



# EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON PRESIÓN POSITIVA CONTINUA EN LA VÍA AÉREA (CPAP) SOBRE DISTINTOS FACTORES DE RIESGO VASCULAR Y MARCADORES DE FUNCIÓN ENDOTELIAL Y DAÑO CELULAR EN PACIENTES CON SÍNDROME DE APNEA-HIPOPNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO

**ANTONIO JAVIER VALLEJO VAZ**

Laboratorio de Hipertensión e Hipercolesterolemia  
Unidad Clínico-Experimental de Riesgo Vascular  
Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

Directores de Tesis Doctoral

Dr. P. Stiefel García-Junco / Dra. R. Muñoz Hernández / Prof. J. Villar Ortiz

# **TESIS DOCTORAL**

Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON PRESIÓN POSITIVA CONTINUA EN LA VÍA AÉREA (CPAP) SOBRE DISTINTOS FACTORES DE RIESGO VASCULAR Y MARCADORES DE FUNCIÓN ENDOTELIAL Y DAÑO CELULAR EN PACIENTES CON SÍNDROME DE APNEA-HIPOPNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO**

**EFFECT OF TREATMENT WITH CONTINUOUS POSITIVE AIRWAY PRESSURE (CPAP) ON DIFFERENT VASCULAR RISK FACTORS AND MARKERS OF ENDOTHELIAL FUNCTION AND CELL DAMAGE IN PATIENTS WITH OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA-HYPOPNEA SYNDROME**

**Dr. ANTONIO JAVIER VALLEJO VAZ**

Directores de Tesis

Dr. P. Stiefel García-Junco / Dra. R. Muñoz Hernández / Prof. J. Villar Ortiz

La presente tesis doctoral, adscrita a la Universidad de Sevilla (departamento de Medicina), ha sido desarrollada por Dr. Antonio Javier Vallejo Vaz (médico especialista en Medicina Interna e investigador predoctoral del Laboratorio de Hipertensión e Hipercolesterolemia y Unidad Clínico-Experimental de Riesgo Vascular, Instituto de Biomedicina de Sevilla) bajo la supervisión de los doctores:

- Dr. P. Stiefel García-Junco, médico especialista en Medicina Interna, Doctor en Medicina, médico adjunto de Medicina Interna del Hospital Univ. Virgen del Rocío, co-investigador responsable del Laboratorio de Hipertensión e Hipercolesterolemia del Instituto de Biomedicina de Sevilla y profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla.
- Dra. R. Muñoz Hernandez, Licenciada y Doctora en Biología e investigadora postdoctoral del Instituto de Biomedicina de Sevilla.
- Prof. Dr. J. Villar Ortiz, médico especialista en Medicina Interna, Doctor en Medicina, Director de la Unidad Clínico-Experimental de Riesgo Vascular (Servicio de Medicina Interna, Hospital Univ. Virgen del Rocío), investigador responsable del Laboratorio de Hipertensión e Hipercolesterolemia del Instituto de Biomedicina de Sevilla y Catedrático de Medicina de la Universidad de Sevilla.

La presente tesis se ha desarrollado en el Hospital Universitario Virgen del Rocío y en el Laboratorio de Hipertensión e Hipercolesterolemia (Unidad Clínico-Experimental de Riesgo Vascular) del Instituto de Biomedicina de Sevilla (Universidad de Sevilla/CSIC/HUVR), Sevilla.

Asimismo, durante el periodo de realización de la presente tesis doctoral el doctorando realizó una estancia continuada en un centro internacional de reconocido prestigio en el área cardiovascular entre Junio de 2013 y Diciembre de 2014. Dicha estancia tuvo lugar en el Cardiovascular and Cell Sciences Research Institute, St George's University of London, Londres, Reino Unido, adscrito a los grupos de investigación "Pathogenesis of Angina Pectoris and Biomarkers", dirigido por Prof. Juan Carlos Kaski (Professor of Cardiovascular Sciences and Director of the Institute), y "Cardiovascular Prevention and Epidemiology", dirigido por Prof. Kausik K. Ray (Professor of Cardiovascular Disease Prevention).



El presente estudio recibió financiación en convocatoria competitiva por el Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias [FIS]; referencia proyecto: PI/0044/07; investigador principal: Dr. P. Stiefel) y la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (referencia proyecto: P09-CTS-4971).

# ÍNDICE

## **ABSTRACT**

*Pág. 10*

## **SECCIÓN 1 – INTRODUCCIÓN**

*Pág. 16*

## **SECCIÓN 2 – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

*Pág. 33*

## **SECCIÓN 3 – METODOLOGÍA**

*Pág. 36*

## **SECCIÓN 4 – RESULTADOS**

*Pág. 67*

## **SECCIÓN 5 – MICROPARTÍCULAS CELULARES EN PACIENTES CON SAHS: REVISIÓN SISTEMÁTICA**

## **SECTION 5 – CELL-DERIVED MICROPARTICLES IN PATIENTS WITH SAHS: A SYSTEMATIC REVIEW**

*Pág. 90*

## **SECCIÓN 6 – DISCUSIÓN**

*Pág. 106*

## **SECCIÓN 7 – CONCLUSIONES**

## **SECTION 7 – CONCLUSIONS**

*Pág. 134*

## **BIBLIOGRAFÍA**

*Pág. 138*

## **ANEXOS**

*Pág. 153*

## ÍNDICE EXTENDIDO

<b>ABSTRACT</b>	<b>Pág. 10</b>
<b>SECCIÓN 1 – INTRODUCCIÓN</b>	<b>Pág. 16</b>
1.1.- Síndrome de Apnea-Hipopnea del Sueño	Pág. 17
1.2.- Síndrome de Apnea-Hipopnea Obstructiva del Sueño y Patología Cardiovascular	Pág. 20
1.3.- Relación fisiopatológica entre Síndrome de Apnea-Hipopnea Obstructiva del Sueño y Riesgo Vascular	Pág. 24
1.4.- Síndrome de Apnea-Hipopnea Obstructiva del Sueño y Disfunción Endotelial	Pág. 25
1.5.- Tratamiento con Presión Positiva Continua en la Vía Aérea (CPAP), patología cardiovascular y disfunción endotelial	Pág. 27
<b>SECCIÓN 2 – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>Pág. 33</b>
2.1.- Hipótesis	Pág. 34
2.2.- Objetivos	Pág. 34
<b>SECCIÓN 3 – METODOLOGÍA</b>	<b>Pág. 36</b>
3.1.- Criterios de inclusión y exclusión	Pág. 37
3.2.- Variables incluidas en el estudio	Pág. 38
3.3.- Equipo de investigación y ámbito de trabajo	Pág. 40
3.4.- Valoración y seguimiento de los pacientes	Pág. 41
3.5.- Cuestionario de Epworth	Pág. 41
3.6.- Poligrafía respiratoria	Pág. 42
3.7.- Tratamiento con dispositivo de presión continua positiva en la vía aérea	Pág. 47
3.8.- Síndrome metabólico	Pág. 47

3.9.-	Monitorización ambulatoria de 24 horas de presión arterial (MAPA 24H)	Pág. 48
3.10.-	Test de hiperemia reactiva tras isquemia transitoria mediante Flujiometría por láser-doppler	Pág. 50
3.11.-	Obtención, procesamiento y conservación de muestras	Pág. 53
3.12.-	Parámetros bioquímicos de laboratorio clínico convencional	Pág. 54
3.13.-	Marcadores bioquímicos de fibrosis	Pág. 55
3.14.-	Estudio de resistencia a la insulina	Pág. 56
3.15.-	Micropartículas celulares CD31+/Anexina V+	Pág. 57
3.16.-	Factor de crecimiento vascular endotelial (VGEF)	Pág. 60
3.17.-	DNA libre circulante en sangre (cfDNA)	Pág. 61
3.18.-	Análisis estadístico	Pág. 63
3.19.-	Aspectos éticos y financiación	Pág. 65

#### **SECCIÓN 4 – RESULTADOS** **Pág. 67**

4.1.-	Síndrome de apnea-hipopnea del sueño	Pág. 68
4.2.-	Características generales	Pág. 68
4.3.-	Subgrupos según diagnóstico de hipertensión	Pág. 72
4.4.-	Seguimiento de los pacientes	Pág. 72
4.5.-	Perfil glucémico y resistencia a la insulina	Pág. 75
4.6.-	Función renal, perfil lipídico, PCR y homocisteína	Pág. 76
4.7.-	Monitorización ambulatoria de presión arterial (MAPA 24 horas)	Pág. 78
4.8.-	Test de hiperemia reactiva a la isquemia	Pág. 82
4.9.-	Marcadores de fibrosis	Pág. 84
4.10.-	VEGF, micropartículas CD31+/Anexina V+ y DNA libre circulante	Pág. 86

#### **SECCIÓN 5 – MICROPARTÍCULAS CELULARES EN PACIENTES CON SAHS: REVISIÓN SISTEMÁTICA**

##### **SECTION 5 – CELL-DERIVED MICROPARTICLES IN PATIENTS WITH SAHS: A SYSTEMATIC REVIEW**

		<b>Pág. 90</b>
5.1.-	Objectives	Pág. 91
5.2.-	Methods	Pág. 91

5.3.- Results Pág. 95

**SECCIÓN 6 – DISCUSIÓN** **Pág. 106**

6.1.- Presión Arterial Pág. 109

6.2.- Trastornos metabólicos. Resistencia a la Insulina Pág. 112

6.3.- Inflamación Pág. 116

6.4.- Remodelado Vascular y Fibrosis Pág. 118

6.5.- Disfunción Endotelial Pág. 120

6.6.- Daño Celular Pág. 127

6.7.- Efectos del tratamiento con CPAP según diagnóstico de Hipertensión Pág. 130

6.8.- Limitaciones Pág. 131

**SECCIÓN 7 – CONCLUSIONES**

**SECTION 7 – CONCLUSIONS** **Pág. 134**

**BIBLIOGRAFÍA** **Pág. 138**

**ANEXOS** **Pág. 153**

# Abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
Ach	Acetilcolina
AH	Área de hiperemia
AHI	Apnea-hypopnea index
BMI	Body mass index
BP	Blood pressure
cfDNA	DNA libre circulante / cell-free DNA
CPAP	Presión positive continua en la vía aérea / Continuous positive airway pressure
CRP	C-reactive protein
CT90%	Porcentage de tiempo durante la poligrafía respiratoria con saturación de oxígeno <90%
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)
EMP	Micropartículas endoteliales / Endothelial microparticles
EpMP	Micropartículas de progenitores endoteliales / Endothelial progenitor microparticles
ErMP	Micropartículas eritrocitarias / Erythrocyte microparticles
ESD	Excesiva somnolencia diurna
ESS	Escala de Somnolencia de Epworth / Epworth Sleepiness Scale
FC	Frecuencia cardiaca
FLD	Flujimetría laser-doppler
FMD	Dilatación mediada por flujo / Flow mediated dilation
GMP	Micropartículas derivadas de granulocitos / Granulocyte microparticles
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidad / High-density lipoprotein
HOMA	Homeostasis Model Assessment
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High performance liquid chromatography)
HR	Hazard ratio
HTA	Hipertensión arterial
IAH	Índice de apnea-hipopnea
IC95%	Intervalo de confianza al 95%
ICTP	Telopéptido carboxi-terminal de la molécula de colágeno tipo I
ID	Índice de desaturación

IMC	Índice de masa corporal
IR	Insulin resistance
LDF	Laser-doppler flowmetry
LDL	Lipoproteína de baja densidad / Low-density lipoprotein
LMP	Micropartículas leucocitarias / Leukocyte microparticles
LyMP	Micropartículas linfocitarias / Lymphocyte microparticles
MAPA	Monitorización ambulatoria de presión arterial
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MP	Micropartículas
mRNA	RNA mensajero
NCEP-ATPIII	National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
NO	Óxido nítrico
OR	Odds ratio
OSA	Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAM	Presión arterial media
PAS	Presión arterial sistólica
PCR	Proteína C reactiva
PCRus	Proteína C reactiva ultrasensible
PCR*	Polymerase chain reaction
PICP	Propéptido carboxi-terminal de la molécula de procolágeno tipo I
PMP	Micropartículas plaquetarias / Platelets microparticles
PP	Presión de pulso
RI	Resistencia a la insulina
RIC	Rango intercuartílico
RR	Riesgo relativo / Relative risk
SAHS	Síndrome de apnea-hipopnea del sueño / Sleep apnea-hypopnea syndrome
SAOS	Síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño
SatO2	Saturación de oxígeno
SD	Desviación estándar / Standard deviation
SEPAR	Sociedad Espanola de Neumología y Cirugía Torácica
SM	Síndrome metabólico
SMD	Desviación media estandarizada / Standardized mean difference
TA	Tensión arterial
UP	Unidades de perfusión
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial / Vascular endothelial growth Factor

## Introduction – Introducción

Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSA) leads to repetitive episodes of hypoxemia-reoxygenation and changes in intrathoracic pressure that may result in sympathetic nervous system activation, oxidative stress, low-grade inflammation and endothelial dysfunction, among others. This may ultimately lead to vascular injury and development of atherosclerotic lesions. In fact, OSA has been consistently related to both prevalent and incident cardiovascular disease. By preventing the episodes of apneas and hipopneas, the treatment with CPAP could ameliorate or even revert the underlying altered pathophysiologic mechanisms that are present in patients with OSA and, as a result, reduce the vascular risk that this disease may pose on these individuals.

El síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAOS) provoca episodios repetidos de hipoxemia-reoxigenación y oscilaciones de la presión intratorácica que pueden conducir a activación del sistema nervioso simpático, estrés oxidativo, inflamación subclínica y disfunción endotelial, entre otras consecuencias. Ello podría a su vez generar daño vascular y desarrollo de lesiones ateroscleróticas. De hecho, al SAOS se ha relacionado consistentemente con patología cardiovascular prevalente e incidente. El tratamiento con CPAP, mediante la corrección de los episodios de apneas e hipopneas, podría mejorar o incluso revertir los mecanismos fisiopatológicos subyacentes presente en los pacientes con SAOS y con ello reducir el riesgo vascular asociado a dicho trastorno.

## Objectives – Objetivos

To assess, in patients with moderate to severe OSA, the effect of treatment with CPAP on different markers of endothelial function and cell damage, as well as on other vascular risk-related conditions such as blood pressure, insulin resistance and lipid levels, C-reactive protein (CRP) and markers of fibrosis. As a secondary aim, we also intended to evaluate whether the presence of a diagnosis of hypertension may

Determinar, en pacientes con SAOS moderado a severo, el efecto del tratamiento con CPAP sobre distintos marcadores de función endotelial y daño celular, así como sobre otras condiciones asociadas a riesgo vascular, como presión arterial, resistencia a la insulina y lípidos, proteína C-reactiva (PCR) y marcadores de fibrosis. Como objetivo secundario, también estudiamos si la presencia de diagnóstico de hipertensión puede

influence the effect that the CPAP therapy may have on the aforementioned markers and conditions.

influir sobre el efecto que el tratamiento con CPAP puede tener sobre los mismos marcadores y condiciones.

## Methods – Métodos

We included 30 consecutive patients newly diagnosed with OSA who had an apnea-hypopnea index (AHI)  $\geq 15$  events/h, indication for treatment with CPAP, good adherence to this therapy, and that were well-controlled in relation to blood pressure, other vascular risk factors and comorbidity. Participants were evaluated before and after 3-month therapy with CPAP. At both times we carried out 1) ambulatory blood pressure monitoring (ABPM 24 hours), 2) measurement of the hyperaemic response to transient ischemia (as expression of the endothelium-dependent vasodilation) by laser-doppler flowmetry (LDF), 3) collection of fasting blood samples to measure glucose, insulin, lipids levels and high-sensitivity CRP (hsCRP), 4) study of insulin resistance (estimated by the HOMA2 model, including beta-cell function, insulin sensitivity and insulin resistance index), 5) measurement of procollagen type I carboxyl terminal peptide (PICP) levels, carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) levels and the ratio PICT/ICTP, as markers of synthesis, metabolism and level of coupling of both processes, respectively, for the type I collagen molecule, 6) measurement of levels of CD31+/Annexin V+ apoptotic microparticles (MP, by flow cytometry), circulating cell-free DNA (cfDNA, by amplification of the  $\beta$ -globin gene by polymerase chain reaction) and vascular

Se incluyeron 30 pacientes consecutivos con nuevo diagnóstico de SAOS, índice de apnea-hipopnea (IAH)  $\geq 15$  eventos/h, indicación de tratamiento con CPAP, buena tolerancia a dicho tratamiento, y estables desde el punto de vista de presión arterial, otros factores de riesgo vascular y comorbilidad. Los pacientes fueron valorados antes y tras 3 meses de tratamiento con CPAP. En ambos momentos se llevó a cabo 1) monitorización ambulatoria de presión arterial (MAPA 24 horas), 2) test de hiperemia reactiva a la isquemia (como expresión de vasodilatación dependiente del endotelio) mediante flujimetría por láser-doppler (FLD), 3) extracción de muestra en ayunas para determinación de glucemia, insulinemia, perfil lipídico y PCR ultrasensible (PCRus), 4) estudio de resistencia a la insulina (estimado mediante el modelo HOMA2, incluyendo función celular beta, sensibilidad a la insulina e índice de resistencia a la insulina), 5) determinación de propéptido carboxi-terminal de la molécula de procolágeno tipo I (PICP), telopéptido carboxi-terminal de la molécula de colágeno tipo I (ICTP) y cociente PICP/ICTP como indicadores de síntesis, degradación y grado de acoplamiento entre ambos procesos, respectivamente, para el colágeno tipo I, 6) determinación de los niveles de micropartículas (MP) apoptóticas CD31+/Anexina V+ (mediante citometría de flujo), DNA libre circulante (cfDNA,

endothelial growth factor (VEGF, by ELISA). The statistical analyses were performed using the software SPSS. The comparisons of dichotomous categorical variables measured before and after 3 months of treatment with CPAP were carried out using the McNemar's Test. In case of continuous variables, the analyses were performed by the paired Student's t test or the Wilcoxon Test, depending on whether the sample was normally or not normally distributed, respectively. This clinical trial was registered at ClinicalTrials.gov, reference number NCT01791270.

mediante reacción en cadena de la polimerasa para el gen de la  $\beta$ -globina) y de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, mediante ELISA). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante SPSS. La comparación de variables cualitativas dicotómicas antes y tras 3 meses de tratamiento con CPAP se llevó a cabo mediante el Test de McNemar; en el caso de variables cuantitativas se usó el Test de la t de Student para muestras apareadas o el Test de Wilcoxon según la normalidad o no de la muestra en cada caso, respectivamente. Ensayo clínico registrado en ClinicalTrials.gov con el número NCT01791270.

## Results – Resultados

The patients had a mean age of 51 years, 63% were males, 30% smokers, and 56.7% had hypertension (all of them under pharmacological therapy). The main BMI was within the range of obesity (mean $\pm$ SD: 35.8 $\pm$ 6.6 kg/m<sup>2</sup>) and 53% of patients fulfil the criteria to be diagnosed with metabolic syndrome. With respect to OSA, the mean AHI was 56.3 $\pm$ 25.5 and the percentage of time with O<sub>2</sub> saturation <90% (CT90%) during the respiratory polygraphy was 31% ( $\pm$ 26.5). The participants had normal average blood pressure (BP) levels, with no differences between hypertensive and normotensive patients, meaning that the former group had well-controlled BP. hsCRP levels were 2.1 mg/dL. At baseline the hypertensive patients presented a significant increased levels of MP compared with those without hypertension (median 74.0 [interquartile range 41.0–110.5] vs. 20.5 [11.5–41.5], p=0.008). Compared with measurements at baseline, after 3 months of

Los pacientes presentaron una edad media de 51 años, el 63% eran varones, un 30% fumadores, y el 56.7% hipertensos (todos ellos bajo tratamiento farmacológico). El IMC medio se encontraba en rango de obesidad (media $\pm$ SD: 35.8 $\pm$ 6.6 kg/m<sup>2</sup>) y un 53% cumplía criterios de síndrome metabólico. Respecto al SAOS, el IAH medio fue de 56.3 $\pm$ 25.5 y el porcentaje de tiempo con saturación de O<sub>2</sub> <90% (CT90%) durante la poligrafía respiratoria fue del 31% ( $\pm$ 26.5). Los participantes presentaron cifras medias normales de presión arterial (PA), sin diferencias entre hipertensos y normotensos, indicando un buen control tensional de los primeros. El nivel de PCRus fue de 2.1 mg/dL. A nivel basal, los pacientes hipertensos presentaron unos niveles significativamente elevados de MP comparado con los normotensos (mediana 74.0 [rango intercuartílico 41.0–110.5] vs. 20.5 [11.5–41.5], p=0.008). Comparado con la situación basal, tras 3 meses de tratamiento con CPAP se objetivó: 1)

therapy with CPAP we found: 1) A reduction in the BP levels (24-h systolic BP 125,4±12,38 vs. 121,3±12,6 mmHg, p=0,009; 24-h diastolic BP: 76,1±10,5 vs. 72,6±10,9 mmHg, p=0,005) and heart rate (p=0.002) as measured by ABPM; 2) A decrease in the number of patients with not dipper patterns (79.3% vs. 44.8%, p=0.021); 3) An improvement in the insulin resistance index (2,1 [1,3–3,8] vs. 1,7 [1,2–2,5], p=0,024) with a reduction in insulin levels (p=0.008) and a trend towards and improvement in the beta-cell function (p=0.055) and insulin sensitivity (p=0.060), without changes in the levels of glucose and HbA1c; 4) A significant improvement in the area of hyperaemia (1073 [689–1375] vs. 1309 [1029–1776], p=0,004); 5) An increase in the levels of VEGF (602±234 vs. 641±213 pg/mL, p=0.049) and a decrease in the levels of MP (69.6±62.6 vs. 39.8±22.1 MP/μl, p=0.030) and cfDNA (188±116 vs. 121±79 ng/ml, p=0.003). Similarly, we observed a non-significant trend towards a reduction in total cholesterol and LDL-C levels (p=0.067 and p=0.085, respectively). Conversely, the treatment with CPAP did not modify the levels of hsCRP or the markers of collagen metabolism. During the follow-up we did not observed any changes in weight, BMI or smoking status. A more severe OSA was associated with larger changes in VEGF levels but smaller changes in MP and cfDNA levels as a result of the treatment with CPAP. The subgroup analysis according to the presence or not of a diagnosis of hypertension showed that the BP changes took mainly place at the expense of the normotensive patients, whereas the improvement observed in the insulin resistance, area of hyperaemia and levels of VEGF, MP and cfDNA

Reducción de las cifras de PA (PA sistólica de 24 horas: 125,4±12,38 vs. 121,3±12,6 mmHg, p=0,009; PA diastólica de 24 horas: 76,1±10,5 vs. 72,6±10,9 mmHg, p=0,005) y frecuencia cardiaca (p=0.002) determinadas por MAPA; 2) Descenso del número de pacientes con patrón no dipper (79.3% vs. 44.8%, p=0.021); 3) Mejoría del índice de resistencia a la insulina (2,1 [1,3–3,8] vs. 1,7 [1,2–2,5], p=0,024) con descenso de los niveles de insulina (p=0.008) y una tendencia a una mejoría de la función celular beta (p=0.055) y sensibilidad a la insulina (p=0.060), sin cambios en la glucemia y HbA1c; 4) Mejoría significativa del área de hiperemia (FLD, 1073 [689–1375] vs. 1309 [1029–1776], p=0,004); 5) Aumento de los niveles de VEGF (602±234 vs. 641±213 pg/mL, p=0.049) y reducción de los niveles de MP (69.6±62.6 vs. 39.8±22.1 MP/μl, p=0.030) y cfDNA (188±116 vs. 121±79 ng/ml, p=0.003). Asimismo se observó una tendencia no significativa hacia una reducción de los niveles de colesterol total y LDL-C (p=0.067 y p=0.085, respectivamente). Por el contrario, el tratamiento con CPAP no modificó los niveles de PCRus o marcadores del metabolismo del colágeno. Durante el seguimiento no se produjeron cambios en el peso, IMC o hábito tabáquico. Una mayor severidad del SAOS se asoció a un mayor cambio en los niveles de VEGF y menor modificación en los de MP y cfDNA durante el tratamiento con CPAP. El análisis por subgrupos según presencia o no de diagnóstico de hipertensión mostró que los cambios en las cifras de PA tuvieron lugar principalmente a expensas de los pacientes normotensos, mientras que la mejoría en los parámetros de resistencia a la insulina, área de hiperemia (FLD)

mainly occurred in the hypertensive patients.

y niveles de VGEF, MP y cfDNA tuvieron lugar a expensas sobre todo de los pacientes hipertensos.

### **Systematic review MP and OSA – Revisión sistemática MP y SAOS**

We carried out a systematic and comprehensive search of the literature including the databases Medline, EMBASE, Cochrane, Web of Science and SciELO, following a pre-defined strategy. A total of 1380 references were retrieved, of which 13 studies (including 462 patients [141 children] and 294 controls) met our predefined inclusion criteria (measurement of circulating cell-derived MP of any phenotype in patients with a confirmed diagnosis of SAHS). The studies showed differences in relation to the populations included and in several aspects of the protocol used for MP measurement. The phenotype of the MP studied was variable, with isolation of MP from different cell types and using different markers to detect MP from the same cell type. Only 3 studies (n=35) assessed the effect of the treatment with CPAP on MP; a fourth trial (n=21) evaluated the effect of CPAP withdrawal in patients already under this treatment. Overall, the results were considerably not uniform and the evidence for the association between OSA and MP or between CPAP and MP is still largely uncertain.

Llevamos a cabo una búsqueda sistemática y exhaustiva de la literatura incluyendo las bases de datos Medline, EMBASE, Cochrane, Web of Science y SciELO, siguiendo una estrategia de búsqueda predeterminada. De un total de 1380 referencias obtenidas, 13 estudios (incluyendo 462 pacientes [141 niños] y 294 controles) cumplieron los criterios de inclusión (determinación de MP celulares circulantes de cualquier fenotipo en pacientes con diagnóstico confirmado de SAHS). Los estudios mostraron diferencias en relación a la población de sujetos incluidos y en varios aspectos del protocolo de determinación de MP. El fenotipo de las MP estudiadas fue variable, con determinación de MP de diferente origen celular y con uso de diferentes marcadores para detectar MP del mismo origen. Sólo 3 estudios (n=35) evaluaron el efecto del tratamiento con CPAP; un cuarto trabajó (n=21) estudió el efecto de la retirada de CPAP en pacientes bajo dicho tratamiento. Globalmente, los resultados no fueron uniformes y la evidencia de asociación entre SAOS y MP ó CPAP y MP resulta bastante incierta.

### **Conclusions – Conclusiones**

In moderate to severe OSA patients the treatment with CPAP, by preventing the episodes of apneas and hipopneas, may improve the

En pacientes con SAOS moderado a severo el tratamiento con CPAP, al corregir los episodios de apneas e hipopneas, puede mejorar el riesgo

vascular risk of such individuals by promoting a reduction in blood pressure and an improvement of the endothelial function and insulin resistance. The effect of the CPAP therapy in each case could be influenced by the OSA severity and the presence of hypertension (even when this condition is well-controlled).

vascular de dichos pacientes a través de una reducción de la presión arterial y mejoría de la función endotelial y resistencia a la insulina. El efecto de la CPAP puede venir determinado en cada caso por la severidad del SAOS y la presencia de hipertensión (aun cuando ésta esté bien controlada).

# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

### Síndrome de Apnea-Hipopnea del Sueño

El síndrome de apnea-hipopnea del sueño (SAHS) es un trastorno respiratorio caracterizado por episodios repetidos de colapso u obstrucción de la vía aérea superior durante el sueño que provocan un cese parcial (hipopnea) o completo (apnea) del flujo aéreo que conducen a episodios de hipoxemia intermitente<sup>1-3</sup>. Dichos episodios se definen mediante el Índice de Apnea-Hipopnea (IAH), resultante de la suma de las apneas e hipopneas durante el total del periodo de sueño dividido por el número de horas de sueño, expresado como eventos/hora<sup>1,3</sup>. El diagnóstico de SAHS se confirma mediante polisomnografía nocturna (o registros abreviados de poligrafía respiratoria nocturna) y se define generalmente como la presencia de un IAH >15 o bien como un IAH >5 asociado a síntomas relacionados con la enfermedad no explicados por otras causas<sup>1-5</sup>. En función del IAH, el SAHS se clasifica como leve (IAH 5 a 14.9), moderado (IAH 15 a 29.9) o severo (IAH  $\geq$ 30)<sup>3,4</sup>. Una apnea se define como la ausencia o reducción >90% del flujo aéreo respiratorio de más de 10 segundos de duración; la hipopnea consiste en una reducción del 30 al 90% del flujo aéreo de más de 10 segundos de duración que se acompaña de desaturación de oxígeno igual o superior al 3% y/o un microdespertar (detectado en el electroencefalograma durante la polisomnografía)<sup>1,3</sup>.

El colapso de la vía aérea superior que conduce al SAHS se produce como consecuencia de alteraciones anatómico-funcionales en la misma derivada de diferentes factores anatómicos, musculares y neurológicos. La porción de la faringe entre el septum nasal posterior y la epiglotis presenta pocas estructuras óseas o soporte rígido, por lo que su permeabilidad es en gran medida dependiente de la actividad muscular<sup>6</sup>. Distintos factores anatómicos que conducen a una disminución del calibre y aumento de la resistencia de la vía aérea superior (obesidad por ejemplo) generan mayores presiones negativas en la faringe durante la inspiración, favoreciendo su colapsabilidad<sup>1,6</sup>. Una pérdida excesiva de tono muscular en la vía aérea superior o una alteración en los mecanismos cerebrales del sueño (en el proceso de control de los músculos faríngeos) y defecto en los reflejos protectores son factores que igualmente predisponen a al colapso de la vía aérea superior y consiguiente interrupción del flujo aéreo<sup>1,6</sup>. La consiguiente hipoxemia e hipercapnia durante la apnea o

hipopnea estimulan el esfuerzo respiratorio finalizando el episodio acompañado de un despertar o arousal<sup>6</sup>.

El SAHS puede ser debido a apneas/hipopneas obstructivas o centrales. La apnea es obstructiva si se acompaña de esfuerzo respiratorio durante la misma (detectado por las bandas toraco-abdominales durante la polisomnografía; es decir, se mantiene el estímulo respiratorio) o central en ausencia de dicho esfuerzo<sup>1,3</sup>. En el caso de la apnea obstructiva (síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño, SAOS) el esfuerzo de los músculos respiratorios frente a la vía aérea superior colapsada origina un aumento de la presión negativa intratorácica que puede tener consecuencias fisiopatológicas para el desarrollo de comorbilidad asociada<sup>3</sup>. Finalmente, la apnea puede ser mixta, con un componente obstructivo y central (generalmente iniciada como central para finalizar con componente obstructivo)<sup>1,3</sup>.

Los episodios repetidos de colapso de la vía aérea superior y consecuentes apneas e hipopneas condicionan una distorsión de la arquitectura del sueño, con frecuentes despertares asfícticos y microdespertares (arousals) que llevan a una fragmentación del sueño y sueño no reparador y, consecuentemente, excesiva somnolencia diurna. El SAHS, dependiendo de la severidad del mismo, se ha asociado igualmente a otros síntomas tanto nocturnos (como por ejemplo frecuentes ronquidos, nicturia, insomnio, sueño agitado, pesadillas, movimientos anormales...) como diurnos (astenia, cefalea matutina, irritabilidad, apatía, depresión, dificultades de concentración, pérdida de memoria...)<sup>1,3,5</sup>.

El SAHS, a través de la privación de sueño reparador y las consecuencias fisiopatológicas derivadas de los ciclos repetidos de sueño-apnea/hipopnea-arousal (incluyendo distintos grados de hipoxemia, hipercapnia, oscilaciones de la presión intratorácica, incremento de la actividad simpática y activación cortical) se ha asociado a un deterioro de la calidad de vida de los sujetos que lo padecen, mayor incidencia de accidentes de tráfico, domésticos y laborales, mayor riesgo anestésico y de complicaciones quirúrgicas, hospitalizaciones más prolongada, distintos trastornos neurocognitivos y conductuales, respiratorios, cardíacos, metabólicos e inflamatorios, y a un exceso de mortalidad<sup>1,3,5,7-10</sup>; más recientemente el SAHS se ha vinculado también a posible desarrollo de cáncer<sup>11,12</sup>. En la

población infantil se ha relacionado con dificultades de aprendizaje y trastornos de la conducta<sup>1</sup>.

Los principales factores de riesgo para el desarrollo del SAHS son el sexo masculino (si bien la frecuencia de SAHS tiende a igualarse tras la menopausia y en edades avanzadas), la edad (sobre todo a partir de los 60 años) y la obesidad<sup>1,2,13</sup>; factores genéticos, familiares y raciales también parecen influir<sup>3</sup>; asimismo, son factores agravantes el consumo de alcohol, tabaquismo, dormir en decúbito supino o la toma de fármacos sedantes e hipnóticos<sup>1,3</sup>. Respecto a la obesidad, ésta constituye un factor de riesgo fundamental para el desarrollo de SAOS; de hecho, datos del Wisconsin Sleep Cohort Study mostraron que una ganancia de un 10% de peso predecía un incremento aproximado del 32% (IC95% 20% a 45%) en el IAH y multiplicaba por 6 las probabilidades de desarrollar un trastorno respiratorio del sueño moderado a severo<sup>14</sup>.

El SAOS constituye un problema importante de salud pública dada su elevada prevalencia en la población general y su comorbilidad asociada, entre otras patologías con las enfermedades cardiovasculares. Tradicionalmente, estudios epidemiológicos han estimado que hasta el 5% de la población adulta en países occidentales pueden tener SAOS no diagnosticado<sup>15</sup>; dicha frecuencia es mayor en varones que en mujeres (2-3:1), aumenta con la edad, y el síndrome es más prevalente conforme el peso medio de la población aumenta<sup>1,3,15,16</sup>. Estos datos son similares a los descritos en otros países no occidentales<sup>17</sup>. La frecuencia de SAOS en la población, sin embargo, parece haber ido incrementándose en los últimos años; así, en Estados Unidos, análisis del estudio Wisconsin Sleep Cohort Study extrapolados a la población general en individuos entre 30 a 60 años estudiados mediante polisomnografía nocturna y publicado a principios de los años 90 estimaban entonces una frecuencia de SAOS del 4% en varones y 2% en mujeres<sup>16</sup>. Análisis similares posteriores indican un incremento en la frecuencia de SAOS de entre el 14 y el 55% durante las dos últimas décadas, según el subgrupo considerado, con una prevalencia general de SAOS con IAH  $\geq 5$  y síntomas de somnolencia diurna del 14% en varones y 5% en mujeres en 2010<sup>18</sup>. Dicho incremento está muy probablemente relacionado, entre otros posibles factores, con el aumento progresivo de obesidad en la población<sup>18</sup>. En niños los datos son menos precisos, si bien se estima una probable prevalencia de entre el 2 al 4%, pudiendo llegar hasta el 10% en aquellos niños que son roncadores habituales<sup>15,19</sup>.

En España se estima que entre un 24 a 26% de la población presenta un IAH superior a 5 y entre el 3 al 6% de la población padece un SAHS sintomático<sup>3</sup>. Durán J et al, en 2001, sobre una muestra aleatoria superior a 2100 sujetos no institucionalizados entre 30 a 70 años de edad en población general residentes en el País Vasco, describieron una frecuencia de pausas respiratorias del 6% y somnolencia diurna en el 18%, un IAH >10 en el 19% de varones y 15% de mujeres y una prevalencia de SAHS de acuerdo a un IAH >10 con somnolencia diurna excesiva del 3.4% en varones y 3% en mujeres<sup>13</sup>. Dicha frecuencia se incrementaba consistentemente con la edad en ambos sexos, con una odds ratio (OR) de 2.2 (Intervalo de confianza al 95% [IC95%] 1.7 a 3.0) por cada incremento de 10 años para un IAH >5<sup>13</sup>.

A todos estos datos se suma la falta general de identificación de individuos con SAOS. Estudios en Estados Unidos han estimado que más del 85% de individuos con un SAOS significativo y potencialmente tratable no habían sido clínicamente diagnosticados<sup>20</sup>. En España se ha descrito que tan sólo un 5 a 9% de la población con SAHS habría sido diagnosticado y tratado<sup>1</sup>. La falta de identificación de SAHS parece ser mayor en mujeres que en varones<sup>21</sup>. Así, el análisis de los pacientes referidos a la Unidad de Sueño del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla durante 30 meses consecutivos (n=1745) por clínica sugestiva de SAOS encontró un diagnóstico final del mismo por polisomnografía en 1166 casos, con una relación hombres/mujeres de 4.9/1<sup>22</sup>, sugiriendo un menor grado de sospecha de SAHS por médicos no especialistas en trastornos del sueño y consiguiente menor derivación de mujeres a unidades especializadas.

Dado que la condición objeto de estudio en el presente trabajo es el SAHS de origen obstructivo, en adelante nos referiremos al SAOS a menos que se especifique lo contrario.

### **Síndrome de Apnea-Hipopnea Obstructiva del Sueño y Patología Cardiovascular**

El SAOS y la enfermedad cardiovascular (ECV) se relacionan bidireccionalmente, en tanto que los pacientes con SAOS presentan una mayor frecuencia de ECV y en los individuos con ECV existe una mayor prevalencia de SAOS<sup>6</sup>. Ambas entidades comparten además factores de riesgo comunes, como la edad, sexo, obesidad, tabaco o consumo de alcohol. Y con frecuencia múltiples comorbilidades como hipertensión, diabetes, síndrome metabólico

o la propia ECV están presentes en pacientes con SAOS. Todo ello dificulta discernir si las alteraciones observadas en los pacientes con SAOS son debidas al propio síndrome de apnea del sueño, a los factores de riesgo vascular/ECV o a ambos<sup>6</sup>.

En general, se estima que la prevalencia de SAOS es 2 a 4 veces superior en pacientes con ECV comparado con la población general<sup>6,23,24</sup>, y dicho síndrome puede condicionar un mayor riesgo en aquellos pacientes con ECV. Así, si bien los datos son limitados, en un reciente meta-análisis en pacientes con enfermedad coronaria (n=1302) o cerebrovascular (n=822) la presencia de SAOS se asoció a un mayor riesgo de nuevos eventos coronarios, ictus o mortalidad por cualquier causa<sup>23</sup>. A su vez, el desarrollo de ECV en paciente con SAOS puede conllevar un empeoramiento del trastorno respiratorio. Chami et al, sobre una muestra de más de 2700 pacientes libres de ECV a nivel basal, objetivaron como aquellos individuos que presentaron eventos cardiovasculares (infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca e ictus) tras 5 años de seguimiento experimentaron un mayor grado de deterioro del SAOS (incrementos superiores del IAH) comparado con participantes que no desarrollaron ECV<sup>25</sup>.

Diversos estudios epidemiológicos de base poblacional y corte transversal han puesto de manifiesto una mayor prevalencia de distintas condiciones cardiovasculares en pacientes con SAOS, incluyendo hipertensión<sup>26</sup>, diabetes<sup>27,28</sup>, síndrome metabólico<sup>29</sup>, resistencia a la insulina<sup>30</sup>, hipertrofia ventricular izquierda<sup>31,32</sup> y derecha<sup>33</sup>, arritmias<sup>34,35</sup>, y ECV<sup>36-38</sup>. En el Sleep Heart Health Study, incluyendo más de 6000 participantes de edad media (>40 años) de la población general, después de ajustar por distintas variables de interés (incluyendo el índice de masa corporal [IMC]), la presencia de trastornos del sueño se asoció a una mayor prevalencia de hipertensión (OR 1.37, IC95% 1.03 a 1.83, para IAH  $\geq$ 30 vs. <1.5)<sup>26</sup>, diabetes (OR 1.7, IC95% 1.1 a 2.7, vs. ausencia de trastornos del sueño)<sup>27</sup>, y ECV (infarto de miocardio, angina, revascularización coronaria, insuficiencia cardiaca o ictus; OR para la comparación entre cuartiles superior vs. inferior de IAH: 1.42, IC95% 1.13 a 1.78)<sup>36</sup>. Coughlin et al describieron una asociación independiente entre SAOS y distintos componentes del síndrome metabólico (presión arterial, insulinemia, niveles de triglicéridos o niveles bajos de HDL) después de ajustar por distintas covariables incluyendo el IMC; comparado con controles, la presencia de síndrome metabólico fue aproximadamente 9 veces superior en sujetos con SAOS<sup>29</sup>. En un estudio con más de 2700 pacientes registrados en un sistema de salud en Israel el diagnóstico de SAOS se correlacionó con la presencia de enfermedad isquémica coronaria,

hipertensión pulmonar, insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía y arritmias<sup>37</sup>. Y en el Wisconsin Sleep Cohort Study, con casi 1500 pacientes de población general trabajadora (30 a 60 años), un IAH igual o superior a 20 se asoció a una mayor prevalencia de ictus a nivel basal comparado con aquellos sujetos sin trastornos del sueño (AHI <5; OR ajustada 3.8, IC95% 1.2 a 12.6)<sup>39</sup>.

Dicha asociación entre SAOS y ECV puede estar determinada por la severidad del SAOS. Así, en el mismo Sleep Heart Health Study la presencia de hipopneas con desaturaciones de oxígeno  $\geq 4\%$  se asoció con ECV prevalente (OR por cuartiles de IAH: 1.00 [IAH <1.10 eventos/h], 1.10 [IAH 1.01-3.20], 1.33 [IAH 3.21-7.69] y 1.41 [IAH >7.69]), si bien no se observó asociación entre ECV e hipopneas con niveles de desaturación inferiores<sup>40</sup>. Y en el Wisconsin Sleep Cohort Study, a diferencia de lo comentado previamente, no se observó diferencia en la prevalencia de ictus en aquellos individuos con IAH <5 o con IAH 5-20<sup>39</sup>.

Los datos de estudios de prevalencia han sido apoyados por distintos estudios prospectivos que sugieren que, en general, la presencia de SAOS constituye un factor de riesgo para el desarrollo de ECV y otras condiciones cardiovasculares. En análisis prospectivos del Nurses' Health Study, incluyendo alrededor de 70.000 mujeres de 40 a 65 años sin ECV previa y un seguimiento medio de 8 a 10 años, la presencia de ronquidos habituales durante el sueño, como marcador indirecto de OSA, se asoció a un mayor riesgo de desarrollo de ECV<sup>41</sup>, hipertensión<sup>42</sup> y diabetes mellitus tipo 2 (DM2)<sup>43</sup>. El riesgo relativo (RR, ajustado por la edad, IMC y otras covariables) en mujeres roncadoras habituales comparado con aquellas no roncadoras fue de 1.20 (IC95% 1.01 a 1.43) para ECV<sup>41</sup>, 1.55 (IC95% 1.42 a 1.70) para hipertensión<sup>42</sup>, y 2.03 (IC95% 1.71 a 2.40) para DM2<sup>43</sup>.

En el Wisconsin Sleep Cohort Study el riesgo de hipertensión tras 4 años de seguimiento se incrementó con la severidad del SAOS determinada por el IAH a nivel basal, en una relación "dosis-dependiente", de forma que, comparado con aquellos sujetos con un IAH=0, el riesgo de hipertensión (OR) fue de 1.42 (IC95% 1.13 a 1.78), 2.03 (IC95% 1.29 a 3.17) y 2.89 (IC95% 1.46 a 5.64) para aquellos individuos con un IAH de 0.1-4.9, 5.0-14.9 y  $\geq 15$  eventos/hora, respectivamente<sup>44</sup>. En la misma cohorte de pacientes y similar seguimiento, un IAH  $\geq 20$  se asoció con un incremento del riesgo de ictus en análisis no ajustados (OR 4.31, IC95% 1.31 a 14.15), si bien tras ajustar por edad, sexo e IMC la tendencia fue igualmente a

un mayor riesgo pero no alcanzó significación estadística (3.08, IC95% 0.74 a 12.81)<sup>39</sup>. Young et al comunicaron los resultados tras 18 años de seguimiento del Wisconsin Sleep Cohort Study en relación con mortalidad cardiovascular, objetivándose un riesgo superior en pacientes con trastornos respiratorios del sueño severo (IAH  $\geq 30$ ) sin tratamiento regular con CPAP (Hazard ratio [HR] ajustado 5.2, IC95% 1.4 a 19.2)<sup>10</sup>.

Finalmente, distintos meta-análisis publicados en los últimos años han comunicado resultados que apoyan un mayor riesgo de patología cardiovascular incidente en pacientes con SAOS, incluyendo enfermedad coronaria<sup>45</sup>, ictus<sup>45,46</sup>, eventos cardiovasculares no fatales<sup>7</sup>, enfermedad cardiovascular<sup>46</sup> o muerte de causa cardiovascular<sup>7,9,45</sup>, principalmente en sujetos con SAOS severo<sup>9,46</sup> y en varones<sup>45</sup>.

La asociación entre SAOS y desarrollo de ECV parece diferir según el sexo (con un mayor riesgo en pacientes varones, si bien dichos análisis pueden estar limitados por la inclusión en los estudios de un menor número de mujeres con SAOS severo en ciertos casos) y estar condicionada por la edad, con un mayor riesgo en sujetos más jóvenes. Análisis del seguimiento a largo plazo de la cohorte del Sleep Heart Health Study han relacionado la presencia de SAOS con un mayor riesgo de desarrollo de hipertensión<sup>47</sup>, enfermedad coronaria<sup>48</sup>, insuficiencia cardíaca<sup>48</sup>, ictus<sup>49</sup> y mortalidad por cualquier causa y particularmente por enfermedad coronaria<sup>50</sup>. Estos hallazgos, sin embargo, fueron más evidentes (y en algunos casos solamente significativos) en pacientes varones por debajo de los 70 años de edad (40-70 años)<sup>48-50</sup>. En un reciente análisis conjunto de las cohortes de los estudios Atherosclerosis Risk in the Communities y Sleep Heart Health Study, tras un seguimiento medio de 13 años, la presencia de SAOS se asoció independientemente al desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda sólo en mujeres<sup>51</sup>; en el mismo estudio se objetivó una asociación con la incidencia de insuficiencia cardíaca y mortalidad en mujeres, si bien dicha relación fue no significativa tras ajustar por niveles de troponina T ultrasensible<sup>51</sup>. Un estudio previo en los mismos pacientes había objetivado una asociación a nivel basal entre SAOS y niveles superiores de troponina como marcador de daño miocárdico subclínico, y de dichos niveles de troponina con la incidencia de insuficiencia cardíaca y riesgo de muerte tras 12 años de seguimiento<sup>52</sup>.

## **Relación fisiopatológica entre Síndrome de Apnea-Hipopnea Obstructiva del Sueño y Riesgo Vascular**

Los episodios repetidos de apnea/hipopnea y arousal derivados de la inestabilidad y colapso de la vía aérea superior durante el sueño inducen episodios recurrentes de hipoxia y reoxigenación, hipercapnia, oscilaciones de la presión intratorácica, desestructuración de la respuesta autonómica y hemodinámica normal durante el sueño y activación cortical<sup>3,6,53</sup>. Dichos ciclos se repiten multitud de veces durante el sueño en los pacientes con SAOS.

La hipoxemia crónica intermitente y la hipercapnia, mediante la activación de quimiorreceptores periféricos y posiblemente también mediante un efecto directo sobre áreas centrales de regulación simpática, generan un aumento de la actividad simpática con liberación de catecolaminas, vasoconstricción con aumento de la presión arterial, y aumento de la frecuencia cardíaca y gasto cardíaco<sup>6,53,54</sup>. La recurrencia de estos episodios podría resultar en un aumento del tono simpático también durante los periodos de normoxia<sup>6</sup>.

