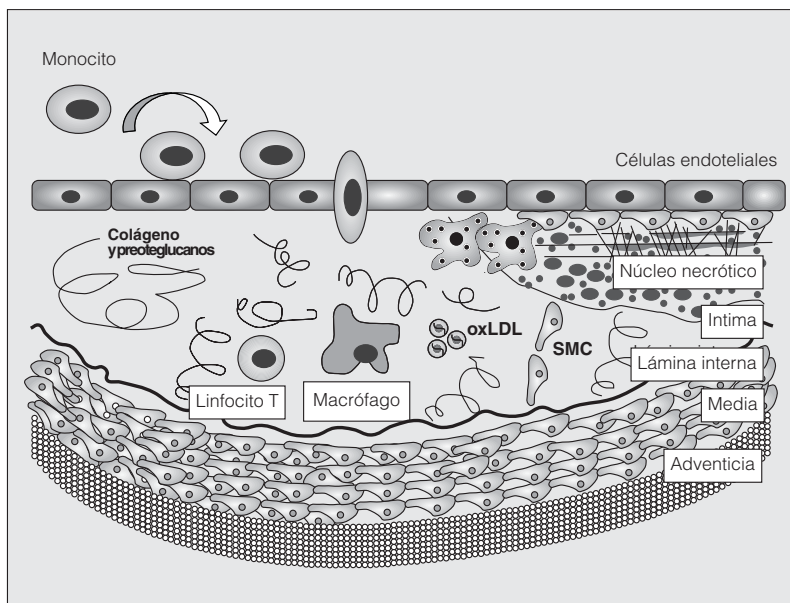


Fig. 7. Muestra el proceso de formación de la placa de ateroma. Tres son los procesos que caracterizan la formación de la aterosclerosis: 1) En la parte superior: los monocitos se adhieren al endotelio vascular, penetran la línea endotelial y entran a la íntima de la pared del vaso por diapénesis entre las células endoteliales. Este proceso requiere de un gradiente quimioatrayente como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) o las LDL modificadas. 2) En la parte media: a) En la íntima los monocitos maduran a macrófagos, los cuales aumentan la expresión de receptores y fagocitan lipoproteínas modificadas. Los ésteres de colesterol acumulados en el citoplasma activan a los macrófagos dando lugar a las células espumosas. Estas células son características de los estadios tempranos de la aterosclerosis; b) Los macrófagos producen factores de crecimiento y citoquinas que amplifican la señal proinflamatoria; c) Los linfocitos T también migran a la íntima produciendo citoquinas proinflamatorias, que amplifican la actividad inflamatoria colaborando en la formación de la placa de ateroma. 3) En la parte inferior de la figura: se muestra la multiplicación de las células del músculo liso (SMC), las cuales migran y se acumulan en la placa, y dan una abundante matriz extracelular. Si la lesión avanza, el lumen arterial se estrecha hasta que el flujo se obstruye dando lugar a las manifestaciones clínicas.

Factor inducible de hipoxia (HIF-1)

Como puede observarse en la figura 6 con más detalle, el HIF-1 se expresa en todas las células nucleadas en respuesta a la hipoxia. Es un factor de transcripción que activa genes de proteínas que median la respuesta adaptativa a la reducción de la biodisponibilidad del oxígeno. Para ello participa en el metabolismo de la glucosa y energético, en la angiogenia, en la reactividad vascular y en la remodelación, en la proliferación celular y en la supervivencia célula. Entre los productos proteicos identificados de los genes diana del HIF-1 para aumentar la biodisponibilidad de oxígeno figuran, entre otros, al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el péptido natriurético auricular, la endotelina-1, enzimas glucolíticas, la eritropoyetina y la óxido nítrico sintasa inducible²⁷⁻³².

La hipoxia induce la activación de la expresión génica de HIF-1, que se inactiva rápidamente en presencia de oxígeno²⁷. El estrés oxidativo desempeñaría un papel importante en las vías de regulación dependientes del HIF-1 tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas³³.

Actualmente muy pocos estudios clínicos han demostrado la activación directa del HIF-1 en pacientes con AOS. Todas las investigaciones se han encaminado hacia

el estudio de los productos génicos expresados por el HIF-1, para demostrar indirectamente tanto la activación de éste (incremento de las concentraciones plasmáticas de VEGF³⁴, de péptido natriurético auricular³⁵ y de eritropoyetina³⁶) como del precursor de la endotelina-1³⁷. La activación de HIF-1 en pacientes con AOS daría lugar a la expresión de genes antes mencionados que se relacionan con la adaptación de las células a la hipoxia.

Angiogenia y aterosclerosis

Como ya se ha mencionado, en respuesta a períodos de hipoxia/normoxia y de estrés oxidativo se activan factores de transcripción como el NF- κ B y el HIF-1, entre otros. Dicha activación dará lugar a la expresión génica de factores de crecimiento, citocinas y enzimas, que, por un lado, desencadenarán una respuesta inflamatoria y, por otro, promoverán la formación de la angiogenia para incrementar la distribución de oxígeno celular y la glucólisis.

El VEGF y otras citocinas como la IL-1, IL-8 y el TNF- α intervienen en distintas etapas de la angiogenia. La IL-1 e IL-8 activan células endoteliales vasculares. La IL-1 induce la expresión de colagenasas o metaloproteinasas de la matriz, las cuales tienen un papel importante

en la degradación de la matriz extracelular permitiendo la formación de nuevos vasos. Mientras que la IL-8 posee actividad angiogénica similar al TNF- α y al VEGF, no obstante la formación de nuevos vasos sanguíneos depende principalmente de las concentraciones de VEGF en tejidos, ya que su expresión esta controlada básicamente por la concentración de oxígeno^{34,38,39}. Por otro lado, las células endoteliales sintetizan y liberan al medio extracelular factores que regulan también la angiogenia, las respuestas inflamatorias, la hemostasis, el tono y la permeabilidad vasculares.

La AOS y la angiogenia tienen como común denominador el estrés oxidativo y la inflamación implicados en la disfunción endotelial⁴⁰, que finalmente puede desembocar en enfermedades cardiovasculares. Los mecanismos involucrados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares asociadas a la AOS pueden ser debidos a la activación de estos factores de transcripción (NF- κ B, HIF-1), que predispondrían a la formación de disfunción endotelial, anomalías vasculares, lesiones en diversos tejidos y arterosclerosis.

La aterosclerosis es un daño progresivo, que se caracteriza por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las arterias. Debido a las diferencias en el flujo dinámico de la sangre, hay áreas de la vasculatura más propensas a la formación de la lesión, como las ramificaciones o zonas de bifurcación⁴¹. En la figura 7 se muestran los 3 procesos que caracterizan la formación de la aterosclerosis. Ésta es el camino final de diversas enfermedades⁴²⁻⁴⁴. El SAHS induce arterosclerosis por una determinada serie de procesos característicos que luego van a seguir los pasos comunes de otras enfermedades que también la inducen. A modo de resumen, son los siguientes:

1. La hipoxia/normoxia, como elemento diferencial, induce estrés oxidativo, activación de las vías del NF- κ B y del HIF-1, entre otras, y generación de múltiples mediadores. Se produce una lesión endotelial, que altera la liberación de los mediadores que regulan el tono vascular, como el óxido nítrico.

2. Se produce el rodamiento, la adhesión y la penetración de los leucocitos en la íntima. Especialmente los monocitos que están adheridos al endotelio vascular entran en la íntima de la pared del vaso por diapédesis entre las células endoteliales. Los monocitos evolucionan a macrófagos, que fagocitan lipoproteínas modificadas.

3. Los macrófagos evolucionan a células espumosas, que son características de los estadios tempranos de la aterosclerosis. Los macrófagos, además, producen factores de crecimiento y citocinas que amplifican la señal proinflamatoria. Los linfocitos T también migran a la íntima y producen citocinas proinflamatorias que amplifican más la actividad inflamatoria y contribuyen a la formación de la placa de ateroma.

4. La placa de ateroma desarrolla canales microvasculares con función nutritiva, como resultado de la neoangiogenia, y promueve el crecimiento de la placa. En la progresión del ateroma la placa aumenta de tamaño proyectándose hacia el lumen arterial e impide el flujo