Los ciclos repetidos de hipoxemia y reoxigenación (“isquemia-reperfusión”) favorecen asimismo el desarrollo de estrés oxidativo y liberación de radicales libres, producción de citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión, factores pro-angiogénicos (p.ej. VEGF), células inflamatorias circulantes, activación de leucocitos, liberación de sustancias vasoactivas como la endotelina o activación de factores de transcripción (como el factor-1 inducible por hipoxia o el factor nuclear  $\kappa$ B). Todo ello puede conducir a una situación de inflamación sistémica y vascular, lesión endotelial generalizada (disfunción endotelial), remodelado vascular, activación del sistema renina-angiotensina o alteraciones metabólicas (p.ej. deterioro de la función celular beta y resistencia a insulina)<sup>6,53-55</sup>. El SAOS también se ha relacionado con un incremento de la activación plaquetaria, aumento de fibrinógeno y otros marcadores de trombosis, lo que puede generar un estado protrombótico o de hipercoagulabilidad<sup>6,53,56</sup>. Todos estos mecanismos se encuentran a su vez estrechamente interrelacionados entre sí.

Por otra parte, el esfuerzo respiratorio de los músculos toraco-abdominales contra una vía aérea superior colapsada genera un aumento importante de las presiones negativas intratorácicas. Ello, a su vez, provoca un aumento de la presión transmural del ventrículo izquierdo, de la postcarga y del retorno venoso al corazón (precarga), con aumento de la

demanda miocárdica de oxígeno y alteración de la estabilidad hemodinámica y autonómica<sup>3,6</sup>. Todo esto, unido a la elevación de la presión arterial y liberación de factores inflamatorios y citoquinas, puede a su vez favorecer el desarrollo de hipertrofia, remodelado y disfunción ventricular izquierda<sup>3,6</sup>. Por otro lado, la hipoxemia puede generar una vasoconstricción refleja de las arterias pulmonares, lo que de forma crónica podría generar hipertensión pulmonar y aumento de la postcarga del ventrículo derecho<sup>6</sup>.

La comorbilidad frecuentemente asociada al SAOS, como la obesidad, y sus consecuencias fisiopatológicas podrían asimismo potenciar todos estos mecanismos.

Todos los mecanismos anteriormente comentados favorecerían, en última instancia, el desarrollo de lesión aterosclerótica y enfermedad cardiovascular. La disfunción endotelial jugaría un papel central como mecanismo intermedio entre el SAOS y el desarrollo de dicha patología cardiovascular.

### **Síndrome de Apnea-Hipopnea Obstructiva del Sueño y Disfunción Endotelial**

El endotelio constituye una monocapa celular que ocupa la interface entre el compartimento intravascular y la pared vascular. Más allá de la barrera mecánica que supone en la pared vascular, el endotelio es un órgano autocrino, paracrino y endocrino que ejerce funciones homeostáticas fundamentales, segregando una multitud de moléculas que tienen una función clave en la defensa contra la arteriosclerosis por medio de la regulación del tono vascular, adhesión celular, agregación plaquetaria, coagulación, fibrinólisis, regulación de la proliferación del músculo liso vascular e inflamación<sup>53,57</sup>. La disfunción endotelial puede preceder o acelerar la evolución del proceso arteriosclerótico y su presencia se correlaciona con eventos cardiovasculares futuros<sup>53,57</sup>. El óxido nítrico (NO) se ha identificado como la molécula vasodilatadora más importante liberada por el endotelio; se trata de un potente vasodilatador de la fibra muscular lisa vascular, pero además inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, la adhesión de leucocitos y la penetración de macrófagos hacia la pared arterial, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la proliferación del músculo liso vascular, así como disminuye la expresión de genes proinflamatorios; todas estas acciones son eventos claves en el desarrollo de lesiones arterioscleróticas<sup>58,59</sup>. El término disfunción

endotelial se refiere a la pérdida de las funciones protectoras del endotelio y condiciona no solo vasoconstricción sino un medio proinflamatorio, proliferativo y procoagulativo que favorece todos los estadios de la arteriosclerosis<sup>53,60</sup>.

La función endotelial se puede valorar de forma no invasiva mediante la determinación en plasma de los niveles circulantes de distintos biomarcadores (p.ej. biodisponibilidad de óxido nítrico [relación nitritos/nitratos], moléculas de adhesión, citoquinas, VEGF o especies reactivas de oxígeno, entre otras), cuantificación de ciertas poblaciones celulares (p.ej. células progenitoras endoteliales o células endoteliales apoptóticas circulantes), o mediante estudios funcionales de respuesta vascular (p.ej. cambios en el flujo sanguíneo o en el diámetro arterial en respuesta a estímulos como la hipoxemia o a sustancias con efecto vasodilatador dependiente del endotelio [p.ej. acetilcolina])<sup>53,61-63</sup>. Con respecto a estas últimas, la vasodilatación mediada por flujo (flow-mediated dilation, FMD) es actualmente la técnica funcional mejor validada para valorar no invasivamente la función endotelial periférica, si bien otras técnicas como la pletismografía de oclusión venosa, tonometría arterial periférica o la flujimetría por láser doppler se usan también para el estudio de la función endotelial (mediada por NO)<sup>61,63</sup>.

En pacientes con SAOS los episodios de hipoxemia y reoxigenación, estrés oxidativo, activación simpática, liberación de sustancias vasoactivas, inflamación sistémica o hipercoagulabilidad son todos mecanismos que pueden favorecer el desarrollo de disfunción endotelial<sup>64</sup>. Así, si bien es necesario una mayor evidencia (en parte debido a la necesidad de diferenciar adecuadamente la propia contribución del SAOS y la de posible comorbilidad asociada [p.ej. obesidad, hipertensión, diabetes...]) a los hallazgos de disfunción endotelial objetivados, diversos estudios han sugerido la existencia de un deterioro de la función endotelial y de la propia capacidad de reparación del endotelio en los pacientes con SAOS, con disminución de la biodisponibilidad de NO y tendencia a un estado proinflamatorio y protrombótico<sup>6,53,64</sup>. Hoyos et al han publicado recientemente (2015) una completa y extensa revisión sistemática incluyendo más de 40 estudios de base poblacional y de casos-contrroles con determinación de la función endotelial mediante alguna medida de reactividad vascular (principalmente FMD)<sup>64</sup>; dichos autores concluyen que, en general, existe una asociación consistente entre SAOS y vasodilatación dependiente del endotelio determinada mediante estas técnicas, principalmente en aquellas que valoran la macrovasculatura (p.ej. FMD); no

obstante, no todos los estudios confirman esta asociación independientemente de otros factores de riesgo vascular<sup>64</sup>.

### **Tratamiento con Presión Positiva Continua en la Vía Aérea (CPAP), patología cardiovascular y disfunción endotelial**

El tratamiento más eficaz del SAHS es la administración de presión positiva continua en la vía aérea (CPAP)<sup>65</sup>. Desde que en 1981 Sullivan et al describiesen la aplicación de presión positiva continua en la vía aérea en una serie de 5 pacientes (como alternativa a la traqueotomía para SAHS graves)<sup>66</sup>, el tratamiento con CPAP se ha ido desarrollando progresivamente hasta ser actualmente el tratamiento de elección para la mayoría de pacientes con un SAHS significativo<sup>4,5,65</sup>. El dispositivo de CPAP consiste en un compresor o turbina que genera una presión positiva de aire constante que, a través de una tubuladura y finalmente una mascarilla (nasal u oronasal) se transmite a la vía aérea, estabilizándola y evitando su colapso y, con ello, previniendo los episodios de apneas e hipopneas y sus consecuencias fisiopatológicas<sup>65</sup>. La aplicación de una presión positiva continua mantendría permeable la vía aérea superior a través de un efecto mecánico neumo-dilatador que evita su colapso; de esta manera, la presión aplicada contrarresta la presión crítica que supera la capacidad de los músculos dilatadores de la vía aérea para mantener su permeabilidad provocando el colapso de la misma<sup>65</sup>. Entre los efectos de la CPAP sobre la vía aérea superior se han descrito un incremento en el volumen y sección desde la zona nasofaríngea a la orofaringe, aumento de los diámetros sobre todo laterales, y otros cambios estructurales<sup>65</sup>. Además del efecto mecánico, la CPAP podría actuar a través del aumento de los volúmenes pulmonares, lo cual se transmitiría a través de la tráquea al resto de la vía aérea, estabilizándola, e incrementando el tono de los músculos dilatadores<sup>65</sup>.

Siguiendo los criterios de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) en sus documentos de consenso (2005)<sup>1</sup> y normativa SEPAR (2011)<sup>3</sup> y del Documento de Consenso sobre el SAHS en Andalucía (2012)<sup>67</sup>, el tratamiento con CPAP en pacientes con SAOS estaría indicado en aquellos sujetos con un IAH igual o superior a 30, así como en pacientes con IAH igual o superior a 5 con sintomatología relevante o comorbilidad (especialmente cardiovascular) asociada. El objetivo del tratamiento del SAHS es

fundamentalmente el control de los síntomas de la enfermedad y disminuir el riesgo cardiovascular, accidentabilidad y otras comorbilidades asociadas al síndrome<sup>3</sup>.

La aplicación de CPAP ha demostrado ser un tratamiento efectivo del SAOS, con reducción del IAH y mejora de los índices de saturación y somnolencia<sup>4,65</sup>, incluso en pacientes mínimamente sintomáticos<sup>68</sup>, lo que a su vez conlleva una mejora de mecanismos intermedios implicados en la relación entre SAOS y patología cardiovascular, como hipoxemia, hiperactivación simpática o variaciones de la presión intratorácica<sup>3,65</sup>. A pesar de ello, sin embargo, la evidencia del efecto de la CPAP sobre la ECV, hipertensión, diabetes y otros trastornos es insuficiente<sup>4,6,53</sup>. Si bien existen diversos estudios a este respecto, el número de participantes no suele ser elevado y el seguimiento no es prolongado, a lo que se suma la falta de uniformidad y de consistencia de los resultados reportados (tabla 1)<sup>4,6,53</sup>. Meta-análisis recientes han mostrado datos en la misma línea. Así, para el caso de hipertensión, distintos meta-análisis han sido publicados en los últimos años, con resultados no uniformes: Bratton et al y Aljimi et al no objetivaron efectos beneficiosos del tratamiento con CPAP en pacientes con SAOS mínimamente sintomáticos o en pacientes con SAOS no seleccionados, respectivamente<sup>68,69</sup>; por el contrario, el meta-análisis de Fava et al sugiere que la terapia con CPAP reduce significativamente la presión arterial en pacientes con SAOS, si bien dicha reducción es de pequeña magnitud (<4 mmHg)<sup>70</sup>; finalmente, Varounis et al, en pacientes con hipertensión resistente (n=350, 3 a 6 meses de seguimiento) tratados con CPAP vs. terapia médica, describieron un descenso significativo en la media de presión arterial por MAPA de 24 horas<sup>71</sup>.

En relación a mortalidad cardiovascular, un reciente meta-análisis de estudios observacionales prospectivos limitado por el número de trabajos incluidos (3 estudios) no objetivó diferencias significativas en mortalidad cardiovascular en el grupo de pacientes tratados con CPAP comparado con sujetos sin SAOS (HR 0.82, IC95% 0.50 a 1.33, I<sup>2</sup>=0%)<sup>9</sup>. Por el contrario, en el seguimiento a largo plazo de la cohorte del Wisconsin Sleep Cohort Study (n=1522, seguimiento medio 13.8 años, 20.963 personas-años) el riesgo de mortalidad por causas cardiovasculares que se objetivó en pacientes con IAH ≥30 (HR 5.2, IC95% 1.4 a 19.2) dejó de ser significativo con la inclusión en el análisis de aquellos pacientes que habían seguido un tratamiento regular con CPAP (≥4 noches por semana): HR 2.9, IC95% 0.8 a 10.0<sup>10</sup>.

**Tabla 1. Resumen de ensayos clínicos controlados randomizados sobre el efecto del tratamiento con CPAP en eventos cardiovasculares en pacientes con SAOS**

(\*) Hipertensión: sólo se incluyen estudios realizados después de los incluidos en dos meta-análisis publicados en 2007; el meta-análisis de Haentjens et al incluyó 12 ensayos clínicos (n=572 pacientes, 1 a 12 semanas de seguimiento) con valoración de la presión arterial mediante monitorización ambulatoria de 24 horas (MAPA), observándose una disminución de 1.69 mmHg en la presión arterial media de 24 horas (IC95% -2.69 a -0.69, I<sup>2</sup>=41%) con el tratamiento con CPAP (vs. placebo) en pacientes con SAOS, especialmente en aquellos con una SAOS más severo<sup>72</sup>. Bazzano et al incluyeron 16 estudios randomizados (n=818 participantes, 2 a 24 semanas de seguimiento) con determinación de presión arterial en clínica o por MAPA y comparando CPAP vs. control; el tratamiento con CPAP produjo una reducción de la presión arterial sistólica, diastólica y media de -2.46 mmHg (IC95% -4.31 a -0.62), -1.83 mmHg (IC95% -3.05 a -0.61) y -2.22 mmHg (IC95% -4.38 a -0.05), respectivamente<sup>73</sup>. ABPM: ambulatory blood pressure monitoring. AHI: apnoea-hypopnoea index. CHF: chronic heart failure. BP=blood pressure. CPAP: continuous positive airway pressure. LVEF: left ventricular ejection fraction. OSA: obstructive sleep apnoea. UNE: urinary norepinephrine. Reproducida de *Sánchez-de-la-Torre M et al, Lancet Respir Med 2013;1:61-72*<sup>53</sup> con permiso de Elsevier Ltd.©.

	Outcomes	Treatment	Patient population	Duration of follow-up	Key findings
<b>Hypertension*</b>					
Durán-Cantolla et al (2010) <sup>56</sup>	Blood pressure	Therapeutic CPAP vs sham CPAP	340 patients with untreated hypertension and AHI at least 15/h	3 months	1.5 mm Hg decrease in mean ABPM, 2.1 mm Hg decrease in systolic ABPM, and 1.3 mm Hg decrease in diastolic ABPM
Barbé et al (2010) <sup>57</sup>	Blood pressure	Therapeutic CPAP vs conservative treatment	359 hypertensive patients with AHI at least 20/h, without daytime sleepiness (Epworth Sleepiness Scale score <11)	1 year	Significant decrease in clinic diastolic blood pressure of 2.19 mm Hg. A decrease of 3.5 mm Hg was observed in patients who used CPAP more than 5.6 h per night
Lozano et al (2010) <sup>58</sup>	Blood pressure	Therapeutic CPAP vs conservative treatment	75 patients with resistant hypertension and AHI at least 15/h	3 months	4.9 mm Hg decrease in diastolic ABPM in the CPAP group. Decrease of 6.9 mm Hg in diastolic ABPM and 9.7 mm Hg in systolic ABPM noted in patients adherent to CPAP longer than 5.8 h per night
Martínez-García et al (2012) <sup>59</sup>	Blood pressure	Therapeutic CPAP vs conservative treatment	210 patients with resistant hypertension and AHI at least 15/h	3 months	No changes in ABPM. More patients with CPAP recovered a dipper pattern. Patients with adherence longer than 4 h showed a significant decrease of 5.5 mm Hg in systolic ABPM and 4.2 mm Hg in diastolic ABPM
<b>Stroke</b>					
Hsu et al (2006) <sup>60</sup>	Neurological function	Therapeutic CPAP vs conservative treatment	30 patients with AHI at least 15/h and acute stroke	6 months	No change in neurological function, sleepiness, or health status in the CPAP group. Patients allocated to CPAP had very low adherence (average 1.4 h per night)
Ryan et al (2011) <sup>61</sup>	Neurological function	Therapeutic CPAP vs rehabilitation	48 patients with AHI at least 15/h admitted for rehabilitation within 3 weeks of stroke onset	1 month	CPAP treatment improved functional and motor, but not neurocognitive outcomes
Parra et al (2011) <sup>62</sup>	Neurological function	Therapeutic CPAP vs conservative treatment	140 patients with AHI at least 20/h and acute, first-ever ischaemic stroke	2 years	Cardiovascular event-free survival and neurological recovery was similar in both groups
<b>Heart failure</b>					
Kaneko et al (2003) <sup>63</sup>	LVEF	Therapeutic CPAP vs conservative treatment	24 patients with AHI at least 20/h and LVEF less than 45%	1 month	LVEF increased from 25.0% to 33.8% with CPAP
Egea et al (2008) <sup>64</sup>	LVEF	Therapeutic CPAP vs sham CPAP	60 patients with AHI higher than 10/h and chronic heart failure with LVEF less than 45%	3 months	LVEF increased from 28.8% to 31.0% with CPAP
Arias et al (2005) <sup>65</sup>	Cardiac function	Therapeutic CPAP vs sham CPAP	27 patients with AHI at least 10/h and LVEF less than 50%, and 15 healthy controls	Crossover design, 12 weeks on CPAP and 12 weeks on sham CPAP	At baseline, an abnormal left ventricular filling pattern was present in 15 of 27 patients with OSA and only 3 of 15 in the control group. CPAP significantly improved several diastolic abnormalities
Smith et al (2007) <sup>66</sup>	LVEF and exercise capacity	Auto-titrating CPAP vs sham CPAP	26 patients with AHI at least 15/h and LVEF less than 45%	Crossover design, 6 weeks on autotitrating CPAP and 6 weeks on sham CPAP	Autotitrating CPAP did not improve cardiac function, exercise capacity, or neurohormonal activation. CPAP compliance was low (3.5 h per night)
Mansfield et al (2004) <sup>67</sup>	LVEF, overnight UNE excretion, and quality of life	Therapeutic CPAP vs conservative treatment	55 patients with AHI greater than 5/h and LVEF less than 55%	3 months	CPAP treatment was associated with significant improvements in LVEF (1.5 [SD 1.4%] vs 5.0 [1.0%], p=0.04), and with reductions in overnight UNE excretion and improvements in quality of life
<b>Composite</b>					
Barbé et al (2012) <sup>68</sup>	Incidence at a composite endpoint (hypertension or cardiovascular events)	Therapeutic CPAP vs conservative treatment	725 patients with AHI at least 20/h, without daytime sleepiness (Epworth score <11)	4 years	Incidence of the composite endpoint was similar in both groups (9.20 vs 11.02 per 100 person-years). In a post-hoc analysis, patients who used CPAP longer than 4 h per night showed a significant decrease in the incidence of the composite endpoint

Como se ha comentado anteriormente, la disfunción endotelial secundaria al SAOS parece jugar un papel principal en el desarrollo de arteriosclerosis y patología cardiovascular en estos pacientes. La corrección mediante tratamiento con CPAP de los episodios de apneas e hipopneas y con ello de la hipoxemia y otros eventos fisiopatológicos secundarios podría conducir a una mejora de la función endotelial que, en última instancia, podría reflejarse en una disminución del riesgo cardiovascular futuro.

La valoración de los efectos de la aplicación de CPAP sobre la función endotelial en los pacientes con SAOS está limitada por el reducido número de pacientes incluidos en los estudios y su limitado seguimiento. En una reciente revisión sistemática, Hoyos et al identificaron 22 estudios de diseño antes-después con intervención con CPAP (tabla 2) y 9 ensayos controlados y aleatorizados con CPAP vs. control (tabla 3) con determinación de la vasodilatación dependiente del endotelio (principalmente mediante FMD)<sup>64</sup>; en general se observa un mejoría de la vasodilatación dependiente del endotelio con la aplicación de CPAP (sobre todo en los estudios de intervención observacionales), aunque no todos los estudios confirman estos hallazgos y los resultados de los ensayos clínicos son menos consistentes (tablas 2 y 3)<sup>64</sup>. Un par de meta-análisis recientes incluyendo un número más limitado de estudios han mostrado resultados en la misma línea<sup>63,74</sup>. En definitiva, los hallazgos de distintos estudios apuntan a un efecto favorable del tratamiento con CPAP frente a la disfunción endotelial, si bien la evidencia es todavía insuficiente y son necesarios más estudios controlados y aleatorizados, que incluyan un mayor número de pacientes y un seguimiento prolongado, para confirmar estos resultados.

**Tabla 2. Estudios antes-después del efecto del tratamiento con CPAP sobre la disfunción endotelial**

First author, year of publication	n/sex	Age (y)	AHI (events/h)	Duration	EDV technique	CPAP change in EDV	EIV technique	CPAP change in EIV	Comments
<b>Macro-vascular</b>									
Bakker 2013	15 (11 M)	48 (range 26–60)	36.5 (24.7, 77.3)	6 mo	FMD	↔ (NS)	GTN-ID	↔ (NS)	
Bayram 2009	29 M	44 ± 8	60.4 ± 22.1	6 mo	FMD	↑ CPAP users** ↔ CPAP failures (NS)	GTN-ID	↔	ΔFMD correlated with CPAP use (r = 0.76**)
Butt 2011	36 (26 M)	49 ± 10	36 ± 20	26 wk	FMD	↑**	GTN-ID	↑**	
Del Ben 2012	10 M	NR	43.4 ± 12.6	6 mo	FMD	↑*	ND		
Duchna 2006	7 M	51 ± 10	6.7 ± 3.8	161 ± 82 nights	HVC (BDK)	↑**	HVC (GTN)	↔	
Duchna 2005	16 M	50 ± 10	22.4 ± 21.7	6 mo	HVC (BDK)	↑**	HVC (GTN)	↔	
Duchna 2000	6 M	49	39.3 ± 31.4	8 wk	HVC (BDK)	↑**	HVC (GTN)	↔	
El Solh 2007	14 M	46 ± 5	27.3 ± 12.5	8 wk	FMD	↑**	ND		
Jelic 2008	22 (NR)	38 ± 11	25 (10, 52)	4 wk	FMD	↑ CPAP adherers** ↔ Non-adherers nor decliners (p = 0.06)	ND		CPAP adherers: ≥4 h/night
Jelic 2009	16 (9 M)	36 ± 9	22 ± 24	4 wk	FMD	↔ CPAP adherers (p = 0.06) ↔ Non-adherers nor decliners	ND		CPAP adherers: ≥4 h/night
Jelic 2010	26 (NR)	NR	NR	4 wk	FMD	↑ CPAP adherers* ↔ Non-adherers nor decliners (NS)			CPAP adherers: ≥4 h/night
Panoutsopoulos 2012	20 M	54 ± 11	25.4 ± 15.1	12 wk	FMD	↑**	ND		six CPAP failures not included in analysis
Patt 2010	7 (5 M)	39 ± 5	35 ± 10 (SEM)	12 wk	FMD	↑*	ND		ΔFMD not correlated with AHI or CPAP use.
Ohike 2005	10 M	53 ± 11	33 ± 14.7	4 wk	FMD	↑** at 1 & 4 wk	GTN-ID	↔	
Tulmac 2012	30 (22 M)	52 ± 11	60.6 ± 24.9	1 night	FMD	↑**	ND		Sub-analysis: only men, non-DM, non-HT & non-HL
<b>Micro-vascular</b>									
Bakker 2013	15 (11 M)	48 (range 26–60)	36.5 (24.7, 77.3)	6 mo	LDF-I (ACH)	↑*	LDF-I (SNP)	↔	
Oyama 2012	32 (19 M) OSA and MetS	54 ± 9	56.2 ± 21.6	12 wk	VOP (hyperaemia)	↑**	ND		UCA: EDV with AHI (r = 0.57**) NR
Buchner 2011	6 M	NR	37.9 ± 26.1	6 mo	VOP (ACH)	↑ (NS)	VOP (SNP)	↔	
Butt 2011	36 (26 M)	49 ± 10	36 ± 20	26 wk	LDF-I (ACH)	↑**	LDF-I (SNP)	↑*	
Imadojemu 2002	7 (6 M)	52 ± 4 (SEM)	47 ± 2 1.2	4.5 mo	VOP (hyperaemia)	↑*	ND		NR
Jurado-Gamez 2011	25 (NR)	47 (40, 47)	71 (52, 85)	12 wk	Cutaneous perfusion	↑**	ND		UCA: EDV with AHI (r = 0.41*), ODI (r = 0.48*) not with %T < SaO <sub>2</sub> 90
Lattimore 2006	10 (9 M)	49 ± 8 (SEM)	39 (15, 104)	12 wk	VOP (ACH)	↑**	VOP (SNP)	↔	Not severity of hypoxemia, AHI or CPAP use
Shiina 2010	50 (45 M)	54 ± 10	53.6 ± 22.1	12 wk	VOP (hyperaemia)	↔	ND		

Datos expresados como media ± SD o mediana (percentiles 25, 75). ↑ indica mejoría y ↔ no cambio, \* p<0.05, \*\*p<0.01. ACH = acetylcholine, AHI = apnea hypopnea index, BDK = bradykinin, CPAP = continuous positive airway pressure, DM = diabetes mellitus, EDV = endothelium-dependent vasodilatation, EIV = endothelium-independent vasodilatation, FMD = flow mediated dilatation, GTN-ID = nitro-glycerine induced dilatation, HL = hyperlipidemia, HT = hypertension, HVC = hand vein compliance, LDF-I = laser Doppler flowmetry after iontophoresis, ND = not done, NR = not reported, ODI = oxygen desaturation index, ODI4 = number of oxygen desaturation index per hour below 4%, %T < SaO<sub>2</sub>90 = the time spent below 90% of oxygen saturation, SEM = standard error of the mean, SNP = sodium nitroprusside, UCA = univariate correlational analysis, VOP = strain gauge venous occlusion plethysmography. Reproducida de Hoyos CM et al, *Sleep Med Rev* 2015;20:15–26<sup>64</sup> con permiso de Elsevier Ltd.©.

**Tabla 3. Ensayos clínicos controlados randomizados del efecto del tratamiento con CPAP sobre la disfunción endotelial**

First author, year of publication	n/sex	Age (y)	AHI (events/h)	Duration and design	EDV technique	EDV CPAP vs controls	EIV technique	EDV improved between groups?
<b>Macro-vascular</b>								
Comondore 2009 [78]	13 (9 M) CPAP No Therapy	56 ± 8	27.9 (AHI ≥ 15).	4 wk, CO	FMD	NR FMD/GTN-ID ↔ (NS)	GTN-ID	NR
Ip 2004 [52]	CPAP (14, 14 M) No Therapy (13, 13 M)	44 ± 7 41 ± 11	47.7 ± 15.3 45.1 ± 14.3 (AHI ≥ 15).	4 wk, parallel	FMD	↑**	GTN-ID	↔ (NS)
Jones 2013 [116]	43 (28 M) CPAP Sham	46 ± 9	31 (20, 41)	12 wk, CO	PWA (Salbutamol inhalation)	↔ (NS)	GTN-ID	↔ (NS)
Kohler 2013 [76]	CPAP (107, 90 M) Standard Care (101, 87 M)	58.4 (7.2) 58.2 (7.5)	9.5 (3.8, 17.2) 10.4 (5.7, 16)	6 mo, parallel	FMD	↑**	GTN-ID	N (NS)
Kohler 2011 [79]	CPAP (20, 19 M) Sham (21, 21 M)	64 ± 5 62 ± 8	36 ± 17.3 45.3 ± 22.3 (Group ODI4 ≥ 10 events/h)	2 wk withdrawal, parallel	FMD	↓**	GTN-ID	↔ (NS)
Nguyen 2010 [77]	CPAP (10, 8 M) Sham (10, 10 M)	53 ± 12 54 ± 11	38.8 ± 21.4 31.6 ± 11.1 (RDI ≥ 15/h and ESS > 10).	3 mo, parallel	FMD	NR, (CPAP ↑*, Sham ↔ NS from baseline)	GTN-ID	NR (CPAP ↔, Sham ↔ from baseline)
<b>Micro-vascular</b>								
Cross 2008 [81]	27 (26 M) CPAP Sham	48 ± 2	63 ± 5 (AHI > 15, ODI4 > 20 events/h, ESS > 10).	6 wk, CO	VOP (ACH and SubP)	↑**	VOP (SNP)	↑**
Simpson 2013 [94]	CPAP (18 M) Sham (12 M)	52 ± 12 46 ± 11	38.1 ± 15.4 37.3 ± 18.2 (AHI ≥ 20 and ODI3 ≥ 15 events/h)	12 wk, parallel	PAT	↔ (NS)	ND	
Trzepizur 2009 [83]	12 M CPAP MAS (AHI ≥ 15 events/h)	56 (56, 58)	40 (31, 49)	2 mo, CO	LDF-I (ACH)	NR (CPAP ↑*, MAS ↑*)	LDF-I (SNP)	NR (CPAP ↔, MAS ↔)

Datos expresados como media ± SD o mediana (percentiles 25, 75). ↑ indica mejoría, ↔ indica no cambio, ↓ indica empeoramiento, \* p<0.05, \*\*p<0.01. AHI = apnea hypopnea index, ACH = acetylcholine, CO = cross-over, CPAP = continuous positive airway pressure, EDV = endothelial dependent vasodilatation, EIV = endothelial-independent vasodilatation, ESS = Epworth sleepiness scale, FMD = flow mediated dilatation, GTN-ID = nitroglycerine induced dilatation LDF-I = laser Doppler flowmetry after iontophoresis, M = men, MAS = mandibular advancement splint, ND = not done, NR = not reported, NS = not significant, ODI = oxygen desaturation, index, ODI3 = number of oxygen desaturation index per hour >3%, ODI4 = number of oxygen desaturation index per hour >4%, PAT = reactive hyperaemia peripheral arterial tonometry, PWA = pulse wave analysis, RDI = respiratory disturbance index, SNP = sodium nitroprusside, SubP = substance p, VOP = venous occlusion plethysomography. Reproducida de Hoyos CM et al, *Sleep Med Rev* 2015;20:15-26<sup>64</sup> con permiso de Elsevier Ltd.©.

# HIPÓTESIS y OBJETIVOS

## HIPÓTESIS

El tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea (CPAP) en pacientes con síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAOS), al mejorar o revertir la situación de hipoxia-reoxigenación intermitente y los cambios fisiopatológicos derivados de la misma, conllevaría una mejoría de la disfunción endotelial y otros mecanismos fisiopatológicos alterados presente en estos pacientes.

Dichos cambios en la función endotelial podrían determinarse de forma no invasiva mediante la respuesta hiperémica a una isquemia transitoria y mediante la determinación de distintos marcadores bioquímicos de disfunción endotelial y daño celular (como factor de crecimiento vascular endotelial [VEGF], micropartículas [MP] apoptóticas o DNA libre circulante).

El tratamiento con CPAP por sí mismo y/o mediante la mejoría de la función endotelial conllevaría una serie de cambios favorables de distintos factores y condiciones asociadas a riesgo vascular y SAOS, como cifras de presión arterial, patrón nocturno de presión arterial, glucemia o resistencia a la insulina, entre otros.

## OBJETIVOS

---

### **Objetivo Principal:**

Determinación de los cambios (respecto a situación basal) en marcadores de función endotelial tras 3 meses de tratamiento con CPAP en pacientes con nuevo diagnóstico de SAOS no tratados previamente con CPAP:

- Hiperemia reactiva a isquemia transitoria mediante flujimetría por láser-doppler.
- Micropartículas apoptóticas CD31+/Anexina V+.
- DNA libre circulante.

### **Objetivos secundarios:**

- Comparación del efecto del tratamiento con CPAP sobre los mismos marcadores referidos previamente en pacientes con y sin hipertensión arterial.
- Determinación de los cambios (respecto a situación basal) en distintas condiciones y factores asociados a riesgo vascular tras 3 meses de tratamiento con CPAP en el conjunto de pacientes y según diagnóstico o no de hipertensión, en particular:
  - Cifras medias de presión arterial y otros parámetros relacionados obtenidos mediante monitorización ambulatoria de presión arterial durante 24 horas.
  - Patrón de descenso nocturno de presión arterial.
  - Perfil glucídico y de resistencia a la insulina.
  - Perfil lipídico.
- Determinación de los cambios (respecto a situación basal) en marcadores de fibrosis tras 3 meses de tratamiento con CPAP en el conjunto de pacientes y según diagnóstico o no de hipertensión.
- Determinación de los cambios (respecto a situación basal) en otros marcadores de función endotelial (VEGF) o inflamación subclínica (PCR ultrasensible) tras 3 meses de tratamiento con CPAP en el conjunto de pacientes y según diagnóstico o no de hipertensión.

Por último, se llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura para identificar los resultados publicados en relación con micropartículas celulares en pacientes con SAHS, para:

- Comparar los resultados obtenidos en nuestro estudio con aquellos ya publicados.
- Recopilar los datos comunicados hasta la fecha para extraer conclusiones respecto a su posible papel como nuevo biomarcador emergente en pacientes con SAHS.

# METODOLOGÍA

## METODOLOGÍA

Llevamos a cabo un estudio cuasi-experimental de diseño antes–después, longitudinal, prospectivo, en pacientes con nuevo diagnóstico de Síndrome de Apnea-Hipopnea Obstrucciona del Sueño (SAOS) con indicación de tratamiento con CPAP (presión positiva continua en la vía aérea, continuous positive airway pressure), que no habían sido tratados previamente con esta intervención. Los pacientes fueron seleccionados en el momento del diagnóstico. Se incluyeron 30 casos consecutivos que cumplían los criterios de inclusión/exclusión y aceptaron su participación en el estudio, atendidos en consultas de sueño de la Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

### *Criterios de inclusión y exclusión*

Se incluyeron pacientes de edad igual o superior a 18 años con nuevo diagnóstico de SAOS e indicación de tratamiento con CPAP. Se definió diagnóstico de SAOS para la inclusión en nuestro estudio como la presencia de un Índice de Apnea-Hipopnea (IAH) en la poligrafía respiratoria igual o superior a 15. La indicación de CPAP se realizó de acuerdo a los criterios propuestos por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) en su documento de consenso del año 2005 y mantenidos en su normativa SEPAR sobre SAHS de 2011<sup>1,3</sup>: 1) IAH igual o superior a 30, 2) IAH entre 5 y 30 con presencia de síntomas relacionados con el SAHS y/o cuestionario de Epworth con puntuación igual o mayor a 12 y/o comorbilidad asociada.

Se consideraron criterios de exclusión para la participación en nuestro estudio: 1) no indicación de tratamiento con CPAP, tratamiento previo con CPAP, negativa a tratamiento con CPAP, intolerancia a tratamiento con CPAP, o previsible no adecuado cumplimiento del tratamiento con CPAP; 2) hipoxemia en vigilia (presión parcial de oxígeno [pO<sub>2</sub>] en gasometría arterial inferior a 70 mmHg) o saturación arterial de oxígeno (SatO<sub>2</sub>) inferior a 90% en la oximetría; 3) presencia de factores de riesgo vascular (p.ej. hipertensión) no bien controlados en el momento de la inclusión y que por ello fuera previsible una modificación del tratamiento

farmacológico durante los tres meses de seguimiento del estudio, o que hubieran precisado de modificación de dicho tratamiento en los 3 meses anteriores a la inclusión en el estudio; 4) Insuficiencia renal con filtrado glomerular (MDRD)<sup>75</sup> inferior a 30 ml/min/1,73m<sup>2</sup>; 5) coexistencia de enfermedad inflamatoria o autoinmune en fase de actividad o brote, así como toma de fármacos inmunomoduladores y/o biológicos; 6) presencia de neoplasia activa salvo tumores cutáneos distintos al melanoma, o toma de fármacos quimioterápicos o antiangiogénicos; 7) uso de anticonceptivos hormonales; 8) evidencia de cualquier otra enfermedad aguda o crónica que a juicio del investigador contraindique la inclusión en el estudio por poder influir sobre la función endotelial y parámetros a estudio; 9) trastorno psiquiátrico mayor, así como incapacidad del paciente para comprender la naturaleza del estudio, de acudir a las diferentes visitas o de seguir las indicaciones previstas. Se consideró criterio de salida del estudio cualquier cambio en el tratamiento antihipertensivo o cualquier modificación terapéutica durante los tres meses del estudio que pudiera influir en la función endotelial, así como un inadecuado cumplimiento del tratamiento con CPAP (<4 horas durante el periodo de sueño).

#### *Variables incluidas en el estudio*

Las variables recogidas en el estudio se detallan a continuación (una explicación detallada de la determinación de las mismas se describe más adelante en este capítulo). Los datos referidos a dichas variables fueron recogidos y codificados e introducidos en una base de datos de SPSS<sup>®</sup> (versión 15.0, 2006, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para su posterior análisis.

Variabes demográficas: edad (años); género (varón/mujer).

Antecedentes patológicos:

- Hipertensión Arterial (HTA, si/no); toma de tratamiento antihipertensivo (si/no); diabetes Mellitus (DM [cualquier tipo], si/no); dislipemia (cualquier tipo, si/no).
- Antecedente de Cardiopatía Isquémica (definida como presencia previa de angina estable o inestable, síndrome coronario agudo con o sin elevación de segmento ST, evidencia por

técnica de imagen de datos compatibles, o antecedente de revascularización coronaria percutánea o quirúrgica) (si/no).

- Antecedente de Enfermedad Cerebrovascular (definida por la presencia previa de ictus isquémico [incluido accidente vascular transitorio] o hemorrágico o evidencia por pruebas de imagen de datos compatibles) (si/no).
- Antecedente familiar de primer grado (padres, hermanos e hijos) de Enfermedad Cardiovascular (en cualquiera de sus manifestaciones, incluyendo: cerebrovascular, cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica) (si/no).
- Tabaquismo: clasificando al paciente en no fumador (nunca ha fumado), exfumador (definido como abstinencia de tabaco de al menos 6 meses) y fumador actual (cualquier número de cigarrillos). En el caso de los fumadores además se recogió el número de cigarrillos/día.
- Síndrome metabólico, según criterios NCEP ATP-III<sup>76</sup>. Recogido como 1) diagnóstico o no del síndrome, y 2) número de criterios presentes en cada paciente independientemente de que cumplan o no requisitos para el diagnóstico del síndrome.

Parámetros antropométricos: Peso (kg), talla (cm) y perímetro de cintura (cm). A partir del peso y la talla se calculó el Índice de Masa Corporal (IMC, kg/m<sup>2</sup>), según la fórmula:

$$\text{IMC} = \text{peso en kg} / (\text{talla en metros})^2$$

Parámetros respiratorios y de sueño: Cuestionario de Epworth (puntuación) y parámetros obtenidos en la polisomnografía respiratoria: Índice de Apnea-Hipopnea, Índice de Desaturación, Saturación de oxígeno (SatO<sub>2</sub>) basal (%), SatO<sub>2</sub> media (%) y SatO<sub>2</sub> mínima (%), y CT90% (%).

Monitorización Ambulatoria de Presión Arterial (MAPA) de 24 horas: Presión arterial (PA, mmHg), presión de pulso, cargas (%) y desviación estándar (SD) sistólicas y diastólicas, PA media (mmHg), y frecuencia cardíaca (Fc, lpm), en todos los casos para los periodos de 24 horas, diurno y nocturno. Patrón de descenso nocturno de PA (riser, non-dipper, dipper, dipper extremo).

Test de Hiperemia Reactiva a la Isquemia mediante Flujiometría Láser-doppler: valor máximo (Unidades de Perfusión, UP), área bajo la curva (ABC, UP/seg), pendiente (UP/seg), pico de flujo (UP), tiempo hasta la mitad antes de la máxima hiperemia (seg), tiempo hasta la máxima hiperemia (seg), tiempo hasta la mitad después de la máxima hiperemia (seg) y área de hiperemia (UP/seg).

Parámetros bioquímicos:

- Perfil glucídico y resistencia a la insulina: glucemia (mg/dl), hemoglobina glicada (HbA1c, %, unidades NGSP<sup>77</sup>) e insulinemia ( $\mu$ U/ml). Parámetros de Resistencia a la Insulina obtenidos según la ecuación HOMA2 (Homeostasis Model Assessment-2)<sup>78</sup>: función celular beta (%), sensibilidad a la insulina (%) e índice de resistencia a la insulina.
- Perfil lipídico: colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de alta y baja densidad (high -HDL- and low -LDL- density lipoproteins) y triglicéridos (mg/dl).
- Función renal: creatinina plasmática (mg/dl) y microalbuminuria según cociente albúmina/creatinina (mg/g) en muestra de orina elemental.
- Proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us, mg/l). Homocisteína ( $\mu$ mol/l).
- Marcadores de fibrosis: propéptido C-terminal del procolágeno tipo I (PICP, ng/ml) y telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP, pg/ml). Y cálculo del cociente PICP/ICTP como indicador del grado de acoplamiento entre síntesis y degradación de colágeno tipo I.

Biomarcadores experimentales relacionados con la función endotelial: factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endotelial growth factor, VEGF, pg/ml). Micropartículas celulares CD31+/Anexina V+ (cell-derived microparticles [MP], MP/ $\mu$ l). Niveles de DNA libre circulante (circulating cell-free DNA: cfDNA, ng/ml).

#### *Equipo de investigación y ámbito de trabajo*

El estudio se llevó a cabo por un equipo multidisciplinar compuesto por médicos especialistas en Medicina Interna (Unidad Clínico-Experimental de Riesgo Vascular),

Neumología (Consulta de Sueño) y Bioquímica Clínica, biólogos, enfermería, y técnico de laboratorio. El estudio se realizó en el Hospital Universitario Virgen del Rocío (Unidad Clínico-Experimental de Riesgo Vascular [Medicina Interna], y Unidad de Sueño [Enfermedades Respiratorias]), en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital y en el Laboratorio de Hipertensión Arterial e Hipercolesterolemia del Instituto de Biomedicina de Sevilla (Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla).

### *Valoración y seguimiento de los pacientes*

Se llevó a cabo una consulta inicial y revisión posterior a los 3 meses de iniciado el tratamiento con CPAP. Los pacientes fueron incluidos en el estudio durante la consulta de sueño, al diagnóstico de SAHS (dichos pacientes podían provenir derivados desde diferentes especialidades o unidades [incluyendo la Unidad de Riesgo Vascular] del mismo hospital o desde Atención Primaria). Una vez incluidos, realizada la polisomnografía respiratoria y confirmado el diagnóstico de SAOS, los pacientes fueron derivados a Consultas de Riesgo Vascular para la realización del estudio. En ambos tiempos (basal y a los 3 meses de iniciado el tratamiento con CPAP) se llevó a cabo valoración en Consulta de Riesgo vascular. A los 3 meses igualmente se realizó nueva visita en Consulta de Sueño para valoración del cumplimiento de tratamiento con CPAP. El flujo de pacientes vino dado por la actividad asistencial que se desarrolla habitualmente en estas consultas. En la primera consulta se solicitó consentimiento informado. Los distintos estudios y determinación de marcadores se llevaron a cabo de forma “ciega” (respecto al resultado del resto de estudios/marcadores o el estatus de hipertensión o no).

### *Cuestionario de Epworth*

La Escala de Somnolencia de Epworth (Epworth sleepiness scale [ESS], figura 1) valora el grado de somnolencia diurna que presenta el paciente (nivel medio de somnolencia en la vida diaria), siendo la hipersomnia diurna o excesiva somnolencia diurna (ESD) un síntoma típico del SAHS. Se trata de una escala autoadministrada que el paciente rellena una vez el evaluador ha explicado la forma de completar la misma; está compuesta de 8 situaciones

tomadas de la vida habitual debiendo señalar el paciente el grado de tendencia al sueño que presenta en cada una de ellas. Fue establecida en la década de los 90<sup>79-84</sup> y su uso actual está ampliamente extendido, habiendo sido además traducida y validada a lengua española<sup>85</sup>. La puntuación total de la ESS se ha mostrado fiable en estudio test-retest sobre un periodo de 5 meses ( $\rho = 0.82$ ,  $n = 87$ ,  $p < 0.001$ ) y presenta un alto nivel de consistencia interna<sup>80</sup>. Se ha descrito una mejora de la puntuación con el tratamiento con CPAP<sup>81</sup>. El rango de normalidad se define hasta una puntuación de 10 (rango normal definido por los percentiles 2.5 y 97.5: 0 a 10)<sup>79,83</sup>. Entre sus limitaciones están el hecho de que la ESD es un síntoma difícil de medir, el cumplimiento de la ESS es subjetivo y depende de las posibilidades del sujeto de encontrarse en dichas situaciones de forma habitual; además, la ESD presenta una elevada prevalencia en la población general y puede ser debida a múltiples causas, por lo que la presencia de ésta y un IAH superior a 5 suelen ser elementos concurrentes pero no necesariamente asociados<sup>1</sup>; esta última limitación fue minimizado en nuestro estudio mediante la inclusión de pacientes con un IAH superior a 15.

### *Poligrafía respiratoria*

La poligrafía respiratoria nocturna durante el sueño se llevó a cabo en el Laboratorio de Sueño de la Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias. Para el estudio se utilizó un polígrafo respiratorio “Sibelhome plus”<sup>®</sup> (Sibelmed, SIBEL S.A, Barcelona), instalado por personal entrenado en Patología Respiratoria de Sueño, quienes igualmente realizaron las tareas de supervisión y control durante la noche del registro.

El polígrafo monitoriza las siguientes variables (Figura 2):

- 1.- Flujo oronasal, medido con sonda conectada a transductor de presión (flujo nasal) y con termistor (flujo oronasal), simultáneamente.
- 2.- Ronquidos, mediante un micrófono laringotraqueal.
- 3.- Esfuerzo torácico y abdominal, mediante dos bandas con sensores de esfuerzo colocadas a nivel de tórax y abdomen.

**Figura 1. Cuestionario de Epworth.**

<b>PREGUNTA:</b>  “¿Con qué frecuencia se queda Vd. dormido en las siguientes situaciones? Esta pregunta se refiere a su vida habitual reciente. Incluso si no ha realizado recientemente alguna de las actividades mencionadas a continuación, trate de imaginar en qué medida le afectarían. Es importante que responda a cada pregunta lo mejor que pueda”	
<b>SITUACIONES:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Sentado y leyendo</li><li>▪ Viendo la televisión</li><li>▪ Sentado, inactivo en un lugar público (por ejemplo en un teatro, reunión...).</li><li>▪ En coche, como copiloto de un viaje de una hora sin interrupción</li><li>▪ Tumbado por la tarde cuando las circunstancias lo permiten</li><li>▪ Sentado y charlando con alguien</li><li>▪ Sentado después de la comida (sin tomar alcohol)</li><li>▪ En su coche, cuando se para durante algunos minutos debido al tráfico</li></ul>	<b>ESCALA:</b>  0 = nunca se ha dormido  1 = escasa posibilidad de dormirse  2 = moderada posibilidad de dormirse  3 = elevada posibilidad de dormirse

Valora el grado de somnolencia diurna que presenta el paciente (nivel medio de somnolencia en la vida diaria). La hipersomnolencia diurna o excesiva somnolencia diurna (ESD) un síntoma típico del SAHS. El rango de normalidad se define hasta una puntuación de 10 (rango normal definido por los percentiles 2.5 y 97.5: 0 a 10) [ver texto].

4.- Saturación arterial de oxígeno (SatO<sub>2</sub>), mediante un pulsioxímetro flexible digital.

5.- Sensor de posición corporal.