de sangre⁴⁵. El crecimiento de la placa de ateroma dará lugar a diferentes manifestaciones clínicas, como enfermedades cerebro y cardiovasculares asociadas a la AOS⁴⁶⁻⁴⁸.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Sanders; 2003.
2. Alberts B. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science; 2002.
3. Paulsen FP, Steven P, Tsokos M, Jungmann K, Muller A, Verse T. Upper airway epithelial structural changes in obstructive sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:501-9.
4. Rubinstein I. Nasal inflammation in patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope.* 1995;105:175-7.
5. 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;122:1162-7.
6. Salerno FG, Carpagnano E, Guido P, Bonsignore MR, Roberti A, Aliani M. Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. *Respir Med.* 2004;98:25-8.
7. Calero G, Serrano-Mollar A, Farré R, Closa D, Navajas D, Montserrat JM. Lung inflammation in a rat model of obstructive sleep apnea. Role of strenuous breathing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;169:A432.
8. Woodson BT, Garancis JC, Toohill RJ. Histopathologic changes in snoring and obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope.* 1991;101:1318-22.
9. Sekosan M, Zakkar M, Wenig BL, Olopade CO, Rubinstein I. Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope.* 1996;106:1018-20.
10. Bradley TD, Floras JS. Sleep apnea and heart failure. Part II: central sleep apnea. *Circulation.* 2003;107:1822-6.
11. Tkacova R, Rankin F, Fitzgerald FS, Floras JS, Bradley TD. Effects of continuous positive airway pressure on obstructive sleep apnea and left ventricular afterload in patients with heart failure. *Circulation.* 1998;98:2269-75.
12. Fletcher EC. Effect of episodic hypoxia on sympathetic activity and blood pressure. *Respir Physiol.* 2000;119:189-97.
13. Barceló A, Barbé F. Estrés oxidativo y síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Arch Bronconeumol.* 2005;41:393-9.
14. Lavie L. Obstructive sleep apnea syndrome – an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev.* 2003;7:35-51.
15. Montserrat J, Hernández L, Nacher M, Barbé F. Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS) *Arch Bronconeumol.* 2004;40 Supl 6:27-34.
16. Fenster BE, Tsao PS, Rockson SG. Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress. *Am Heart J.* 2003;146: 218-26.
17. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes. Part III: biomarkers of oxidative stress and angiogenic growth factors. *Circulation.* 2006;113:e289-e92.
18. Maulik N, Das DK. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1047-60.
19. Baldwin CM, Bootzin RR, Schwenke DC, Quan SF. Antioxidant nutrient intake and supplements as potential moderators of cognitive decline and cardiovascular disease in obstructive sleep apnea. *Sleep Med Rev.* 2005;9:459-76.
20. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem.* 1999;45:7-17.
21. Kopp BK, Ghosh S. NF- β and Rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol.* 1995;58:1-27.
22. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1995;9:1586-97.
23. Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax.* 1998;53:601-12.
24. Ritcher C, Cogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, et al. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1995;127:67-74.

25. Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. Identification and characterisation of an I κ B kinase. *Cell*. 1997;338:548-54.
26. Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor- κ B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17:3-9.
27. Piacentini L, Karliner JS. Altered gene expression during hypoxia and reoxygenation of the heart. *Pharmacol Ther*. 1999;83:21-37.
28. 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;94:179-84.
29. Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:934-9.
30. Ohga E, Nagase T, Tomita T, Teramoto S, Matsuse T, Katayama H, et al. Increased levels of circulating ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in obstructive sleep apnea syndrome. *J Appl Physiol*. 1999;87:10-4.
31. Greenberg H, Ye X, Wilson D, Htoo AK, Hendersen T, Liu SF. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor- κ B in cardiovascular tissues in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 343:591-6.
32. Semenza GL. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res*. 2000;1:159-62.
33. Pouyssegur J, Mechta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem*. 2006;387:1337-46.
34. Schulz R, Hummel C, Heinemann S, Seeger W, Grimminger F. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:67-70.
35. Svatikova A, Shamsuzzaman AS, Wolk R, Phillips BG, Olson LJ, Somers VK. Plasma brain natriuretic peptide in obstructive sleep apnea. *Am J Cardiol*. 2004;94:529-32.
36. Brzecka A. Brain preconditioning and obstructive sleep apnea syndrome. *Acta Neurobiol Exp*. 2005;65:213-20.
37. Jordan W, Reinbacher A, Cohrs S, Grunewald RW, Mayer G, Ruther E, et al. Obstructive sleep apnea: plasma endothelin-1 precursor but not endothelin-1 levels are elevated and decline with nasal continuous positive airway pressure. *Peptides*. 2005;26: 1654-60.
38. Ikeda E. Cellular response to tissue hypoxia and its involvement in disease progression. *Pathol Int*. 2005;55:603-10.
39. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*. 2001;7:425-9.
40. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H985-H1002.
41. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.
42. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:456S-60S.
43. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
44. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
45. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-9.
46. Lanfranchi PA, Somers VK. Sleep-disordered breathing in heart failure: characteristics and implications. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003;136:153-65.
47. Lattimore JD, Celermajer DS, Wilcox I. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1429-37.
48. Von Kanel R, Dimsdale JE. Hemostatic alterations in patients with obstructive sleep apnea and the implications for cardiovascular disease. *Chest*. 2003;124:1956-67.