Los registros se almacenaron en una base de datos específica y el análisis se llevó a cabo de forma manual, supervisado por un facultativo especializado en Patología Respiratoria del Sueño. Los eventos que se recogen son los siguientes:

- Apnea, definida como ausencia o reducción superior al 90% del flujo oronasal durante un tiempo superior a 10 segundos de duración. La apnea se define como obstructiva (si se

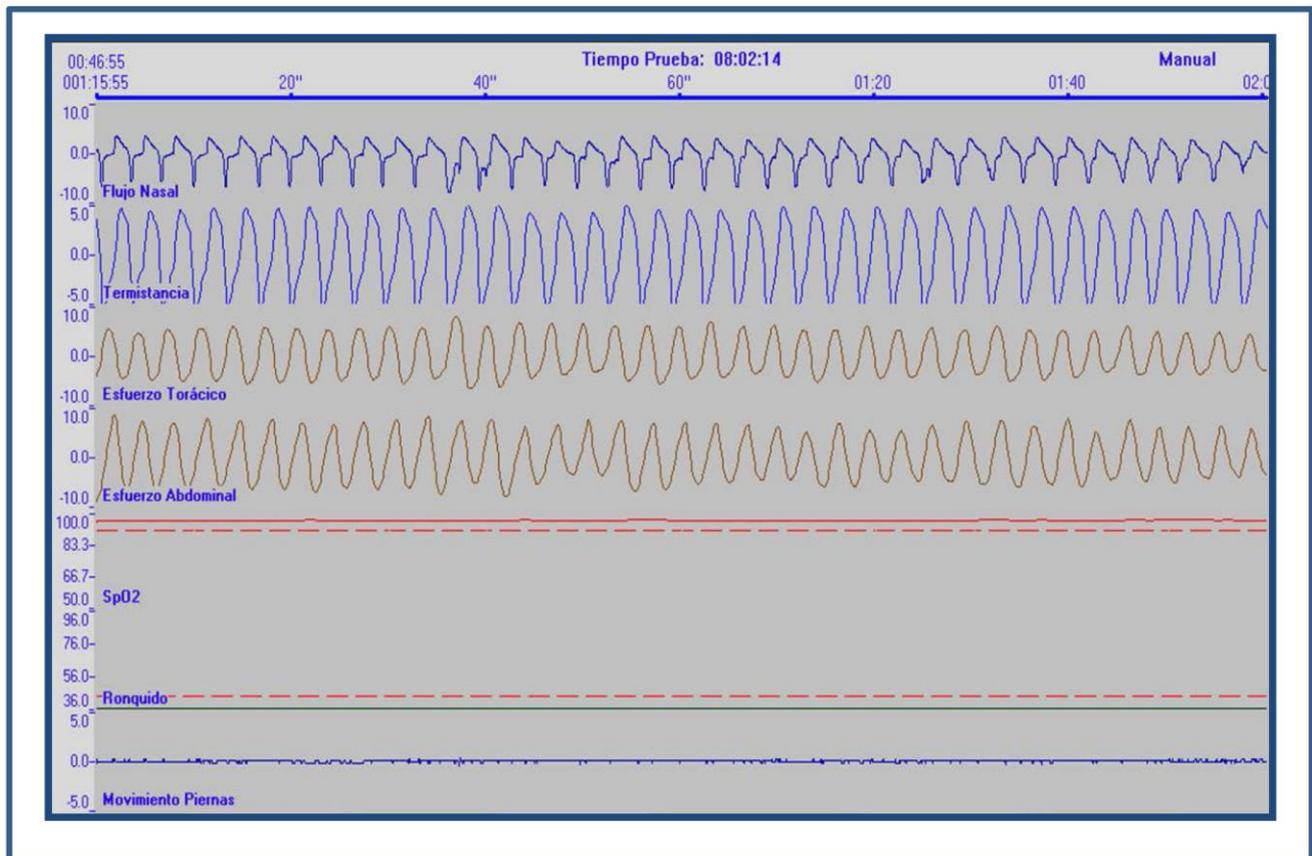
acompaña de esfuerzo respiratorio detectado por las bandas toraco-abdominales), apnea central (en ausencia de dicho esfuerzo), o apnea mixta (Figura 3).

- Hipopnea: disminución del flujo oronasal igual o superior al 50% respecto del basal, durante 10 segundos o más, acompañada de una desaturación.
- Desaturación: descenso de la SatO<sub>2</sub> igual o superior al 4%.

A partir de los datos anteriores se calcularon los siguientes parámetros:

1. Índice de apnea-hipopnea (IAH): cociente entre el número total de apneas e hipopneas dividido por el número de horas de registro. Cuando el IAH fue igual o superior a 15 se consideró criterio de inclusión de SAHS para la inclusión de los pacientes en el estudio.
2. Índice de desaturaciones (ID): cociente entre el número total de desaturaciones  $\geq 4\%$  dividido por el número de horas de registro.
3. SatO<sub>2</sub> basal (previa al inicio del registro, en reposo, sin aporte de oxígeno suplementario [fracción inspiratoria de oxígeno 21%, Fi 0.21]), SatO<sub>2</sub> mínima durante el registro, y porcentaje del tiempo de registro con una SatO<sub>2</sub> menor del 90% (CT90%), obtenidas todas del análisis automático de la oximetría a lo largo de todo el registro.

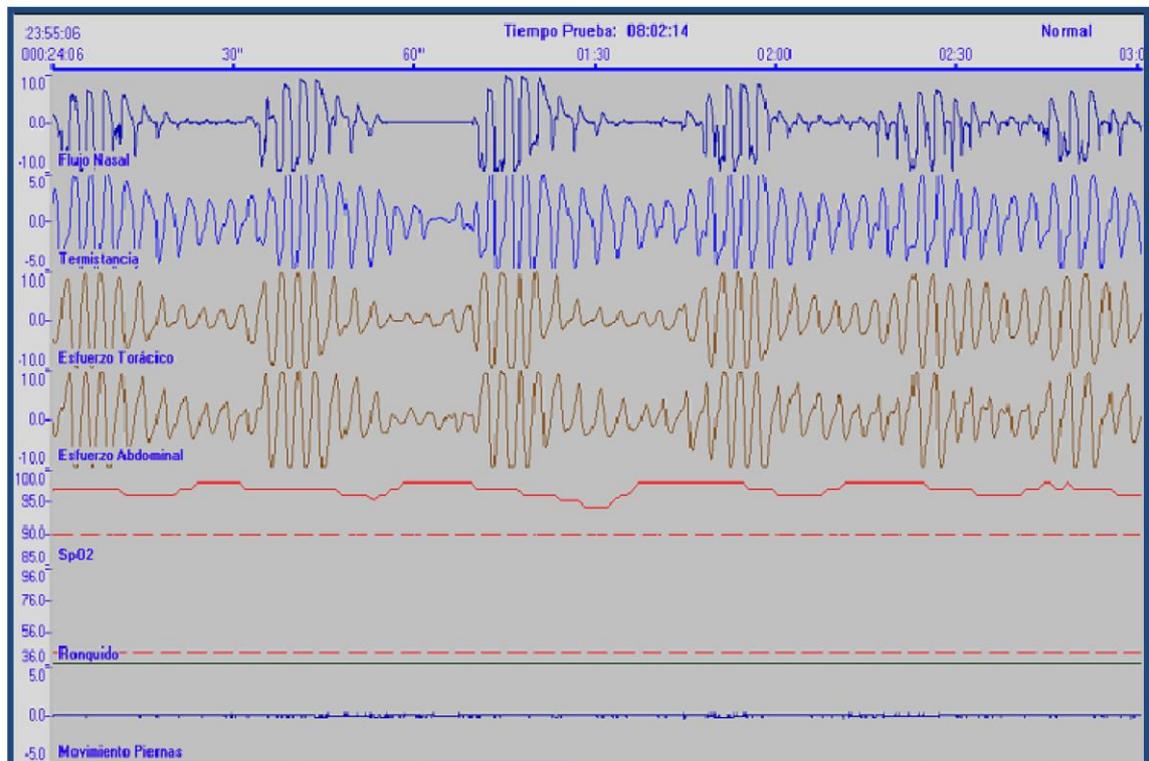
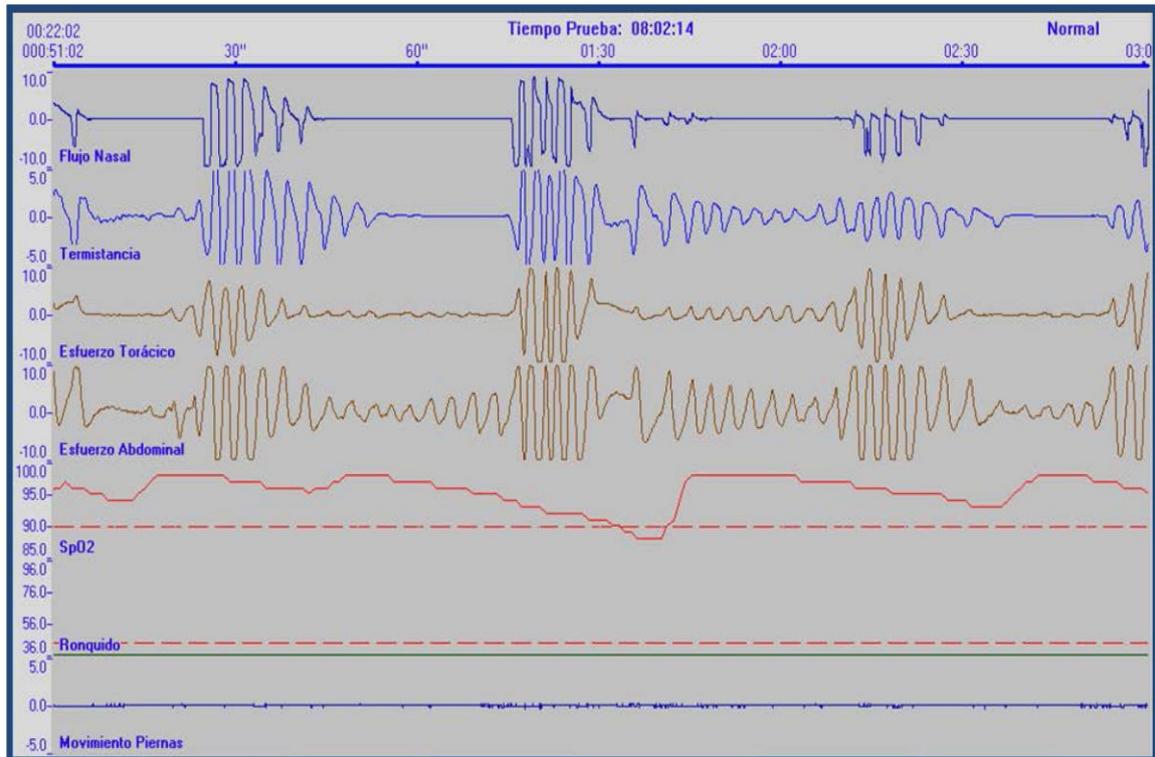
**Figura 2. Registro normal de polisomnografía respiratoria.**



**Figura 3. Registros de polisomnografía respiratoria propios de SAHS.**

Ejemplos de registros de Polisomnografía Respiratoria: registros característicos de pacientes con Síndrome de Apnea-Hipopnea del Sueño, en los que se pueden observar las interrupciones periódicas propias de las apneas e hipopneas en los canales de flujo nasal (con sonda de presión) y flujo oronasal (terminstancia), que se acompañan de esfuerzos toraco-abdominales detectados mediante las bandas colocadas en dichos niveles, lo que determina el origen obstructivo de los episodios de apnea-hipopnea, con variaciones en la saturación arterial de oxígeno (SpO<sub>2</sub>, %).

[Página siguiente]



### *Tratamiento con dispositivo de presión continua positiva en la vía aérea*

La titulación de la presión de la CPAP (Continuous Positive Airway Pressure) ajustada para cada paciente (presión espiratoria, EPAP) se llevó a cabo con dispositivo AutoCPAP mediante registro nocturno en el domicilio del paciente, con un equipo de autoCPAP “REMstar auto”<sup>®</sup> (Respironics, Pennsylvania, USA), por personal entrenado en Patología Respiratoria de Sueño. Dicho dispositivo almacena toda la información del registro en una tarjeta SmartCard Encore Pro<sup>®</sup>, la cual se analiza en un programa específico (EncorePro<sup>®</sup>). Con ello se puede obtener una información completa sobre las necesidades de distintos niveles de presión positiva en la vía aérea a lo largo de la noche, para poder definir el nivel óptimo que se establecerá como terapéutico. Además, también se obtiene información sobre las horas de uso de la CPAP y las fugas que pueda haber en el equipo.

### *Síndrome metabólico*

El diagnóstico de síndrome metabólico se llevó a cabo siguiendo los criterios del National Cholesterol Education Program (NCEP) – Adult Treatment Panel III (ATP-III)<sup>76</sup>. De acuerdo a los mismos, el diagnóstico de Síndrome Metabólico se establece con la presencia de al menos 3 criterios de los reseñados en la figura 4. Sin entrar en la controversia actual sobre si este síndrome constituye una entidad en sí misma con una base etiopatogenia común o bien se trata solamente de una agrupación de factores de riesgo, la presencia de síndrome metabólico está bien establecida como una condición de riesgo cardiovascular elevado en los pacientes que lo presentan<sup>86</sup>.

**Figura 4. Criterios de Síndrome Metabólico (NCEP ATP-III)**

- Perímetro de cintura > 88 cm en mujeres ó > 102 cm en varones
- Triglicéridos  $\geq$  150 mg/dl
- Colesterol HDL en varones < 40 ó mujeres < 50 mg/dl.
- Presión Arterial  $\geq$  130/85 mmHg
- Glucemia en ayunas  $\geq$  110 mg/dl

Diagnóstico de Síndrome Metabólico: cumplimiento de al menos 3 criterios

### *Monitorización ambulatoria de 24 horas de presión arterial (MAPA 24H)*

Constituye actualmente la prueba de referencia para el diagnóstico clínico, no invasivo, de hipertensión arterial. La MAPA se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Europea de Hipertensión<sup>86,87</sup>. La colocación y retirada del dispositivo así como los consejos al paciente para el adecuado uso del mismo y obtención de medidas fiables se llevaron a cabo en la Unidad Clínico-Experimental de Riesgo Vascular por personal de enfermería entrenado en esta técnica. La interpretación de los resultados la realizó personal médico de dicha Unidad, acostumbrado a la valoración de los mismos. Siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Europea de Hipertensión, se consideró criterio diagnóstico de Hipertensión Arterial por MAPA 24h la presencia de unas cifras medias de presión arterial sistólicas/diastólicas iguales o superiores a 130/80, 135/85 y/o 120/70 mmHg para los periodos de 24 horas, diurno y nocturno, respectivamente<sup>88</sup>.

El estudio se llevó a cabo mediante dispositivo validado (SpaceLabs 90207<sup>®</sup>, Redmond, WA, USA). El mismo consta de un manguito de presión flexible que se coloca en el brazo del paciente, de tamaño ajustado a la circunferencia del brazo, el cual está conectado a un pequeño dispositivo automático que el paciente lleva colocado en el cinturón. El dispositivo se programó para la toma de presión arterial cada 20 minutos durante 24 horas. Los valores son almacenados por el dispositivo y tras su retirada son extraídos a un ordenador y analizados mediante su software específico. Se consideraron valorables aquellos registros que presentaban al menos un 80% de lecturas válidas. A cada paciente se le entregó un diario para la recogida de eventos (horas de comida, de actividad física, de trabajo, de sueño, de toma de medicación, etc.) para rellenar durante el día en que tenían colocado el dispositivo; en dicho diario se anotaban las horas de acostarse y levantarse y a partir de ellas se establecieron los periodos diurnos y nocturno para el análisis de resultados. La MAPA se llevó a cabo en un día laborable y se le indicaba al paciente llevar a cabo su vida y actividad habituales, con excepción de la realización de ejercicio o esfuerzos importantes.

A partir del registro de MAPA 24h se obtuvieron los siguientes parámetros, para cada uno de los periodos considerados (periodo completo de 24 horas, periodo diurno y periodo nocturno) (figura 5):

1. Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) medias, en mmHg. A partir de éstas se calcularon las presiones de pulso (PP, diferencia entre presión arterial sistólica menos diastólica) y presión arterial media (PAM), según la fórmula:

$$PAM = PAD + 1/3 (PAS - PAD) = PAD + 1/3 PP$$

2. Cargas sistólica y diastólica, definidas como el porcentaje de lecturas por encima del límite establecido para el diagnóstico de hipertensión.
3. Variabilidad tensional, determinada mediante la desviación estándar de la media de las presiones sistólica y diastólica.
4. Patrón de descenso nocturno de la presión arterial (patrón circadiano). En condiciones normales se produce un descenso fisiológico de la presión arterial durante el sueño, fundamentalmente debido a la disminución de la actividad simpática con predominio del sistema nervioso parasimpático, entre otros mecanismos. Un patrón de descenso alterado se ha establecido como factor de riesgo vascular independiente de la cifras tensionales. El patrón normal consiste en un descenso de la presión arterial durante el sueño de entre un 10% a un 20% respecto a la presión en el periodo diurno y se conoce como patrón dipper. Un descenso inferior al 10% constituye un patrón non-dipper; cuando no sólo no descendiendo sino que aumenta la presión media durante la noche respecto al día se habla de patrón riser; y por último, un descenso excesivo, por debajo del 20% se considera dipper extremo. En nuestro estudio el patrón de descenso nocturno se estableció a partir de las presiones arteriales sistólicas y se consideraron cada uno de los 4 patrones de forma independiente y también agrupados según patrón normal o alterado, es decir en patrón dipper y patrón no dipper (non-dipper + riser + dipper extremo).
5. Frecuencia cardiaca media, en latidos por minutos (lpm).

## Figura 5. Registro de MAPA (medida ambulatoria de presión arterial) de 24 horas.

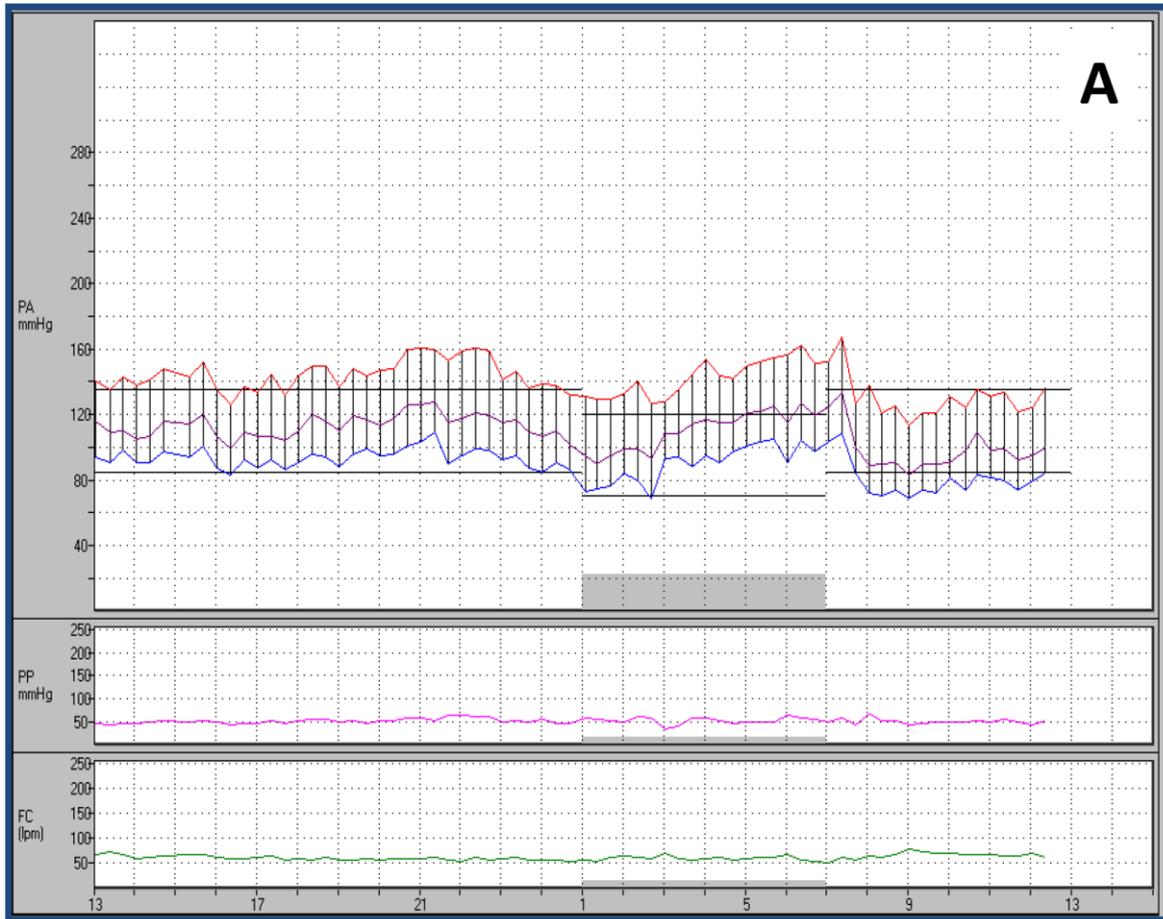
Ejemplo de registro de Monitorización Ambulatoria de Presión Arterial (MAPA) de 24 horas. **(A)** Registro gráfico que muestra en la parte superior cada una de las tomas de presión arterial (PA) a lo largo de los periodos diurno y nocturno (zona gris), junto con las líneas de referencia para los límites de la normalidad para cada periodo; línea roja: PA sistólica; línea azul: PA diastólica; línea morada: PA media; línea rosa: presión de pulso; línea verde: registro de frecuencia cardiaca. **(B)** Resumen de valores numéricos; PROM: valores promedios; EST: variabilidad (definida como desviación estándar de los valores medios correspondientes); MAX, MIN: valores máximos y mínimos PAM: presión arterial media; porcentaje sobre límite: cargas sistólicas y diastólicas. **(A) y (B)** Registro de paciente con hipertensión no adecuadamente controlada: valores de PA elevados en todos los periodos, cargas significativamente elevadas y patrón riser.

[Página siguiente]

### *Test de hiperemia reactiva tras isquemia transitoria mediante Flujimetría por láser-doppler*

Este estudio se realizó en instalaciones de la Unidad Clínico-Experimental de Riesgo Vascular. Este test nos permite el estudio de la función endotelial mediante la determinación del flujo sanguíneo capilar y la vasodilatación dependiente del endotelio microvascular tras una isquemia transitoria; dicha isquemia genera por parte de las células endoteliales la liberación de óxido nítrico (NO) y consecuentemente vasodilatación; en condiciones de disfunción endotelial la producción de NO está disminuida, lo que dará lugar a una menor relajación endotelial y por tanto una menor hiperemia tras la isquemia. Para el estudio utilizamos el dispositivo laser-doppler lineal modelo Periflux System 5000 Laser-Doppler Flowmeter® (Perimed, Järfalla, Stockholm, Sweden).

El protocolo para la medición ha sido descrito previamente en detalle por nuestro grupo<sup>61</sup>. En resumen, las pruebas se llevaron a cabo en una habitación con el paciente en posición de decúbito supino, en un ambiente relajado y tranquilo, con una temperatura estable de 22°C, y la presencia sólo del investigador y enfermera de la Unidad. Las mediciones se realizaron en la mañana estando el paciente en ayunas de al menos 8 horas. La técnica y posibles síntomas que podían aparecer fueron explicados al paciente. Un esfigmomanómetro de medida de presión arterial se coloca en el brazo del paciente y la sonda doppler (HG Erkameter 300™, Alemania) a nivel de la superficie anterior del antebrazo a 15 cm de la muñeca. Tras 15-20 minutos de reposo, el manguito de presión arterial situado en el brazo es



Resumen General						
	PROM	EST	MIN	MAX	Baja	
Sistólico:	141	12.12 mmHg	113 (09:02 Jue)	167 (07:22 Jue)	-1.4%	
Diastólico:	89	10.14 mmHg	69 (02:42 Jue)	109 (21:22 Mié)	-1.1%	
PAM:	109	11.63 mmHg	83	134	-1.8%	
Presión Pulso:	51	6.03 mmHg	35	66		
Frecuencia cardíaca:	62	5.35 lpm	52	79		
Porcentaje de Sistólico sobre límite:				Lectura(s) 72.9%	Hora 72.6 %	
Porcentaje de Diastólico sobre límite:				74.3%	75.0 %	
Período(s) despierto 07:00 - 01:00						
Sistólico:	140	12.43 mmHg	113 (09:02 Jue)	167 (07:22 Jue)		
Diastólico:	89	9.84 mmHg	69 (09:02 Jue)	109 (21:22 Mié)		
PAM:	108	11.65 mmHg	83	134		
Presión Pulso:	51	5.55 mmHg	43	66		
Frecuencia cardíaca:	63	5.57 lpm	52	79		
Porcentaje de lecturas sistólicas > 135mmHg:				Lectura(s) 63.5%	Hora 62.0 %	
Porcentaje de lecturas diastólicas > 85mmHg:				67.3%	71.3 %	
Número de lecturas de período(s) despierto: 52						
Período(s) de sueño 01:00 - 07:00						
Sistólico:	142	11.32 mmHg	127 (02:42 Jue)	162 (06:22 Jue)		
Diastólico:	90	11.25 mmHg	69 (02:42 Jue)	105 (05:42 Jue)		
PAM:	110	11.85 mmHg	90	127		
Presión Pulso:	53	7.31 mmHg	35	65		
Frecuencia cardíaca:	60	4.46 lpm	54	70		
Porcentaje de lecturas sistólicas > 120mmHg:				Lectura(s) 100.0%	Hora 100.0 %	
Porcentaje de lecturas diastólicas > 70mmHg:				94.4%	94.1 %	
Número de lecturas de período(s) de sueño: 18						

inflado por encima de la presión arterial sistólica y es así mantenido durante 4 minutos, lo que provoca un descenso rápido de las unidades de perfusión (UP). A continuación el manguito es desinflado rápidamente, observándose un rápido aumento de las UP por encima de los valores basales; dicho flujo post-isquemia se registra hasta su vuelta a la situación basal. El registro recogido, sobre el que el investigador señala el punto de comienzo de la isquemia y el punto de finalización del estudio, es almacenado por el programa PeriSoft® para Windows, que analiza los resultados y nos indica los valores de las diferentes variables (figura 6)

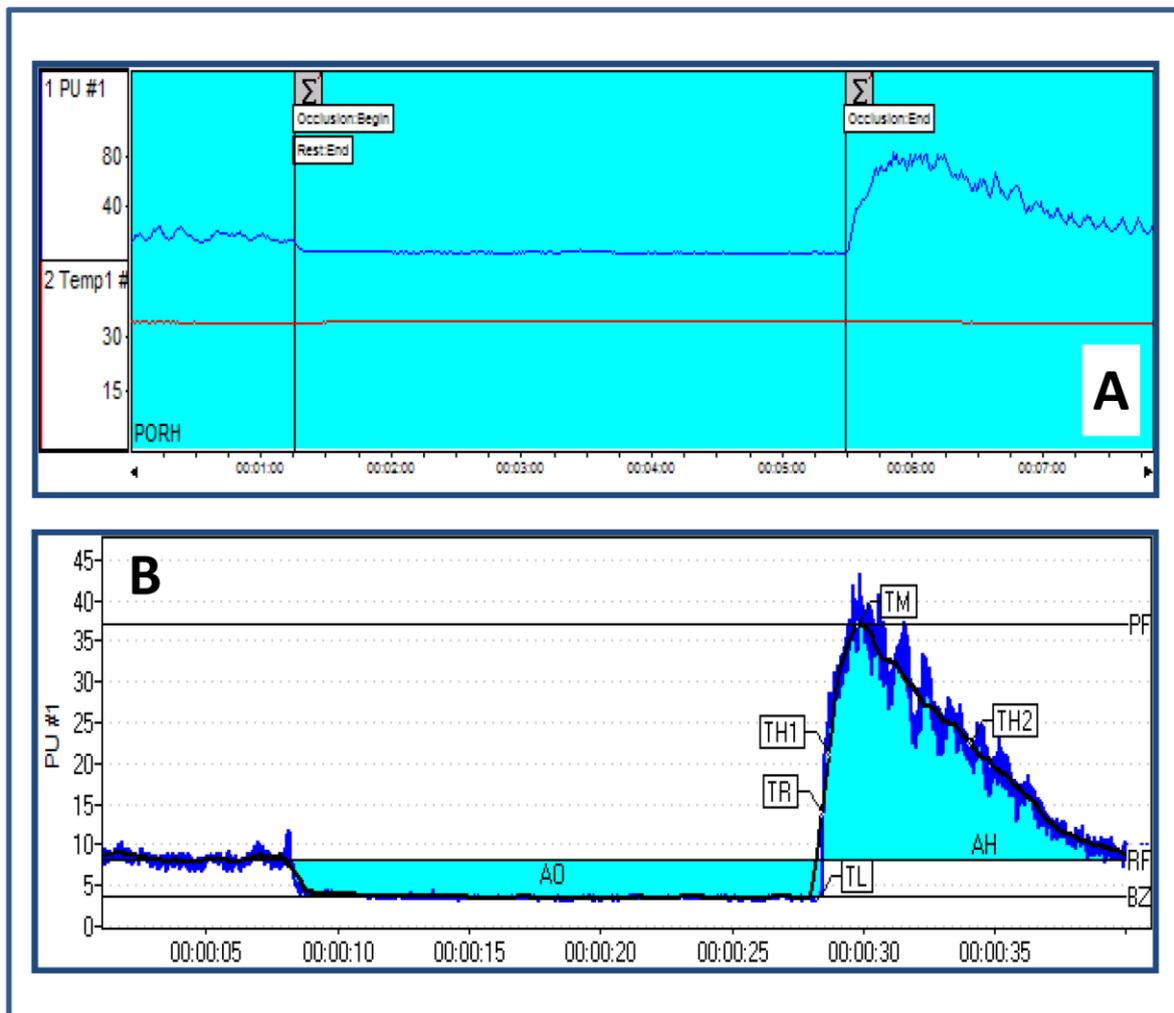
A partir del registro obtenido, el software realiza dos tipos de análisis:

1. Un análisis general (figura 6-A), donde se nos informa en UP del valor inicial, valor máximo, valor al final del estudio, porcentaje de cambio del primer valor al máximo y al último, pendiente de ascenso de la curva (UP/seg) y área bajo la curva (ABC, UP/seg).
2. Y un análisis ajustado (“smothering”) del anterior (figura 6-B), donde obtenemos los siguientes parámetros: área de oclusión (UP/seg), tiempo de latencia (seg), pico de flujo y máxima hiperemia (UP), porcentaje de cambio hasta el pico de flujo, tiempo hasta alcanzar la mitad de la máxima hiperemia (seg), tiempo hasta la máxima hiperemia (seg), tiempo hasta la mitad después de la máxima hiperemia (seg), tiempo de recuperación (seg) y área de hiperemia (UP/seg).

El área de hiperemia es considerada la variable resultado principal, ya que nos aporta una mayor información, al integrar en sí misma la rapidez, intensidad y duración de la respuesta hiperémica tras la isquemia transitoria (figura 6 y anexo 1)<sup>61</sup>.

Se trata de una prueba no invasiva, sin complicaciones objetivadas más allá de la propias molestias de mantener el manguito inflado durante 4 minutos (sensación de hormigueo distal o de calor, eventualmente algún hematoma local). No se registraron complicaciones asociadas a la prueba durante el presente estudio. Asimismo, nuestro grupo dispone de experiencia en la realización de esta prueba, constatado por la publicación previa de trabajos incluyendo la valoración no invasiva de función endotelial mediante esta técnica<sup>61,89</sup>.

**Figura 6. Registro de hiperemia reactiva tras isquemia transitoria mediante Flujimetría láser-doppler.**



Ejemplo de registros de Test de Hiperemia Reactiva a la Isquemia mediante Flujimetría por Láser-doppler. **(A)** Análisis general, línea azul (la línea roja señala el registro de la temperatura, que en nuestro caso no se llevó a cabo). **(B)** Análisis ajustado o “smothering”. Ver explicción en el texto. AH: área de hiperemia. AO: área de oclusión. BZ: “cero biológico”. TH1: tiempo hasta la mitad antes de la máxima hiperemia. TH2: tiempo hasta la mitad después de la máxima hiperemia. TL: tiempo de latencia. TM: máxima hiperemia. PF: pico de flujo. PORH: post-oclusive reactive hiperemia. PU: unidades de perfusión. RF: tiempo de recuperación

### *Obtención, procesamiento y conservación de muestras*

La extracción de las muestras se llevó a cabo en Consulta de Enfermería de la Unidad de Riesgo Vascular y el procesamiento y conservación de las mismas por técnico de laboratorio: extracción de muestra sanguínea venosa en la mañana tras al menos 8 horas de

ayuno para determinación de parámetros habituales y experimentales, mediante aguja Venoject® (Terumo™) y empleando tubos conteniendo 1 mg de EDTA, citrato sódico al 3,8% (Vacutainer®) y suero, según los parámetros a determinar. Inmediatamente después de cada extracción sanguínea se procedió a la separación del plasma, citrato y suero mediante centrifugación (2500 rpm, 4°C, 15 minutos). Las muestras se guardaron a –80°C hasta la realización de las determinaciones.

Las determinaciones de los parámetros bioquímicos convencionales o asistenciales así como los marcadores de fibrosis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital siguiendo los procedimientos y metodología ya establecidos para su determinación en el Hospital de cara a la práctica clínica habitual. La determinación de los marcadores experimentales VEGF y MP se llevó a cabo en el Laboratorio experimental de Hipertensión y Lípidos del Instituto de Biomedicina de Sevilla; y la medida de cfDNA en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital.

#### *Parámetros bioquímicos de laboratorio clínico convencional*

La glucosa se determinó mediante espectrofotometría enzimática con glucosa oxidasa y la hemoglobina glicada (HbA1c) por cromatografía líquida de alta resolución (high resolution liquid chromatography, HPLC). La insulinemia se analizó por método de electroquimioluminiscencia (ECLIA) automatizado en Modular Analytics E-170 (Roche Diagnostics, GmbH™).

Respecto al perfil lipídico, el colesterol total, HDL y triglicéridos se analizaron mediante método espectrofotométrico enzimático (“Colesterol CHOD-PAP”, “HDL-C-plus” y “GPO-PAP” respectivamente, de Roche Diagnostics GmbH™) en autoanalizador multicanal Cobas 8000 (Roche Diagnostics™). El colesterol LDL se determinó a partir de los anteriores mediante la fórmula de Friedewald cuando los triglicéridos fueron menores de 400 mg/dl:

$$\text{LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{Triglicéridos} / 5)$$

En caso contrario los niveles de LDL se midieron igualmente de forma directa (método espectrofotométrico enzimático, con el kit “LDL-C-plus”, de Roche Diagnostics GmbH™ en autoanalizador multicanal Cobas 8000, Roche Diagnostics™).

Respecto a los parámetros de función renal, la creatinina plasmática y la creatinina en orina se determinaron por método espectrofotométrico enzimático (Reacción de Jaffé) (“CREJ2”, de Roche Diagnostics GmbH™, y “Creatinine OSR6178”, de Beckman Coulter Biomedical, respectivamente), realizados en autoanalizador multicanal Beckman Coulter AU640 (Beckmann Coulter Biomedical Ltd.). La microalbuminuria en orina se midió mediante método inmunturbidimétrico (“Microalbuminin OSR6167”, de Beckman Coulter Biomedical Ltd.) realizado en autoanalizador multicanal Beckmann Coulter AU2700 (Beckmann Coulter Biomedical Ltd.).

La determinación de proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) se llevó a cabo por inmunonefelometría. Y las concentraciones de homocisteína se midieron por HPLC.

#### *Marcadores bioquímicos de fibrosis*

Como marcadores de fibrosis se determinaron el propéptido carboxi-terminal de la molécula de procolágeno tipo I (PICP) y el telopéptido carboxi-terminal de la molécula de colágeno tipo I (CITP), como indicadores de síntesis y degradación, respectivamente, de colágeno fibrilar tipo I<sup>90</sup>, y a partir de ellos se calculó el cociente o ratio PICP/ICTP, como indicador del grado de acoplamiento entre ambos procesos (síntesis y degradación)<sup>91</sup>.

El PICP se analizó mediante método de enzimoanálisis usando el ensayo Metra C1CP (Quidel Corporation®), con un coeficiente de variación intraserial e interserial de 6,6 y 7,2%, respectivamente; en cuanto a la sensibilidad, el nivel de detección mínimo fue de 0,2 ng/ml.

El CITP se determinó mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia usando el test Elecsys β-CrossLaps (Roche Diagnostics®) en suero. Consiste en un inmunoensayo destinado específicamente a determinar los fragmentos reticulados isomerizados de

colágeno tipo I. La sensibilidad funcional fue de 70 pg/ml, y la mediana de la variancia intraindividual proporcionó un coeficiente de variación del 17,9%<sup>91</sup>.

### *Estudio de resistencia a la insulina*

El estudio de resistencia a la insulina se llevó a cabo de forma no invasiva siguiendo el modelo HOMA2 (Homeostasis Model Assessment, versión 2) a partir de los niveles plasmáticos en ayunas de glucosa e insulina.

El modelo HOMA se utiliza para estimar la función celular beta y sensibilidad a la insulina a partir de las concentraciones plasmáticas de glucosa en ayunas y de insulina o péptido C, y se basa en el feed-back existente entre los niveles de glucosa e insulina plasmáticas<sup>78,92</sup>. La relación entre glucosa e insulina en situación basal refleja el balance entre la producción hepática de glucosa y la secreción de insulina, el cual se mantiene a través de un feed-back entre el hígado y las células beta pancreáticas<sup>93</sup>. El modelo fue establecido por vez primera en 1985 (HOMA1)<sup>92</sup>, siendo las ecuaciones del mismo ampliamente usadas y simplificadas a las siguientes<sup>93</sup>:

$$\text{HOMA1-RI} = (\text{IP} \times \text{GP}) / 22,5$$

$$\text{HOMA1-\%B} = (20 \times \text{IP}) / (\text{GP} - 3,5)$$

Donde IR indica índice de resistencia a la insulina, %B función celular beta (%), IP insulina plasmática en ayunas (mU/l) y GP glucosa plasmática en ayunas (mmol/l).

Este modelo fue posteriormente actualizado en 1998 (HOMA2)<sup>94</sup> para, entre otros aspectos, tener en cuenta las variaciones de la glucosa hepática y la resistencia periférica, el incremento en la curva de secreción de insulina en respuesta a concentraciones de glucosa plasmática por encima de 10 mmol/l, la contribución de la proinsulina circulante, o la actualización a los nuevos ensayos para la determinación de insulina o de péptido C<sup>78,93,94</sup>. Este modelo corregido (“the computer model”) utiliza ecuaciones no lineales y requiere de un programa informático para su cálculo<sup>93</sup>.

El modelo presenta una amplia difusión como aproximación no invasiva al estudio de la resistencia a la insulina<sup>93</sup> y ha sido validado frente a otras formas de determinación de resistencia a la insulina, incluyendo estudios invasivos; así, existe una buena correlación entre la estimación de la resistencia a la insulina mediante HOMA y el clamp euglucémico ( $R_s=0,85-0,88$ ,  $p<0,0001$ ;  $r=0,73$ ,  $p<0,0001$ ) o entre la función celular beta por HOMA y CIGMA (continuous infusion glucose model assessment) ( $R_s=0,88$ ), clamp hiperglucémico ( $R_s=0,61$ ,  $p<0,01$ ) y la respuesta aguda de insulina en el test de tolerancia a glucosa intravenosa ( $R_s=0,63$ )<sup>93</sup>.

El modelo nos aporta los siguientes parámetros:

- Función celular beta (%B), estimada como porcentaje respecto a una población normal de referencia (y considerándose normal una función del 100%).
- Sensibilidad a la insulina (%S), igualmente estimada como porcentaje respecto a una población normal de referencia.
- Índice de Resistencia a la Insulina (IR).

En nuestro estudio los cálculos se realizaron mediante la introducción de los datos en un aplicación informática (calculadora HOMA2) obtenida desde la página web oficial para el cálculo de este índice de la Diabetes Trials Unit de la Universidad de Oxford (The Oxford Center For Diabetes, Endocrinology and Metabolism)<sup>78</sup>.

#### *Micropartículas celulares CD31+/Anexina V+ (MP)*

La determinación de MP se llevó a cabo en el Laboratorio de Hipertensión y Lípidos del Instituto de Biomedicina de Sevilla, mediante técnica de citometría de flujo con el uso de los marcadores: anticuerpo anti-CD31 y Anexina V. CD31 se encuentra presente en células endoteliales y plaquetas; Anexina es un marcador de apoptosis. Por tanto, en nuestro estudio estimamos MP apoptóticas.

Citometría de flujo: esta técnica nos permite la determinación de distintos componentes (“eventos”) presentes en una muestra previamente marcados con distintas

moléculas emisoras de fluorescencia (fluorocromos), que serán específicas según los eventos que estudiamos. Dichos eventos deben estar individualmente en suspensión en un fluido, de forma que una vez alineados por el citómetro son sometidos consecutivamente a un haz de luz (láser), que permite analizar las características de dispersión de luz y fluorescencia emitidas. Dicha fluorescencia, de una determinada longitud de onda según el fluorocromo utilizado, es recogida por unos sensores que, mediante la liberación de electrones transforman la señal en impulso eléctrico, obteniendo con ello el resultado final numérico y gráfico de las mediciones. En nuestro caso la citometría de flujo nos permite un doble marcaje simultáneo para determinar, por un lado, el origen celular, usando anticuerpos específicos de antígenos de superficie, y por otro, la naturaleza del estímulo para la formación de las MP, en nuestro caso de apoptosis. Asimismo nos permite discriminar por tamaño a la hora de analizar las MP mediante el uso de pequeñas bolas (microbeads) de un determinado diámetro conocido (teniendo en cuenta que el tamaño de las MP oscilan entre 100 nm y 1  $\mu$ m) y diferenciar así de otros componentes presentes en la muestra que no se corresponden con MPs. Para nuestro estudio usamos el citómetro modelo Cytomics FC 500 Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc) y su software específico (CPX software).

Marcador de células endoteliales: anticuerpo frente a CD31 (PECAM-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1). Se utilizó el anticuerpo "FITC Mouse Anti-Human CD31" (nº ref.: 555445), BD Biosciences Pharmigen™, CA, USA. Utiliza como fluorocromo el FICT (fluorescein isothiocyanate).

Marcador de apoptosis: Anexina V, proteína fijadora de fosfolípidos, calcio-dependiente, con alta afinidad para la unión a fosfatidilserina. Usamos el kit "PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I" (nº ref.: 559763), BD Biosciences Pharmigen™, CA, USA. Utiliza como fluorocromo ficoeritrina (PE). Dicho kit incluye también una solución buffer (para diluir) con concentraciones óptimas de calcio necesaria para la unión de la Anexina V a fosfatidilserina.

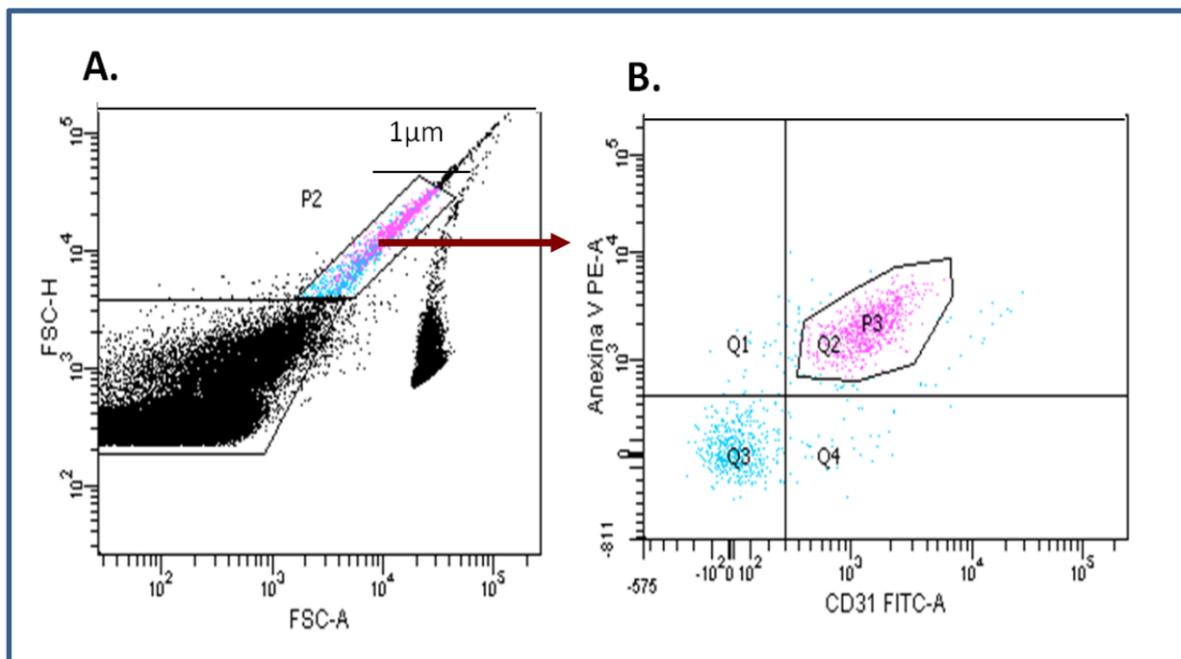
## **PROTOCOLO:**

Se utilizó muestra de plasma, libre de células al haber sido centrifugada y separada la muestra tras su recogida, como se ha expuesto previamente. Dicha muestra fue sometida a centrifugación a 3000 rpm durante 25 minutos a temperatura ambiente para separar los restos plaquetarios. Del sobrenadante de la muestra una vez centrifugada tomamos 100 µl que pasamos a un tubo de citometría. A continuación añadimos 10 µl de anti-CD31-FITC, homogeneizamos y dejamos incubar en oscuridad 15 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo añadimos 1 ml de PBS (phosphate buffered saline, solución buffer usada para lavar), centrifugamos a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C y tras la misma volcamos para eliminar el sobrenadante. En un siguiente paso añadimos 195 µl de buffer de Anexina V previamente diluido en agua destilada (en una relación 1:10) y a continuación 5 µl de PE-Anexina V, homogeneizamos y dejamos incubar en oscuridad 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo añadimos 1 ml de PBS, volvemos a centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C y volcamos para eliminar el sobrenadante. Previo a la lectura añadimos 100 µl de solución de fluoroesferas Flow Count™ (suspensión de fluoroesferas de tamaño e intensidad uniformes y de concentración conocida utilizadas como referencia para determinar el conteo absoluto en la citometría de flujo), agitamos en el Vortex y procedemos a la lectura en el citómetro (figura 7).

En nuestro caso en lugar de añadir los marcadores (anti-CD31-FITC y Anexina V) a la vez a la muestra, lo realizamos en dos pasos para evitar posibles interferencias o reactividad entre ambos. Para cada caso usamos un control negativo, añadiendo igual muestra del paciente, y en los que se siguieron todos los mismos pasos excepto la adición de los marcadores.

Para cada paciente en cada momento del estudio (basal y a los 3 meses tras inicio de CPAP) el experimento se llevó a cabo por duplicado y se tomó la media de ambas determinaciones como resultado final.

**Figura 7. Citometría de flujo. Análisis de micropartículas apoptóticas endoteliales.**



Ejemplo de gráficas obtenidas por citometría de flujo en el análisis de las micropartículas apoptóticas endoteliales (EMP). Las EMP se discriminan inicialmente por tamaño (Figura M9-A, localizándose en el cuadro de color); a continuación, en el grupo obtenido (flecha) las EMPs se discriminan en función de la positividad de los marcadores empleados (Figura M9-B), de forma que las EMP se engloban en el cuadro señalado: doble marcaje positivo anexina + y CD31 +.

### *Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)*

La determinación cuantitativa de las concentraciones de VEGF se realizaron en muestras de suero mediante técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) usando el kit Quantikine ELISA Human VEGF Immunoassay™ (R&D Systems, MN, USA), con lectura de las densidades ópticas en un autoanalizador modular Power Wave XS™ (Biotek, Vermont, USA). Las determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Hipertensión y Lípidos del Instituto de Biomedicina de Sevilla.

Se trata de una técnica de ELISA tipo sándwich, cuantitativa, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico para VEGF. Estos anticuerpos se encuentran inmovilizados revistiendo las microplacas (figura 8-A), de forma que al pipetear la muestra en los pocillos

las moléculas de VEGF presentes se unen a dichos anticuerpos. Tras lavar el contenido de los pocillos para retirar las sustancias no unidas a los anticuerpos, se añade un segundo anticuerpo policlonal específico para VEGF que lleva fijado una enzima. Se vuelve a realizar un lavado para retirar los segundos anticuerpos no unidos a VEGF. De esta manera finalmente obtenemos así complejos anticuerpo-VEGF-anticuerpo-enzima (figura 8-B). Por último, se añade una solución de sustrato a los pocillos que reaccionan con la enzima, de forma que se emite color de forma proporcional a la cantidad de VEGF unido en el paso inicial; dicha emisión la podemos medir y determinar así la cantidad de VEGF presente en la muestra.

El protocolo para la determinación de VEGF se muestra en el anexo 2.

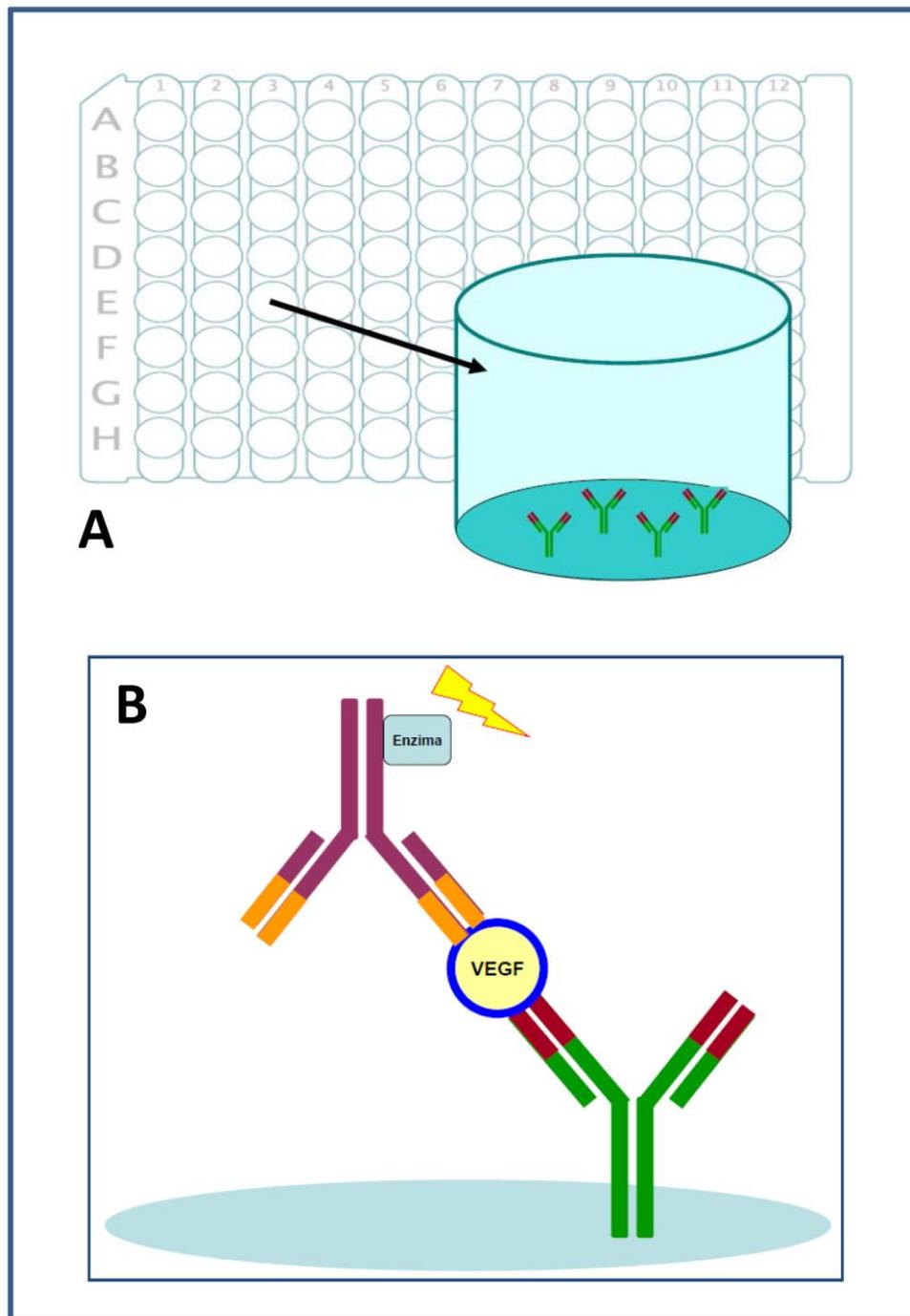
#### *DNA libre circulante en sangre (cfDNA)*

La extracción de DNA libre circulante (circulating cell-free DNA, cfDNA) en suero se llevó a cabo a partir de 400  $\mu$ l de suero del paciente, usando el dispositivo "Compact MagnaPure Instrument" (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) y el kit para aislamiento de ácidos nucleicos "MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I" (Roche, Mannheim, Germany), siguiendo el protocolo "Total Plasma NA 100 400 V3 1".

La medición de la concentración de cDNA en suero se llevó a cabo mediante ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR\*) cuantitativa a tiempo real (real-time quantitative PCR\*) para el gen de la  $\beta$ -globina (gen presente en todas las células nucleadas del organismo), usando el dispositivo "Light-Cycler 480 Real-Time PCR\* instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)" para el ensayo 5' nucleasa (Taqman assay). Para ello se tomaron 2  $\mu$ l de DNA que fueron amplificados en un volumen final de 20  $\mu$ l usando el kit "LC480 Probes Master Kit" (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante.

El sistema de la  $\beta$ -globina Taqman PCR\* consiste en la amplificación de los cebadores ("primers")  $\beta$ -globina-354F (5'-GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A-3'),  $\beta$ -globina-455R (5'-CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG-3') y una sonda fluorescente de doble marcado beta-globina-402T (5'-(FAM) TCT GGC CAA GTT TCA ACT CTG CTC GCT (TAMRA)-3'); dicha amplificación se llevó a cabo en termociclador con un primer ciclo a 95°C durante 10 seg, seguido de 48 ciclos de

Figura 8. Determinación de VEGF.



Placa de 96 pocillos para la realización de los experimentos por ELISA para la determinación de VEGF **(A)**. Los anticuerpos para VEGF se encuentran inmovilizados revistiendo las paredes de los pocillos. Mediante esta técnica obtenemos finalmente complejos anticuerpos-VEGF-anticuerpos-enzima **(B)**. Dicha enzima emite color al añadirsele el sustrato correspondiente, y dicha emisión total es medida para determinar la cantidad de VEGF presente en la muestra (ver texto)

95°C 5 seg y 62°C 15 seg, y un ciclo final de 40°C durante 30 seg. El tamaño final de la amplificación fue de 102 bp.

Se utilizaron controles para comprobar la adecuada realización de las pruebas. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y la media entre ambas determinaciones fue tomada como resultado final.

### *Análisis estadístico*

Inicialmente llevamos a cabo un estudio descriptivo de las distintas variables en situación basal y a los tres meses de tratamiento con CPAP, tanto en el total de los pacientes como agrupados según diagnóstico o no de hipertensión. Las variables cualitativas se expresan como frecuencia absoluta (n) y/o relativa (porcentaje respecto del total). Las variables cuantitativas se describen como media  $\pm$  desviación estándar (SD) e intervalo de confianza al 95% para la media, o como mediana y percentiles 25 y 75 (rango intercuartílico), según la distribución normal o no de las variables. Para estudiar la normalidad estadística en la distribución de las distintas variables, dado que el tamaño muestral es menor de 50, se utilizó como prueba de normalidad el Test de Shapiro-Wilk; de acuerdo con el mismo, un valor de p menor de 0,05 nos permite rechazar la hipótesis nula (normalidad en la distribución de la variable) y por tanto aceptar la hipótesis alternativa, considerando entonces que la muestra no se distribuye normalmente para dicha variable.

Para la comparación de variables en distintos grupos en situación basal llevamos a cabo análisis mediante Test de la Chi Cuadrado (o Test de Fisher cuando las frecuencias esperadas en algún grupo de la tabla de contingencia fue menor de 5) y/o Regresión Logística Binaria en caso de variables dependientes cualitativas. Para el caso de variable respuesta (dependiente) cuantitativa usamos el Test de la U de Mann-Whitney en caso de no normalidad de alguna de las variables, y en caso contrario se usó el Test de la T de Student para muestras independientes, Test de Welch y/o Regresión Lineal Simple según correspondía en función de variable predictora cualitativa o cuantitativa y teniendo en cuenta el test de homocedasticidad para valorar igualdad de las varianzas (F de Schnedecor o Test de Levene).

La comparación de las variables antes y tras 3 meses de tratamiento con CPAP se llevó a cabo mediante pruebas de comparación para muestras apareadas. Para el caso de variables cualitativas dicotómicas relacionadas (antes-después) se usó el Test no paramétrico de McNemar. En el caso de las variables cuantitativas se comprobó primero para cada par de variables antes-después si cumplían las condiciones de aleatoriedad y normalidad, para determinar si el test a usar para la comparación debía ser paramétrico o no. Para ello y como primer paso se generó para cada par de variables antes-después una nueva variable correspondiente a la diferencia entre ambas (nueva variable = variable antes – variable después de tratamiento con CPAP), es decir “delta” o cambio de la variable tras tratamiento. Dichas nuevas variables resultantes se sometieron a las pruebas de aleatoriedad (Test de rachas) y de normalidad (Test de Shapiro-Wilk,  $n < 50$ ). Todas las variables cumplieron la condición de distribución aleatoria de sus valores ( $p \geq 0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula). La interpretación del Test de Shapiro-Wilk es similar a la comentada previamente para el estudio de correlaciones. En el caso de normalidad de la muestra se usó para la comparación de las variables antes y después el Test de la T de Student para muestras apareadas (test paramétrico). En caso de distribución no normal de la diferencia de las variables antes y después, la comparación de medias se llevó a cabo mediante el Test no paramétrico de Wilcoxon. Los valores resultantes de las comparaciones de medias se expresan como diferencia media  $\pm$  desviación estándar e intervalo de confianza al 95% para la diferencia media, y valor de p.

Para los estudios de correlaciones bivariadas, cuando ambas variables cumplían la condición de normalidad se usó el Coeficiente de Correlación de Pearson (prueba paramétrica), y en caso de que al menos una de las dos variables a correlacionar no presentara dicha condición usamos como coeficiente de correlación la Rho de Spearman (test no paramétrico). En ambos casos, un valor más próximo a +1 ó -1 indica un mayor grado de correlación, mientras que la asociación es débil cuanto más próximo es el coeficiente a 0; el signo positivo o negativo de dicho valor nos indica si la relación entre ambas variables es directa o inversa, respectivamente.

En todos los casos se consideró significativa una p menor de 0,05 (error alfa del 5%). Los intervalos de confianza se calcularon, por tanto, para un 95% de confianza. Para la comparación de medias, la inclusión en el intervalo de confianza del valor 0 (valor nulo, no

diferencia) indica por tanto no significación estadística. El estudio estadístico se realizó mediante el programa SPSS® (IBM Corporation, Somers, NY, USA), versión 15.0.

### *Aspectos éticos*

Este trabajo constituye una parte de un proyecto más general y extenso titulado “Expresión de la Subunidad B1 del Canal Maxi-k+ en leucocitos de sangre periférica, niveles de presión arterial y grado de disfunción endotelial en el Síndrome de Apnea-Hipopnea del Sueño”. Dicho proyecto recibió financiación en convocatoria competitiva por el Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, FIS) y como tal fue valorado y resuelto favorable/aprobado por la Comisión de Ética del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Asimismo dicho estudio fue registrado en el registro oficial de ensayos clínicos ClinicalTrials.gov (U.S. National Institutes of Health, <https://clinicaltrials.gov/>) con el número NCT01791270.

Este proyecto se llevó a cabo de acuerdo a los principios éticos para la investigación biomédica recogidos en la Declaración de Helsinki, y siguiendo así mismo las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos propuestas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, 2002).

Desde el punto de vista ético, para llevar a cabo el estudio, sentamos como bases: 1) una selección equitativa de los pacientes y respeto por los participantes en el estudio, aportando la información necesaria acerca de los objetivos del proyecto, métodos y pruebas para llevarlos a cabo, beneficios esperados y posibles riesgos si los hubiera; 2) mantenimiento de la privacidad mediante la confidencialidad de los datos; 3) información verbal y entrega de hoja de información por escrito a los pacientes candidatos y solicitud de consentimiento informado a todos los sujetos participantes en el estudio (quienes podían declinar libremente su participación en cualquier momento, sin que ello resultase en menoscabo en su atención, cuidados o tratamiento).

Entendemos que este proyecto tiene validez científica, en tanto que propone una hipótesis clara y factible y se vale de principios y métodos científicos ampliamente aceptados

y reconocidos. E igualmente valor científico y social, al evaluar aspectos que buscan la mejora de la salud y el bienestar en un grupo de pacientes con riesgo elevado de complicaciones cardiovasculares, entre otras, así como mejorar el conocimiento existente hasta el momento en un tema con múltiples aspectos aún por resolver.

No existen conflictos de intereses en relación a este trabajo por parte de los investigadores participantes en el mismo.

# RESULTADOS

## RESULTADOS

Se incluyeron 30 pacientes consecutivos con diagnóstico reciente de Síndrome de Apnea-Hipopnea Obstructiva del Sueño (SAOS) con un índice de apnea-hipopnea (IAH) superior a 15, indicación de tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea (continuous positive airway pressure, CPAP) y situación estable respecto a otras comorbilidades y medicación.

### *Síndrome de apnea-hipopnea del sueño*

Al diagnóstico los pacientes presentaron un IAH medio (SD) de  $56.3 \pm 25.5$  y un índice de desaturación (ID) de  $54.5 \pm 24.8$  (tabla 4). La saturación de oxígeno (SatO<sub>2</sub>) en situación basal fue normal ( $96.6 \pm 1.4$  %), objetivándose durante el sueño, sin embargo, un descenso clínicamente significativo, puesto de manifiesto mediante una SatO<sub>2</sub> media de  $90.6 \pm 4.5$  % durante la poligrafía, con una SatO<sub>2</sub> mínima de  $61.6 \pm 22.4$  % y un porcentaje de tiempo con SatO<sub>2</sub> <90% (CT90%) superior al 30% (tabla 4). Como era de esperar, el cuestionario de Epworth previamente realizado mostró unos valores medios sugestivos de SAHS ( $10.7 \pm 3.4$ , tabla 4), si bien dicha puntuación no se correlacionó significativamente con el IAH o ID ( $r = 0.337$  [ $p=0.063$ ] y  $r = 0.334$  [ $p=0.071$ ], respectivamente).

### *Características generales*

Las características generales de los pacientes se muestran en las tablas 5 y 6. En resumen, los participantes eran relativamente jóvenes, con una edad media en torno a 50 años, la mayoría varones (63.3%), con una baja prevalencia de antecedentes personales de enfermedad cardio- o cerebro-vascular (3.3% en cada caso), aproximadamente la mitad eran hipertensos y un 23% presentaban diabetes (todos tipo 2). La mayoría de los sujetos no tenían antecedentes de hábito tabáquico (43.3%); entre aquellos pacientes fumadores (30%) la mediana de consumo de cigarrillos al día fue de 20.0 (rango intercuartílico [RIC]: 20.0, 40.0), tabla 5.

Los participantes presentaban un índice de masa corporal (IMC) medio en rango de obesidad ( $35.8 \pm 6.6 \text{ kg/m}^2$ ), siendo la misma de predominio visceral o abdominal (perímetro de cintura  $115.2 \pm 12.5 \text{ cm}$ ), y aproximadamente la mitad cumplían criterios de síndrome metabólico según definición ATP-III (53.3%) (tabla 6). Como era de esperar, por ser un importante factor de riesgo para el desarrollo de SAOS, un mayor IMC se correlacionó positivamente con una mayor severidad del síndrome medida por el IAH ( $r = 0.44$ ,  $p=0.014$ ) o ID ( $r = 0.44$ ,  $p=0.014$ ); dicha correlación fue igualmente significativa, aunque algo más débil, para el perímetro de cintura (IAH:  $r = 0.37$ ,  $p=0.044$ ; ID:  $r = 0.37$ ,  $p=0.042$ ).

**Tabla 4. Escala de Somnolencia de Epworth y Poligrafía Respiratoria Basal.**

	Media $\pm$ SD (IC95% para la media)	Mediana (RIC)
Escala de Somnolencia de Epworth	10,7 $\pm$ 3,7 (IC95% 9,3 – 12,1)	10,0 (8,0 – 14,0)
<b>POLISOMNOGRAFÍA</b>		
Índice de Apnea-Hipopnea	56,3 $\pm$ 25,5 (IC95% 46,7 – 65,8)	57,0 (33,3 – 74,2)
Índice de Desaturación	54,5 $\pm$ 24,8 (IC95% 45,2 – 63,8)	55,6 (32,0 – 71,3)
SatO2 Basal (%)	96,6 $\pm$ 1,4 (IC95% 96,1 – 97,2)	97,0 (96,0 – 98,0)
SatO2 Media (%)	90,6 $\pm$ 4,5 (IC95% 88,9 – 92,2)	92,1 (87,8 – 94,3)
SatO2 Mínima (%)	61,6 $\pm$ 22,4 (IC95% 53,2 – 69,9)	65,5 (47,0 – 82,0)
CT90% (%)	30,9 $\pm$ 26,5 (IC95% 21,0 – 40,8)	35,1 (2,9 – 50,5)

Parámetros expresados como media  $\pm$  SD (intervalo de confianza al 95% para la media) / mediana (rango intercuartílico). CT90%: porcentaje de tiempo durante la poligrafía con saturación de oxígeno inferior al 90%. RIC: rango intercuartílico (p25 – p75). SatO2: saturación de oxígeno. SD: desviación estándar.

**Tabla 5. Características generales de los participantes a nivel basal y tras 3 meses de tratamiento con CPAP.**

	Basal	3 meses con CPAP	p
<b>Edad (años)</b>	51,7 ± 11,5 (IC95% 47,4 – 56,0)	-	-
<b>Sexo (varón)</b>	63,3 %	-	-
<b>Hipertensión</b>	56,7 %	-	-
<b>Tratamiento Antihipertensivo</b>	56,7 %	-	-
<b>Diabetes Mellitus tipo 2</b>	23,3 %	-	-
<b>Dislipemia</b>	56,7 %	-	-
<b>Cardiopatía isquémica</b>	3,3 %	-	-
<b>Enfermedad cerebrovascular</b>	3,3 %	-	-
<b>Antecedente familiar de ECV</b>	20 %	-	-
<b>Tabaquismo</b>			
<b>No Fumador</b>	43,3 %	43,3 %	
<b>Ex-fumador</b>	26,7 %	26,7 %	ns
<b>Fumador</b>	30,0 %	30,0 %	
<b>Nº cigarrillos/día</b>	32,8 ± 24,6 (IC95% 13,8 – 51,7) 20,0 (20,0 – 40,0)	25,0 ± 18,0 (IC95% 11,1 – 38,8) 20,0 (10,0 – 30,0)	ns
Excluyendo caso único de ↓ tabaco*	26,9 ± 18,3 (IC95% 11,6 – 42,2) 20,0 (15,0 – 35,0)	26,9 ± 18,3 (IC95% 11,6 – 42,2) 20,0 (15,0 – 35,0)	ns

Parámetros expresados como porcentaje respecto del total para variables cualitativas, o como media ± SD (intervalo de confianza al 95% para la media) en caso de variables cuantitativas [en caso de Nº cigarrillos/día, además mediana (rango intercuartílico), al presentar dicha variable una distribución no normal]. (\*) Nº cigarrillos/día excluyendo el único caso en que un paciente redujo consumo de cigarrillos (reducción de 80 cig/d basalmente a 10 cig/día tras 3 meses de estudio. ECV: enfermedad cardiovascular. ns: no significativo.

**Tabla 6. Parámetros antropométricos, metabólicos y bioquímicos a nivel basal y tras 3 meses de tratamiento con CPAP.**

	Basal	3 meses con CPAP	p
<b>PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS</b>			
Peso (kg)	101,7 ± 19,4; IC95% 94,4, 108,9	103,9 ± 19,9; IC95% 95,3, 112,6	0,877
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	35,8 ± 6,6; IC95% 33,4, 38,3	37,1 ± 6,2; IC95% 34,4, 39,8	0,939
Perímetro Cintura (cm)	115,2 ± 12,5; IC95% 110,5, 119,9	-	-
<b>SÍNDROME METABÓLICO*</b>			
Síndrome Metabólico	53,3 %	-	-
Nº Criterios de SM	3,0 (2,0 – 3,0)	-	-
<b>PERFIL LIPÍDICO</b>			
Colesterol Total (mg/dl)	202,3 ± 42,7; IC95% 186,1, 218,5	195,4 ± 32,4; IC95% 183,1, 207,8	<b>0,067</b>
LDL (mg/dl)	129,3 ± 32,9; IC95% 116,8, 141,9	123,0 ± 25,5; IC95% 112,4, 133,5	<b>0,085</b>
HDL (mg/dl)	46,4 ± 10,0; IC95% 42,5, 50,2	46,6 ± 11,1; IC95% 42,1, 51,0	0,494
Triglicéridos (mg/dl)	136,0 (115,0 – 175,0)	141,0 (107,0 – 166,0)	0,781
<b>PERFIL GLUCÍDICO Y RESISTENCIA A INSULINA</b>			
Glucemia (mg/dl)	98,5 (91,0 – 126,0)	97,5 (90,0 – 111,0)	0,300
HbA1c (%)	5,8 (5,7 – 6,5)	5,9 (5,7 – 6,4)	0,307
Insulinemia (µU/ml)	15,9 (10,8 – 28,9)	13,0 (9,4 – 19,0)	<b>0,008</b>
<b>HOMA-2</b>			
Función Celular Beta (%)	124,9 (84,3 – 168,7)	115,2 (95,0 – 145,2)	<b>0,055</b>
Sensibilidad a Insulina (%)	47,6 (26,5 – 73,9)	58,9 (39,8 – 80,4)	<b>0,060</b>
Índice Resistencia Insulina	2,1 (1,3 – 3,8)	1,7 (1,2 – 2,5)	<b>0,024</b>
<b>OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS</b>			
Creatinina plasmática (mg/dl)	0,83 ± 0,2; IC95% 0,75, 0,90	0,80 ± 0,2; IC95% 0,73, 0,88	<b>0,066</b>
Microalbuminuria <sup>^</sup> (mgr/gr)	6,0 (3,2 – 14,5)	5,0 (4,0 – 9,0)	0,988
PCR ultrasensible (mg/l)	2,1 (1,4 – 4,2)	2,8 (1,8 – 4,6)	0,297
Homocisteína (µmol/l)	11,8 ± 2,3; IC95% 10,9, 12,7	11,8 ± 2,5; IC95% 10,9, 12,8	0,923

Parámetros expresados como porcentaje respecto del total para variables cualitativas, y como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” ó “mediana (rango intercuartílico)” en caso de variables cuantitativas, según presenten una distribución normal o no, respectivamente. (\*) Síndrome metabólico según criterios ATP-III. (^) Microalbuminuria según cociente albúmina/creatinina en muestra de orina elemental. HbA1c: hemoglobina glicada. HDL: lipoproteínas de alta densidad (high-density lipoproteins). HOMA: Homeostasis Model Assessment. LDL: lipoproteínas de baja densidad (low-density lipoproteins). PCR: proteína C reactiva.

### *Subgrupos según diagnóstico de hipertensión*

El 56.7% (n=17) de los participantes eran hipertensos, todos los cuales se encontraban bajo tratamiento farmacológico (tabla 7). De acuerdo con los criterios de inclusión, todos los pacientes se encontraban en situación estable respecto a las cifras de presión arterial (PA) y no precisaron modificación de su tratamiento durante el seguimiento del estudio. Los pacientes normotensos eran en general más jóvenes (mediana 45.0 años [RIC 42.0 - 54.0], frente a 61.0 años [RIC 46.0-62.0] en los hipertensos,  $p=0.026$ ) y con mayor frecuencia varones (84.6%, frente a un 47.1% de varones entre los hipertensos,  $p=0.034$ ). No se objetivaron otras diferencias destacables en las características generales, parámetros antropométricos (peso, IMC o perímetro de cintura) o respecto a síndrome metabólico entre ambos grupos (tablas 7 y 8). Si bien se observó una tendencia a valores inferiores de IAH e ID en los hipertensos (comparado con los normotensos), dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.069$  en ambos casos) y no se objetivaron otras diferencias en el estudio polisomnográfico (tabla 7).

### *Seguimiento de los pacientes*

Todos los paciente fueron seguidos durante 3 meses bajo tratamiento con CPAP y no hubo pérdidas durante el seguimiento. Así mismo, el nivel de tolerancia y cumplimiento del tratamiento con CPAP durante el seguimiento fue adecuado, con una duración media de uso de CPAP durante los periodos nocturnos durante los 3 meses de tratamiento de  $5.3 \pm 1.6$  horas, sin que hubiera necesidad de retirar a ningún paciente del estudio por dicho motivo. Este hecho fue favorecido por una adecuada selección de los participantes en el momento de su inclusión (ver metodología).

Es de destacar que durante el seguimiento no se produjeron cambios significativos en el peso ni IMC de los participantes ( $p>0.87$  en ambos casos, tabla 6), con una diferencia media (no significativa) entre la situación basal y tras 3 meses de tratamiento con CPAP de  $0.12 \pm 3.7$  kg (IC95%  $-1.5$  a  $1.7$ ) para el peso y de  $0.02 \pm 1.3$  kg/m<sup>2</sup> (IC95%  $-0.54$  a  $0.58$ ) para el IMC, por lo que los cambios observados en las variables resultados comentados más adelante no estarían

**Tabla 7. Características generales y poligrafía respiratoria a nivel basal según diagnóstico de hipertensión.**

	<b>NORMOTENSOS</b> n = 13	<b>HIPERTENSOS</b> n = 17	<b>p</b>
<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES</b>			
<b>Edad</b> (años)	45,0 (42,0 – 54,0)	61,0 (46,0 – 62,0)	<b>0,026</b>
<b>Sexo</b> (varón)	84,6 %	47,1 %	<b>0,034</b>
<b>Diabetes mellitus tipo 2</b>	15,4 %	29,4 %	0,427
<b>Dislipemia</b>	46,2 %	64,7 %	0,310
<b>Tabaquismo</b>			
<b>No fumador</b>	46,2 %	41,2 %	0,924
<b>Exfumador</b>	23,1 %	29,4 %	
<b>Fumador</b>	30,8 %	29,4 %	
<b>Nº cigarrillos/día</b>	10,0 (10,0 – 15,0)	30,0 (20,0 – 40,0)	<b>0,046</b>
<b>Cardiopatía Isquémica</b>	0,0 %	5,9 %	1,000
<b>Accidente cerebrovascular</b>	0,0 %	5,9 %	1,000
<b>Antecedente familiar de ECV</b>	15,4 %	23,5 %	0,672
<b>POLIGRAFÍA RESPIRATORIA</b>			
<b>Escala de Epworth</b>	11,8 ± 3,9; IC95% 9,5, 14,2	9,9 ± 3,4; IC95% 8,1, 11,6	0,152
<b>Índice de Apnea-Hipopnea</b>	63,8 ± 18,1; IC95% 52,8, 74,7	50,5 ± 29,2; IC95% 35,5, 65,6	<b>0,069</b>
<b>Índice de desaturación</b>	61,6 ± 17,5; IC95% 51,0, 72,2	49,0 ± 28,5; IC95% 34,3, 63,7	<b>0,069</b>
<b>SatO2 basal</b> (%)	97,0 (96,0 – 98,0)	96,5 (95,0 – 98,0)	0,703
<b>SatO2 media</b> (%)	92,4 (87,4 – 93,0)	91,9 (88,0 – 94,6)	0,325
<b>SatO2 mínima</b> (%)	56,2 ± 21,6; IC95% 43,1, 69,3	65,6 ± 22,7; IC95% 53,9, 77,3	0,135
<b>CT90%</b>	28,8 ± 23,7; IC95% 14,4, 43,1	32,4 ± 29,0; IC95% 17,5, 47,4	0,950
<b>Nº horas CPAP</b>	5,2 ± 1,3; IC95% 4,4, 6,0	5,3 ± 1,8; IC95% 4,3, 6,2	0,918

Parámetros expresados como porcentaje respecto del total para variables cualitativas, o como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” ó “mediana (rango intercuartílico)” en caso de variables cuantitativas, según presenten una distribución normal o no, respectivamente. CT90%: porcentaje de tiempo durante la poligrafía con saturación de oxígeno inferior al 90%. ECV: enfermedad cardiovascular. SatO2: saturación de oxígeno.

**Tabla 8. Parámetros antropométricos, metabólicos y bioquímicos a nivel basal según diagnóstico de hipertensión.**

	<b>NORMOTENSOS</b> n = 13	<b>HIPERTENSOS</b> n = 17	<b>P</b>
<b>PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS</b>			
<b>Peso (kg)</b>	102,8 ± 17,3; IC95% 92,3, 113,3	100,8 ± 21,3; IC95% 89,8, 111,8	0,784
<b>Perímetro cintura (cm)</b>	115,4 ± 10,0; IC95% 109,3, 121,5	115,0 ± 14,4; IC95% 107,6, 122,5	0,950
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	34,5 ± 4,4; IC95% 31,8, 37,2	36,8 ± 7,8; IC95% 32,8, 40,8	0,327
<b>SÍNDROME METABÓLICO</b>			
<b>Síndrome Metabólico</b>	38,5 %	64,7 %	0,153
<b>Nº criterios de SM</b>	2,0 (2,0 – 3,0)	3,0 (2,0 – 3,0)	0,094
<b>PERFIL NGLUCÍDICO Y RESISTENCIA A INSULINA</b>			
<b>Glucemia basal (mg/dl)</b>	99,0 (95,0 – 103,0)	93,0 (89,0 – 138,0)	0,950
<b>HbA1c (%)</b>	5,8 (5,8 – 6,0)	5,8 (5,6 – 6,7)	0,895
<b>Insulinemia basal (μU/ml)</b>	16,0 (14,1 – 28,9)	14,6 (10,8 – 19,3)	0,490
<b>HOMA-2</b>			
<b>Función celular beta (%)</b>	157,9 ± 70,2; IC95% 113,3, 202,5	122,7 ± 68,2; IC95% 86,4, 159,0	0,194
<b>Sensibilidad insulina (%)</b>	45,7 ± 23,7; IC95% 30,6, 60,8	60,5 ± 33,3; IC95% 42,7, 78,3	0,203
<b>Índice resistencia insulina</b>	2,2 (1,6 – 3,9)	1,9 (1,2 – 2,4)	0,295
<b>PERFIL LIPÍDICO</b>			
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	192,4 ± 42,4; IC95% 166,8, 218,1	210,3 ± 42,5; IC95% 187,6, 232,9	0,270
<b>HDL (mg/dl)</b>	42,5 ± 7,6; IC95% 37,92, 4,1	49,5 ± 10,9; IC95% 43,7, 55,3	<b>0,062</b>
<b>LDL (mg/dl)</b>	126,0 ± 29,1; IC95% 108,5, 143,6	132,0 ± 36,5; IC95% 112,5, 151,4	0,639
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	158,2 ± 65,3; IC95% 118,7, 197,7	143,9 ± 52,3; IC95% 116,0, 171,8	0,518
<b>OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS</b>			
<b>Creatinina plasmática (mg/dl)</b>	0,8 ± 0,1; IC95% 0,7, 0,9	0,8 ± 0,2; IC95% 0,7, 0,9	0,454
<b>Microalbuminuria* (mgr/gr)</b>	5,0 (3,0 – 8,0)	7,5 (3,7 – 33,0)	0,167
<b>PCR ultrasensible (mg/l)</b>	1,9 (1,6 – 4,0)	2,9 (1,1 – 4,4)	0,926
<b>Homocisteína (μmol/l)</b>	11,6 ± 1,6; IC95% 10,6, 12,7	11,9 ± 2,7; IC95% 10,4, 13,4	0,763

Parámetros expresados como porcentaje respecto del total para variables cualitativas, o como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” ó “mediana (rango intercuartílico)” en caso de variables cuantitativas, según presenten una distribución normal o no, respectivamente. (\*) Microalbuminuria determinada según cociente albúmina/creatinina en orina elemental. HbA1c: hemoglobina glicada. HDL: lipoproteínas de alta densidad (high density lipoproteins). HOMA-2: homeostasis model assessment 2. IMC: Índice de masa corporal. LDL: lipoproteínas de baja densidad (low density lipoproteins). PCR: proteína C reactiva. SM: síndrome metabólico.

influenciados por cambios en dichos parámetros. Por otro lado, en relación al hábito tabáquico (tabla 5), solamente un paciente modificó su consumo de tabaco durante el tiempo de seguimiento, con una reducción del mismo de 80 a 10 cigarrillos al día; el hábito se mantuvo igual durante el estudio en el resto de pacientes (a pesar de los consejos aportados sobre la conveniencia de abandono del mismo en los fumadores). En el análisis de las variables de interés a los 3 meses se excluyó a dicho paciente que modificó su consumo de tabaco, para controlar por esta variable y evitar que los posibles cambios observados pudieran estar influidos por la variación en el consumo de cigarrillos.

### *Perfil glucémico y resistencia a la insulina*

Los niveles basales (mediana, RIC) de glucosa en ayunas y hemoglobina glicada (HbA1c) fueron 98.5 mg/dL (91.0 – 126.0) y 5.8 % (5.7 – 6.5), respectivamente (tabla 6). Un 23.3 % de los pacientes eran diabéticos (todos tipo 2), los cuales se encontraban estables en cuanto al control glucémico, estimado tanto por glucemia en ayunas como por HbA1c.

Los pacientes presentaban un índice de resistencia a la insulina (HOMA2-IR) elevado (2.1, RIC 1.3 – 3.8), con una sensibilidad a la insulina disminuida (47.6%, RIC 26.5 – 73.9) e hiperinsulinismo (insulinemia 15.9  $\mu$ U/mL, RIC 10.8 – 28.9; función celular beta 124.9%, RIC 84.3 – 168.7) (tabla 6). Como era de esperar, el peso, perímetro de cintura e IMC se correlacionaron positivamente con los niveles de insulinemia e índice de resistencia a la insulina e inversamente con la sensibilidad a la insulina. Asimismo, una mayor severidad del SAHS (determinada mediante el IAH e ID) se correlacionó significativamente con una menor sensibilidad a la insulina (IAH:  $r = -0.45$ ,  $p=0.017$ ; ID:  $r = -0.48$ ,  $p=0.010$ ) y mayor índice de resistencia (IAH:  $r = 0.43$ ,  $p=0.022$ ; ID:  $r = 0.46$ ,  $p=0.014$ ), asociaciones probablemente mediadas por el IMC (dada la relación fisiopatológica de ambos – SAHS y resistencia a la insulina – con dicho parámetro).

Tras 3 meses de tratamiento con CPAP se comprobó una mejoría significativa en el índice de resistencia a la insulina (HOMA2-IR a los 3 meses: 1.7, RIC 1.2 – 2.5,  $p=0.024$ ); dicha mejoría fue principalmente debida a un descenso en los niveles de insulina basal ( $p=0.008$ ), si bien también se objetivó una tendencia hacia una mejoría tanto de la sensibilidad a la

insulina como de la función celular beta tras tratamiento con CPAP ( $p=0.060$  y  $p=0.055$ , respectivamente) (tabla 6). No se produjeron cambios en los niveles de glucosa en ayunas o HbA1c.

No hubo diferencias significativas a nivel basal en el perfil glucídico ni parámetros HOMA2 en función de la presencia de historia de hipertensión o no (tabla 8). Sin embargo, al valorar los cambios tras 3 meses de tratamiento con CPAP se objetivó que la mejoría en los niveles de insulina, función celular beta, sensibilidad a la insulina e índice de resistencia a la insulina observadas en el conjunto de los pacientes se produjo a expensas de aquellos paciente normotensos, donde hubo una mejoría significativa de dichos parámetros ( $p<0.030$ , excepto función celular beta  $p=0.053$ ), ya que en los sujetos con historia de hipertensión no se apreciaron cambios estadísticamente significativos con el tratamiento con CPAP ( $p>0.230$ ) (tabla 9).

#### *Función renal, perfil lipídico, PCR y homocisteína*

Los participantes presentaron una función renal normal a su inclusión en el estudio (creatinina plasmática  $0.83 \pm 0.2$  mg/dL) y la misma se mantuvo similar tras finalizar el seguimiento y tratamiento con CPAP (tabla 6). No se objetivaron cambios significativos en los niveles de microalbuminuria.

Los participantes presentaron a nivel basal unos niveles de colesterol LDL de  $129.3 \pm 32.9$  mg/dL y HDL  $46.4 \pm 10.0$  mg/dL. No hubo cambios estadísticamente significativos tras el periodo de tratamiento con CPAP en el conjunto de los pacientes ni en función de la presencia o no de historia de hipertensión (tablas 6 y 8).

Los niveles de PCR ultrasensible (PCRus) a nivel basal fueron 2.1 (mediana, RIC 1.4 – 4.2) mg/L (tablas 6 y 8) y los mismos se correlacionaron positivamente con los niveles basales de glucosa en ayunas ( $r = 0.44$ ,  $p=0.038$ ) y HbA1c ( $r = 0.42$ ,  $p=0.052$ ), si bien no con los parámetros de resistencia a la insulina. Tampoco se correlacionaron con los parámetros derivados de la poligrafía respiratoria. Tras 3 meses de tratamiento con CPAP no se objetivaron cambios significativos en los niveles de PCRus ( $p=0.297$ , tabla 6).

Finalmente, los niveles de homocisteína basales ( $11.8 \pm 2.3 \mu\text{mol/L}$ ) tampoco se modificaron tras los 3 meses de tratamiento con CPAP ( $p=0.923$ , tabla 6).

**Tabla 9. Diferencias significativas tras 3 meses de tratamiento con CPAP (vs. basal) según diagnóstico inicial de hipertensión. Otras variables no MAPA.**

	Basal	3 meses con CPAP	p
<b>HbA1c (%)</b>			
Normotensos	5.8 (5.8 – 6.0)	5.8 (5.5 – 6.0)	0.240
Hipertensos	5.8 (5.6 – 6.7)	6.0 (5.7 – 7.0)	0.613
<b>INSULINEMIA (<math>\mu\text{U/ml}</math>)</b>			
Normotensos	16.0 (14.1 – 28.9)	12.5 (10.1 – 20.6)	<b>0.029</b>
Hipertensos	14.6 (10.8 – 19.3)	13.0 (9.1 – 18.2)	0.234
<b>FUNCIÓN CELULAR BETA (HOMA2) (%)</b>			
Normotensos	157.9 $\pm$ 70.2; IC95% 113.3, 202.5	134.0 $\pm$ 44.1; IC95% 106.0, 162.0	<b>0.053</b>
Hipertensos	122.7 $\pm$ 68.2; IC95% 86.4, 159.0	112.5 $\pm$ 51.6; IC95% 85.0, 140.0	0.362
<b>SENSIBILIDAD A INSULINA (HOMA2) (%)</b>			
Normotensos	45.7 $\pm$ 23.7; IC95% 30.6, 60.8	59.7 $\pm$ 26.7; IC95% 42.7, 76.7	<b>0.022</b>
Hipertensos	60.5 $\pm$ 33.3; IC95% 42.7, 78.3	60.2 $\pm$ 27.2; IC95% 45.7, 74.7	0.795
<b>ÍNDICE DE RESISTENCIA A INSULINA (HOMA2)</b>			
Normotensos	2.2 (1.6 – 3.9)	1.6 (1.3 – 2.7)	<b>0.029</b>
Hipertensos	1.9 (1.2 – 2.4)	1.7 (1.2 – 2.4)	0.458
<b>CREATININA PLASMÁTICA (mg/dl)</b>			
Normotensos	0.8 $\pm$ 0.1; IC95% 0.7, 0.9	0.8 $\pm$ 0.1; IC95% 0.7, 0.9	0.875
Hipertensos	0.8 $\pm$ 0.2; IC95% 0.7, 0.9	0.7 $\pm$ 0.2; IC95% 0.6, 0.9	<b>0.035</b>
<b>ÁREA DE HIPEREMIA (PU/seg)</b>			
Normotensos	1091.6 (908.5 – 1397.3)	1309.5 (1138.4 – 1775.8)	<b>0.037</b>
Hipertensos	1072.9 (689.2 – 1342.5)	1349.4 (950.7 – 1905.0)	0.441
<b>COCIENTE PICP / ICTP</b>			
Normotensos	0.11 (0.09 – 0.13)	0.11 (0.10 – 0.13)	0.668
Hipertensos	0.15 (0.11 – 0.17)	0.12 (0.09 – 0.13)	<b>0.041</b>

Se muestran sólo resultados para comparaciones con significación estadística  $p < 0,09$ . Parámetros expresados como “media  $\pm$  SD e intervalo de confianza al 95% para la media” ó “mediana (rango intercuartílico)” según la variable presente una distribución normal o no, respectivamente. HbA1c: hemoglobina glicada. HOMA-2: homeostasis model assessment 2. ICTP: Telopéptido del colágeno tipo I. PICP: propéptico C-terminal de colágeno tipo I. PU: unidades de perfusión.

### *Monitorización ambulatoria de presión arterial (MAPA 24 horas)*

Los pacientes presentaban un adecuado control de los niveles de PA a nivel basal medidos por MAPA (tablas 10 y 11), con cifras medias de 24 horas de  $125.4 \pm 12.3$  mmHg de PA sistólica (carga 35.8 %) y  $76.1 \pm 10.5$  mmHg de PA diastólica (carga 25.3 %) y valores igualmente en rango considerando los periodos diurno y nocturno por separado ( $128.2 \pm 12.7$  /  $79.1 \pm 11.2$  mmHg y  $118.2 \pm 14.6$  /  $68.6 \pm 11.9$  mmHg, respectivamente); no hubo diferencias significativas en función de que los pacientes presentasen una historia previa de hipertensión o no, indicando un buen control tensional en aquellos pacientes hipertensos incluidos (como era requerido en los criterios de inclusión). Tras 3 meses de intervención con CPAP se comprobó una mejoría generalizada de los valores de PA, siendo el descenso de los niveles de PA de mayor magnitud durante el periodo nocturno (tabla 10). En el análisis por subgrupos se comprobó que dicha mejoría en los parámetros de la MAPA tuvo lugar en los pacientes normotensos, mientras que en aquellos con historia de hipertensión se objetivó igualmente una tendencia hacia una mejoría en las cifras de PA que sin embargo no alcanzaron significación estadística (tabla 12).

En concordancia con lo descrito previamente en la literatura para el SAHS e hipertensión secundaria, el estudio del comportamiento de la PA durante el sueño (tabla 10) puso de manifiesto un elevado número de pacientes con patrón no dipper (79.3 %). Tras finalizar el periodo de seguimiento se comprobó un descenso sustancial de dicho porcentaje, que pasó a ser del 44.8 % ( $p=0.021$ ), presentando entonces más de la mitad de los pacientes un patrón normal de descenso nocturno de la PA (55.2%) (tabla 10).

Con respecto a la frecuencia cardíaca (FC), ésta presentó un comportamiento similar al de la presión arterial, con cifras basales medias en torno a 79 lpm durante el día y 70 lpm durante la noche, sin diferencias significativas según diagnóstico previo de hipertensión, y con mejoría destacable tras 3 meses de tratamiento con CPAP, más evidente durante el periodo de sueño (FC final en torno a 77 lpm durante el día y 65 lpm durante el periodo nocturno,  $p=0.040$  y  $p=0.001$ , respectivamente; tablas 10 y 11). La mejoría de FC durante la noche se comprobó tanto en pacientes normotensos como hipertensos, si bien durante el periodo diurno la mejoría fue estadísticamente significativa sólo en el grupo de sujetos sin historia de hipertensión (tabla 12).

**Tabla 10. Monitorización ambulatoria de presión arterial (MAPA 24 horas) a nivel basal y tras 3 meses de tratamiento con CPAP.**

		Basal	3 meses con CPAP	p
<b>PRESIÓN ARTERIAL</b>				
<b>TA 24 horas</b> (mmHg)	<b>Sistólica</b>	125,4 ± 12,38; IC95% 120,8, 129,9	121,3 ± 12,6; IC95% 116,5, 126,1	<b>0,009</b>
	<b>Diastólica</b>	76,1 ± 10,5; IC95% 72,1, 80,0	72,6 ± 10,9; IC95% 68,4, 76,7	<b>0,005</b>
<b>TA Día</b> (mmHg)	<b>Sistólica</b>	128,2 ± 12,7; IC95% 123,4, 133,0	125,6 ± 14,2; IC95% 120,2, 131,0	<b>0,052</b>
	<b>Diastólica</b>	79,1 ± 11,2; IC95% 74,9, 83,3	76,1 ± 12,1; IC95% 71,5, 80,7	<b>0,005</b>
<b>TA Noche</b> (mmHg)	<b>Sistólica</b>	118,2 ± 14,6; IC95% 112,7, 123,8	111,4 ± 11,9; IC95% 106,9, 116,0	<b>0,005</b>
	<b>Diastólica</b>	68,6 ± 11,9; IC95% 64,1, 73,2	64,6 ± 10,5; IC95% 60,6, 68,7	<b>0,034</b>
<b>TA Media</b> (mmHg)	<b>24 horas</b>	92,5 ± 10,6; IC95% 88,5, 96,4	88,8 ± 11,0; IC95% 84,6, 93,0	<b>0,006</b>
	<b>Día</b>	95,5 ± 11,1; IC95% 91,3, 99,6	92,6 ± 12,2; IC95% 87,9, 97,2	<b>0,011</b>
	<b>Noche</b>	85,2 ± 12,4; IC95% 80,4, 89,9	80,2 ± 10,5; IC95% 76,2, 84,2	<b>0,015</b>
<b>TA de pulso</b> (mmHg)	<b>24 horas</b>	49,3 ± 7,6; IC95% 46,4, 52,1	48,7 ± 7,6; IC95% 45,8, 51,6	0,310
	<b>Día</b>	49,1 ± 8,2; IC95% 46,0, 52,1	49,5 ± 8,4; IC95% 46,3, 52,7	0,444
	<b>Noche</b>	49,6 ± 7,6; IC95% 46,7, 52,5	46,8 ± 7,0; IC95% 44,1, 49,5	<b>0,003</b>
<b>Carga TA 24 horas (%)</b>	<b>Sistólica</b>	35,8 ± 25,9; IC95% 25,9, 45,7	27,1 ± 25,1; IC95% 17,5, 36,7	0,133
	<b>Diastólica</b>	25,35 (10,10 – 54,50)	15,00 (6,10 – 43,40)	<b>0,048</b>
<b>Variabilidad TA 24 horas (SD)</b>	<b>Sistólica</b>	11,70 (9,81 – 13,97)	12,75 (11,49 – 15,82)	0,126
	<b>Diastólica</b>	10,26 (8,29 – 11,74)	10,44 (8,88 – 11,96)	0,750
<b>PATRÓN DE PRESIÓN ARTERIAL</b>				
<b>Dipper</b>		20,7 %	55,2 %	<b>0,021</b>
<b>Total No Dipper*</b>		79,3 %	44,8 %	
	<b>Non-dipper</b>	55,2 %	31,0 %	-
	<b>Riser</b>	17,2 %	10,3 %	-
	<b>Dipper Extremo</b>	9,9 %	3,4 %	-
<b>FRECUENCIA CARDIACA</b>				
<b>Frecuencia cardiaca 24 horas (lpm)</b>		77,0 ± 9,7; IC95% 73,1, 80,9	73,3 ± 10,0; IC95% 69,2, 77,3	<b>0,002</b>
<b>Frecuencia cardiaca Día (lpm)</b>		79,5 ± 10,5; IC95% 75,3, 83,8	76,8 ± 10,7; IC95% 72,5, 81,2	<b>0,040</b>
<b>Frecuencia cardiaca Noche (lpm)</b>		70,1 ± 9,9; IC95% 66,1, 74,2	65,1 ± 9,2; IC95% 61,4, 68,9	<b>0,001</b>

Parámetros expresados como porcentaje respecto del total para variables cualitativas, o como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” ó “mediana (rango intercuartílico)” en caso de variables cuantitativas, según presenten una distribución normal o no, respectivamente. (\*) Total No Dipper: non-dipper + dipper extremo + riser. TA: tensión arterial.

**Tabla 11. Monitorización ambulatoria de presión arterial (MAPA 24 h) a nivel basal según diagnóstico de hipertensión.**

		<b>NORMOTENSOS</b> n = 13	<b>HIPERTENSOS</b> n = 17	<b>p</b>
<b>TA 24 h</b> (mmHg)	<b>Sistólica</b>	123,4 ± 8,9; IC95% 118,0, 128,8	126,8 ± 14,4; IC95% 119,4, 134,2	0,467
	<b>Diastólica</b>	75,0 (68,0 – 81,0)	77,0 (69,0 – 85,0)	0,753
<b>TA Día</b> (mmHg)	<b>Sistólica</b>	126,7 ± 10,0; IC95% 120,6, 132,7	129,3 ± 14,7; IC95% 121,8, 136,9	0,580
	<b>Diastólica</b>	78,0 ± 9,9; IC95% 72,0, 83,9	80,0 ± 12,3; IC95% 73,6, 86,3	0,636
<b>TA Noche</b> (mmHg)	<b>Sistólica</b>	115,4 ± 11,0; IC95% 108,4, 122,4	120,2 ± 16,7; IC95% 111,6, 128,8	0,391
	<b>Diastólica</b>	66,9 ± 11,2; IC95% 59,7, 74,0	69,8 ± 12,6; IC95% 63,3, 76,3	0,529
<b>TA Media</b> (mmHg)	<b>24 h</b>	91,0 ± 8,6; IC95% 85,7, 96,2	93,6 ± 11,9; IC95% 87,5, 99,8	0,506
	<b>Día</b>	94,2 ± 9,2; IC95% 88,6, 99,8	96,4 ± 12,5; IC95% 90,0, 102,9	0,595
	<b>Noche</b>	83,1 ± 10,8; IC95% 76,2, 89,9	86,6 ± 13,5; IC95% 79,7, 93,5	0,458
<b>TA de pulso</b> (mmHg)	<b>24 h</b>	48,7 ± 6,7; IC95% 44,6, 52,7	49,7 ± 8,4; IC95% 45,4, 54,0	0,709
	<b>Día</b>	48,7 ± 8,0; IC95% 43,8, 53,5	49,3 ± 8,6; IC95% 44,9, 53,7	0,832
	<b>Noche</b>	48,5 ± 5,7; IC95% 44,8, 52,1	50,4 ± 8,7; IC95% 45,9, 54,9	0,513
<b>Carga 24 h</b> (%)	<b>Sistólica</b>	30,6 ± 20,5; IC95% 17,6, 43,7	39,4 ± 29,2; IC95% 24,4, 54,4	<b>0,016</b>
	<b>Diastólica</b>	25,0 (7,9 – 42,0)	27,7 (12,1 – 54,5)	0,516
<b>Variabilidad 24 h (SD)</b>	<b>Sistólica</b>	11,5 (9,0 – 13,1)	12,2 (10,6 – 13,9)	0,645
	<b>Diastólica</b>	10,1 (8,14 – 11,74)	10,3 (9,1 – 11,3)	0,770
<b>Patrón TA nocturno (%)</b>	<b>Dipper</b>	23,1 %	17,6 %	0,951
	<b>Total no Dipper*</b>	76,9 %	82,4 %	
<b>Frecuencia cardiaca (lpm)</b>	<b>24 h</b>	77,0 ± 8,7; IC95% 70,7, 83,2	77,0 ± 10,6; IC95% 71,3, 82,6	1,000
	<b>Día</b>	81,5 ± 8,7; IC95% 75,2, 87,7	78,3 ± 11,5; IC95% 72,1, 84,4	0,462
	<b>Noche</b>	65,9 ± 9,3; IC95% 59,2, 72,5	72,8 ± 9,6; IC95% 67,7, 77,9	<b>0,084</b>

Parámetros expresados como porcentaje respecto del total para variables cualitativas, o como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” ó “mediana (rango intercuartílico)” en caso de variables cuantitativas, según presenten una distribución normal o no, respectivamente. (\*) Total No Dipper: non-dipper + dipper extremo + riser. TA: tensión arterial.

**Tabla 12. Diferencias significativas en la MAPA tras 3 meses de tratamiento con CPAP (vs. basal) según diagnóstico inicial de hipertensión.**

		Basal	3 meses con CPAP	p
TA 24 HORAS (mmHg)	<b>SISTÓLICA</b>			
	Normotensos	123,4 ± 8,9; IC95% 118,0, 128,8	116,0 ± 9,7; IC95% 109,8, 122,2	<b>0,006</b>
	Hipertensos	126,8 ± 14,4; IC95% 119,4, 134,2	125,0 ± 13,3; IC95% 118,1, 131,8	0,314
	<b>DIASTÓLICA</b>			
	Normotensos	75,0 (68,0 – 81,0)	66,5 (62,5 – 77,5)	<b>0,005</b>
Hipertensos	77,0 (69,0 – 85,0)	74,0 (69,0 – 79,0)	0,267	
TA DÍA (mmHg)	<b>SISTÓLICA</b>			
	Normotensos	126,7 ± 10,0; IC95% 120,6, 132,7	121,5 ± 11,9; IC95% 113,9, 129,0	<b>0,022</b>
	Hipertensos	129,3 ± 14,7; IC95% 121,8, 136,9	128,7 ± 15,3; IC95% 120,6, 136,3	0,600
	<b>DIASTÓLICA</b>			
	Normotensos	78,0 ± 9,9; IC95% 72,0, 83,9	72,6 ± 11,8; IC95% 65,1, 80,1	<b>0,006</b>
Hipertensos	80,0 ± 12,3; IC95% 73,6, 86,3	78,5 ± 12,1; IC95% 72,3, 84,7	0,233	
TA NOCHE (mmHg)	<b>SISTÓLICA</b>			
	Normotensos	115,4 ± 11,0; IC95% 108,4, 122,4	103,6 ± 6,4; IC95% 99,5, 107,6	<b>0,002</b>
	Hipertensos	120,2 ± 16,7; IC95% 111,6, 128,8	117,0 ± 11,9; IC95% 110,8, 123,1	0,295
TA NOCHE (mmHg)	<b>DIASTÓLICA</b>			
	Normotensos	66,9 ± 11,2; IC95% 59,7, 74,0	58,6 ± 7,6; IC95% 53,7, 63,4	<b>0,004</b>
	Hipertensos	69,8 ± 12,6; IC95% 63,3, 76,3	68,9 ± 10,3; IC95% 63,6, 74,2	0,712
TA MEDIA (mmHg)	<b>24 HORAS</b>			
	Normotensos	91,0 ± 8,6; IC95% 85,7, 96,2	84,2 ± 9,4; IC95% 78,3, 90,2	<b>0,005</b>
	Hipertensos	93,6 ± 11,9; IC95% 87,5, 99,8	92,0 ± 11,0; IC95% 86,3, 97,7	0,277
	<b>DÍA</b>			
	Normotensos	94,2 ± 9,2; IC95% 88,6, 99,8	88,9 ± 11,3; IC95% 81,7, 96,1	<b>0,008</b>
	Hipertensos	96,4 ± 12,5; IC95% 90,0, 102,9	95,1 ± 12,5; IC95% 88,7, 101,6	0,345
	<b>NOCHE</b>			
	Normotensos	83,1 ± 10,8; IC95% 76,2, 89,9	73,6 ± 6,9; IC95% 69,1, 78,0	<b>0,002</b>
Hipertensos	86,6 ± 13,5; IC95% 79,7, 93,5	84,9 ± 10,1; IC95% 79,7, 90,2	0,518	
TA DE PULSO (mmHg)	<b>NOCHE</b>			
	Normotensos	48,5 ± 5,7; IC95% 44,8, 52,1	45,0 ± 4,3; IC95% 42,2, 47,7	<b>0,021</b>
	Hipertensos	50,4 ± 8,7; IC95% 45,9, 54,9	48,0 ± 8,3; IC95% 43,7, 52,3	<b>0,058</b>

Se muestran resultados para comparaciones con significación estadística  $p < 0,1$ . Parámetros expresados como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” ó “mediana (rango intercuartílico)” para variables cuantitativas, según la variable presente una distribución normal o no, respectivamente. TA: tensión arterial.

**Tabla 12 (Continuación).**

		Basal	3 meses post-CPAP	p
CARGA 24 h (%)	<b>SISTÓLICA</b>			
	Normotensos	30.6 ± 20.5; IC95% 17.6, 43.7	15.2 ± 12.2; IC95% 7.5, 23.0	<b>0.046</b>
	Hipertensos	39.4 ± 29.2; IC95% 24.4, 54.4	35.5 ± 28.7; IC95% 20.7, 50.2	0.831
	<b>DIASTÓLICA</b>			
	Normotensos	25.0 (7.9 – 42.0)	7.8 (2.4 – 33.2)	<b>0.038</b>
	Hipertensos	27.7 (12.1 – 54.5)	19.7 (7.4 – 45.8)	0.485
VARIABILIDAD (SD)	<b>SISTÓLICA</b>			
	Normotensos	11.5 (9.0 – 13.1)	13.7 (11.6 – 15.7)	<b>0.029</b>
	Hipertensos	12.2 (10.6 – 13.9)	12.0 (10.9 – 16.0)	0.604
FRECUENCIA CARDIACA (lpm)	<b>24 HORAS</b>			
	Normotensos	77.0 ± 8.7; IC95% 70.7, 83.2	71.1 ± 8.7; IC95% 64.8, 77.3	<b>&lt;0.001</b>
	Hipertensos	77.0 ± 10.6; IC95% 71.3, 82.6	74.6 ± 10.7; IC95% 68.9, 80.3	0.144
	<b>DÍA</b>			
	Normotensos	81.5 ± 8.7; IC95% 75.2, 87.7	75.7 ± 9.6; IC95% 68.8, 82.6	<b>0.001</b>
	Hipertensos	78.3 ± 11.5; IC95% 72.1, 84.4	77.7 ± 11.6; IC95% 71.3, 83.7	0.649
	<b>NOCHE</b>			
	Normotensos	65.9 ± 9.3; IC95% 59.2, 72.5	61.2 ± 7.2; IC95% 56.0, 66.3	<b>0.006</b>
Hipertensos	72.8 ± 9.6; IC95% 67.7, 77.9	67.6 ± 9.6; IC95% 62.5, 72.7	<b>0.017</b>	

Las cifras basales de PA y FC no se correlacionaron con la severidad del SAHS estimada mediante los índices IAH o ID. No obstante, se comprobó una asociación inversa entre los niveles de saturación de oxígeno (SatO<sub>2</sub>) durante la poligrafía respiratoria y las cifras de FC diurna por MAPA (no ocurrió así con la FC nocturna).

#### *Test de hiperemia reactiva a la isquemia*

Los diferentes parámetros determinados mediante flujimetría láser-doppler a nivel basal y tras 3 meses de tratamiento con CPAP se muestran en la tabla 13, destacando un área de hiperemia (AH) post-isquemia (como principal variable resultado de dicha prueba) a nivel basal de 1072.9 PU/seg (mediana, RIC 689.3 – 1375.2), la cual mejoró significativamente al final del seguimiento: 1309.6 (1028.8 – 1775.9) PU/seg, p=0.004. El área bajo la curva (ABC),

equivalente al AH en el análisis no ajustado de la curva resultado del test, mejoró igualmente tras CPAP ( $p=0.061$ ). Como era de esperar, ambos parámetros (AH y ABC) se correlacionaron significativamente entre sí ( $r = 0.62$ ,  $p<0.001$ ).

El análisis por subgrupos en función de la presencia de hipertensión mostró no diferencias a nivel basal entre ambos grupos (AH:  $p=0.950$ ; tabla 14); la mejoría en el AH tras el tratamiento con CPAP fue significativa sólo en los pacientes normotensos ( $p=0.037$ , tabla 9); los valores medios mejoraron igualmente en el grupo de pacientes hipertensos, si bien dicha diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.441$ ), probablemente debida a una mayor variabilidad de los resultados en este subgrupo.

**Tabla 13. Test de hiperemia reactiva a la isquemia mediante Flujimetría por láser-doppler a nivel basal y tras 3 meses de tratamiento con CPAP.**

	Basal	3 meses con CPAP	p
Valor Máximo (PU)	45,1 (37,3 – 57,3)	51,0 (45,3 – 64,8)	0,583
Área Bajo la Curva (PU/seg)	3951,0 (3078,8 – 4767,8)	4345,3 (3971,8 – 4865,1)	<b>0,061</b>
Pendiente (PU/seg)	0,02 (0,01 – 0,02)	0,02 (0,01 – 0,03)	0,987
Pico de Flujo (PU)	41,6 ± 16,1; IC95% 35,6, 47,6	46,9 ± 11,9; IC95% 42,3, 51,4	0,124
Tiempo hasta la mitad antes de máxima hiperemia (seg)	3,6 ± 1,5; IC95% 3,1, 4,2	3,9 ± 1,4; IC95% 3,4, 4,5	0,349
Tiempo hasta máxima hiperemia (seg)	12,0 ± 4,0; IC95% 10,5, 13,5	15,3 ± 9,7; IC95% 11,6, 19,0	0,163
Tiempo hasta la mitad después de máxima hiperemia (seg)	25,8 ± 8,8; IC95% 22,5, 29,2	26,3 ± 9,8; IC95% 22,5, 30,1	0,906
Área de hiperemia (PU/seg)	1072,3 ± 483,2; IC95% 888,5, 1256,1 1072,9 (689,3 – 1375,2)	1604,4 ± 915,7 (IC95%: 1256,1, 1952,7 1309,6 (1028,8 – 1775,9)	<b>0,004</b>

Parámetros expresados como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” ó “mediana (rango intercuartílico)” según presenten una distribución normal o no, respectivamente. PU: unidades de perfusión.

**Tabla 14. Test de hiperemia reactiva a la isquemia mediante Flujimetría por láser-doppler a nivel basal según diagnóstico de hipertensión.**

	<b>NORMOTENSOS</b> n = 13	<b>HIPERTENSOS</b> n = 17	<b>p</b>
<b>Valor máximo (PU)</b>	45,6 (37,3 – 71,6)	44,8 (38,9 – 55,9)	0,851
<b>Área bajo la curva (PU/seg)</b>	3414,7 (3046,7 – 4652,2)	4314,2 (3596,2 – 5062,7)	0,217
<b>Pendiente (PU/seg)</b>	0,02 (0,01 – 0,03)	0,02 (0,01 – 0,02)	0,153
<b>Pico de flujo (PU)</b>	43,1 ± 18,5; IC95% 31,9, 54,3	40,5 ± 14,5; IC95% 33,0, 47,9	0,664
<b>Tiempo hasta la mitad antes de máxima hiperemia (seg)</b>	3,0 ± 1,6; IC95% 2,1, 4,0	4,0 ± 1,2; IC95% 3,4, 4,7	<b>0,066</b>
<b>Tiempo hasta máxima hiperemia (seg)</b>	11,8 ± 4,6; IC95% 9,0, 14,6	12,2 ± 3,5; IC95% 10,4, 14,0	0,794
<b>Tiempo hasta la mitad después de máxima hiperemia (seg)</b>	23,2 ± 8,4; IC95% 17,9, 28,5	27,6 ± 8,82; IC95% 23,1, 32,2	0,184
<b>Área de hiperemia (PU/seg)</b>	1091,6 (908,5 – 1397,3)	1072,9 (689,2 – 1342,5)	0,950

Parámetros expresados como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” ó “mediana (rango intercuartílico)” según presenten una distribución normal o no, respectivamente. PU: unidades de perfusión.

### *Marcadores de fibrosis*

Los niveles de propéptido C-terminal y telopéptido de colágeno tipo I (PICP e ICTP, respectivamente) así como del cociente PICP/ICTP, a nivel basal y tras 3 meses de tratamiento con CPAP, se muestran en la tabla 15. No se objetivaron diferencias en dichos parámetros tras la intervención con CPAP.

Los niveles basales de PICP e ICTP fueron similares en los pacientes normotensos e hipertensos ( $p > 0.670$ , tabla 16), si bien al relacionar ambos marcadores se objetivó una tendencia (no estadísticamente significativa) a un mayor cociente PICP/ICTP en aquellos pacientes con historia de hipertensión (mediana 0.15 [RIC 0.11 – 0.17] vs. pacientes no hipertensos: 0.11 [0.09 – 0.13],  $p = 0.123$ ) seguida de un descenso significativo tras 3 meses de tratamiento con CPAP (PICP/ICTP final 0.12, RIC 0.09 – 0.13,  $p = 0.041$ ) que no se objetivó en los pacientes normotensos ni para cada uno de los marcadores de forma aislada (tablas 9 y 16).

**Tabla 15. Marcadores de fibrosis a nivel basal y tras 3 meses de tratamiento con CPAP.**

	Basal	3 meses con CPAP	p
Propéptido PICP (ng/ml)	37,0 (25,5 – 45,4)	35,5 (28,2 – 43,5)	0,749
Telopéptido ICTP (pg/ml)	256,9 (226,5 – 373,2)	309,5 (237,0 – 407,8)	0,321
PICP / ICTP	0,12 (0,09 – 0,17)	0,11 (0,09 – 0,13)	0,183

Parámetros expresados como mediana (rango intercuartílico). ICTP: Telopéptido del colágeno tipo I. PICP: propéptico C-terminal de colágeno tipo I.

**Tabla 16. Marcadores de fibrosis a nivel basal según diagnóstico de hipertensión.**

	NORMOTENSOS n = 13	HIPERTENSOS n = 17	p
Propéptido PICP (ng/ml)	34,4 (27,8 – 46,7)	37,7 (24,7 – 44,7)	0,930
Telopéptido ICTP (pg/ml)	320,7 ± 104,4; IC95% 257,6, 383,8	294,7 ± 202,4; IC95% 186,8, 402,5	0,678
Cociente PICP / ICTP	0,11 (0,09 – 0,13)	0,15 (0,11 – 0,17)	0,123

Parámetros expresados como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” ó “mediana (rango intercuartílico)” según presenten una distribución normal o no, respectivamente. ICTP: Telopéptido del colágeno tipo I. PICP: propéptico C-terminal de colágeno tipo I.

A nivel basal, los niveles de PICP y sobre todo los de ICTP se correlacionaron positivamente de forma significativa con distintos parámetros de presión arterial como las PA sistólicas, diastólicas y medias de 24 horas, diurnas y nocturnas y cargas de PA. Dichas correlaciones no se objetivaron para el cociente PICP/ICTP, que sí se asoció en cambio con un mayor IMC ( $r = 0.51$ ,  $p=0.006$ ), mayor índice de resistencia a la insulina ( $r = 0.43$ ,  $p=0.027$ ), menor sensibilidad a la insulina ( $r = -0.45$ ,  $p=0.020$ ) y niveles superiores de PCRus ( $r = 0.51$ ,  $p=0.018$ ; en este caso debido fundamentalmente a la asociación inversa del ICTP con los niveles de PCRus:  $r = -0.59$ ,  $p=0.004$ , sin correlación entre PICP y PCRus [ $p=0.225$ ]).

### VEGF, micropartículas CD31+/Anexina V+ y DNA libre circulante

Los resultados de dichos marcadores experimentales se muestran en la tabla 17. Los niveles basales de factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endothelial growth factor, VEGF) se incrementaron tras el periodo de tratamiento con CPAP ( $p=0.049$ ). Por el contrario, los valores de micropartículas (MP) y DNA libre circulante (cfDNA) disminuyeron significativamente ( $p=0.030$  y  $p=0.003$ , respectivamente).

En el análisis de subgrupos según diagnóstico de hipertensión se comprobó la presencia de niveles basales significativamente más elevados de MP en aquellos sujetos hipertensos comparado con los normotensos ( $p=0.008$ ; tabla 18). En cambio, los niveles basales fueron similares para ambos grupos en el caso del VEGF y cfDNA ( $p=0.340$  y  $p=0.729$ , respectivamente; tabla 18).

De forma destacada, en todos los casos (VEGF, MP y cfDNA) los cambios observados en el conjunto de la muestra tras los 3 meses de tratamiento con CPAP tuvieron lugar fundamentalmente a expensas de los pacientes hipertensos, donde disminuyeron los niveles de MP ( $p=0.011$ ) y cfDNA ( $p=0.008$ ) y aumentaron los de VEGF ( $p=0.056$ ), sin observarse cambios significativos tras dicha intervención en el grupo de pacientes normotensos ( $p>0.110$ ; tabla 19).

**Tabla 17. Micropartículas, factor de crecimiento vascular endotelial y DNA libre circulante a nivel basal y tras 3 meses de tratamiento con CPAP.**

	Basal	3 meses con CPAP	p
VEGF (pg/ml)	602.0 ± 234.2; IC95% 507.5, 696.6 626.1 (492.9 – 715.1)	641.1 ± 212.7; IC95% 555.2, 727.0 676.4 (484.0 – 774.7)	<b>0.049</b>
MP CD31+/Anexina V+ (MP/μL)	69.6 ± 62.6; IC95% 42.5, 96.7 47.0 (23.0 – 96.0)	39.8 ± 22.1; IC95% 30.2, 49.4 40.0 (19.5 – 54.0)	<b>0.030</b>
cfDNA (ng/ml)	187.9 ± 115.8; IC95% 139.0, 236.8 179.0 (95.4 – 236.0)	121.3 ± 79.0; IC95% 87.9, 154.6 95.8 (65.1 – 141.0)	<b>0.003</b>

Parámetros expresados como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” y “mediana (rango intercuartílico)”. cfDNA: DNA libre circulante (circulating cell-free DNA). MP: micropartículas. VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endothelial growth factor).

**Tabla 18. Micropartículas apoptóticas endoteliales, factor de crecimiento vascular endotelial y DNA libre circulante a nivel basal según diagnóstico de hipertensión.**

	<b>NORMOTENSOS</b> n = 13	<b>HIPERTENSOS</b> n = 17	<b>p</b>
<b>VEGF (pg/ml)</b>	650.3 ± 245.2; IC95% 494.5, 806.1 686.5 (554.2 – 768.7)	560.6 ± 224.9; IC95% 430.8, 690.5 583.5 (410.2 – 685.0)	0.340
<b>MP CD31+/Anexina V+ (MP/μL)</b>	29.1 ± 25.2; IC95% 8.0, 50.2 20.5 (11.5 – 41.5)	91.2 ± 66.3; IC95% 54.4, 127.9 74.0 (41.0 – 110.5)	<b>0.008</b>
<b>cfDNA (ng/ml)</b>	181.0 ± 121.7; IC95% 103.6, 258.3 175.5 (68.9 – 248.0)	194.8 ± 114.5; IC95% 122.1, 267.6 179.0 (115.0 – 223.5)	0.729

Parámetros expresados como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” y “mediana (rango intercuartílico)”. cfDNA: DNA libre circulante (circulating cell-free DNA). MP: micropartículas. VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endothelial growth factor). U: unidades.

**Tabla 19. Diferencias en los niveles de VEGF, EMP y cfDNA tras 3 meses de tratamiento con CPAP (vs. basal) según diagnóstico inicial de hipertensión.**

Parámetros expresados como “media ± SD e intervalo de confianza al 95% para la media” y “mediana (rango intercuartílico)”. VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endothelial growth factor). U: unidades.

	<b>Basal</b>	<b>3 meses con CPAP</b>	<b>p</b>
<b>VEGF (pg/ml)</b>			
<b>Normotensos</b>	650.3 ± 245.2; IC95% 494.5, 806.1 686.5 (554.2 – 768.7)	674.8 ± 210.4; IC95% 541.1, 808.5 684.6 (629.3 – 764.0)	0.480
<b>Hipertensos</b>	560.6 ± 224.9; IC95% 430.8, 690.5 583.5 (410.2 – 685.0)	612.1 ± 218.1; IC95% 486.2, 738.1 591.0 (435.5 – 819.8)	<b>0.056</b>
<b>MICROPARTÍCULAS CD31+/Anexina V+ (MP/μL)</b>			
<b>Normotensos</b>	29.1 ± 25.2; IC95% 8.0, 50.2 20.5 (11.5 – 41.5)	31.1 ± 16.8; IC95% 17.0, 45.1 25.0 (18.5 – 41.5)	0.779
<b>Hipertensos</b>	91.2 ± 66.3; IC95% 54.4, 127.9 74.0 (41.0 – 110.5)	44.4 ± 23.7; IC95% 31.3, 57.6 46.0 (24.0 – 57.0)	<b>0.011</b>
<b>DNA LIBRE CIRCULANTE (ng/ml)</b>			
<b>Normotensos</b>	181.0 ± 121.7; IC95% 103.6, 258.3 175.5 (68.9 – 248.0)	133.7 ± 102.3; IC95% 68.7, 198.7 91.8 (58.3 – 208.0)	0.117
<b>Hipertensos</b>	194.8 ± 114.5; IC95% 122.1, 267.6 179.0 (115.0 – 223.5)	108.8 ± 47.2; IC95% 78.8, 138.8 97.9 (71.5 – 134.5)	<b>0.008</b>

No se observaron correlaciones significativas de los tres marcadores entre sí a nivel basal ni asociación con la severidad del SAHS determinada por el IAH o ID. Niveles iniciales superiores de cfDNA se correlacionaron positivamente con las cifras de PA media durante el día ( $r = 0.42$ ,  $p=0.042$ ) y con los niveles plasmáticos de creatinina ( $r = 0.42$ ,  $p=0.039$ ).

La relación entre la severidad del SAOS y el cambio (delta) experimentado en los niveles de MP, VEGF y cfDNA entre la situación basal y tras 3 meses con CPAP se muestra en la tabla 20. Brevemente, una menor severidad del SAOS se asoció a mayores cambios en los niveles de MP y cfDNA, mientras que un mayor IAH e ID se correlacionaron con mayores cambios en los niveles de VEGF.

Finalmente, cifras más elevadas de presión arterial a nivel basal se correlacionaron positivamente con mayores cambios en los niveles de cfDNA durante el tratamiento con CPAP (tabla 21).

**Tabla 20. Severidad de SAHS medida por poligrafía respiratoria y cambio en los niveles de MP, VEGF y cfDNA tras 3 meses de tratamiento con CPAP**

	$\Delta$ MP	$\Delta$ VEGF	$\Delta$ cfDNA
Índice apnea-hipopnea	-0.344 (0.108)	<b>0.442</b> <b>(0.024)</b>	<b>-0.427</b> <b>(0.037)</b>
Índice de Desaturación	-0.358 (0.093)	<b>0.427</b> <b>(0.030)</b>	-0.389 (0.060)
Saturación O2 basal	0.261 (0.240)	0.008 (0.971)	0.053 (0.811)
Saturación O2 media	<b>0.422</b> <b>(0.045)</b>	-0.208 (0.307)	<b>0.434</b> <b>(0.034)</b>
Saturación O2 mínima	<b>0.427</b> <b>(0.042)</b>	-0.249 (0.219)	<b>0.453</b> <b>(0.026)</b>
CT 90%	-0.267 (0.217)	0.165 (0.419)	<b>-0.490</b> <b>(0.015)</b>

Parámetros expresados como  $r$  ( $p$ ) [coeficiente de correlación -rho de Spearman- y valor de  $p$ ]. cfDNA: DNA libre circulante. CT90%: porcentaje de tiempo durante la polisomnografía con saturación de oxígeno inferior al 90%. MP: micropartículas CD31+/Anexina V+. VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endotelial growth factor).

**Tabla 21. Presión arterial basal medida por MAPA y cambio en los niveles de cfDNA tras 3 meses de tratamiento con CPAP**

	<b>Δ cfDNA</b>
TA Sistólica media 24 h	<b>0.450</b> <b>(0.027)</b>
TA Diastólica media 24 h	<b>0.450</b> <b>(0.027)</b>
TA Sistólica media diurna	<b>0.545</b> <b>(0.006)</b>
TA Diastólica media diurna	<b>0.526</b> <b>(0.008)</b>
TA Sistólica media nocturna	0.152 (0.488)
TA Diastólica media nocturna	0.263 (0.225)
TA Media 24 h	<b>0.454</b> <b>(0.026)</b>
TA Media día	<b>0.588</b> <b>(0.003)</b>
TA Media noche	0.242 (0.265)

Parámetros expresados como r (p) [coeficiente de correlación -rho de Spearman- y valor de p]. cfDNA: DNA libre circulante. TA: tensión arterial.

**CELL-DERIVED  
MICROPARTICLES IN  
PATIENTS WITH SLEEP  
APNEA-HYPOPNEA  
SYNDROME:  
A SYSTEMATIC REVIEW**

# **CELL-DERIVED MICROPARTICLES IN PATIENTS WITH SLEEP APNEA-HYPOPNEA SYNDROME: A SYSTEMATIC REVIEW**

## **OBJECTIVE**

---

We aimed to perform a systematic review of all published studies assessing the role of cell-derived microparticles (MP, whether endothelial, leukocyte, platelet or other phenotype) in patients with sleep apnea-hypopnea syndrome (SHAS), in order to summarize the current knowledge about the clinical role of the cell-derived MP in these type of patients as well as to compare our results on microparticles with those already published in the literature and thus to put them into context.

## **METHODS**

---

The studies were eligible if they reported the measurement of any type of cell-derived MP (endothelial, leukocyte, platelet, or other phenotype) in patients with a confirmed diagnosis of SAHS (irrespective of its severity and treatment with or without CPAP). Any type of study design was considered. Conference abstracts were not taken into consideration due to the limited information included. No other exclusion criteria were established provided that the study met the inclusion criteria.

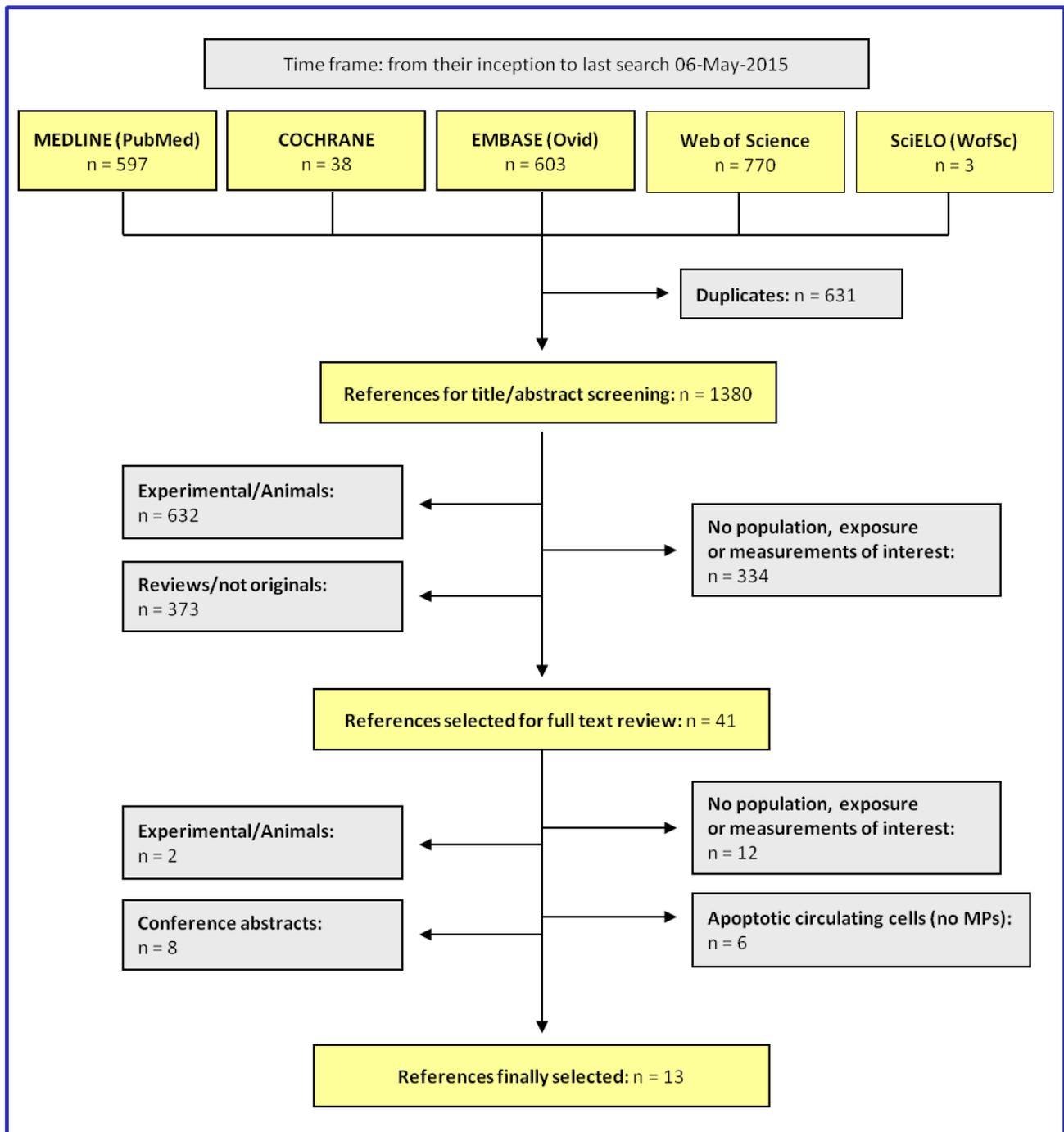
We carried out a systematic and comprehensive search of the published literature in peer-review journals through the electronic databases Medline (via Pubmed), EMBASE (via OvidSP), Cochrane Library, Web of Science and SciELO (via Web of Science). Databases were examined from their inception to May, 2015, and no restrictions or limits were entered. Free terms, as well as MeSH terms (Medical Subject Headings, in case of Medline) and “headings” (in case of EMBASE) were used. The key terms that we used as well as the search strategy that we defined for each database are shown in table 22.

The search and screening performed are described in detail in figure 9. Briefly, the references retrieved from the search in each database were merged in an EndNote<sup>®</sup> file (EndNote X7.3.1. Thomson Reuters 2015) and the duplicate references were discarded. The resulting references (n=1380) were then screening by title and/or abstract and those who clearly could be identified not fulfilling the inclusion criteria were excluded. The 41 remaining papers from this first screening were then subjected to full text review to check whether the inclusion criteria were met, leading to a total number of 13 studies ultimately selected for inclusion in the review. Finally, the bibliography from the selected articles and from relevant review papers were manually scrutinized for possible additional articles not previously identified during the search, though no new references were added from this step. The search was performed independently by AJVV; in case of doubt, additional investigators were consulted and a decision made by consensus.

Data were abstracted from each study according to a formal question excel spreadsheet. The data collected included details about the type and design of the study; inclusion/exclusion criteria and SAHS diagnosis; sample size; general, demographic, clinical and SAHS-related characteristics of patients; interventions (CPAP) and follow-up where applicable; cell-derived MP and measurement methods; results and outcome; and other data that could be considered relevant from each particular study.

Descriptive statistics for individual studies are described. The differences observed among the studies (e.g. different study designs, type of patients, differences in the MP markers and measurements, etc.) and, therefore, the considered significant heterogeneity identified, prevented us to carry out any pooled meta-analyses of the studies.

**Figure 9. Search strategy flow chart**



See Table ..... for detailed search strategy and key terms entered for each database.

**Table 22. Systematic review: search strategy.**

SEARCH STRATEGY
<p><b>Medline (Pubmed)</b></p> <p>((Cell-derived Microparticles) OR ("Cell-Derived Microparticles"[Mesh]) OR (Microparticle) OR (Microparticles) OR (Membrane Particles) OR (Ectosome) OR (Ectosomes) OR (Cell-derived Microvesicles) OR (Microvesicle) OR (Microvesicles) OR (Membrane Vesicles) OR (Exosome) OR (Exosomes) OR ("Exosomes"[Mesh]) OR (Exosome-like Vesicle) OR (Exosome-like Vesicles) OR (Apoptotic Body) OR (Apoptotic Bodies) OR ("Annexin V") OR ("Annexin 5") OR ("Annexin A5"[Mesh]) OR (Phosphatidylserine) OR ("Phosphatidylserines"[Mesh]) OR (Membrane Shedding) OR (Apoptosis) OR ("Apoptosis"[Mesh]) OR (Cell Activation) OR (Mechanical Stress) OR ("Stress, Mechanical"[Mesh])) AND ((Sleep apnea syndrome) OR ("Sleep Apnea Syndromes"[Mesh]) OR (Central Apnea) OR ("Sleep Apnea, Central"[Mesh]) OR (Obstructive Apnea) OR ("Sleep Apnea, Obstructive"[Mesh]) OR (OSA) OR (Apnea syndrome) OR (Sleep apnea) OR (Apnea Hypopnea) OR (Sleep Hypopnea) OR (Sleep Apnea Hypopnea Syndrome) OR (SAHS) OR (Apnea Hypopnea Index) OR (Continuous Positive Airway Pressure) OR ("Continuous Positive Airway Pressure"[Mesh]) OR (CPAP) OR (Polysomnography) OR ("Polysomnography"[Mesh]) OR (sleep breathing disorder))</p>
<p><b>Cochrane Library</b></p> <p>((cell-derived microparticles) OR (microparticle) OR (microparticles) OR (membrane particles) OR (membrane microparticle) OR (ectosome) OR (ectosomes) OR (cell-derived microvesicles) OR (microvesicle) OR (membrane vesicle) OR (microvesicles) OR (exosome) OR (exosomes) OR (exosome-like vesicle) OR (exosome-like vesicles) OR (apoptotic body) OR (apoptotic bodies) OR (annexin 5) OR (annexin v) OR (annexin a5) OR (phosphatidylserine) OR (membrane shedding) OR (apoptosis) OR (cell activation) OR (mechanical stress) OR (shear stress) OR (shear stress)) AND ((sleep apnea syndrome) OR (central apnea) OR (central sleep apnea syndrome) OR (obstructive apnea) OR (osa) OR (apnea syndrome) OR (sleep apnea) OR (apnea hypopnea) OR (sleep hypopnea) OR (sleep apnea hypopnea syndrome) OR (sahs) OR (apnea hypopnea index) OR (continuous positive airway pressure) OR (positive end expiratory pressure) OR (cpap) OR (polysomnography) OR (sleep breathing disorder) OR (sleep disordered breathing))</p>
<p><b>EMBASE (OvidSP)</b></p> <p>(cell-derived microparticles.mp. or leukocyte microparticle/ or platelet microparticle/ or endothelial microparticle/ or microparticle.mp. or microparticles.mp. or membrane particles.mp. or membrane microparticle/ or ectosome.mp. or ectosomes.mp. or cell-derived microvesicles.mp. or microvesicle.mp. or membrane vesicle/ or microvesicles.mp. or exosome.mp. or exosome/ or exosomes.mp. or exosome-like vesicle.mp. or exosome-like vesicles.mp. or apoptotic body.mp. or apoptotic bodies.mp. or annexin 5.mp. or annexin/ or annexin v.mp. or annexin a5.mp. or phosphatidylserine.mp. or phosphatidylserine/ or membrane shedding.mp. or apoptosis.mp. or apoptosis/ or cell activation.mp. or cell activation/ or mechanical stress.mp. or mechanical stress/ or shear stress.mp. or shear stress/) AND (sleep apnea syndrome.mp. or central apnea.mp. or central sleep apnea syndrome/ or obstructive apnea.mp. or osa.mp. or apnea syndrome.mp. or sleep apnea syndrome/ or sleep apnea.mp. or apnea hypopnea.mp. or sleep hypopnea.mp. or sleep apnea hypopnea syndrome.mp. or sahs.mp. or apnea hypopnea index.mp. or apnea hypopnea index/ or continuous positive airway pressure.mp. or positive end expiratory pressure/ or cpap.mp. or polysomnography.mp. or polysomnography/ or sleep breathing disorder.mp. or sleep disordered breathing/)</p>
<p><b>WEB OF SCIENCE</b></p> <p>((cell-derived microparticles) OR (microparticle) OR (microparticles) OR (membrane particles) OR (membrane microparticle) OR (ectosome) OR (ectosomes) OR (cell-derived microvesicles) OR (microvesicle) OR (membrane vesicle) OR (microvesicles) OR (exosome) OR (exosomes) OR (exosome-like vesicle) OR (exosome-like vesicles) OR (apoptotic body) OR (apoptotic bodies) OR (annexin 5) OR (annexin v) OR (annexin a5) OR (phosphatidylserine) OR (membrane shedding) OR (apoptosis) OR (cell activation) OR (mechanical stress) OR (shear stress) OR (shear stress)) AND ((sleep apnea syndrome) OR (central apnea) OR (central sleep apnea syndrome) OR (obstructive apnea) OR (osa) OR (apnea syndrome) OR (sleep apnea) OR (apnea hypopnea) OR (sleep hypopnea) OR (sleep apnea hypopnea syndrome) OR (sahs) OR (apnea hypopnea index) OR (continuous positive airway pressure) OR (positive end expiratory pressure) OR (cpap) OR (polysomnography) OR (sleep breathing disorder) OR (sleep disordered breathing))</p>
<p><b>SciELO</b></p> <p>((cell-derived microparticles) OR (microparticle) OR (microparticles) OR (membrane particles) OR (membrane microparticle) OR (ectosome) OR (ectosomes) OR (cell-derived microvesicles) OR (microvesicle) OR (membrane vesicle) OR (microvesicles) OR (exosome) OR (exosomes) OR (exosome-like vesicle) OR (exosome-like vesicles) OR (apoptotic body) OR (apoptotic bodies) OR (annexin 5) OR (annexin v) OR (annexin a5) OR (phosphatidylserine) OR (membrane shedding) OR (apoptosis) OR (cell activation) OR (mechanical stress) OR (shear stress) OR (shear stress)) AND ((sleep apnea syndrome) OR (central apnea) OR (central sleep apnea syndrome) OR (obstructive apnea) OR (osa) OR (apnea syndrome) OR (sleep apnea) OR (apnea hypopnea) OR (sleep hypopnea) OR (sleep apnea hypopnea syndrome) OR (sahs) OR (apnea hypopnea index) OR (continuous positive airway pressure) OR (positive end expiratory pressure) OR (cpap) OR (polysomnography) OR (sleep breathing disorder) OR (sleep disordered breathing))</p>

CPAP: continuous positive airway pressure. OSA: obstructive sleep apnea. SAHS: sleep apnea-hypopnea syndrome.

## RESULTS

---

A total of 13 studies<sup>95-109</sup> were included, involving a total of 462 patients with SAHS (“cases”, n=141 children and n=321 adults) and 294 control subjects. In all studies, the cases had obstructive SAHS (obstructive sleep apnea, OSA). A detailed description of the design, characteristics of patients and measurements and results is shown in the tables 23 to 28. All but one study were observational studies including convenience samples (table 23): 9 non-prospective case-control studies and 3 non-randomized non-controlled clinical trial (intervention with CPAP therapy in those cases where it was indicated [quasiexperimental design]). Only one study was a randomized controlled clinical trial (allocation to continue with CPAP therapy or to switch to sub-therapeutic CPAP for 2 weeks in patients already treated with CPAP, double blinded)<sup>106</sup>. Four studies were published by the same group in France (Priou P et al 2010, Trzepizur W et al 2011, and Tual-Chalot S et al 2012 and 2014)<sup>100,103,105,109</sup> and additionally 2 authors reported 2 studies each (Ayers L et al 2009 and 2013<sup>98,106</sup>, and Kim J et al 2011 and 2013<sup>102,108</sup>). Two works were communicated in the form of a correspondence<sup>96</sup> and a letter<sup>103</sup>, respectively, with limited information reported (table 23).

As shown in the tables 23 and 24, most studies compared OSA vs. non-OSA patients at baseline. In one case it was in a background of pulmonary hypertension<sup>96</sup>; in 2 studies the individuals were children<sup>102,108</sup>; Priou P et al 2010 defined instead a desaturator and a non-desaturator group for comparison<sup>100</sup>. Only 3 studies (comprising a limited total number of 35 patients) evaluated the effect of treatment with CPAP on a non-controlled followed-up cohort of OSA patients, 2 of them with a short follow-up less than 6 weeks and the remaining study (n=7) with a mean follow-up of 6 months<sup>99,101,104</sup>. A fourth study assessed, instead, the effect of CPAP withdrawal in OSA patients already under this therapy<sup>106</sup>. The inclusion and exclusion criteria for each study are described in detail in the table 24. The apnea-hypopnea index (AHI) for inclusion in the studies, when reported, ranged from  $\geq 5$  to  $\geq 15$  ( $\geq 1$  in children).

The characteristics of patients finally included in the studies are shown in the tables 25 and 26. The severity of OSA was variable, ranging from mild to severe (table 25). Adult patients were relatively young; by large, most patients included were males; mean BMI varied between slightly overweight to overt obesity (means  $< 35$  kg/m<sup>2</sup>); cardiovascular risk factors

and prevalence of smoking were, again, variables; in general, there was a lack of a comprehensive report of the characteristics of the patients (table 26).

Analytical procedures and technical considerations are shown in the table 27. Both citrate and EDTA were used as anticoagulants; in all but one case platelet-poor plasma were used, though the centrifugation procedure to obtain it was variable. Flow cytometry was used to measure the cell-derived microparticles (MP), except in one case where the ELISA technique was used. As detailed in the table 28, different phenotypic MP were measured in the studies, including platelet (PMP), endothelial (EMP), endothelial progenitor (EpMP), leukocyte (LMP), lymphocyte (LyMP), granulocyte (GMP), erythrocyte (ErMP) and annexin V positive MP; different markers were considered to differentiate these MP; at the same time, in many cases the authors used distinct markers to differentiate the same phenotypic type of MP (table 28).

In the table 28 we described the results reported by each study. The cross-sectional analyses at baseline comparing OSA and non-OSA adult patients reported by the different studies showed controversial results for any phenotypic type of MP with either no significant differences between both groups or with increased levels of MP in OSA patients. The reported results, therefore, do not allow to extract further conclusions. Geiser T et al (2009) did not find significant changes in PMP between 4 am and 7 am<sup>95</sup>; Trzepizur W et al (2011) reported a decreased in LMP levels from evening to morning in the control group but a significant increase in moderate-to-severe OSA patients<sup>103</sup>. The only study reporting results in children (Kim J et al 2011)<sup>102</sup> showed higher levels of different MP in OSA patients than controls and they may be related to the AHI (a second article from the same author<sup>108</sup> in children did not report the results of the measured MP, see table 28).

The results regarding the effect of CPAP therapy on MP are very limited (table 28). Two trials assessed EMP: Jelic S et al 2009<sup>99</sup> and Yun CH et al 2010<sup>101</sup>; in both of them there were no significant changes in CD31+/CD42- EMP levels after 4-6 weeks of treatment with CPAP; Yun CH et al also assessed CD31+/Annexin V+, again without significant changes, but, conversely, they found that E-selectin positive EMP (CD62E+) levels decreased significantly after CPAP therapy. The only trial (Maruyama K et al, 2012) that assessed PMP (ELISA technique) found their levels to significantly decrease after treatment with CPAP in 7 patients

with OSA followed-up for a mean of  $6.0 \pm 1.4$  months<sup>104</sup>. Finally, Ayers L et al (2013)<sup>106</sup> studied the effect of 2-week CPAP withdrawal in OSA patients previously under this therapy for at least 12 months; the cessation of CPAP (placebo sub-therapeutic CPAP administered instead) resulted in a significant increase of EMP (E-selectin and CD106 positive but not CD31+/cd41-EMP) and GMP, levels with no changes in PMP (by flow cytometry) or LMP.

The significant observed heterogeneity among the investigations, posed by the different characteristics of the studies and patient populations, technical procedures and markers used to identify the different MP, as well as the limitations of the reported results, prevented us to carry out any pooled meta-analysis of the data.

**Table 23. Studies reporting on Microparticles in patients with sleep apnoea syndrome**

Reference	Type of article	Country	Design	Overview	CPAP therapy	N patients	N controls
<b>Geiser T et al, 2002</b>	Original	Switzerland	Case-control, not prospective	OSA vs non-OSA individuals, at 4 and 7 am and with and without CPAP	2 nights	12	6
<b>Amabile N et al, 2009</b>	Correspondence	USA	Case-control, not prospective	Pulmonary hypertension with OSA vs non-OSA patients	NA	7	18
<b>Ayers L et al, 2009</b>	Original	UK	Case-control, not prospective	Minimally symptomatic OSA vs non OSA individuals	NA	57	15
<b>Jelic S et al, 2009</b>	Original	USA	Case-control baseline; FU cases (non-randomized non-controlled clinical trial)	Newly diagnosed non-obese OSA vs non-OSA	4 weeks n=7	16	16
<b>Priou P et al, 2010</b>	Original	France	Case-control, not prospective	Desaturator group vs non-desaturator group of patients	NA	35	27 (n=7 with OSA)
<b>Yun CH et al, 2010</b>	Original	South Korea	Case-control baseline; FU cases (non-randomized non-controlled clinical trial)	OSA vs non-OSA individuals	4-6 weeks n=21	82	22
<b>Kim J et al, 2011</b>	Original	USA	Case-control, not prospective	Children with vs without OSA	NA	79	56
<b>Trzepizur W et al, 2011</b>	Letter	France	Case-control, not prospective	OSA vs non-OSA individuals, at evening and morning	NA	23	15
<b>Maruyama K et al, 2012</b>	Original	Japan	Case-control baseline; FU cases (non-randomized non-controlled clinical trial)	OSA vs non-OSA individuals	>1 month (mean 6.0 ±1.4) n=7	27	19
<b>Tual-Chalot S et al, 2012</b>	Original	France	Case-control, not prospective	OSA vs non-OSA individuals	NA	22	20
<b>Ayers L et al, 2013</b>	Original	Switzerland	Randomized controlled clinical trial, double blind. Cases: continue with CPAP therapy; Controls: switch to subtherapeutic CPAP for 2 weeks	CPAP withdrawal vs not in OSA patients treated with CPAP	2 weeks; Cases: CPAP therapy; Controls: subtherapeutic CPAP	20	21 (all with OSA)
<b>Kim J et al, 2013</b>	Original	USA	Case-control, not prospective	Children with vs without OSA	NA	62	44
<b>Tual-Chalot S et al, 2014</b>	Original	France	Case-control, not prospective	OSA vs non-OSA individuals	NA	20	15

CPAP: continuous positive airway pressure. NA: not applicable. OSA: obstructive sleep apnoea.

**Table 24. Patients and controls included in the different studies (inclusión/exclusión criteria) and obstructive sleep apnoea diagnosis**

Reference	Cases	Exclusion Criteria	Control	OSA diagnosis
<b>Geiser T et al, 2002</b>	Consecutive OSA patients hospitalized on a routine basis for CPAP training; AHI >10/h	Treatment with anticoagulants, aspirin or glucocorticoids	Healthy volunteers; no OSA (AHI <10/h); no CV risk factors; non-smokers; BMI 23.2±0.7 kg/m <sup>2</sup>	Clinical history and polysomnography. AHI >10/h
<b>Amabile N et al, 2009</b>	Precapillary pulmonary hypertension with scheduled right heart catheterization; no endothelium-active vasodilator therapy, OSA; ≥18 y	LVEF <50%, LVED pressure >15 mmHg, recent pulmonary embolism, aortic or mitral regurgitation or stenosis, chronic renal failure, ACS, hemolytic anemia syndromes, uncontrolled systemic hypertension	Same inclusion/exclusion criteria, without OSA	Polysomnography based on clinical suspicion
<b>Ayers L et al, 2009</b>	Minimally symptomatic OSA; ODI-4% >7.5 events/h; no history of excessive daytime sleepiness or any other daytime symptom of OSA which would have justified a trial of CPAP therapy; 45-75 y		45-75 y; no history of OSA; ODI-4% <5 events/h; AHI <5/h (home sleep study); matched for age, sex, BMI, waist-to-hip ratio and CV comorbidities	One-night in-hospital respiratory polygraphic sleep study. ODI-4% >7.5 event/h
<b>Jelic S et al, 2009</b>	Newly diagnosed OSA; BMI <30 kg/m <sup>2</sup> ; free of conditions known to affect vascular endothelium; AHI ≥5/h	Dyslipidemia; DM; CV, neurological, pulmonary or renal disease; former and current smokers; patients receiving medications or nutritional supplements	Non-smoking healthy subjects not receiving medications or nutritional supplements; recruited from the community; matched for age, gender and BMI; AHI <5	Nocturnal polysomnography. AHI ≥5 obstructive events/h
<b>Priou P et al, 2010</b>	Males; 18-65 y; ODI-3% ≥10 events/h of sleep ("desaturator group")	Previous OSA treatment; history of CAD, HF, stroke, hypertension, DM, dyslipidemia; receiving any drug known to affect endothelial function	Same inclusion/exclusion criteria but with ODI-3% <10% events/h of sleep ("nondesaturator group")	Nocturnal polysomnography. AHI >15
<b>Yun CH et al, 2010</b>	Consecutive adults ≥20 y with history of habitual snoring or observed apnoeas; OSA with AHI ≥5	Central sleep apnea; other sleep disorders; history of CV, cerebrovascular, pulmonary, renal, hepatic, hematological, inflammatory, autoimmune, malignancy, migraine, thyroid or psychiatric disease; recent trauma; current use of vitamin, anti-inflammatory drugs, aspirin; inability to understand the consent form	Same inclusion/exclusion criteria but AHI <5	Nocturnal polysomnography. AHI ≥5
<b>Kim J et al, 2011</b>	Consecutive healthy children with OSA; AHI >1/h; 4-12 y	DM or pre-DM; genetic abnormality; underlying systemic disease; previous (1 month) any acute infectious process	Children with AHI <1/h; no O <sub>2</sub> desaturation events	Nocturnal polysomnography; obstructive AHI >1/h total sleep time, and a nadir SatO <sub>2</sub> <92%
<b>Trzepizur W et al, 2011</b>	Consecutive males 18-70 y investigated for suspected OSA; AHI ≥5/h	Previous OSA treatment; BMI ≥35 kg/m <sup>2</sup> ; history of CAD, HF, stroke, hypertension, DM, dyslipidemia; receiving any drug known to affect endothelial function	Same inclusion/exclusion criteria but AHI <5	Polysomnography or respiratory recording. AHI ≥5 events/h
<b>Maruyama K et al, 2012</b>	OSA; AHI >5/h	Anticoagulant or antithrombotic medication	Healthy subjects with no history of OSA	Polysomnography. AHI >5 events/h

**Table 24 (continuation)**

Reference	Cases	Exclusion Criteria	Control	OSA diagnosis
<b>Tual-Chalot S et al, 2012</b>	Consecutive males 19-70 y investigated for suspected OSA; AHI $\geq 5/h$	Previous OSA treatment; BMI $\geq 35$ kg/m <sup>2</sup> ; history of CAD, HF, stroke, hypertension, DM, dyslipidemia; receiving any drug known to affect endothelial function	Same inclusion/exclusion criteria but AHI <5	Polysomnography or respiratory recording. AHI $\geq 5$ events/h
<b>Ayers L et al, 2013</b>	OSA patients treated with CPAP for >12 months with a minimal average compliance of 4 h/night; ODI-4% >10/h in the initial sleep study, ODI-4% >10/h during an ambulatory nocturnal pulse oxymetry study performed at the end of a 4-night period without CPAP; 20-75 y	Previous diagnosis of ventilatory failure, Cheyne Stokes breathing, unstable and untreated coronary or peripheral artery disease, severe and inadequately controlled hypertension, history of any sleep-related accident, professional drivers	Same inclusion/exclusion criteria but treated with sub-therapeutic CPAP (placebo-CPAP)	Polysomnographic sleep studies. ODI-4% >10/h
<b>Kim J et al, 2013</b>	Children with OSA; AHI $\geq 1/h$ ; 5-10 y	DM, pre-DM, any defined genetic abnormality or underlying systemic disease, acute infectious processes	Healthy nonsnoring children without OSA (AHI <1/h) who underwent overnight polysomnography; age, sex and ethnicity matched	Polysomnography. AHI $\geq 1/h$
<b>Tual-Chalot S et al, 2014</b>	Consecutive male patients investigated by polysomnography for suspected OSA; AHI $\geq 5/h$ ; 19-70 y	Previous OSA treatment; BMI $\geq 35$ kg/m <sup>2</sup> ; history of CAD, HF, stroke, hypertension, DM, dyslipidemia; treatment with any drug known to affect endothelial function	Same inclusion/exclusion criteria but AHI <5	Overnight polysomnography. AHI $\geq 5$ events/h

ACS: acute coronary syndrome. AHI: apnea-hypopnea index. BMI: body mass index. CAD: coronary artery disease. CPAP: continuous positive airway pressure. CV: cardiovascular. DM: diabetes mellitus. HF: heart failure. LVED: left ventricular end diastolic. LVEF: left ventricular ejection fraction. ODI: oxygen desaturation index. ODI-3%: oxygen desaturation of  $\geq 3\%$ . ODI-4%: oxygen desaturation of  $>4\%$ . OSA: obstructive sleep apnoea. SatO<sub>2</sub>: saturation index. y: years.

**Table 25. Obstructive sleep apnoea-related characteristics of the cases included in the different studies**

Reference	Epworth Sleepiness Scale	AHI	SatO2 (%)	ODI (events/h)	CT90 (%)	CPAP adherence
<b>Geiser T et al, 2002</b>		AHI <25: n=6 AHI 25-50: n=5 AHI >50: n=1	SatO2 apneic episodes: 73.6 ± 8.9 %			NA
<b>Amabile N et al, 2009</b>						NA
<b>Ayers L et al, 2009</b>	8.3 ± 3.8			ODI-4%: 23.1 ± 15.0		NA
<b>Jelic S et al, 2009</b>	12 ± 5	22 ± 24	SatO2 nadir: 88 ± 5		1.4 ± 2.6 %	
<b>Priou P et al, 2010</b>	9.1 ± 1.0	31.1 ± 3.1	Mean SatO2: 93.1 ± 0.3	ODI-3%: 31.1 ± 3.6		NA
<b>Yun CH et al, 2010</b>	10.6 ± 4.9	39.1 (20.2-58.0)	Min SatO2: 81.2 (75.0-86.0)			% of days with CPAP use >4h: 89.3 ± 7.1 %. Median h/day 5.83 ± 1.10 h
<b>Kim J et al, 2011</b>		Mild OSA n=65 Mod-Sev OSA n=14	SatO2 nadir: Mild OSA 90.1 ± 3.2 Mod-Sev OSA 79.5 ± 11.6			NA
<b>Trzepizur W et al, 2011</b>		16.2 ± 2.4 AHI ≥15: n=10				NA
<b>Maruyama K et al, 2012</b>		Mild-mod OSA: 15.4 ± 6.5 Severe OSA 45.1 ± 18.3	Min SatO2: Mild-mod OSA 83.8 ± 8.5 Severe OSA 77.3 ± 7.7		Mild-mod OSA: 2.3 ± 4.5 Severe OSA: 13.9 ± 23.0	
<b>Tual-Chalot S et al, 2012</b>	9.9 ± 0.8	21.6 ± 3.2	Mean SatO2: 93.2 ± 0.3	ODI-4%: 15.4 ± 2		NA
<b>Ayers L et al, 2013</b>	13.8 ± 2.6	36 ± 17.3		ODI-4% 26.6 ± 13.5		Cases: 373.1 ± 67.9 min
<b>Kim J et al, 2013</b>		Mild OSA 2.04 ± 0.91 Mod-Sev OSA 15.5 ± 9.5	SatO2 nadir: Mild OSA 89.4 ± 3.5 Mod-Sev OSA 81.2 ± 8.3			NA
<b>Tual-Chalot S et al, 2014</b>	10 ± 1	22.8 ± 3.7	Mean SatO2: 93.2 ± 0.3	19.7 ± 3.4		NA

Blank cells: data not reported. AHI: apnea-hypopnea index. CPAP: continuous positive airway pressure. CT90%: percentage of time during polysomnography with oxygen saturation below 90%. Mild-mod: mild-to-moderate. Min: minimum. Mod-sev: moderate-to-severe. NA: not applicable. ODI: oxygen desaturation index. ODI-3%: oxygen desaturation of ≥3%. ODI-4%: oxygen desaturation of >4%. OSA: obstructive sleep apnoea. SatO2: oxygen saturation.

**Table 26. Characteristics of cases included in the different studies**

Reference	Age (years)	Males	HTN	DLP	DM	Smokers	Ex-smokers	CAD	Stroke /TIA	Others	Drugs	BMI	Systolic BP (mmHg)	Diastolic BP (mmHg)	Mean BP (mmHg)	Glucose (mg/dL)	TC (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	
Geiser T et al, 2002	59.8 ± 9.5	100%	25%	8.3%	0%	16.7%	25%	0%	8.3%	Mild obstructive lung disease 25%	ACEI 16.7% CAB 25% BB 8.3%										
Amabile N et al, 2009	≥18 y											34.3 ± 3.1									
Ayers L et al, 2009	56.6 ± 6.6	89,5%	40,4%		15,8%	15,8%	35,1%	10,5%			AntiHTN 40.4% Statins 30.9%				102.3 ± 11	106.3 ± 23.4	212.6 ± 42.5				
Jelic S et al, 2009	36 ± 9	66%		0%	0%	0%	0%	0%	0%	Renal disease 0%		27 ± 2	118 ± 13	71 ± 10		90 ± 16	183 ± 56				
Priou P et al, 2010	48.9 ± 1.3	100%	0%	0%	0%	n=2		0%	0%			26.4 ± 0.6	136 ± 21	64 ± 11		100.9 ± 1.8	204.9 ± 7.7		54.1 ± 3.9	131.2 ± 8.7	
Yun CH et al, 2010	41.5 ± 9.8	91.5%	36.6%	22%	7.3%	54.9%		0%	0%	Renal disease 0% Habitual alcohol drinking 45.1%	AntiHTN 22% Statins 8.5%	26.0 ± 3.6	124.7 ± 14.5	82.5 ± 11.2		92.1 ± 20.0	202.2 ± 29.7	121.7 ± 26.0	50.8 ± 10.3	160.0 ± 64.8	
Kim J et al, 2011	Mild OSA 8.2 ± 1.7 Mod-sev OSA 7.8 ± 2.3	64.5%				0%				White ethnicity 59.5%			Mild OSA 105.4 ± 10.9 Mod-sev OSA 110.2 ± 11.2	Mild OSA 62.2 ± 6 Mod-sev OSA 65.7 ± 7.4	Mild OSA 76.6 ± 7.2 Mod-sev OSA 80.6 ± 8.1		Mild OSA 168.3 ± 27.8 Mod-sev OSA 184.9 ± 46.7	Mild OSA 100.5 ± 22.7 Mod-sev OSA 116.1 ± 39.5	Mild OSA 52.4 ± 10.9 Mod-sev OSA 50.2 ± 13.3	Mild OSA 76.5 ± 35.7 Mod-sev OSA 115.2 ± 83.5	
Trzepizur W et al, 2011	18-70 y	100%	0%	0%	0%			0%	0%												
Maruyama K et al, 2012	Mild-mod OSA 58.5 ± 15.7 Severe OSA 60.2 ± 18.2	81.5%	40.7%	18.5%	7.4%	7.4%						Mild-mod OSA 23.8 ± 4.7 Severe OSA 25.2 ± 6.9				Mild-mod OSA 90.8 ± 11.8 Severe OSA 96.8 ± 15.2	Mild-mod OSA 108.9 ± 33.6 Severe OSA 120.2 ± 30.5	Mild-mod OSA 57.7 ± 22.5 Severe OSA 53.6 ± 13.2	Mild-mod OSA 156.8 ± 111.7 Severe OSA 134.9 ± 83.5		
Tual-Chalot S et al, 2012	53.8 ± 1.9	100%	0%	0%	0%	13.6%		0%	0%			26.7 ± 0.5	137.7 ± 4.9	80.0 ± 3.1		102.7 ± 5.4	224.2 ± 7.7	150.8 ± 7.7	50.3 ± 3.9	17.5 ± 0.2	
Ayers L et al, 2013	63.5 ± 5.1	95%	80.9%		23.8%	19.1%	38.1%	4.8%			AntiHTN 76.2% LMT 33.3% GMT 9.5%	32.9 ± 6.5	133.3 ± 16.6	82.3 ± 7.8		106.3 (97.3, 131.5)	185.6 (158.5, 220.4)	119.8 (92.8, 139.2)	38.7 (38.7, 54.1)	105.0 (87.5, 131.2)	
Kim J et al, 2013	Mild OSA 8.2 ± 1.6 Mod-sev OSA 7.8 ± 2.5	66%				0%				Caucasian Ethnicity 62.9%							Mild OSA 170.7 ± 29.2 Mod-sev OSA 192.0 ± 50.6	Mild OSA 101.3 ± 23.8 Mod-sev OSA 116.5 ± 44.3	Mild OSA 53.5 ± 10.4 Mod-sev OSA 48.3 ± 11.6	Mild OSA 78.8 ± 38.5 Mod-sev OSA 135.4 ± 90.6	
Tual-Chalot S et al, 2014	46.5 ± 2	100%	0%	0%	0%	30%		0%	0%			27.8 ± 0.8				95.5 ± 1.8	216.5 ± 7.7	139.2 ± 7.7	50.3 ± 3.9	122.5 ± 8.7	

Blank cells: data not reported. AntiHTN: antihypertensive drugs. BMI: body mass index. BP: blood pressure. CAD: coronary artery disease. DLP: dyslipemia. DM: diabetes mellitus. GMT: glucose-lowering medical therapy. HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol. HTN: hypertension. LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol. LMT: lipid-lowering medical therapy. Mild-mod: mild-to-moderate. Mod-sev: moderate-to-severe. OSA: obstructive sleep apnea. TC: total cholesterol. TG: triglycerides. TIA: transient isquemic attack.

**Table 27. Analytical and technical considerations**

Reference	Blood sample collection	Anticoagulant	Storage	PPP/PPF	Sample	Wash step	Method	Measurement	MP size
<b>Geiser T et al, 2002</b>	4 am and 7 am; with and without CPAP; no permanent iv lines used	Citrate		No (whole blood)	Whole blood	No	Flow cytometry	% of the total number of GPIb or GPIIIa positive particles	
<b>Amabile N et al, 2009</b>	From a systemic vein	Citrate		500xg 15 min → 10,000xg 5 min	Plasma	(No)	Flow cytometry	events/μL	0.1-1 μm diameter on FSC and SSC
<b>Ayers L et al, 2009</b>	Fasting state; 9-10 h am; 19 G needle	Citrate	-80°C	1,550xg 20 min at 20°C	Plasma	Yes	Flow cytometry	MP/μL	
<b>Jelic S et al, 2009</b>	Fasting state; 9-10 h am; 20 G angiocath	Citrate		1,000xg 6 min	Plasma	(No)	Flow cytometry	EMP/μL	≤1.5 μm on FSC
<b>Priou P et al, 2010</b>	Fasting state; in the morning; 21 G needle	EDTA	-80°C	270xg 20 min → 1,500xg 20 min	Plasma	No	Flow cytometry	events/μL	0.1-1 μm diameter on FSC and SSC
<b>Yun CH et al, 2010</b>	6-9:30 h am; 21 G needle	Citrate	-70°C	1,500xg 15 min → 13,000xg 2 min	Plasma	(No)	Flow cytometry	counts/μL	<1 μm
<b>Kim J et al, 2011</b>	Fasting blood, in the morning		-80°C	2,000xg 20 min → 20,000xg 90 min	Plasma	(No)	Flow cytometry	events/μL	<1 μm events at FSC and SSC
<b>Trzepizur W et al, 2011</b>	At 18-19 h pm (before dinner) and at 7-8 h am (before breakfast); 21 G needle	EDTA	-80°C	270xg 20 min → 1,500xg 20 min	Plasma	No	Flow cytometry	MP/μL	0.1-1 μm diameter on FSC and SSC
<b>Maruyama K et al, 2012</b>	6-7 h am; 21 G needle	EDTA-ACD	-20°C	8,000xg 5 min at room temperature	Plasma	(No)	ELISA	U/mL	
<b>Tual-Chalot S et al, 2012</b>	Fasting state; 7-8 h am; 21 G needle	EDTA	-80°C	270xg 20 min → 1,500xg 20 min	Plasma	No	Flow cytometry	events/μL	0.1-1 μm diameter on FSC and SSC
<b>Ayers L et al, 2013</b>	Fasting state; 9-10 h am	Citrate	-80°C	1,550xg 20 min at 20°C	Plasma	Yes	Flow cytometry	MP/μL	
<b>Kim J et al, 2013</b>	Fasting state, in the morning		-80°C	2,000xg 20 min → 20,000xg 90 min	Plasma	(No)	Flow cytometry	events/μL	<1 μm events at FSC and SSC
<b>Tual-Chalot S et al, 2014</b>	Fasting state; 7-8 h am; 21 G needle	EDTA	-80°C	270xg 20 min → 1,500xg 20 min	Plasma	No	Flow cytometry	events/μL	0.1-1 μm diameter on FSC and SSC

CPAP: continuous positive airway pressure. FSC: forward light scatter. iv: intravenous. MP: microparticle. PPF: platelet-free plasma. PPP: platelet-poor plasma. SSC: side-angle light scatter.

**Table 28. Microparticles studied and results**

Reference	Platelet MP	Endothelial MP	Endothelial Progenitor MP	Leukocyte MP	Lymphocyte MP	Granulocyte MP	Erythrocyte MP	Other MP	Results
<b>Geiser T et al, 2002</b>	CD42b+ CD61+	----	----	----	----	----	----	----	Similar PMPs levels in OSA and controls, at 4 am and 7 am and with and without CPAP
<b>Amabile N et al, 2009</b>	CD31+/CD41+	CD62E+ CD144+ CD31+/CD41-	----	CD45+	----	----	----	Annexin V+	No significant difference in any MP group in pulmonary hypertension patients with and without OSA
<b>Ayers L et al, 2009</b>	CD31+/CD41+	CD31+/CD41-	----	----	CD45+	----	----	Annexin V+	AnnV+ MPs, PMPs and LMPs significantly higher in OSA patients compared to controls. No statistical difference for EMPs. There was a correlation between LMPs and ODI (r=0.30, p=0.01)
<b>Jelic S et al, 2009</b>	----	CD31+/CD42b-	----	----	----	----	----	----	At baseline, levels of EMPs significantly greater in OSA patients than in controls. No significant change in EMPs levels in OSA patients after CPAP compared with levels at baseline
<b>Priou P et al, 2010</b>	CD41+	CD146+	----	CD45+ CD62L+	----	CD66B+	CD235a+	Annexin V+ CD62P+	Significant increase in GMPs and L-selectin+ MPs in desaturators compared with nondesaturator patients. No significant difference in total MPs or in any other MP subgroup. ODI but not AHI correlated with CD62L+ MPs (r=0.28, p=0.029)
<b>Yun CH et al, 2010</b>	----	CD31+/CD42- CD31+/AnnV+ CD62E+	----	----	----	----	----	----	EMPs (any subgroup) were significantly higher in OSA than in non-OSA patients. As significant correlation between CD31+/CD42- and CD31+/AnnV+ levels was observed (r=0.89, p<0.001). In subgroup analyses in those free from smoking, hypertension, hyperlipidemia and DM, CD31+/CD42- EMPs were significantly higher in OSA than in non-OSA patients, but CD31+/AnnV+ and CD62E did not differ between groups. CD31+/CD42- and CD31+/AnnV+ EMPs were higher in severe OSA compared to mild or moderate OSA and correlated with AHI (r=0.28, p=0.01; r=0.36, p=0.001; respectively), but CD62E MPs were not affected by severity of OSA. CD62E+ EMPs decreased after CPAP (no significant changes in the other EMPs subgroups)
<b>Kim J et al, 2011</b>	CD41a+/AnnV+	CD31+/AnnV+/CD42- CD62E+/AnnV+/CD42-	CD34+/CD309+	CD45+/AnnV+ CD11b+/AnnV+	----	----	----	----	Levels of EMPs, EpMPs, LMPs and PMPs were significantly higher in children with moderate-to-severe OSA compared to controls and in mild OSA (except PMPs) compared to controls. CD11b+/AnnV+ LMPs and PMPs were correlated with AHI (r=0.334 and r=0.301 respectively, p<0.001). EMPs, EpMP and LMP showed independent association with AHI after controlling for age, gender, race, BMI z score, and apoB

**Table 28 (continuation).**

Reference	Platelet MP	Endothelial MP	Endothelial Progenitor MP	Leukocyte MP	Lymphocyte MP	Granulocyte MP	Erythrocyte MP	Other MP	Results
<b>Trzepizur W et al, 2011</b>	----	----	----	CD62L+	----	----	----	----	Significant decrease in LMPs from the evening to the morning in the control group. No significant changes in the overall OSA group. In moderate-to-severe OSA, LMPs increased significantly from evening to morning. In OSA patients, the morning-evening difference in LMPs and morning LMPs levels correlated with AHI (r=0.45, p=0.03; and r=0.55, p=0.006; respectively)
<b>Maruyama K et al, 2012</b>	PMPs by ELISA	----	----	----	----	----	----	----	PMP levels were significantly higher in severe OSA than in control and mild-to-moderate OSA patients. PMP levels were similar in control and mild-to-moderate OSA patients. PMPs and AHI were correlated in OSA patients (r=0.39, p<0.05). Treatment with CPAP decreased significantly the levels of PMPs in OSA patients
<b>Tual-Chalot S et al, 2012</b>	CD41+	CD146+	----	CD62L+	CD45+	----	----	Annexin V+	Total number of MPs and of any phenotypic subgroups of MP were not significantly different between OSA and non-OSA groups. A correlation was observed between CD62L+ MPs and AHI (r=0.49, p=0.0078)
<b>Ayers L et al, 2013</b>	CD31+/CD41+	CD31+/CD41- CD106+ CD62E+	----	CD45+	----	CD66B+	----	----	Withdrawal of CPAP significantly increased the levels of CD62E+ EMPs, CD106+ EMPs and CD66B+ GMPs at 2 weeks in the subtherapeutic group compared with baseline (no significant changes in those under therapeutic CPAP). There was a significant difference in the change (median change) in CD62E EMPs levels between the therapeutic and subtherapeutic groups. No other significant results were found regarding any MP subgroup
<b>Kim J et al, 2013</b>	CD41a+	CD31+/CD42b- CD62E+/CD42b-	CD34+/CD309+	CD45+ CD11b+	----	----	----	----	Results regarding MPs not reported. Same patients that in Kim J et al, 2011 ??
<b>Tual-Chalot S et al, 2014</b>	CD41+	CD146+	----	CD62L+	CD45+	----	----	Annexin V+	CD62L+ LMPs levels were significantly higher on OSA patients compared to non-OSA controls. Total number of MPs and of any other phenotypic subgroup of MPs were not significantly different between OSA and non-OSA groups.

Markers: CD11b: integrin alpha M; CD31: PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule); CD34: hematopoietic progenitor cell antigen CD34; CD41: glycoprotein GPIIb; CD42b: glycoprotein GPIb; CD45: Leukocyte common antigen; CD61: glycoprotein GPIIIa; CD62E: E-selectin; CD62L: L-selectin; CD62P: P-selectin; CD106: vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1); CD144: VE-cadherin; CD146: melanoma cell adhesion molecule (MCAM); CD309: vascular endothelial growth factor 2 (VEGF-2);

AHI: apnea-hypopnea index. ApoB: apolipoprotein B. CPAP: continuous positive airway pressure. DM: diabetes mellitus. EMP: endothelial microparticle. EpMP: endothelial progenitor microparticle. GMP: granulocyte microparticle. LMP: leukocyte microparticle. MP: microparticle. OSA: obstructive sleep apnea. PMP: platelet microparticle.

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que, en pacientes con síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAOS) moderado a severo, en situación estable respecto a comorbilidad y buen cumplimiento y adherencia a la terapia con presión positiva continua en la vía aérea (CPAP), el tratamiento a corto plazo (3 meses) con CPAP mejora las cifras de presión arterial, síndrome de resistencia a la insulina, disfunción endotelial y daño celular. Dichos efectos favorables estarían muy probablemente mediados por la atenuación o reversión de los episodios recurrentes de hipoxia-reoxigenación mediante la corrección por la CPAP del colapso repetido de la vía aérea superior durante el sueño. Asimismo, nuestro estudio sugiere que dichos efectos de la CPAP pueden diferir en función de la presencia o no de hipertensión arterial (aun cuando las cifras de presión arterial en los pacientes hipertensos estén bien controladas). Los efectos observados con el tratamiento con CPAP no estarían influidos por cambios en el peso (índice de masa corporal, IMC), hábito tabáquico o modificaciones de tratamiento farmacológico, ya que ninguno de estos factores se modificó durante el periodo de seguimiento. Por el contrario, no se observaron cambios en los marcadores estudiados de inflamación (proteína C reactiva ultrasensible, PCRus) o de fibrosis, probablemente porque un seguimiento más prolongado puede ser necesario para que dichas alteraciones puedan revertir, en caso de que así ocurra, sobre todo para los cambios asociados a fibrosis.

Nuestro estudio incluyó pacientes con SAOS moderado a severo determinado por un índice de apnea-hipopnea igual o superior a 15. Si bien el diagnóstico de SAOS en la práctica clínica habitual se puede definir como un IAH >5 asociado a la presencia de síntomas, la elección de un IAH  $\geq 15$  en nuestro estudio se justifica por: 1) evitar los casos más leves que pudieran estar en el límite del diagnóstico, 2) evitar la valoración subjetiva de los síntomas como criterio diagnóstico, 3) aquellos con menor IAH pueden ser con más frecuencia no subsidiarios de tratamiento con CPAP (siendo además en este grupo los criterios de tratamiento con CPAP menos uniformes y más variables), y 4) porque la asociación del SAOS con el riesgo cardiovascular lo es sobre todo a partir de un IAH superior a 15-20 y especialmente superior a 30<sup>1,3</sup>. Los estudios de poligrafía comprobaron que la mayoría de los

pacientes finalmente incluidos en nuestro estudio presentaban un IAH en rango de severidad (mediana 57 eventos/h, rango intercuartílico 33 a 74) con frecuentes desaturaciones durante el sueño, si bien en situación basal previa al sueño la saturación de oxígeno era adecuada (media  $96.6 \pm 1.4$  %).

Durante el desarrollo del presente estudio no se produjeron pérdidas durante el seguimiento así como tampoco salida de pacientes por inestabilidad de cualquier comorbilidad asociada o necesidad de cambios en la medicación, lo que refleja una adecuada selección de la muestra de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión previamente especificados (ver sección de metodología).

Como era de esperar, los participantes fueron más frecuentemente varones y con obesidad. Respecto al sexo, como ya se ha comentado previamente en la introducción, el SAOS es 2 a 3 veces más prevalente en los varones<sup>1,3,15,16</sup>; asimismo, es más frecuentemente sospechado en varones que en mujeres, y por tanto los varones son más frecuentemente diagnosticado y derivados a unidades especializadas para su estudio y tratamiento; de hecho, un estudio previo revisando los pacientes con SAOS derivados a la Unidad de Sueño de nuestro hospital durante 30 meses consecutivos objetivó una relación hombres/mujeres de 4.9 a 1<sup>22</sup>. La selección en nuestro estudio de una muestra consecutiva de pacientes resultó concordante, por tanto, con los datos previos.

Respecto al peso, la obesidad constituye un factor de riesgo fundamental para el desarrollo de SAOS<sup>14</sup>; en nuestro estudio esto se refleja por unos valores de IMC elevados, con una media en rango evidente de obesidad:  $35.8 \pm 6.6$  kg/m<sup>2</sup>. Respecto al posible efecto de la CPAP sobre el peso, un reciente meta-análisis incluyendo 25 ensayos clínicos con casi 3200 pacientes (84% varones, IMC medio 31 kg/m<sup>2</sup>) y un seguimiento (mediana) de 3 meses (rango 1 a 48 meses) mostró un incremento significativo del IMC tras tratamiento con CPAP en el análisis conjunto de los datos, aunque la magnitud del cambio fue pequeña (delta IMC antes-después  $0.13 \pm 0.27$  kg/m<sup>2</sup>)<sup>110</sup>; el comportamiento del peso e IMC en los pacientes tratados con CPAP fue variable para cada estudio individualmente y sólo fue significativo en 4 de los 25 ensayos. En línea con la mayoría de dichos estudios, en nuestro trabajo no hemos observado un efecto significativo de la CPAP sobre el peso ( $p=0.88$ ) o IMC ( $p=0.93$ ); esto es, por otra parte, un factor importante a tener en cuenta para la interpretación de los

resultados, dada la asociación descrita entre el IMC y riesgo vascular; en nuestro trabajo, los hallazgos observados no estarían influidos por cambios en el peso e IMC.

En el presente trabajo hemos estudiado el efecto del tratamiento con CPAP sobre distintos procesos relacionados con el riesgo vascular, como la presión arterial, trastornos metabólicos (fundamentalmente resistencia a la insulina), disfunción endotelial, inflamación, daño celular o fibrosis, mediante la determinación de distintos marcadores representativos de cada uno de estos procesos. Con ello pretendemos ayudar a esclarecer a través de qué mecanismos fisiopatológicos la CPAP ejerce su potencial efecto beneficioso sobre el riesgo vascular y determinar que marcadores pueden ser los más adecuados para valorar la efectividad de la CPAP en este sentido. Si bien hemos asignado dichos marcadores a los procesos de los que principalmente pueden ser representativos, debemos reconocer que tales marcadores están relacionados entre sí y pueden estar involucrados en diferentes mecanismos fisiopatológicos al mismo tiempo; en particular, la disfunción endotelial podría por sí misma agrupar a todos ellos.

### ***Presión Arterial***

La ocurrencia de episodios de apneas/hipopneas obstructivas durante la noche se acompaña de cambios en parámetros cardiovasculares, como la presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca<sup>111</sup>. La hipoxia intermitente, estimulación de quimiorreceptores, activación simpática, estimulación del sistema renina-angiotensina, liberación de sustancias vasoactivas y la disfunción endotelial son todos mecanismos que pueden conducir a elevaciones de la presión arterial en pacientes con SAOS<sup>6,111</sup>; los cambios en la presión intratorácica parecen tener en cambio un efecto más limitado en este sentido<sup>6</sup>.

SAOS e hipertensión se han relacionado consistentemente en repetidos estudios<sup>6,111</sup>. Distintos trabajos sugieren una prevalencia de hipertensión variable entre un 35% a 80% en los pacientes con SAOS, en tanto que un 30% a 40% de los pacientes hipertensos podrían tener un SAOS (con frecuencia no diagnosticado)<sup>6,111</sup>. El SAOS se asocia además a hipertensión resistente o no controlada y se considera una causa de hipertensión secundaria<sup>86,111</sup>. La asociación de SAOS con hipertensión parece ser mayor en sujetos jóvenes o de edad media

(<60 años) que en pacientes más mayores<sup>47,112,113</sup>. Igualmente, la elevación de la PA en pacientes con SAOS se relaciona con una atenuación del descenso fisiológico de la PA durante el sueño (patrón no dipper) tanto en pacientes normotensos como hipertensos<sup>114</sup>, lo cual a su vez se relaciona con un mayor riesgo cardiovascular futuro independientemente de los niveles de PA<sup>115-117</sup>.

La monitorización ambulatoria de la PA (MAPA) de 24 horas constituye la técnica “gold standard” para la valoración no invasiva de la PA<sup>86</sup>. En nuestro estudio, la MAPA-24h puso de manifiesto unos niveles de presión arterial adecuadamente controlados a nivel basal, con valores medios en rango normal y sin diferencias entre pacientes normotensos e hipertensos, lo que refleja la adecuada selección de los participantes de acuerdo con los criterios de inclusión/exclusión exigidos en nuestro estudio (que requerían que los pacientes estuvieran estables y bien controlados). A pesar del buen control tensional, el porcentaje de pacientes con un patrón día/noche alterado, de acuerdo a lo previamente descrito en pacientes con SAOS, fue elevado (non-dipper 55.2%, riser 17.2%, dipper extreme 9.9%), remarcando el efecto desfavorable del SAOS durante el periodo de sueño.

El efecto del tratamiento con CPAP sobre la PA ha sido estudiado en numerosos estudios, los cuales han presentado resultados variables, si bien en general sugieren un efecto favorable de la CPAP sobre los niveles de PA<sup>111</sup>. En este sentido, cabe destacar el estudio publicado por Barber et al, un ensayo clínico multicéntrico (n=723) llevado a cabo en España con un seguimiento prolongado (mediana 4 años, rango intercuartílico 2.7-4.4); en dicho estudio se observó que, en pacientes con SAOS sin somnolencia diurna (IAH  $\geq 20$ , escala de Epworth  $\leq 10$ ) y sin enfermedad cardiovascular previa, el tratamiento con CPAP produjo una reducción de la incidencia de hipertensión o eventos cardiovasculares en el subgrupo de pacientes con una adherencia a CPAP  $\geq 4$  horas/noche pero no en aquellos con uso de CPAP  $< 4$  h/noche<sup>118</sup>.

Distintos meta-análisis se han comunicado hasta la fecha, en general con resultados positivos, si bien la magnitud del efecto de la CPAP sobre la PA fue pequeña ( $< 4$  mmHg) y la evidencia no resulta aún concluyente. Fava et al, en 2014, incluyendo 29 ensayos clínicos randomizados (n=1820) con un seguimiento de entre 2 semanas a 4 años, encontraron una diferencia (media  $\pm$  SEM) de  $2.6 \pm 0.6$  y  $2.0 \pm 0.4$  mmHg en las PA sistólica y diastólica,

respectivamente, a favor del tratamiento con CPAP comparado con el grupo control<sup>70</sup>; dichos resultados positivos se mantuvieron al analizar solamente aquellos ensayos que valoraron la PA por medio de MAPA<sup>70</sup>. En la misma línea, dos meta-análisis anteriores comunicados por Iftikhar et al (incluyendo 7 ensayos clínicos y estudios observacionales) y Bazzano et al (16 ensayos clínicos) objetivaron un descenso significativo de la PA tras tratamiento con CPAP, en ambos casos inferior a 3 mmHg de media<sup>73,119</sup>. Asimismo, Varounis et al (5 estudios observacionales y ensayos clínicos, n=359, 2 a 6 meses de tratamiento) comprobaron dichos efectos positivos de la CPAP en pacientes con hipertensión resistente<sup>71</sup>. Por el contrario, Mo et al y Aljimi et al, en 2007, en pacientes con SAOS no seleccionados, describieron una tendencia hacia un efecto favorable modesto de la CPAP pero no estadísticamente significativo<sup>69,120</sup>. Más recientemente, Bratton et al, en pacientes con SAOS mínimamente sintomáticos (n=1206, seguimiento 1 mes a 4 años) no encontraron diferencias significativas en las PA antes y después de CPAP<sup>68</sup>. En definitiva, los resultados, aunque no concluyentes, tienden a ser favorables al tratamiento con CPAP, aunque la reducción de la PA sería modesta y podría depender de la severidad del SAOS, y son necesarios nuevos estudios para establecer conclusiones definitivas.

En nuestro estudio, tras 3 meses de tratamiento con CPAP se produjo un descenso significativo de los valores de presión arterial, tanto sistólicos como diastólicos y de PA media, para los periodos de 24 horas, diurno y nocturno. Interesantemente, el estudio por subgrupos según presencia o no de diagnóstico de hipertensión mostró que el descenso de la PA fue mayor y significativo en pacientes normotensos, mientras que en aquellos SAOS hipertensos la reducción fue más modesta y no alcanzó la significación estadística; ello pudo ser motivado por el hecho de que todos los pacientes hipertensos se encontraban bajo tratamiento antihipertensivo farmacológico y adecuadamente controlados, lo que pudo disminuir el margen de mejora y efecto de la CPAP sobre la PA en este subgrupo.

Por otra parte, de forma destacable, el tratamiento con CPAP condujo a la normalización del patrón de descenso nocturno de la PA en un número sustancial de pacientes, de forma que el porcentaje de participantes no dippers se redujo del 79.3% pre-tratamiento al 44.8% tras 3 meses de CPAP.

La frecuencia cardíaca determinada por MAPA de 24 horas mostró un comportamiento similar a las presiones arteriales, con un descenso significativo tras 3 meses de tratamiento con CPAP, tanto en los valores medios de 24 horas como diurno y sobre todo nocturno, lo que apoya el efecto favorable de la CPAP mediante la corrección de la hipoxia y las alteraciones de la presión intratorácica, atenuando con ello la activación simpática y sobrecarga cardíaca. El descenso de la frecuencia cardíaca durante el día tuvo lugar a expensas de los pacientes normotensos, al igual que ocurría con las cifras de PA, si bien a diferencia de ésta, durante la noche la mejoría fue significativa en ambos grupos; la no diferencia entre grupos durante la noche apoya el efecto protector de la CPAP sobre las variaciones de la presión intratorácica, lo cual tendría un efecto más limitado como mecanismo elevador de las PA.

### ***Trastornos metabólicos. Resistencia a la Insulina***

Diversos estudios tanto transversales como prospectivos han sugerido una asociación independiente del SAOS con trastornos del metabolismo de la glucosa y desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2)<sup>27,43,121</sup>. Análisis del Sleep Heart Health Study describieron una mayor prevalencia y riesgo de glucosa alterada en ayunas, intolerancia a la glucosa y DM2 “oculta” (no diagnosticada previamente) en pacientes con trastornos respiratorios de sueño<sup>27</sup>. El SAOS puede asimismo estar presente en un elevado porcentaje de pacientes con DM2 (en algunos estudios hasta el 70-80% de diabéticos tipo 2 podrían tener un SAOS no reconocido)<sup>122</sup>, y su presencia en dichos pacientes se ha relacionado con un peor control glucémico<sup>123</sup>. Igualmente, la presencia de SAOS se ha relacionado independientemente con distintos componentes y mayor prevalencia del síndrome metabólico<sup>29</sup>.

Distintos mecanismo podrían ser responsables de alteraciones en el metabolismo glucídico en los pacientes con SAOS. Los episodios de hipoxia intermitente, de forma directa o bien a través de la activación del sistema nervioso simpático, producción de estrés oxidativo, inflamación o liberación de adipoquinas, podrían favorecer dichas alteraciones mediante deterioro de la función celular beta o aumento de la resistencia periférica a la insulina<sup>124</sup>. Así, por ejemplo, un estudio en animales sanos ha comprobado como la hipoxia intermitente puede conducir a resistencia a la insulina asociada a una disminución de la utilización de

glucosa por las fibras musculares independientemente de la activación del sistema nervioso simpático<sup>125</sup>. Por otra parte, la frecuente obesidad presente en los pacientes con SAOS puede favorecer dichos efectos deletéreos.

En nuestro estudio, incluyendo pacientes con DM2 (23%) y no diabéticos, los sujetos presentaban niveles medios de glucosa y HbA1c adecuadamente controlados (de acuerdo a la estabilidad exigida en los criterios de inclusión). Sin embargo, y en consonancia con los datos anteriormente expuestos, el índice de resistencia a la insulina (HOMA2) se encontraba elevado. En nuestro estudio ello podría estar favorecido por el propio SAOS, por la frecuente obesidad de los pacientes o por la inclusión de sujetos con DM2 (a pesar de estar bien controlados en cuanto a glucemia e HbA1c) y posiblemente con prediabetes no diagnosticada. No hubo diferencias a nivel basal según la presencia o no de hipertensión.

A pesar de la evidencia en la asociación entre SAOS y trastornos del metabolismo glucídico, la evidencia del efecto del tratamiento con CPAP sobre distintos marcadores relacionados con la glucosa y resistencia a la insulina es controvertida; diversos estudios individuales, tanto observacionales como ensayos clínicos, han descrito tanto un efecto favorable como no efecto en absoluto sobre distintos marcadores como la glucemia en ayunas, HbA1c y sensibilidad o resistencia a la insulina<sup>124</sup>. Recientes meta-análisis, limitados por el bajo número de pacientes estudiados, no han aclarado dicha controversia, como se muestra en la tabla 29<sup>124,126-130</sup>; si bien alguno de estos meta-análisis, incluyendo principalmente estudios observacionales, han observado una mejoría del índice HOMA-IR (como marcador de resistencia a la insulina) independiente del IMC, principalmente en pacientes no diabéticos con adecuado cumplimiento del tratamiento con CPAP, otros análisis incluyendo ensayos clínicos randomizados no han apoyado dichos resultados (tabla 29)<sup>124,126-130</sup>.

Nuestros datos, en pacientes con una adecuada adherencia al tratamiento, muestran una mejoría significativa de la resistencia a la insulina tras tratamiento con CPAP durante 3 meses, asociada a un aumento de la sensibilidad a la insulina, disminución de los niveles plasmáticos de insulina y reducción de la sobrecarga funcional de las células beta; no se observaron modificaciones en los niveles de glucosa o HbA1c tras el seguimiento, probablemente influido porque ya basalmente los niveles de ambos parámetros estaban bien

**Tabla 29. Resumen de revisiones sistemáticas y meta-análisis publicados en relación con el efecto del tratamiento con CPAP sobre marcadores relacionados con el metabolismo glucídico en pacientes con SAOS**

Referencia	Estudios	Nº de estudios	Participantes			Nº de participantes	Duración	Comentarios
			SAOS	Diabetes	Otros			
<b>REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS</b>								
<b>Yang D et al, 2012</b>	Estudios observacionales prospectivos	9 (2 controlados)	Nuevo diagnóstico de SAOS. Moderado a severo. IAH $\geq 15$ (rango media $>15$ a 91). No tratamiento previo de SAOS. Uso medio de CPAP $>4$ a 6 h/d.	No-DM.	Adultos (edad media rango 40 a 56 años). Sin enfermedad CV, cerebrovascular, hepática, endocrina, inflamatoria u otra enfermedad crónica en el momento de la polisomnografía. Sin cambios significativos en dieta, IMC o medicación durante el curso del estudio. IMC medio rango 32.0 a 46.1 kg/m <sup>2</sup> .	185	8 a 24 semanas	PubMed, HighWire Press, Ovid Medline, Cochrane library and EMBASE. Fecha: antes de Diciembre 2011. Límites: originales en Inglés.
<b>Hecht L et al, 2011</b>	Ensayos clínicos controlados randomizados y no randomizados	6 (3 paralelos, 2 cross-over, 1 controlado no randomizado)	IAH rango 29.7 a 39.7.	DM y no-DM	Adultos (edad media rango 18 a 75 años). IMC medio rango 27.2 a 37.1 kg/m <sup>2</sup> . 5 estudios incluyeron solo varones.	296	1 a 12 semanas	Medline, Embase and the Cochrane Controlled Trial Register. Fecha: hasta Enero 2010. 5 estudios incluidos en el meta-análisis.
<b>Iftikhar IH et al, 2013</b>	Ensayos clínicos controlados randomizados	5 (4 cross-over, 1 grupos paralelos)	IAH medio rango 27.9 a 47.9. Adherencia media a CPAP rango 3.9 a 5.5 h/d	No-DM (1 estudio intolerancia a la glucose)	Adultos ( $\geq 18$ años). 83% varones. IMC medio rango 27.5 a 39.0 kg/m <sup>2</sup> .	244	1 a 12 semanas	PubMed and Embase. Fecha: hasta Agosto 2012. . Límites: artículos en Inglés. Diseño cross-over en 4 de los estudios.
<b>Yang D et al, 2013</b>	Estudios observacionales prospectivos o randomizados	15 (11 observacionales no controlados, 2 observacionales controlados, 2 randomizados)	Nuevo diagnóstico de SAOS. Moderado a severo. IAH medio rango $>15$ a 91. Uso medio de CPAP $>4$ a 6 h/d.	DM y No-DM	Edad media rango 40 a 64 años. IMC medio rango 27.7 a 46.1 kg/m <sup>2</sup> .	367	3 a 24 semanas	PubMed, HighWire Press, Ovid Medline (R), Cochrane library, and EMBASE. Fecha: antes de Diciembre 2011.
<b>Chen L et al, 2014</b>	Ensayos clínicos controlados	6 (4 no randomizados)	SAOS	DM	Edad media rango 50.7 a 66.1 años. Varones rango 60% a 100%.	128	1 a 4 meses	Medline, Cochrane, EMBASE, and Google Scholar. Fecha: hasta Marzo 2013. Límite: artículos en Inglés.
<b>REVISIÓN SISTEMÁTICA</b>								
<b>Jullian-Desayes et al, 2015</b>	Ensayos clínicos controlados y randomizados	9 (4 cross-over, 5 grupos paralelos)	IAH $>10$ Adherencia a CPAP variable (con frecuencia baja y mayor para casos que controles)	DM y no-DM	Predominantemente varones. IMC medio rango 27 a 39 kg/m <sup>2</sup> .	433	1 a 12 semanas	Medline

Tabla 29 (continuación)

Referencia	Participantes	IMC	Glucosa	HbA1c	Insulina	Sensibilidad a la Insulina	HOMA-IR	Comentarios
<b>REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS</b>								
Yang D et al, 2012	No-DM.	MD 0.05 IC95% -0.73 a 0.83 I <sup>2</sup> =0%	MD 0.02 IC95% -0.14 a 0.18 I <sup>2</sup> =0%	-	-	-	<b>MD -0.75</b> <b>IC95% -0.96 a -0.53</b> I <sup>2</sup> =31%	HOMA-IR en caso de uso irregular de CPAP: -0.22 (IC95% -2.24 a 1.80)
Hecht L et al, 2011	DM y no-DM	-	-	Cross-over: n=1 estudio: MD 0.04% IC95% -1.06 a 1.14  Grupos paralelos: n=1 estudio: MD -0.12 IC95% -0.84 a 0.60	Cross-over: MD -2.95 pmol/L IC95% -20.39 a 14.50 I <sup>2</sup> =0%  Grupos paralelos: MD 0.24 pmol/L IC95% -0.63 a 1.10 I <sup>2</sup> =0%	n=1 estudio Kitt-insulin sensitivity index: <b>MD 1.68%/min</b> <b>IC95% 0.3 a 3.06.</b>	Cross-over: MD -0.77 IC95% -4.12 a 2.57 I <sup>2</sup> =0%  Grupos paralelos: MD 0.07 IC95% -0.40 a 0.55 I <sup>2</sup> =0%	5 estudios incluidos en el meta-análisis.
Iftikhar IH et al, 2013	No-DM	-	-	-	-	-	<b>MD -0.44</b> <b>IC95% -0.82 a -0.06</b> I <sup>2</sup> =0%	-
Yang D et al, 2013	DM y No-DM	No-DM: MD 0.22 IC95% -0.96 a 1.40 I <sup>2</sup> =0%  DM: MD -0.03 IC95% -2.84 a 2.78 I <sup>2</sup> =0%	No-DM: MD -0.12 IC95% -0.3 a 0.06 I <sup>2</sup> =0%  DM: MD -0.71 IC95% -2.24 a 0.83 I <sup>2</sup> =0%	-	-	-	No-DM: <b>MD -0.55</b> <b>IC95% -0.91 a -0.20</b> I <sup>2</sup> =28%  DM: 1 estudio: MD -1.5 IC95% -3.39 a 0.39	-
Chen L et al, 2014	DM	-	-	SMD: -0.073 IC95% -0.320 a 0.173 I <sup>2</sup> =0%	-	<b>SMD 0.552 mmol/kg x min</b> <b>IC95% 0.168 a 0.937</b> I <sup>2</sup> =0%	-	-
<b>REVISIÓN SISTEMÁTICA</b>								
Jullian-Desayes et al, 2015	DM y No-DM	5 estudios no mostraron mejoría en los marcadores glucídicos. 1 estudio mayoría en la resistencia a insulina en sujetos con IMC >25 kg/m <sup>2</sup> . 1 estudio post-hoc en SAOS severo observe mejoría en glucosa e índice de sensibilidad a insulina en el test de tolerancia a glucosa (75g, 2h) 2 estudios no objetivaron efecto de la CPAP en el clamp euglucémico CONCLUSIÓN: el impacto de la CPAP en marcadores relacionados con la glucosa es incierto y, en caso de existir, es limitado y menor que el de los fármacos antidiabéticos.						

Búsqueda: Medline. ECPAP: presión positiva continua en la vía aérea (continuous positive airway pressure). CV: cardiovascular. DM: diabetes mellitus. HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance. IAH: índice de apnea-hipopnea. IC95: interval de confianza al 95%. IMC: índice de masa corporal. MD: diferencia media (mean difference). No-DM: no diabetes mellitus. SAOS: síndrome de apnea-hipopnea obstructive del sueño. SMD: diferencia media estandarizada (standardized mean difference).

controlados y el margen de mejora es, por tanto, más limitado. Interesantemente, dichos cambios tuvieron lugar fundamentalmente a expensas de los pacientes normotensos; ello podría sugerir que en los pacientes hipertensos mecanismos fisiopatológicos asociados a dicha condición podrían potenciar o añadirse a aquellos derivados del SAOS y hacer así más difícil la mejora en la resistencia a la insulina o requerir una duración más prolongada del tratamiento.

Nuestros resultados se añaden a aquellos estudios que sugieren un efecto favorable de la CPAP sobre la resistencia a la insulina, si bien, como se deriva de lo comentado previamente, son necesarios estudios adicionales, preferentemente ensayos clínicos randomizados, con un número elevado de pacientes y tratamiento prolongado, para poder establecer conclusiones más definitivas a este respecto.

En relación a los parámetros lípidos, tras 3 meses de tratamiento con CPAP se objetivó una tendencia a la disminución de los niveles de colesterol total ( $p=0.067$ ) a expensas de los niveles de colesterol LDL ( $p=0.085$ ), sin cambios en colesterol HDL o triglicéridos. Estos datos son concordantes con los mostrados por un meta-análisis publicado en 2014 con 29 estudios, la mayoría de 3 a 6 meses de duración, en los que el tratamiento con CPAP disminuyó el colesterol total y LDL e incrementó los niveles de HDL, sin cambios en los triglicéridos<sup>131</sup>. Los mecanismos por los que la CPAP puede mejorar los niveles lipídicos no son conocidos, si bien existen distintos factores que podrían contribuir, incluyendo una mayor actividad física propiciada por la disminución de la hipersomnias diurna, la mejora en la resistencia a la insulina, disminución de la hiperactividad simpática<sup>131</sup> y corrección de la hipoxemia (que en estudios en animales se ha asociado con una sobreexpresión de lipoproteínas, aumento de ácidos grasos libres y peroxidación lipídica<sup>132,133</sup>). No obstante, el impacto del tratamiento con CPAP sobre los lípidos parece ser limitado en comparación con el tratamiento hipolipemiante farmacológico<sup>124</sup>.

### ***Inflamación***

Los episodios de hipoxia y reoxigenación, así como el estrés oxidativo, activación simpática o disfunción endotelial consiguientes, pueden llevar a la producción de distintos

mediadores inflamatorios, los cuales, a su vez, favorecen la expresión de factores nucleares de transcripción, liberación de otros factores inflamatorios, moléculas de adhesión y activación celular<sup>54,134</sup>. Entre estas moléculas inflamatorias la proteína C reactiva (PCR) es probablemente el biomarcador más ampliamente estudiado como indicador de inflamación de bajo grado<sup>134</sup>. En distintos estudios los niveles de PCR ultrasensible (PCRus) se han asociado de forma independiente con factores de riesgo y eventos cardiovasculares futuros<sup>135,136</sup>.

En pacientes con SAOS, si bien la mayoría de estudios describen unos niveles elevados de PCRus comparado con controles, los datos no son concluyentes y el efecto de posibles factores confusores como la obesidad, el sexo o patología vascular concomitante no está bien establecido<sup>134</sup>. No obstante, un meta-análisis publicado en 2013 incluyendo 4283 individuos procedentes de 30 estudios diferentes apoya la presencia de niveles elevados de PCR en pacientes con SAOS comparado con controles (diferencia media estandarizada [standardized mean difference, SMD] 1.77, IC95% 1.28 a 2.26), si bien se objetivó una elevada heterogeneidad ( $I^2=96.4\%$ )<sup>137</sup>.

En nuestro estudio los pacientes presentaron niveles elevados de PCRus a nivel basal (mediana 2.1 mg/l). Dichos niveles se asocian con un aumento moderado del riesgo cardiovascular<sup>136</sup>. En nuestro estudio dicha elevación podría estar determinada por el propio SAOS, si bien factores concomitantes como la obesidad presente en los pacientes también podrían contribuir a elevaciones de este marcador. En el análisis por subgrupos se objetivó una tendencia a niveles superiores de PCRus en pacientes hipertensos, si bien la diferencia no fue significativa (posiblemente influido por el hecho de que los pacientes hipertensos estaban bien controlados).

El tratamiento con CPAP durante 3 meses no produjo cambios significativos en los niveles de PCRus comparado con los valores basales. Los datos publicados en la literatura son contradictorios en este sentido, con estudios mostrando tanto un descenso como no cambios en los niveles de PCRus tras CPAP<sup>134</sup>. El efecto de la CPAP sobre los niveles de este marcador podría venir determinado por la duración del tratamiento, de forma que 3 meses de terapia pueden ser insuficientes para atenuar suficientemente la situación inflamatoria crónica derivada del SAOS y por tanto para observar cambios significativos en los niveles de PCRus.

En este sentido, Guo et al, en un meta-análisis incluyendo aproximadamente 1200 participantes, objetivaron que los niveles de PCR no se modificaron en 3 meses de tratamiento (SMD 0.26, IC95% -0.08 a 0.60), disminuyeron significativamente en estudios de más 3 meses de duración (SMD 0.68, IC95% 0.34 a 1.02), y aún disminuyeron más evidentemente tras 6 meses de tratamiento con CPAP (SMD 0.74, IC95% 0.43 a 1.05)<sup>138</sup>. Un segundo meta-análisis apoya estos resultados<sup>139</sup>. Otro factor a tener en cuenta en nuestro estudio es la obesidad de los pacientes, la cual podría mantener una situación crónica de inflamación de bajo grado y con ello niveles persistentemente elevados de PCRus.

### ***Remodelado Vascular y Fibrosis***

El daño crónico sobre la pared arterial o cardíaca puede conducir a cambios estructurales en la misma con un aumento de la rigidez arterial, remodelado e hipertrofia ventricular, y fibrosis. Los procesos patológicos derivados de la disfunción endotelial, inflamación, hipertensión arterial mantenida o sobrecarga cardíaca favorecen el desarrollo de dichas alteraciones. Estos mecanismos se encuentran presentes en pacientes con SAOS. Distintos estudios han observado un incremento de la rigidez arterial determinada por la velocidad de la onda de pulso o el “augmentation index” en pacientes con SAOS y, si bien la evidencia es limitada, un reciente meta-análisis sugiere que el tratamiento con CPAP puede mejorar dichos parámetros independientemente de la presión arterial<sup>140,141</sup>. Asimismo, el SAOS se ha relacionado con hipertrofia ventricular izquierda<sup>31,32</sup> y derecha<sup>33</sup>, cardiomiopatía<sup>37</sup> y riesgo de desarrollo de insuficiencia cardíaca<sup>48</sup>.

Estos procesos de remodelado y fibrosis de la pared vascular y cardíaca implican importantes alteraciones de la matriz extracelular, incluyendo un desequilibrio en la síntesis y degradación del colágeno tipo 1<sup>91</sup>; dichas alteraciones se podrían estudiar mediante la determinación de propeptido C-terminal de la molécula de procolágeno tipo I (PICP) y telopeptido C-terminal de la molécula de colágeno tipo 1 (ICTP) como biomarcadores de la síntesis y degradación del colágeno tipo 1, así como mediante el cociente PICP/ICTP como estimador del desequilibrio o desacoplamiento entre síntesis y degradación<sup>91</sup>. Dichos marcadores se han asociado con la masa ventricular izquierda y fibrosis y sus niveles se han observado elevados en pacientes con hipertensión<sup>91,142-144</sup>.

En pacientes con SAOS, Vautrin et al (n=57, IAH  $\geq 15$ ) describieron unos niveles elevados de péptido amino-terminal de procolágeno tipo III (PIIIP) – como marcador de la síntesis de colágeno tipo III – en aquellos sujetos con disfunción diastólica de ventrículo izquierdo; los niveles de PIIIP se correlacionaron (débilmente aunque de forma estadísticamente significativa) con la presión arterial, sobre todo nocturna, pero no con la masa ventricular izquierda<sup>145</sup>. Hasta donde nosotros conocemos nuestro estudio es el primero en valorar los marcadores PICP e ICTP en pacientes con SAOS y, de forma importante, el efecto de la CPAP sobre los marcadores circulantes de síntesis y degradación de colágeno.

En nuestro estudio, a nivel basal, se comprobó una ligera tendencia a niveles superiores de PICP, inferiores de ICTP y, consiguientemente, mayor cociente PICP/ICTP en los pacientes hipertensos comparado con los sujetos normotensos, si bien la diferencia no fue en ningún caso estadísticamente significativa. Tras 3 meses de tratamiento con CPAP, los niveles no experimentaron cambios significativos en el total de los pacientes. Sin embargo, al diferenciar según diagnóstico de hipertensión, sí se comprobó una disminución significativa del cociente PICP/ICTP en los pacientes hipertensos, lo cual fue motivada principalmente por una tendencia al aumento en los niveles de ICTP con valores similares de PICP, aunque los cambios en estos marcadores de forma aislada fueron en ambos casos no significativos. Estos datos sugieren que en pacientes hipertensos la CPAP puede tener un efecto beneficioso sobre el remodelado vascular y consiguiente fibrosis al ajustar el desacoplamiento entre síntesis y degradación de colágeno mediante un aumento de la degradación del mismo. El hecho de tener hipertensión sumaría un factor contribuyente más a la propia afectación derivada del SAOS, lo que favorecería que el remodelado y fibrosis tanto arterial como ventricular fueran más acentuados en dichos pacientes frente a aquellos con SAOS pero no hipertensión, y con ello que los pacientes hipertensos se puedan beneficiar más del tratamiento con CPAP en este sentido.

Existen distintos procesos que pueden generar fibrosis y confundir el origen vascular y cardíaco de dichos marcadores. No obstante, en nuestro estudio los pacientes se encontraban estables y no se identificaron condiciones destacables asociadas a fibrosis, si bien no se llevó a cabo una búsqueda activa de las mismas (indicación de pruebas complementarias específicas). Cabe destacar que el propio SAOS se ha asociado a un aumento de fibrosis de los músculos faríngeos como expresión de la afección crónica de la vía aérea

superior<sup>146</sup>. No obstante todo lo anterior, los datos son concordantes con los previos en la literatura en pacientes no SAOS y, en cualquier caso, dichos procesos afectarían por igual a pacientes hipertensos y no hipertensos.

### ***Disfunción Endotelial***

Como se comenta más extensamente en la sección de introducción, el SAOS se ha asociado con una disfunción endotelial derivada de los episodios de hipoxia-reoxigenación y consiguiente activación simpática, estrés oxidativo, producción de radicales libres, liberación de sustancias vasoactivas, citoquinas y moléculas de adhesión, activación de células inflamatorias e inflamación sistémica, tendencia a un estado protrombótico o incremento de la presión arterial<sup>6,53,64</sup>. La comorbilidad frecuentemente asociada al SAOS, como obesidad, síndrome metabólico o hipertensión, favorecerían igualmente el desarrollo de la lesión endotelial.

#### Flujimetría láser-doppler

Los resultados de distintos estudios han descrito una mejoría de la función endotelial tras tratamiento con CPAP, fundamentalmente a nivel de la macrovasculatura periférica mediante estudio de la vasodilatación dependiente del endotelio mediada por flujo (flow-mediated dilation, FMD), aunque no todos los estudios han objetivado resultados positivos y se requiere más evidencia para establecer conclusiones definitivas (ver tablas 1 y 2)<sup>64</sup>. En nuestro trabajo estudiamos la función endotelial mediante el test de hiperemia reactiva a la isquemia mediante flujimetría por láser-doppler (FLD). Dicha técnica permite determinar el estado de la microcirculación mediante la evaluación de la respuesta hiperémica reactiva a una isquemia transitoria, como resultado de la vasodilatación dependiente del endotelio<sup>64,147-149</sup>. Este test no invasivo es probablemente menos dependiente del operador que la FMD, ya que las mediciones y resultados son obtenidos automáticamente por el software<sup>61</sup>. Estudios previos usando FLD han objetivado un deterioro de la respuesta en pacientes con enfermedad coronaria<sup>61</sup>, enfermedad renal<sup>150</sup> y otras condiciones<sup>149</sup>, así como su asociación a un incremento de mortalidad cardiovascular tras 2 años de seguimiento en pacientes con

enfermedad renal terminal (comparado con pacientes renales sin niveles alterados en la FLD)<sup>151</sup>. Si bien distintos autores han utilizado diferentes parámetros obtenidos por esta técnica, un trabajo de nuestro grupo sugiere que el área de hiperemia es probablemente el mejor índice para evaluar la respuesta, al integrar en sí mismo tanto la intensidad como la velocidad y la duración de la respuesta<sup>61</sup>.

En pacientes con SAOS, Butt et al encontraron una respuesta deteriorada en la FLD con iontoforesis con acetilcolina (Ach) en pacientes con SAOS moderado a severo y en controles hipertensos, comparado con controles sanos, sin diferencia significativa entre los grupos con SAOS y con hipertensión<sup>152</sup>; tras 26 semanas de tratamiento con CPAP se objetivó una mejoría significativa de la respuesta hiperémica<sup>152</sup>. Jurado-Gómez et al, en 69 pacientes consecutivos con IAH  $\geq 5$ , describieron un deterioro significativo de la FLD realizada en la mañana, pero no en el test realizado antes del sueño, en pacientes con SAOS sin CPAP (comparado con sujetos derivados a la consulta de sueño pero sin diagnóstico de SAOS [IAH  $< 5$ ])<sup>153</sup>; la repetición del test en 25 pacientes con SAOS severo tras 3 meses de tratamiento con CPAP produjo una mejoría significativa de la FLD tras el sueño<sup>153</sup>. Bakker et al compararon la respuesta por FLD en pacientes con SAOS y obesidad tratados bien con CPAP o bien con cirugía bariátrica; tras 6 meses de tratamiento se comprobó una mejoría de la reactividad microvascular en el grupo asignado a CPAP pero no en aquellos tratados con cirugía, a pesar de que el grupo con CPAP no experimentó cambios en el IMC (que sí tuvieron lugar de forma significativa en el grupo de cirugía bariátrica)<sup>154</sup>. Finalmente, Trzepizur et al igualmente encontraron a nivel basal un deterioro de la reactividad microvascular dependiente del endotelio (FLD con iontoforesis con Ach) en pacientes con SAOS comparado con controles; adicionalmente, un subgrupo de 12 pacientes fueron aleatorizados a tratamiento con CPAP o con dispositivo de avance mandibular; la respuesta por FLD mejoró significativamente tras tratamiento con ambos dispositivos, sin diferencias entre ambos<sup>155</sup>.

Los resultados del presente trabajo se suman a las observaciones positivas ya previamente comentadas: los pacientes con SAOS moderado a severo incluidos en nuestro estudio presentaron una mejoría significativa en el área de hiperemia tras 3 meses de tratamiento con CPAP. De forma destacable, el análisis por subgrupos puso de manifiesto que dicha mejoría tuvo lugar principalmente a expensas de los pacientes normotensos ( $p=0.03$ ); los sujetos hipertensos presentaron una tendencia a la mejoría que no fue sin embargo

estadísticamente significativa,  $p=0.4$ ); este aspecto no ha sido evaluado en los estudios previamente comentados y remarca la necesidad de tener en cuenta la condición de hipertensión de los pacientes con SAOS a la hora de valorar la función endotelial.

## VEGF

El factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endothelial growth factor, VEGF) estimula la migración, supervivencia y diferenciación de las células endoteliales mediante la interacción con receptores tirosin-kinasa presentes en la superficie de dichas células, favoreciendo la integridad y reparación del endotelio, formación de estructuras tubulares de células endoteliales y angiogénesis<sup>156-158</sup>. Asimismo, el VEGF podría favorecer la movilización de células progenitoras endoteliales e incrementar su reclutamiento en el tejido vascular dañado<sup>159</sup>. La hipoxia es un estímulo principal para la expresión genética y liberación de VEGF<sup>158,160,161</sup>; igualmente, la hipoxia estimula la producción de factor inducible por hipoxia (hypoxia inducible factor 1, HIF-1), el cual actúa como un sensor de hipoxia a nivel celular y regula la transcripción de mRNA de VEGF<sup>161,162</sup>. En sujetos voluntarios sanos se ha observado como la hipoxia intermitente aumenta la expresión de VEGF<sup>163</sup>. Y en pacientes con SAOS la administración de oxígeno durante la noche disminuyó sustancialmente los niveles de VEGF<sup>164</sup>. El VEGF podría por tanto comportarse como un factor protector frente al daño vascular derivado por la hipoxia intermitente crónica<sup>165</sup>. Todos estos datos ponen de manifiesto el interés suscitado por el VEGF en pacientes con SAOS como potencial nexo entre la hipoxia y la función endotelial.

De acuerdo con lo anterior, numerosos estudios han descrito de forma repetida niveles de VEGF elevados en pacientes con SAOS<sup>164,166-175</sup>, frecuentemente asociado a la severidad del mismo, aunque los resultados no han sido siempre invariablemente positivos<sup>176-178</sup>. Gozal et al objetivaron como concentraciones de VEGF por encima de 150 pg/ml en adultos eran predictores de la presencia de SAOS según IAH  $>30$ <sup>167</sup>. De forma concordante, en nuestro estudio los niveles de VEGF se encontraron sustancialmente por encima de dichos valores y en general en los valores superiores dentro del rango comunicado por otros trabajos. Por otra parte, Ma et al objetivaron niveles de VEGF significativamente más elevados en pacientes con SAOS e hipertensión que aquellos SAOS normotensos<sup>174</sup>, mientras que un

estudio más reciente no encontró tales hallazgos<sup>179</sup>. Los resultados de nuestro trabajo muestran igualmente no diferencias en los niveles de VEGF entre pacientes con SAOS normotensos e hipertensos.

Un número limitado de estudios incluyendo un número reducido de pacientes han evaluado el efecto de la CPAP sobre los niveles de VEGF. Maeder et al no objetivaron cambios en las concentraciones de VEGF tras una noche de tratamiento con CPAP<sup>180</sup>. Igualmente, la retirada de CPAP en pacientes bajo dicho tratamiento durante más de 12 meses no se asoció a elevaciones en los valores de VEGF a corto plazo (1 semana)<sup>181</sup>. Por el contrario, dos trabajos han descrito una mejora significativa de los niveles de VEGF en pacientes con SAOS tratados durante 1 año con CPAP, independientemente del IMC<sup>169,175</sup>. A diferencia de los resultados previamente comunicados, en nuestro estudio hemos objetivado un ligero incremento, en el límite de la significación estadística ( $p=0.049$ ), de los niveles medios de VEGF tras 3 meses de tratamiento con CPAP (a expensas principalmente del grupo de pacientes hipertensos, si bien el análisis separado por subgrupos no alcanzó diferencias significativas en ambos casos ( $p=0.056$  en pacientes hipertensos;  $p=0.480$  en normotensos). La interpretación de nuestros datos en relación al aumento del VEGF tras CPAP es incierta. No obstante, teniendo en cuenta los datos previamente publicados, podríamos especular que la CPAP a corto plazo (3 meses) podría inducir un aumento inicial de los niveles de VEGF como posible expresión de la reparación vascular en curso motivada por el tratamiento con CPAP, con una normalización posterior progresiva de los niveles de VEGF a largo plazo (1 año). En este sentido, una mayor severidad del SAOS (determinado por un mayor IAH e índice de desaturación) se asociaron positivamente a mayores incrementos en los niveles de VEGF durante el tratamiento con CPAP, lo que puede ser concordante con la hipótesis previamente planteada.

#### Micropartículas CD31+/Anexina V+

Las micropartículas (MP) circulantes son pequeños fragmentos o vesículas formadas a partir de la membrana celular en respuesta a la activación celular, daño celular (p.ej. estrés mecánico) o apoptosis<sup>182</sup>. Las MP constituyen una población heterogénea de partículas de un tamaño entre 100 nm y 1  $\mu$ m que pueden tener su origen en diferentes tipos celulares (p.ej. células endoteliales, plaquetas, eritrocitos o leucocitos) y son morfológicamente distintas de

los exosomas (que se originan de cuerpos multivesiculares intracelulares y son de menor tamaño) y de los cuerpos apoptóticos (de mayor tamaño que las MP)<sup>182,183</sup>. Las MP están formadas por una bicapa de fosfolípidos con exposición de diferentes proteínas y receptores y pueden encerrar componentes citosólicos como enzimas, factores de transcripción o mRNA, derivados de sus células de origen<sup>184,185</sup>. El número, tamaño, composición o características funcionales de las MP depende del tipo celular de origen e igualmente podría venir determinado por el estímulo que las genera<sup>186,187</sup>. Si bien inicialmente se consideraron partículas inertes, actualmente se les atribuye un papel importante en la regulación de la homeostasis celular participando como mediadores en condiciones fisiológicas y patológicas<sup>186</sup>. En condiciones fisiológicas, las MP podrían portar distintas moléculas (como receptores, integrinas, factores de crecimiento, RNAs, etc.) derivadas de sus células de origen y funcionalmente activas; de esta manera, podrían jugar un papel destacado en la interacción y comunicación celular, transferencia intercelular de información biológica, y participar como mediadores en procesos inmunológicos e inflamatorios, vasculares, coagulación, proliferación y diferenciación celular, angiogénesis o regeneración tisular<sup>182,184,186</sup>.

El papel de las MP es complejo y podrían tener efectos tanto favorables como deletéreos en la función endotelial. Así, diversos tipos de MP pueden favorecer el desarrollo de disfunción endotelial mediante la alteración del balance entre óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno<sup>186</sup>. Igualmente, distintos estímulos inflamatorios pueden producir MP derivadas de leucocitos que, a su vez, pueden estimular la actividad inflamatoria y procoagulante del endotelio, por ejemplo estimulando la expresión de genes proinflamatorios en células endoteliales que resultan en la producción de citoquinas y moléculas de adhesión<sup>188</sup>. Por otra parte, las MP derivadas de plaquetas pueden presentar un fenotipo procoagulante con exposición de fosfatidilserina o factor tisular que puede iniciar o propagar los proceso de coagulación<sup>186</sup>; en este sentido, Sinauridze et al observaron que la superficie de las MP derivadas de plaquetas tiene 50 a 100 veces mayor actividad procoagulante comparada con la superficie normal plaquetaria<sup>189</sup>. Por otra parte, Boulanger et al comprobaron como MP de pacientes con infarto agudo de miocardio producían deterioro de la relajación dependiente del endotelio en muestras animales de aorta<sup>190</sup>. Y distintos estudios han comprobado una disminución de la respuesta por FMD en pacientes con niveles elevados de MP<sup>191,192</sup>.

Las MP circulantes se han propuesto como marcadores en distintas condiciones cardiovasculares<sup>186,193,194</sup>. No obstante, no está claro si las MP tienen un papel causal en la producción o progresión de la enfermedad vascular, o si sus niveles elevados son reflejo de mecanismos protectores o de reparación, o si son sólo marcadores de enfermedad vascular, o bien varias de estas circunstancias a la vez<sup>186</sup>. Niveles elevados de MP circulantes se han relacionado con hipertensión<sup>195</sup>, diabetes<sup>196-198</sup>, arteriosclerosis subclínica<sup>186</sup>, enfermedad coronaria<sup>199-202</sup>, enfermedad carotídea<sup>203</sup> y cerebrovascular<sup>204</sup> o enfermedad arterial periférica<sup>200</sup>.

Diferentes trabajos han estudiado los niveles circulantes de MP de distinto origen celular en pacientes con SAOS<sup>187</sup>. Los resultados derivados de nuestra revisión sistemática (tablas 23 a 28) ponen de manifiesto una importante heterogeneidad entre los diferentes estudios, motivada por las diferencias en los pacientes incluidos en cada caso y en los protocolos para la determinación analítica de las MP y, sobre todo, de los diferentes fenotipos y marcadores utilizados, incluso cuando las MP son del mismo origen celular; a ello se une la obtención de resultados no uniformes. Así, mientras algunos estudios no han encontrado diferencias significativas en los niveles de distintas MP entre pacientes con SAOS y controles<sup>95,96,105</sup>, otros han comunicado resultados positivos<sup>99,101,102,104</sup>, mientras que en otros los resultados han sido diferentes en función del subtipo de MP estudiadas<sup>98,100,109</sup> (tabla 28); en conjunto, aun considerando por separado los distintos subtipos de MP, la evidencia de asociación entre MP y SAOS resulta incierta. Los datos en relación al efecto del tratamiento con CPAP son muy limitados, tanto por el número de estudios como por el reducido número de pacientes; Jelic et al (n=7) y Jun et al (n=21), con una duración del tratamiento de 4 a 6 semanas, no objetivaron cambios significativos en los niveles de EMP CD31+/CD42- o MP CD31+/Anexina V+<sup>99,101</sup>; por el contrario, Yun et al sí encontraron un descenso significativo en los niveles de EMP que expresaban E-selectina (CD62E+), la cual puede ser reflejo de activación endotelial y por tanto dichas EMP ser generadas por células endoteliales activadas<sup>101</sup>. Maruyama et al, tras una media de 6 meses de tratamiento con CPAP en 7 pacientes con SAOS objetivaron una disminución significativa del número de PMP circulantes<sup>104</sup>. Finalmente, en el único ensayo clínico hasta la fecha, Ayers et al describieron un incremento significativo en los niveles de ciertos subtipos de EMP (E-selectina y CD106+)

tras 2 semanas de retirada de CPAP en pacientes previamente tratados con ella durante más de 12 meses, pero no hubo cambios en otros subtipos de EMP (CD31+/CD41-) o en PMP<sup>106</sup>.

En nuestro estudio evaluamos los niveles de MP apoptóticas CD31+/Anexina V+ como marcadores de daño endotelial; dichas MP engloban MP de origen endotelial y plaquetario, ya que ambos tipos celulares expresan el marcador CD31. El marcador Anexina V, con alta afinidad para fosfatidilserina, se utilizó como marcador de apoptosis: en condiciones de reposo los fosfolípidos están asimétricamente distribuidos en la membrana celular, de forma que la fosfatidilserina se localiza casi exclusivamente en la lámina interna de la misma; la translocación de fosfatidilserina a la capa externa de la membrana celular o externalización es uno de los pasos iniciales en la apoptosis celular<sup>184</sup>, siendo usado como marcador de apoptosis. Werner et al han descrito una correlación significativa entre niveles aumentados de MP CD31+/Anexina V+ en sangre periférica y mayor deterioro de la vasodilatación coronaria dependiente del endotelio estudiada por angiografía en 50 pacientes con enfermedad coronaria; en análisis multivariados, el incremento de MP predecía una mayor severidad de dicha disfunción endotelial independientemente de otros factores de riesgo clásicos<sup>205</sup>.

A diferencia de los resultados comunicados por Yun et al usando la misma población de MP<sup>101</sup>, en nuestro trabajo comprobamos una disminución significativa de los niveles de MP CD31+/Anexina V+ tras 3 meses de tratamiento con CPAP; en el análisis según diagnóstico o no de hipertensión, a nivel basal los niveles fueron significativamente superiores en los pacientes hipertensos, y tras CPAP comprobamos que los cambios en los niveles de MP eran debidos fundamentalmente a los pacientes hipertensos, en los que los niveles medios se redujeron a la mitad, mientras que no hubo cambios significativos en los sujetos normotensos. Estos datos sugieren que la presencia de hipertensión, aun cuando los niveles de presión arterial están bien controlados, son un determinante muy importante de la producción de MP, probablemente más determinante que el SAOS; el tratamiento con CPAP a corto plazo (3 meses) sería beneficioso en pacientes con SAOS e hipertensión, mientras que en aquellos sujetos con SAOS normotensos 1) el efecto podría ser limitado o no tener lugar, 2) o bien, al partir de niveles significativamente más reducidos, no presentarían tal margen de mejora, 3) o bien requerirían una duración del tratamiento más prolongada para que se produzcan cambios significativos. La ausencia de resultados positivos en el trabajo de Yun et

al con la misma población de MP podría deberse a la menor duración del tratamiento con CPAP (4 a 6 semanas) unido a un menor número de pacientes (n=21) e inclusión de un menor porcentaje de sujetos hipertensos (36%) en dicho estudio<sup>101</sup>. Finalmente, cabe reseñar que en nuestro estudio el beneficio de la CPAP en términos de disminución de los niveles de MP fue superior en pacientes con menor severidad del SAOS determinada por las saturaciones media y mínima de oxígeno en el estudio poligráfico (no hubo en cambio correlación con los niveles de IAH), sugiriendo la necesidad de un diagnóstico precoz para que el tratamiento sea más eficaz.

En definitiva, existe un interés creciente por el estudio de las MP como marcadores de patología cardiovascular y mecanismos subyacentes como la disfunción endotelial. No obstante, en pacientes con SAOS la evidencia de su posible utilidad como marcadores de daño vascular y para monitorizar el efecto de la CPAP es hasta el momento limitada e incierta y, como sugiere nuestro trabajo, los niveles de MP podrían depender de la presencia de patología vascular asociada ya establecida, en particular hipertensión.

### ***Daño Celular***

El DNA libre circulante (cell-free DNA, cfDNA) hace referencia a pequeños fragmentos de cualquier forma de DNA presentes de forma libre fuera de las células en el sistema circulatorio<sup>206</sup>. Además de en sangre, el cfDNA se ha encontrado presente en otros fluidos, entre ellos orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o fluido peritoneal<sup>207</sup>. Aunque la biología y significado del cfDNA no es del todo conocido, se piensa que la principal fuente para sus concentraciones circulantes elevadas es la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis, si bien células íntegras podrían igualmente liberar cfDNA en respuesta a distintos estímulos o bajo ciertas condiciones y funcionar como vectores de transmisión de información en la interacción y comunicación celular<sup>206-208</sup>.

Si bien la presencia de cfDNA en plasma humano se describió inicialmente en la década de los 40<sup>209</sup>, ha sido principalmente en los últimos años cuando ha emergido con más fuerza como un potencial biomarcador para el diagnóstico, monitorización y/o pronóstico en diferentes condiciones y patologías. Las concentraciones normales de cfDNA en sujetos sanos

son bajas, habiéndose estimado aproximadamente entre 0 y 100 ng/ml y sugerido una media de 30 ng/ml<sup>207</sup>, si bien los datos son variables y existe solapamiento entre los valores normales y alterados encontrados en diferentes estudios<sup>208</sup>. Asimismo, los protocolos de determinación del cfDNA son variables en los distintos estudios publicados y requieren una revisión que unifique los procedimientos<sup>208</sup>. No obstante lo anterior, el cfDNA se ha asociado en distintos estudios a procesos como la inflamación<sup>210</sup>, el envejecimiento<sup>211</sup> o el ejercicio intenso<sup>212</sup> y a numerosas condiciones patológicas como enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, lupus, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren)<sup>207</sup>, sepsis y shock séptico<sup>213,214</sup>, lesiones traumáticas<sup>215-217</sup>, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, pancreatitis aguda<sup>218-220</sup>, rechazo de órgano trasplantado<sup>221</sup>, complicaciones asociadas a la gestación<sup>222,223</sup> o cáncer<sup>224,225</sup>, entre otras. El diagnóstico prenatal no invasivo con cfDNA y la asociación entre cfDNA y lesiones tumorales son probablemente los dos campos donde más ha progresado el estudio de este marcador.

Desde el punto de vista vascular, distintos trabajos han relacionado el cfDNA con condiciones como la diabetes, enfermedad coronaria, ictus, isquemia mesentérica aguda o preeclampsia<sup>207,208,226,227</sup>. Así, por ejemplo, Liu et al, describieron niveles más elevados de cfDNA de origen mitocondrial en pacientes diabéticos y en sujetos con enfermedad coronaria comparado con individuos sanos, y en pacientes con diabetes y enfermedad coronaria comparado con diabéticos sin cardiopatía<sup>228</sup>. La idea de que el daño tisular generado por la isquemia aguda pueda llevar a la liberación de cfDNA ha motivado distintos estudio en infarto agudo de miocardio; al menos 4 trabajos han comunicado datos en este sentido y en todos los casos los niveles de cfDNA resultaron significativamente incrementados comparado con controles<sup>229-232</sup>; asimismo, de forma destacable, niveles más elevados de cfDNA se asociaron a un mayor riesgo posterior de complicaciones<sup>229,232</sup>. En enfermedad cerebrovascular aguda un par de estudios han observado una asociación entre niveles superiores de cfDNA y mayor morbilidad y mortalidad a corto y medio (6 meses) plazo post-ictus en sujetos con ictus isquémico o hemorrágico<sup>233</sup> o en pacientes con síntomas compatibles pero resultados de neuroimagen negativos<sup>234</sup>. Estos datos sugieren que el cfDNA puede tener interés no sólo diagnóstico sino también pronóstico en pacientes con eventos vasculares agudos.

El daño celular y tisular resultante de procesos como el estrés oxidativo, respuesta inflamatoria o disfunción endotelial derivados de la hipoxia en pacientes con SAOS sugiere

que en estos pacientes los niveles de cfDNA podrían estar aumentados y servir como marcador de la enfermedad. Hasta donde nosotros conocemos sólo dos estudios han evaluado los niveles de cfDNA en pacientes con SAOS<sup>235,236</sup>. Shin et al incluyeron una muestra de 82 varones con SAOS sin enfermedad coronaria y Ye et al estudiaron 127 pacientes con SAOS libres de factores de riesgo y enfermedad cardiovascular; en ambos casos el SAOS se definió por un IAH  $\geq 5$ , y los pacientes presentaron sobrepeso (IMC medio 26-27 kg/m<sup>2</sup>) y una edad media en torno a 45 años; los dos estudios describieron concentraciones superiores de cfDNA (en plasma<sup>235</sup> o en suero<sup>236</sup>) en pacientes con SAOS respecto a los controles, así como en pacientes con SAOS severo comparado con aquellos con SAOS leve a moderado, y los niveles de cfDNA se asociaron positivamente al IAH<sup>235,236</sup>. Finalmente, Ye et al, en un subgrupo de 10 pacientes con SAOS moderado a severo tratados con CPAP durante 6 meses objetivaron un descenso sustancial de los niveles de cfDNA (117.2  $\pm$  23.1 ng/ml a nivel basal vs. 38.5  $\pm$  8.6 post-tratamiento)<sup>236</sup>.

En la misma línea que los estudios comentados, en nuestro trabajo hemos observado unos niveles basales elevados de cfDNA, por encima de lo previamente descrito en sujetos sanos y superiores a los comunicados por Shin et al y Ye et al (probablemente debido a las diferentes características de los participantes incluidos en cada caso, ya que en nuestro caso incluimos sólo SAOS al menos moderado y los pacientes resultaron ser, de media, mayor edad y con un IMC sustancialmente más elevado, entre otras características). Igualmente, las concentraciones de cfDNA se redujeron significativamente tras 3 meses de tratamiento con CPAP (sin alcanzar los niveles previamente comunicados por Ye et al, motivado probablemente de nuevo por las diferencias en los sujetos incluidos en cada caso y por la diferente duración del tratamiento).

La presencia de diagnóstico o no de hipertensión no resultó en concentraciones diferentes de cfDNA a nivel basal, quizás porque los pacientes hipertensos tenían las cifras de PA adecuadamente controladas (y no significativamente diferentes de los sujetos normotensos). Sin embargo, de forma destacable, objetivamos como tras 3 meses de tratamiento con CPAP los pacientes hipertensos presentaron una reducción significativa de los niveles de cfDNA, mientras que en los sujetos normotensos se observó igualmente una tendencia favorable pero sin alcanzar la significación estadística.

A diferencia de lo observado en los estudios anteriores, nosotros no observamos una correlación significativa entre IAH y niveles de cfDNA. Sin embargo, una mayor severidad del SAOS (mayor IAH o CT90% o menor saturación de oxígeno) se asoció a un menor cambio en las concentraciones de cfDNA durante el tratamiento con CPAP.

Los datos de nuestro estudio sumado a los dos anteriores sugieren que los niveles de cfDNA en pacientes con SAOS se encuentran elevados pero en distinta magnitud dependiendo de la severidad del SAOS (mayores concentraciones de cfDNA) y de las características basales de los pacientes (con posible influencia de la edad e IMC entre otros factores). Por otra parte, el tratamiento con CPAP produce una reducción significativa de los niveles de cfDNA, la cual puede ser mayor con una duración más prolongada del tratamiento y puede depender de la severidad del SAOS y las comorbilidad asociada, en particular de hipertensión arterial. De hecho, en nuestro estudio, niveles superiores de PA a nivel basal se asociaron positivamente con mayores concentraciones de cfDNA iniciales y con mayores cambios de cfDNA durante el tratamiento.

Finalmente, los niveles de cfDNA no se correlacionaron significativamente con las concentraciones de MP o con el área de hiperemia. Ello puede ser debido a que el cfDNA, como marcador de daño celular, es expresión de una afectación tisular más amplia no sólo limitada al endotelio.

### ***Efectos del tratamiento con CPAP según diagnóstico de Hipertensión***

Hasta donde nosotros conocemos, nuestro trabajo es el primero que evalúa la influencia de la presencia de diagnóstico de hipertensión en los efectos del tratamiento con CPAP sobre los distintos marcadores estudiados.

Los resultados mostraron datos interesantes. Primeramente, hay que tener en cuenta que los pacientes hipertensos estaban bien controlados sin diferencias a nivel basal en las cifras de PA con los sujetos normotensos. Brevemente, como se ha ido discutiendo más en detalle a lo largo de esta sección, el tratamiento con CPAP llevó a una mejoría de los niveles de PA, resistencia a la insulina y área de hiperemia (FLD) principalmente en los pacientes normotensos, mientras que los cambios del cociente PICP/ICTP, VEGF, MP y cfDNA fueron

principalmente a expensas de los pacientes hipertensos. Todo ello sugiere que la presencia de hipertensión puede influir en distinto grado sobre los distintos mecanismos fisiopatológicos presentes en los pacientes con SAOS, y remarca la necesidad de tener en cuenta el estatus de hipertensión a la hora de valorar los efectos del tratamiento con CPAP

No obstante, debemos tener en cuenta que los pacientes normotensos eran, de media, más jóvenes y con mayor frecuencia varones, lo que puede tener influencia en los resultados. No hubo diferencia en otras características basales entre los dos grupos.

### ***Limitaciones***

En el presente trabajo debemos reconocer una serie de limitaciones. Por una parte, el pequeño tamaño muestral que probablemente ha determinado un bajo poder estadístico para ciertos análisis, especialmente para la comparación entre subgrupos (p.ej. hipertensos vs. pacientes no hipertensos). El poder estadístico ( $P = 1 - \text{error } \beta$ ) determina la probabilidad de encontrar diferencias significativas en una muestra en caso de que dichas diferencias realmente existan; generalmente se considera adecuado un poder estadístico de al menos el 80%. En nuestro estudio, no obstante, el hecho de que hayamos encontrado numerosas diferencias estadísticamente significativas y que estas sean concordantes entre sí apoyan los resultados obtenidos y el que las diferencias no encontradas efectivamente sean no significativas.

A modo de prueba, llevamos a cabo una estimación post hoc del poder estadístico que tenía nuestro estudio para ciertas variables de acuerdo a la magnitud del efecto encontrado (calculado en función de las medias y desviaciones estándar de los resultados obtenidos) y el tamaño muestral. Para ello utilizamos el software G\*Power versión 3.1.9.2 (Heinrich Heine University Düsseldorf, Germany)<sup>237-239</sup>. Así, para el caso de la comparación antes – después de los niveles de micropartículas, para un error alfa del 0.05,  $n = 30$  y una magnitud del efecto encontrada de 0.547, la potencia estadística estimada post hoc fue del 82%. En el caso del cfDNA (magnitud del efecto 0.649), la potencia fue del 93%.

El tamaño muestral, igualmente, ha limitado la posibilidad de llevar a cabo otros análisis adicionales por subgrupos (p.ej. diabéticos vs. no diabéticos, patología cardiovascular previa vs. no).

Por otra parte, en nuestro estudio se seleccionó una muestra de conveniencia (pacientes consecutivos que cumplían los criterios de inclusión). Por el contrario, si bien nuestro estudio no es un ensayo clínico, si llevamos a cabo una intervención (tratamiento con CPAP), administrando la misma a aquellos pacientes con indicación para dicha terapia (estudio cuasiexperimental); no obstante, la ausencia de grupo control (determinada por el propio diseño del estudio) no nos permite comparar con otro grupo de sujetos el comportamiento de los marcadores estudiados. No obstante, dicha comparación no era un objetivo de nuestro estudio, ya que fue diseñado para comparar a los sujetos con ellos mismos antes y después del tratamiento con CPAP. En cualquier caso, la posible inclusión de un grupo control hubiera tenido que ser con sujetos necesariamente distintos a los casos en relación al SAOS, ya que no hubiera sido ético tomar un grupo control de pacientes con SAOS con las mismas características y comorbilidad y, por tanto, con clara indicación de CPAP, y dejar de administrarles dicho tratamiento. En el caso de la comparación por subgrupos, en cambio, donde el objetivo era valorar la influencia de la hipertensión sobre los efectos del tratamiento con CPAP, el diseño del estudio sí incluyó tanto casos (pacientes hipertensos) como controles (sujetos normotensos). Dichos análisis, no obstante, constituyen un estudio post hoc.

El seguimiento de los pacientes fue de 3 meses. Un seguimiento más prolongado podría quizás haber mostrado otros cambios adicionales debidos a una exposición más crónica al tratamiento con CPAP. No obstante, debemos resaltar que en nuestro trabajo se comprueban numerosos cambios significativos y que, de forma destacable, dichos cambios tienen lugar a corto plazo (3 meses de tratamiento con CPAP), lo que sugiere un rápido beneficio de esta terapia mediado por la atenuación del daño relacionado con la hipoxia.

En nuestro estudio, de forma general, los pacientes incluidos presentan un SAOS moderado a severo, con frecuente obesidad y otros factores de riesgo vascular pero baja comorbilidad en términos de enfermedad cardiovascular establecida, estables y bien controlados en relación a la comorbilidad asociada (fundamentalmente hipertensión y otros

factores de riesgo vascular), y con adecuada adherencia y cumplimiento del tratamiento con CPAP. Los resultados de nuestro trabajo pueden no ser extrapolables a sujetos con distintas características, en los que los marcadores podrían presentar un comportamiento diferente.

En relación con la determinación de MP, es probable que existan MP de tamaño inferior no detectadas debido a que la resolución de los citómetros de flujo actuales no lo permiten; adicionalmente, la existencia de un “ruido de fondo” (background noise) durante la técnica puede generar alguna interferencia en el conteo. Si bien los citómetros actuales han mejorado su sensibilidad y disminuido las interferencias, estas constituyen potenciales limitaciones inherentes al uso de esta técnica<sup>240</sup>. No obstante, un estudio con microvesículas procoagulantes (anexina V+) y derivadas de plaquetas ha observado que el conteo del número de microvesículas mediante citometría de flujo convencional se correlaciona significativamente con los resultados de estudios funcionales de las mismas; dicha capacidad funcional, por definición, es resultado de la población entera de microvesículas<sup>240</sup>. Esto sugiere, por tanto, que la determinación de eventos mediante citometría es un buen reflejo y estimación de la población total de MP.

# CONCLUSIONS

## CONCLUSIONS

The present study was performed in a consecutive sample of patients newly diagnosed with moderate-to-severe obstructive sleep apnea-hypopnea (OSA) syndrome with indication for long-term treatment with continuous positive airway pressure (CPAP). The participants were well controlled with respect to blood pressure and other vascular risk factors and comorbid conditions. On average, the individuals were middle-aged, obese and with frequent vascular risk factors but with a low prevalence of established cardiovascular disease. The patients showed an increased insulin resistance index, slightly high C-reactive protein (CRP) and an impaired endothelial function as determined by a reduced area of hyperemia after a transient ischemia.

The participants were treated with nocturnal CPAP therapy during three months and all of them exhibited an appropriate adherence to treatment. After completion of this period of treatment with CPAP, the patients experienced:

- A significant reduction of blood pressure levels and heart rate and a frequent restoration of the nocturnal dipper pattern.
- An improvement in insulin resistance-related parameters (with no changes in glucose or glycated haemoglobin) and a trend towards a favourable effect on cholesterol levels.
- An improvement in the endothelium-dependent vasodilation, as determined by the area of hyperemia after a transient ischemia (by laser-doppler flowmetry).
- A significant increase in the level of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and reduction of the apoptotic microparticles (MP) CD31+/Annexin V+ and circulating cell-free DNA (cfDNA). A more severe disease was associated with larger changes in VEGF but lower variations in MP and cfDNA levels during the treatment with CPAP.
- Conversely, the markers of vascular remodeling/fibrosis (collagen metabolism) and CRP did not experience any significant modification.

All these changes were independent of the body mass index or smoking, as both of them remained unchanged during the follow-up.

Interestingly, the presence of hypertension, even when it is well controlled, may influence importantly the effects of CPAP in patients with OSA, as suggested by the subgroup analysis depending on the presence or not of this condition. In fact, those subjects without hypertension experienced a modest but significant reduction in the levels of blood pressure, whereas in subjects with hypertension there was a similar trend but it did not reach statistical significance (maybe because blood pressure was well controlled with pharmacological treatment and so there was not much room for further reduction). On the contrary, the changes in insulin resistance, endothelium-dependent vasodilation and levels of VEGF, MP and cfDNA were mainly at the expense of those patients with hypertension.

Altogether, these results suggest that a short-medium term (3 months) treatment with CPAP in subject with moderate-to-severe OSA with good adherence to therapy, results in a beneficial effect on different underlying pathologic mechanisms linked to vascular risk and development of atherosclerosis. OSA severity and presence of (well-controlled) hypertension may determine the effects of CPAP in OSA patients in the sense that patients with less severe OSA (thus, in an earlier stage of the disease) and those with hypertension (thus, with potentially enhanced vascular impairment) may benefit more from therapy with CPAP.

By preventing the collapse of the upper airway and the episodes of apnea and hypopnea, the therapy with CPAP would prevent or attenuate the intermittent hypoxemia-reoxygenation episodes, sympathetic nervous system activation, oxidative stress or changes in intrathoracic pressure, amongst others. These protective effects would ultimately lead to improvements in blood pressure, metabolic disturbances such as insulin resistance, endothelial function and cellular damage, as we have shown in our study.

We have not observed effects on CRP levels as a marker of inflammation, maybe because a longer duration of the CPAP treatment might be needed; in addition, we can not rule out the possibility that CPAP may affect other inflammatory markers not assessed in our study, such as different cytokines or adhesion molecules.

The favourable effects of CPAP therapy that we have found in our study may ameliorate the vascular risk of patients with OSA and, potentially, might lead to a reduction in the risk of future cardiovascular events.

A major strength of our study is that we have approached at the same time the effects of CPAP therapy on a number of different pathologic mechanisms that may link OSA with cardiovascular risk. By doing so, we have tried to clarify by which mechanisms the CPAP may mainly exert its suggested beneficial effects on cardiovascular risk. This may help to design the strategy to approach the treatment of OSA from a cardiovascular point of view.

Although the present study adds to those previously suggesting a beneficial effect of CPAP therapy on cardiovascular-related conditions through the improvement of the endothelial dysfunction and other impaired mechanisms, further studies with larger sample size, longer duration and, where possible, with a randomized controlled design are needed in order to confirm these results and establish definitive conclusions.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Consenso Nacional sobre el síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Arch Bronconeumol* 2005;41:3-110.
2. Qaseem A, Dallas P, Owens DK, Starkey M, Holty JE, Shekelle P. Diagnosis of obstructive sleep apnea in adults: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2014;161:210-20.
3. Lloberes P, Duran-Cantolla J, Martinez-Garcia MA, et al. Diagnosis and treatment of sleep apnea-hypopnea syndrome. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. *Arch Bronconeumol* 2011;47:143-56.
4. Qaseem A, Holty JE, Owens DK, Dallas P, Starkey M, Shekelle P. Management of obstructive sleep apnea in adults: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2013;159:471-83.
5. Epstein LJ, Kristo D, Strollo PJ, Jr., et al. Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *J Clin Sleep Med* 2009;5:263-76.
6. Somers VK, White DP, Amin R, et al. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation* 2008;118:1080-111.
7. Fonseca MI, Pereira T, Caseiro P. Death and disability in patients with sleep apnea--a meta-analysis. *Arq Bras Cardiol* 2015;104:58-66.
8. Hartenbaum N, Collop N, Rosen IM, et al. Sleep apnea and commercial motor vehicle operators: Statement from the joint task force of the American College of Chest Physicians, the American College of Occupational and Environmental Medicine, and the National Sleep Foundation. *Chest* 2006;130:902-5.
9. Ge X, Han F, Huang Y, et al. Is obstructive sleep apnea associated with cardiovascular and all-cause mortality? *PLoS One* 2013;8:e69432.
10. Young T, Finn L, Peppard PE, et al. Sleep-disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep* 2008;31:1071-8.
11. Palamaner Subash Shantha G, Kumar AA, Cheskin LJ, Pancholy SB. Association between sleep-disordered breathing, obstructive sleep apnea, and cancer incidence: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Med* 2015.
12. Kim R, Kapur VK. Emerging from the shadows: a possible link between sleep apnea and cancer. *J Clin Sleep Med* 2014;10:363-4.
13. 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* 2001;163:685-9.
14. Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 2000;284:3015-21.
15. Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1217-39.

16. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993;328:1230-5.
17. Sharma SK, Katoch VM, Mohan A, et al. Consensus and evidence-based Indian initiative on obstructive sleep apnea guidelines 2014 (first edition). *Lung India* 2015;32:422-34.
18. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 2013;177:1006-14.
19. Sociedad Espanola de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Documento de consenso del síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño en niños. *Arch Bronconeumol* 2011;47:2-18.
20. Young T, Evans L, Finn L, Palta M. Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep* 1997;20:705-6.
21. Lin CM, Davidson TM, Ancoli-Israel S. Gender differences in obstructive sleep apnea and treatment implications. *Sleep Med Rev* 2008;12:481-96.
22. Quintana-Gallego E, Carmona-Bernal C, Capote F, et al. Gender differences in obstructive sleep apnea syndrome: a clinical study of 1166 patients. *Respir Med* 2004;98:984-9.
23. Xie W, Zheng F, Song X. Obstructive sleep apnea and serious adverse outcomes in patients with cardiovascular or cerebrovascular disease: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2014;93:e336.
24. Johnson KG, Johnson DC. Frequency of sleep apnea in stroke and TIA patients: a meta-analysis. *J Clin Sleep Med* 2010;6:131-7.
25. Chami HA, Resnick HE, Quan SF, Gottlieb DJ. Association of incident cardiovascular disease with progression of sleep-disordered breathing. *Circulation* 2011;123:1280-6.
26. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study. JAMA* 2000;283:1829-36.
27. Seicean S, Kirchner HL, Gottlieb DJ, et al. Sleep-disordered breathing and impaired glucose metabolism in normal-weight and overweight/obese individuals: the Sleep Heart Health Study. *Diabetes Care* 2008;31:1001-6.
28. Elmasry A, Lindberg E, Berne C, et al. Sleep-disordered breathing and glucose metabolism in hypertensive men: a population-based study. *J Intern Med* 2001;249:153-61.
29. Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA, Calverley PM, Wilding JP. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur Heart J* 2004;25:735-41.
30. Chami HA, Gottlieb DJ, Redline S, Punjabi NM. Association Between Glucose Metabolism and Sleep-Disordered Breathing during REM Sleep. *Am J Respir Crit Care Med* 2015.
31. Chami HA, Devereux RB, Gottdiener JS, et al. Left ventricular morphology and systolic function in sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study. *Circulation* 2008;117:2599-607.
32. Niroumand M, Kuperstein R, Sasson Z, Hanly PJ. Impact of obstructive sleep apnea on left ventricular mass and diastolic function. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1632-6.
33. Guidry UC, Mendes LA, Evans JC, et al. Echocardiographic features of the right heart in sleep-disordered breathing: the Framingham Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:933-8.
34. Mehra R, Benjamin EJ, Shahar E, et al. Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:910-6.
35. Raghuram A, Clay R, Kumbam A, Tereshchenko LG, Khan A. A systematic review of the association between obstructive sleep apnea and ventricular arrhythmias. *J Clin Sleep Med* 2014;10:1155-60.

36. Shahar E, Whitney CW, Redline S, et al. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:19-25.
37. Gilat H, Vinker S, Buda I, Soudry E, Shani M, Bachar G. Obstructive sleep apnea and cardiovascular comorbidities: a large epidemiologic study. *Medicine (Baltimore)* 2014;93:e45.
38. Culebras A. Sleep apnea and stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2015;15:503.
39. Arzt M, Young T, Finn L, Skatrud JB, Bradley TD. Association of sleep-disordered breathing and the occurrence of stroke. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1447-51.
40. Punjabi NM, Newman AB, Young TB, Resnick HE, Sanders MH. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: an outcome-based definition of hypopneas. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1150-5.
41. Hu FB, Willett WC, Manson JE, et al. Snoring and risk of cardiovascular disease in women. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:308-13.
42. Hu FB, Willett WC, Colditz GA, et al. Prospective study of snoring and risk of hypertension in women. *Am J Epidemiol* 1999;150:806-16.
43. Al-Delaimy WK, Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Snoring as a risk factor for type II diabetes mellitus: a prospective study. *Am J Epidemiol* 2002;155:387-93.
44. Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 2000;342:1378-84.
45. Loke YK, Brown JW, Kwok CS, Niruban A, Myint PK. Association of obstructive sleep apnea with risk of serious cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2012;5:720-8.
46. Wang X, Ouyang Y, Wang Z, Zhao G, Liu L, Bi Y. Obstructive sleep apnea and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cardiol* 2013;169:207-14.
47. O'Connor GT, Caffo B, Newman AB, et al. Prospective study of sleep-disordered breathing and hypertension: the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:1159-64.
48. Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, et al. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation* 2010;122:352-60.
49. Redline S, Yenokyan G, Gottlieb DJ, et al. Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:269-77.
50. Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, et al. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med* 2009;6:e1000132.
51. Querejeta Roca G, Redline S, Claggett B, et al. Sex-Specific Association of Sleep Apnea Severity with Subclinical Myocardial Injury, Ventricular Hypertrophy, and Heart Failure Risk in a Community Dwelling Cohort: The Atherosclerosis Risk in Communities-Sleep Heart Health Study. *Circulation* 2015.
52. Querejeta Roca G, Redline S, Punjabi N, et al. Sleep apnea is associated with subclinical myocardial injury in the community. The ARIC-SHHS study. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1460-5.
53. Sanchez-de-la-Torre M, Campos-Rodriguez F, Barbe F. Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease. *Lancet Respir Med* 2013;1:61-72.
54. May AM, Mehra R. Obstructive sleep apnea: role of intermittent hypoxia and inflammation. *Semin Respir Crit Care Med* 2014;35:531-44.

55. Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities. *Chest* 2015;147:266-74.
56. Toraldo DM, F DEN, M DEB, Scoditti E. Obstructive sleep apnoea syndrome: a new paradigm by chronic nocturnal intermittent hypoxia and sleep disruption. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2015;35:69-74.
57. Pamies E, Vallejo AJ, Beltrán LM. Disfunción Endotelial y Daño cardiovascular. In: Editorial Académica Española, ed. *Novedades en Enfermedades Cardiovasculares; nuevos marcadores de riesgo vascular* 2012.
58. Flammer AJ, Luscher TF. Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly* 2010;140:w13122.
59. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 2010;459:923-39.
60. Reriani MK, Lerman LO, Lerman A. Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors. *Biomark Med* 2010;4:351-60.
61. Stiefel P, Moreno-Luna R, Vallejo-Vaz AJ, et al. Which parameter is better to define endothelial dysfunction in a test of postocclusive hyperemia measured by laser-Doppler flowmetry? *Coron Artery Dis* 2012;23:57-61.
62. Budhiraja R, Parthasarathy S, Quan SF. Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med* 2007;3:409-15.
63. Schwarz EI, Puhan MA, Schlatzer C, Stradling JR, Kohler M. Effect of CPAP therapy on endothelial function in obstructive sleep apnoea: A systematic review and meta-analysis. *Respirology* 2015;20:889-95.
64. Hoyos CM, Melehan KL, Liu PY, Grunstein RR, Phillips CL. Does obstructive sleep apnea cause endothelial dysfunction? A critical review of the literature. *Sleep Med Rev* 2015;20:15-26.
65. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). *Manual SEPAR de procedimientos: CPAP y otros sistemas de tratamiento en el SAHS. : Respira-Fundación Española del Pulmón-SEPAR; 2014.*
66. Sullivan CE, Issa FG, Berthon-Jones M, Eves L. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet* 1981;1:862-5.
67. Carmona-Bernal C S-AA, Alcázar-Ramírez JD, Bujalance Zafra J, Campos-Rodríguez F, Capote Gil F, et al. Documento de Consenso sobre el Síndrome de apneas-hiponeas del sueño en Andalucía. *Rev Esp Patol Torac* 2012;24:214-54.
68. Bratton DJ, Stradling JR, Barbe F, Kohler M. Effect of CPAP on blood pressure in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea: a meta-analysis using individual patient data from four randomised controlled trials. *Thorax* 2014;69:1128-35.
69. Alajmi M, Mulgrew AT, Fox J, et al. Impact of continuous positive airway pressure therapy on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea hypopnea: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Lung* 2007;185:67-72.
70. Fava C, Dorigoni S, Dalle Vedove F, et al. Effect of CPAP on blood pressure in patients with OSA/hypopnea a systematic review and meta-analysis. *Chest* 2014;145:762-71.
71. Varounis C, Katsi V, Kallikazaros IE, et al. Effect of CPAP on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea and resistant hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* 2014;175:195-8.

72. Haentjens P, Van Meerhaeghe A, Moscariello A, et al. The impact of continuous positive airway pressure on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea syndrome: evidence from a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *Arch Intern Med* 2007;167:757-64.
73. Bazzano LA, Khan Z, Reynolds K, He J. Effect of nocturnal nasal continuous positive airway pressure on blood pressure in obstructive sleep apnea. *Hypertension* 2007;50:417-23.
74. Xu H, Wang Y, Guan J, Yi H, Yin S. Effect of CPAP on Endothelial Function in Subjects With Obstructive Sleep Apnea: A Meta-Analysis. *Respir Care* 2015;60:749-55.
75. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461-70.
76. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
77. NGSP Web Site. <http://www.ngsp.org/>.
78. HOMA index. Diabetes Trials Unit, Universidad de Oxford, UK. [www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator](http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator).
79. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 1991;14:540-5.
80. Johns MW. Reliability and factor analysis of the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 1992;15:376-81.
81. Johns MW. Daytime sleepiness, snoring, and obstructive sleep apnea. The Epworth Sleepiness Scale. *Chest* 1993;103:30-6.
82. Johns MW. Sleepiness in different situations measured by the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 1994;17:703-10.
83. Johns M, Hocking B. Daytime sleepiness and sleep habits of Australian workers. *Sleep* 1997;20:844-9.
84. The Epworth Sleepiness Scale. <http://epworthsleepinessscale.com/>.
85. Chiner E, Arriero JM, 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* 1999;35:422-7.
86. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2013;34:2159-219.
87. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of hypertension* 2007;25:1105-87.
88. O'Brien E, Parati G, Stergiou G, et al. European Society of Hypertension position paper on ambulatory blood pressure monitoring. *Journal of hypertension* 2013;31:1731-68.
89. Moreno-Luna R, Munoz-Hernandez R, Miranda ML, et al. Olive oil polyphenols decrease blood pressure and improve endothelial function in young women with mild hypertension. *Am J Hypertens* 2012;25:1299-304.
90. Lopez B, Gonzalez A, Diez J. Circulating biomarkers of collagen metabolism in cardiac diseases. *Circulation* 2010;121:1645-54.

91. Macias Blanco C, Fatela-Cantillo D, Jimenez-Jimenez L, et al. [Left ventricular mass, diastolic function and collagen metabolism biomarkers in essential hypertension]. *Med Clin (Barc)* 2012;138:139-44.
92. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
93. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487-95.
94. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998;21:2191-2.
95. Geiser T, Buck F, Meyer BJ, Bassetti C, Haerberli A, Gugger M. In vivo platelet activation is increased during sleep in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Respiration* 2002;69:229-34.
96. Akinnusi ME, El Solh AA. Circulating endothelial microparticle levels and hemodynamic severity of pulmonary hypertension: is there a role for sleep apnea? *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:328; author reply -9.
97. Amabile N, Heiss C, Real WM, et al. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1268-75.
98. Ayers L, Ferry B, Craig S, Nicoll D, Stradling JR, Kohler M. Circulating cell-derived microparticles in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2009;33:574-80.
99. Jelic S, Lederer DJ, Adams T, et al. Endothelial repair capacity and apoptosis are inversely related in obstructive sleep apnea. *Vasc Health Risk Manag* 2009;5:909-20.
100. Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, et al. Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am J Pathol* 2010;177:974-83.
101. Yun CH, Jung KH, Chu K, et al. Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J Clin Neurol* 2010;6:89-98.
102. Kim J, Bhattacharjee R, Kheirandish-Gozal L, Spruyt K, Gozal D. Circulating microparticles in children with sleep disordered breathing. *Chest* 2011;140:408-17.
103. Trzepizur W, Priou P, Paris A, et al. Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2011;37:1293-5.
104. Maruyama K, Morishita E, Sekiya A, et al. Plasma levels of platelet-derived microparticles in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Atheroscler Thromb* 2012;19:98-104.
105. Tual-Chalot S, Fatoumata K, Priou P, et al. Circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium. *Am J Pathol* 2012;181:1473-82.
106. Ayers L, Stoewhas AC, Ferry B, Stradling J, Kohler M. Elevated levels of endothelial cell-derived microparticles following short-term withdrawal of continuous positive airway pressure in patients with obstructive sleep apnea: data from a randomized controlled trial. *Respiration* 2013;85:478-85.
107. Kohler M, Stoewhas AC, Ayers L, et al. Effects of continuous positive airway pressure therapy withdrawal in patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:1192-9.
108. Kim J, Gozal D, Bhattacharjee R, Kheirandish-Gozal L. TREM-1 and pentraxin-3 plasma levels and their association with obstructive sleep apnea, obesity, and endothelial function in children. *Sleep* 2013;36:923-31.

109. Tual-Chalot S, Gagnadoux F, Trzepizur W, Priou P, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles from obstructive sleep apnea syndrome patients induce endothelin-mediated angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:202-7.
110. Drager LF, Brunoni AR, Jenner R, Lorenzi-Filho G, Bensenor IM, Lotufo PA. Effects of CPAP on body weight in patients with obstructive sleep apnoea: a meta-analysis of randomised trials. *Thorax* 2015;70:258-64.
111. Parati G, Lombardi C, Hedner J, et al. Position paper on the management of patients with obstructive sleep apnea and hypertension: joint recommendations by the European Society of Hypertension, by the European Respiratory Society and by the members of European COST (COoperation in Scientific and Technological research) ACTION B26 on obstructive sleep apnea. *Journal of hypertension* 2012;30:633-46.
112. Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, et al. Association of hypertension and sleep-disordered breathing. *Arch Intern Med* 2000;160:2289-95.
113. Haas DC, Foster GL, Nieto FJ, et al. Age-dependent associations between sleep-disordered breathing and hypertension: importance of discriminating between systolic/diastolic hypertension and isolated systolic hypertension in the Sleep Heart Health Study. *Circulation* 2005;111:614-21.
114. Wolf J, Hering D, Narkiewicz K. Non-dipping pattern of hypertension and obstructive sleep apnea syndrome. *Hypertens Res* 2010;33:867-71.
115. Ohkubo T, Hozawa A, Yamaguchi J, et al. Prognostic significance of the nocturnal decline in blood pressure in individuals with and without high 24-h blood pressure: the Ohasama study. *Journal of hypertension* 2002;20:2183-9.
116. Metoki H, Ohkubo T, Kikuya M, et al. Prognostic significance for stroke of a morning pressor surge and a nocturnal blood pressure decline: the Ohasama study. *Hypertension* 2006;47:149-54.
117. Sasaki N, Ozono R, Edahiro Y, et al. Impact of non-dipping on cardiovascular outcomes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Clin Exp Hypertens* 2015;37:449-53.
118. Barbe F, Duran-Cantolla J, Sanchez-de-la-Torre M, et al. Effect of continuous positive airway pressure on the incidence of hypertension and cardiovascular events in nonsleepy patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *JAMA* 2012;307:2161-8.
119. Iftikhar IH, Hays ER, Iverson MA, Magalang UJ, Maas AK. Effect of oral appliances on blood pressure in obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Sleep Med* 2013;9:165-74.
120. Mo L, He QY. [Effect of long-term continuous positive airway pressure ventilation on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome: a meta-analysis of clinical trials]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007;87:1177-80.
121. Punjabi NM, Shahar E, Redline S, Gottlieb DJ, Givelber R, Resnick HE. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol* 2004;160:521-30.
122. Pamidi S, Aronsohn RS, Tasali E. Obstructive sleep apnea: role in the risk and severity of diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010;24:703-15.
123. Aronsohn RS, Whitmore H, Van Cauter E, Tasali E. Impact of untreated obstructive sleep apnea on glucose control in type 2 diabetes. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:507-13.
124. Jullian-Desayes I, Joyeux-Faure M, Tami er R, et al. Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: a systematic review from sham CPAP randomized controlled trials. *Sleep Med Rev* 2015;21:23-38.
125. Iiyori N, Alonso LC, Li J, et al. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:851-7.

126. Yang D, Liu Z, Yang H. The impact of effective continuous positive airway pressure on homeostasis model assessment insulin resistance in non-diabetic patients with moderate to severe obstructive sleep apnea. *Diabetes Metab Res Rev* 2012;28:499-504.
127. Hecht L, Mohler R, Meyer G. Effects of CPAP-respiration on markers of glucose metabolism in patients with obstructive sleep apnoea syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ger Med Sci* 2011;9:Doc20.
128. Iftikhar IH, Khan MF, Das A, Magalang UJ. Meta-analysis: continuous positive airway pressure improves insulin resistance in patients with sleep apnea without diabetes. *Ann Am Thorac Soc* 2013;10:115-20.
129. Yang D, Liu Z, Yang H, Luo Q. Effects of continuous positive airway pressure on glycemic control and insulin resistance in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath* 2013;17:33-8.
130. Chen L, Pei JH, Chen HM. Effects of continuous positive airway pressure treatment on glycaemic control and insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Arch Med Sci* 2014;10:637-42.
131. Nadeem R, Singh M, Nida M, et al. Effect of CPAP treatment for obstructive sleep apnea hypopnea syndrome on lipid profile: a meta-regression analysis. *J Clin Sleep Med* 2014;10:1295-302.
132. Li J, Savransky V, Nanayakkara A, Smith PL, O'Donnell CP, Polotsky VY. Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 2007;102:557-63.
133. Jun J, Reinke C, Bedja D, et al. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2010;209:381-6.
134. Bouloukaki I, Mermigkis C, Kallergis EM, Moniaki V, Mauroudi E, Schiza SE. Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular disease: The influence of C-reactive protein. *World J Exp Med* 2015;5:77-83.
135. Ridker PM. C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2129-38.
136. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2014;129:S49-73.
137. Nadeem R, Molnar J, Madbouly EM, et al. Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *J Clin Sleep Med* 2013;9:1003-12.
138. Guo Y, Pan L, Ren D, Xie X. Impact of continuous positive airway pressure on C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath* 2013;17:495-503.
139. Xie X, Pan L, Ren D, Du C, Guo Y. Effects of continuous positive airway pressure therapy on systemic inflammation in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Med* 2013;14:1139-50.
140. Vlachantoni IT, Dikaiakou E, Antonopoulos CN, Stefanadis C, Daskalopoulou SS, Petridou ET. Effects of continuous positive airway pressure (CPAP) treatment for obstructive sleep apnea in arterial stiffness: a meta-analysis. *Sleep Med Rev* 2013;17:19-28.
141. Wons AM, Kohler M. Established vascular effects of continuous positive airway pressure therapy in patients with obstructive sleep apnoea-an update. *J Thorac Dis* 2015;7:912-9.
142. Demir M, Acarturk E, Inal T, et al. Procollagen type I carboxy-terminal peptide shows left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in hypertensive patients. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:69-74.

143. Querejeta R, Lopez B, Gonzalez A, et al. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation* 2004;110:1263-8.
144. Diez J, Querejeta R, Lopez B, Gonzalez A, Larman M, Martinez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation* 2002;105:2512-7.
145. Vautrin E, Pepin JL, Faure P, et al. Procollagen type III amino terminal peptide (PIIIP) is associated with left ventricular diastolic dysfunction in obstructive sleep apnoea. *Int J Cardiol* 2011;151:387-8.
146. Dantas DA, Mauad T, Silva LF, Lorenzi-Filho G, Formigoni GG, Cahali MB. The extracellular matrix of the lateral pharyngeal wall in obstructive sleep apnea. *Sleep* 2012;35:483-90.
147. Babos L, Jarai Z, Nemcsik J. Evaluation of microvascular reactivity with laser Doppler flowmetry in chronic kidney disease. *World J Nephrol* 2013;2:77-83.
148. Goligorsky MS. Clinical assessment of endothelial dysfunction: combine and rule. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:617-24.
149. Turner J, Belch JJ, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:109-16.
150. Stewart J, Kohen A, Brouder D, et al. Noninvasive interrogation of microvasculature for signs of endothelial dysfunction in patients with chronic renal failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H2687-96.
151. Kruger A, Stewart J, Sahityani R, et al. Laser Doppler flowmetry detection of endothelial dysfunction in end-stage renal disease patients: correlation with cardiovascular risk. *Kidney Int* 2006;70:157-64.
152. Butt M, Khair OA, Dwivedi G, Shantsila A, Shantsila E, Lip GY. Myocardial perfusion by myocardial contrast echocardiography and endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Hypertension* 2011;58:417-24.
153. Jurado-Gamez B, Fernandez-Marin MC, Gomez-Chaparro JL, et al. Relationship of oxidative stress and endothelial dysfunction in sleep apnoea. *Eur Respir J* 2011;37:873-9.
154. Bakker JP, Balachandran JS, Tecilazich F, et al. Pilot study of the effects of bariatric surgery and continuous positive airway pressure treatment on vascular function in obese subjects with obstructive sleep apnoea. *Intern Med J* 2013;43:993-8.
155. Trzepizur W, Gagnadoux F, Abraham P, et al. Microvascular endothelial function in obstructive sleep apnea: Impact of continuous positive airway pressure and mandibular advancement. *Sleep Med* 2009;10:746-52.
156. Domigan CK, Ziyad S, Iruela-Arispe ML. Canonical and noncanonical vascular endothelial growth factor pathways: new developments in biology and signal transduction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:30-9.
157. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011;437:169-83.
158. Kumar VB, Binu S, Soumya SJ, K H, Sudhakaran PR. Regulation of vascular endothelial growth factor by metabolic context of the cell. *Glycoconj J* 2014;31:427-34.
159. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res* 2000;86:1198-202.
160. Germain S, Monnot C, Muller L, Eichmann A. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr Opin Hematol* 2010;17:245-51.

161. Papaioannou AI, Kostikas K, Kollia P, Gourgoulis KI. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res* 2006;7:128.
162. Cao C, Ding Q, Lv D, et al. Vascular endothelial growth factor genotypes and haplotypes contribute to the susceptibility of obstructive sleep apnea syndrome. *PLoS One* 2014;9:e114582.
163. Briancon-Marjollet A, Pepin JL, Weiss JW, Levy P, Tamisier R. Intermittent hypoxia upregulates serum VEGF. *Sleep Med* 2014;15:1425-6.
164. Teramoto S, Kume H, Yamamoto H, et al. Effects of oxygen administration on the circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med* 2003;42:681-5.
165. Briancon-Marjollet A, Henri M, Pepin JL, Lemarie E, Levy P, Tamisier R. Altered in vitro endothelial repair and monocyte migration in obstructive sleep apnea: implication of VEGF and CRP. *Sleep* 2014;37:1825-32.
166. Imagawa S, Yamaguchi Y, Higuchi M, et al. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea--hypopnea syndrome. *Blood* 2001;98:1255-7.
167. Gozal D, Lipton AJ, Jones KL. Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep* 2002;25:59-65.
168. 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.
169. 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. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1624-8.
170. Kaczmarek E, Bakker JP, Clarke DN, et al. Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One* 2013;8:e70559.
171. Li J, Li C, Chai L, Gong W. [Relationship between plasma vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor- $\alpha$  and obstructive sleep apnea hypopnea syndrome in children]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2014;49:44-8.
172. Jiang G, Zhang J, Li W. [Changes and clinical implications of the levels of serum NO and VEGF and HIF-1 $\alpha$  in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2012;26:807-10.
173. de la Pena M, Barcelo A, Barbe F, et al. Endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in patients with sleep apnea syndrome. *Respiration* 2008;76:28-32.
174. Ma J, Xu Y, Zhang Z, Liu H, Xiong W, Xu S. Serum level of vascular endothelial growth factor in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007;27:157-60.
175. Ciftci TU, Kokturk O, Demirtas S, Gulbahar O, Bukan N. Consequences of hypoxia-reoxygenation phenomena in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Ann Saudi Med* 2011;31:14-8.
176. Peled N, Shitrit D, Bendayan D, Peled E, Kramer MR. Association of elevated levels of vascular endothelial growth factor in obstructive sleep apnea syndrome with patient age rather than with obstructive sleep apnea syndrome severity. *Respiration* 2007;74:50-5.
177. Kaditis AG, Alexopoulos EI, Karadonta I, et al. Obstructive sleep-disordered breathing and plasma levels of vascular endothelial growth factor in children. *Respir Med* 2006;100:835-40.

178. Valipour A, Litschauer B, Mittermayer F, Rauscher H, Burghuber OC, Wolzt M. Circulating plasma levels of vascular endothelial growth factor in patients with sleep disordered breathing. *Respir Med* 2004;98:1180-6.
179. Jafari B, Elias JA, Mohsenin V. Increased plasma YKL-40/chitinase-3-like-protein-1 is associated with endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One* 2014;9:e98629.
180. Maeder MT, Strobel W, Christ M, et al. Comprehensive biomarker profiling in patients with obstructive sleep apnea. *Clin Biochem* 2015;48:340-6.
181. Phillips CL, Yang Q, Williams A, et al. The effect of short-term withdrawal from continuous positive airway pressure therapy on sympathetic activity and markers of vascular inflammation in subjects with obstructive sleep apnoea. *J Sleep Res* 2007;16:217-25.
182. Shai E, Varon D. Development, cell differentiation, angiogenesis--microparticles and their roles in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:10-4.
183. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:27-33.
184. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:15-26.
185. Wu ZH, Ji CL, Li H, Qiu GX, Gao CJ, Weng XS. Membrane microparticles and diseases. *European review for medical and pharmacological sciences* 2013;17:2420-7.
186. Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, Nieuwland R. Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:4-9.
187. Trzepizur W, Martinez MC, Priou P, Andriantsitohaina R, Gagnadoux F. Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2014;44:207-16.
188. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:23111-8.
189. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thrombosis and haemostasis* 2007;97:425-34.
190. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001;104:2649-52.
191. Tushuizen ME, Nieuwland R, Rustemeijer C, et al. Elevated endothelial microparticles following consecutive meals are associated with vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:728-30.
192. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005;16:3381-8.
193. Stiefel P, Sanchez-Armengol MA, Villar J, Vallejo-Vaz A, Moreno-Luna R, Capote F. Obstructive sleep apnea syndrome, vascular pathology, endothelial function and endothelial cells and circulating microparticles. *Archives of medical research* 2013;44:409-14.
194. Franca CN, Izar MC, Amaral JB, Tegani DM, Fonseca FA. Microparticles as potential biomarkers of cardiovascular disease. *Arq Bras Cardiol* 2015;104:169-74.
195. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 2003;41:211-7.
196. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002;51:2840-5.

197. Ogata N, Imaizumi M, Nomura S, et al. Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes research and clinical practice* 2005;68:193-201.
198. Jung KH, Chu K, Lee ST, et al. Risk of macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus: endothelial microparticle profiles. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 2011;31:485-93.
199. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *American heart journal* 2003;145:962-70.
200. van der Zee PM, Biro E, Ko Y, et al. P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clinical chemistry* 2006;52:657-64.
201. Morel O, Pereira B, Averous G, et al. Increased levels of procoagulant tissue factor-bearing microparticles within the occluded coronary artery of patients with ST-segment elevation myocardial infarction: role of endothelial damage and leukocyte activation. *Atherosclerosis* 2009;204:636-41.
202. Faille D, Frere C, Cuisset T, et al. CD11b+ leukocyte microparticles are associated with high-risk angiographic lesions and recurrent cardiovascular events in acute coronary syndromes. *J Thromb Haemost* 2011;9:1870-3.
203. Sarlon-Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, et al. Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1436-41.
204. Jung KH, Chu K, Lee ST, et al. Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Annals of neurology* 2009;66:191-9.
205. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:112-6.
206. Peters DL, Pretorius PJ. Continuous adaptation through genetic communication - a putative role for cell-free DNA. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12 Suppl 1:S127-32.
207. Wagner J. Free DNA--new potential analyte in clinical laboratory diagnostics? *Biochem Med (Zagreb)* 2012;22:24-38.
208. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta* 2015;450:243-53.
209. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142:241-3.
210. Jiang N, Pisetsky DS. The effect of inflammation on the generation of plasma DNA from dead and dying cells in the peritoneum. *J Leukoc Biol* 2005;77:296-302.
211. Jylhava J, Kotipelto T, Raitala A, Jylha M, Hervonen A, Hurme M. Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: the Vitality 90+ study. *Mech Ageing Dev* 2011;132:20-6.
212. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med* 2012;42:565-86.
213. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettila V, et al. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clinical chemistry* 2008;54:1000-7.
214. Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, et al. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care* 2012;16:R151.
215. Macher H, Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, et al. Role of early cell-free DNA levels decrease as a predictive marker of fatal outcome after severe traumatic brain injury. *Clin Chim Acta* 2012;414:12-7.

216. Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clinical chemistry* 2000;46:319-23.
217. Chiu TW, Young R, Chan LY, Burd A, Lo DY. Plasma cell-free DNA as an indicator of severity of injury in burn patients. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:13-7.
218. Bagul A, Pushpakom S, Boylan J, Newman W, Siriwardena AK. Quantitative analysis of plasma DNA in severe acute pancreatitis. *JOP* 2006;7:602-7.
219. Gornik I, Wagner J, Gasparovic V, Lauc G, Gornik O. Free serum DNA is an early predictor of severity in acute pancreatitis. *Clin Biochem* 2009;42:38-43.
220. Gornik O, Gornik I, Wagner J, Radic D, Lauc G. Evaluation of cell-free DNA in plasma and serum as early predictors of severity in acute pancreatitis. *Pancreas* 2011;40:787-8.
221. Gielis EM, Ledeganck KJ, De Winter BY, et al. Cell-Free DNA: An Upcoming Biomarker in Transplantation. *Am J Transplant* 2015;15:2541-51.
222. Sifakis S, Koukou Z, Spandidos DA. Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications (review). *Mol Med Rep* 2015;11:2367-72.
223. Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta* 2014;35 Suppl:S64-8.
224. Aarthy R, Mani S, Velusami S, Sundarsingh S, Rajkumar T. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Mol Diagn Ther* 2015.
225. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775:181-232.
226. Arnalich F, Maldifassi MC, Ciria E, et al. Association of cell-free plasma DNA with perioperative mortality in patients with suspected acute mesenteric ischemia. *Clin Chim Acta* 2010;411:1269-74.
227. Martin A, Krishna I, Badell M, Samuel A. Can the quantity of cell-free fetal DNA predict preeclampsia: a systematic review. *Prenat Diagn* 2014;34:685-91.
228. Liu J, Cai X, Xie L, et al. Circulating Cell Free Mitochondrial DNA is a Biomarker in the Development of Coronary Heart Disease in the Patients with Type 2 Diabetes. *Clin Lab* 2015;61:661-7.
229. Antonatos D, Patsilinakos S, Spanodimos S, Korkonikitas P, Tsigas D. Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:278-81.
230. Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 2003;327:95-101.
231. Destouni A, Vrettou C, Antonatos D, et al. Cell-free DNA levels in acute myocardial infarction patients during hospitalization. *Acta Cardiol* 2009;64:51-7.
232. Rainer TH, Lam NY, Man CY, Chiu RW, Woo KS, Lo YM. Plasma beta-globin DNA as a prognostic marker in chest pain patients. *Clin Chim Acta* 2006;368:110-3.
233. Rainer TH, Wong LK, Lam W, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clinical chemistry* 2003;49:562-9.
234. Lam NY, Rainer TH, Wong LK, Lam W, Lo YM. Plasma DNA as a prognostic marker for stroke patients with negative neuroimaging within the first 24 h of symptom onset. *Resuscitation* 2006;68:71-8.
235. Shin C, Kim JK, Kim JH, et al. Increased cell-free DNA concentrations in patients with obstructive sleep apnea. *Psychiatry Clin Neurosci* 2008;62:721-7.
236. Ye L, Ma GH, Chen L, et al. Quantification of circulating cell-free DNA in the serum of patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Lung* 2010;188:469-74.

237. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G\*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* 2009;41:1149-60.
238. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39:175-91.
239. G\*Power: Statistical Power Analyses. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. <http://www.gpower.hhu.de>.
240. Ayers L, Harrison P, Kohler M, Ferry B. Procoagulant and platelet-derived microvesicle absolute counts determined by flow cytometry correlates with a measurement of their functional capacity. *J Extracell Vesicles* 2014;3.

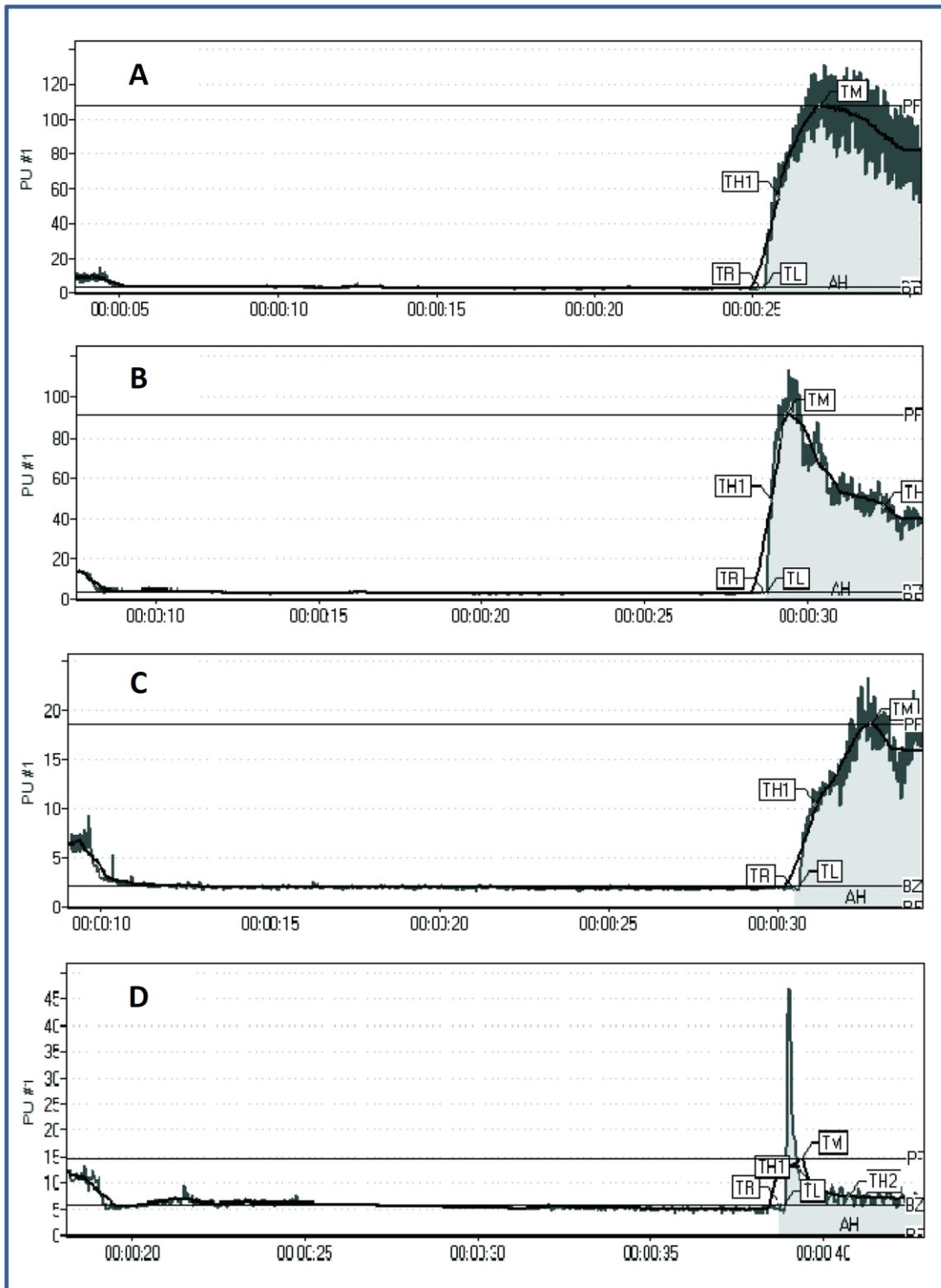
# ANEXOS

- ANEXO 1 –** Ejemplos de registro de hiperemia reactiva post-isquemia mediante Flujimetría Láser-Doppler
- ANEXO 2 –** Protocolo de determinación del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)

## ANEXO 1

### EJEMPLOS DE REGISTROS DE HIPEREMIA REACTIVA POST-ISQUEMIA MEDIANTE FLUJIMETRÍA LÁSER-DOPPLER.

(A) Sujeto sano que muestra una respuesta rápida, intensa y duradera, resultando en un amplio área de hiperemia (zona gris). (B) Sujeto sano con una respuesta igualmente rápida e intensa pero menos duradera. (C) Paciente con una respuesta poco intensa o rápida pero duradera. (D) Paciente con una respuesta rápida, de moderada intensidad y no duradera, dando lugar a un área de hiperemia muy reducida.



## ANEXO 2

---

### PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VGEF)

#### 1) Preparación de los reactivos:

> Buffer de lavado: una vez a temperatura ambiente, agitamos ligeramente para disolver la posible formación previa de cristales. A continuación se añadieron 20 ml de buffer a agua destilada para preparar 500 ml de solución de buffer de lavado.

> Solución sustrato: los reactivos de color (A y B) se mezclaron juntos en volúmenes iguales 15 minutos o menos antes de su uso y se protegieron de la luz hasta su uso. Para cada pocillo son necesarios 200  $\mu$ l de la solución-mezcla resultante.

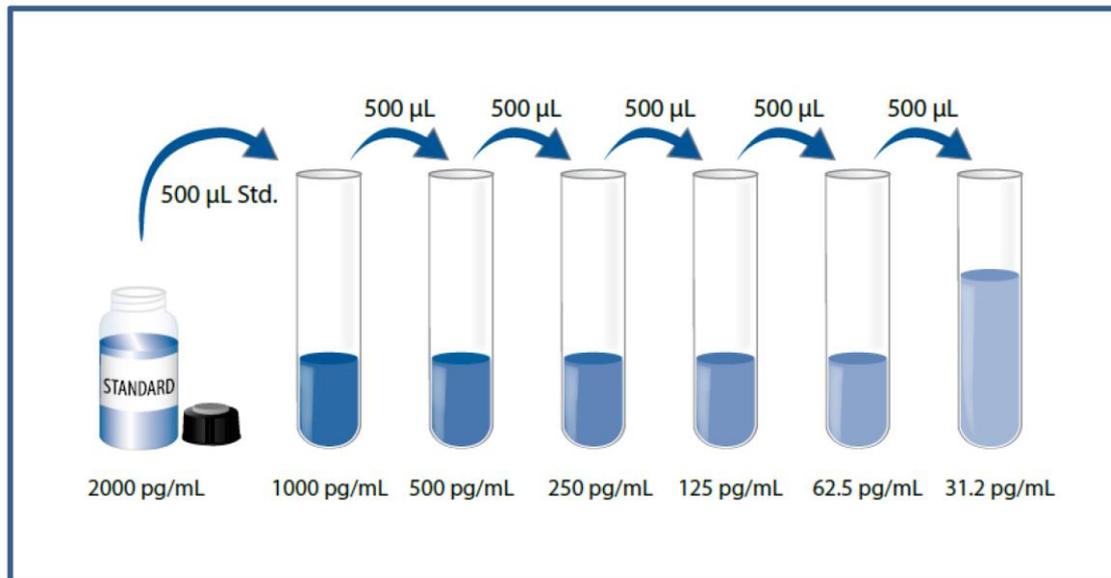
> Solución VEGF estándar: dicha solución fue reconstituida con 1,0 ml de diluyente para calibrado DR6U (tras ser este agitado para evitar precipitados). Esta reconstitución produce una solución de 2000 pg/ml. Tras 15 minutos y agitación se llevaron a cabo diluciones en tubos de polipropileno para obtener muestras de VEGF estándar de concentraciones conocidas (figura). En cada tubo se pipetearon 500  $\mu$ l del diluyente para calibrado DR6U, y a continuación se procedió a las diluciones a partir de la muestra inicial de VEGF estándar tal y como se muestra en la figura. Un tubo con solo solución DR6U constituye el estándar de 0 pg/ml.

#### 2) Procedimiento:

Se utilizaron placas de 96 pocillos (figura M10). Añadimos a cada pocillo 100  $\mu$ l del diluyente de ensayo RD1W. A continuación se añadieron 100  $\mu$ l del estándar, muestra o control, según correspondiera, a cada pocillo. Cubrimos la placa con el adhesivo proporcionado y se dejó en incubación durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras dicha incubación, aspiramos el contenido de cada pocillo y lavamos los mismos con buffer de lavado (400  $\mu$ l por cada pocillo); este procedimiento se repitió hasta un total de 3 lavados. Tras el último lavado se aspiró el

### Figura. Obtención de muestras de VEGF estándar de concentraciones conocidas.

En cada tubo se pipetearon 500  $\mu\text{l}$  del diluyente para calibrado DR6U, y a continuación se procedió a las diluciones a partir de la muestra inicial de VEGF estándar tal y como se muestra en la figura. Un tubo con solo solución DR6U constituye el estándar de 0 pg/ml. Figura tomada de la hoja de datos del kit de ELISA.



contenido de los pocillos para retirar la solución buffer por completo, e invertimos la placa para secar en papel.

A continuación añadimos 200  $\mu\text{l}$  de “VEGF Conjugate” a cada pocillo, cubrimos con un nuevo adhesivo e incubamos 2 horas a temperatura ambiente. Tras la misma, repetimos los lavados de cada pocillo como previamente.

En un siguiente paso añadimos 200  $\mu\text{l}$  de solución sustrato a cada pocillo, e incubamos en oscuridad 25 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo añadimos 50  $\mu\text{l}$  de “Stop Solution” para parar la reacción de la solución sustrato. Comprobamos una distribución uniforme del color; en caso contrario mezclamos ligeramente.

3) Lectura:

La lectura de las densidades ópticas de cada pocillo se llevó a cabo dentro de los 30 minutos siguientes a la finalización del procedimiento anterior, usando un lector de microplacas ajustado a 450 nm. A partir de los valores obtenidos se generó la recta patrón para el cálculo de los resultados finales.

En cada placa introducimos controles negativos, para confirmar la adecuada realización de los experimentos. Para cada muestra, estándar y control en cada momento del estudio (basal y a los 3 meses tras CPAP) la determinación se llevó a cabo por duplicado y se tomó la media de ambas determinaciones como resultado.

