



---

# **Universidad de Valladolid**

## **GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Repercusiones de la hipoxia intermitente en intestino delgado. Estudio en un modelo experimental animal.**

Presentado por Esther Valverde Pérez para optar al Grado en  
Nutrición Humana y Dietética

TUTORAS:

Dra. Ana Obeso Cáceres<sup>1</sup> y Dra. Elvira González Obeso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

<sup>2</sup>Servicio Anatomía Patológica Hospital Clínico Universitario de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE VALLADOLID.

CURSO 2018/2019

## Agradecimientos.

*A mis padres y a mi hermana, por los esfuerzos que han hecho para que yo haya podido llegar hasta aquí y por el apoyo brindado.*

*A mi pareja y amigos, por animarme a seguir adelante.*

*Al grupo de investigación “Fisiología y Fisiopatología de la sensibilidad al oxígeno” por ayudarme con este estudio y, en especial, a Marta Ayllón, Víctor Mínguez y Carla Calleja, por hacer más amenas esas mañanas/tardes de laboratorio.*

*A todos los profesores del Grado, por aportarme los conocimientos necesarios para realizar este trabajo de investigación y formarme para ser una buena profesional.*

*Y por supuesto a mis dos tutoras, las doctoras Ana Obeso y Elvira González, por guiarme en este estudio y enseñarme lo bonito que es el mundo de la investigación.*

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La apnea obstructiva del sueño es probablemente el trastorno del sueño más grave. Ocasiona detención de la respiración y reanudación de ésta de forma repentina durante el sueño. Por tanto, los sujetos que la padecen sufren episodios de hipoxia intermitente combinados con episodios de normoxia. Estas situaciones provocan ciertas modificaciones en la estructura de diferentes órganos y presencia de inflamación. Estos cambios pueden afectar al intestino delgado, órgano sustancial del organismo que posee un complejo sistema inmunitario.

**OBJETIVO:** Observar las posibles repercusiones de la hipoxia intermitente como modelo de la apnea obstructiva del sueño en intestino delgado en un modelo murino experimental.

**MÉTODOS:** Se trata de un estudio experimental en el que se han realizado técnicas histológicas, análisis morfométrico y detección de marcadores de inflamación como CD68, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 mediante inmunofluorescencia en vellosidades de la sección yeyunal.

**RESULTADOS:** El estudio muestra cambios en la morfología, especialmente en cuanto a anchura media y pico de las vellosidades intestinales y composición celular de estas. Sin embargo, no presenta diferencias con respecto a los marcadores inflamatorios analizados (CD68, IL-1 e IL-6).

**CONCLUSIÓN:** La hipoxia intermitente produce alteraciones en la estructura del intestino delgado, pero no modifica los marcadores inflamatorios analizados.

Palabras clave: apnea obstructiva del sueño, síndrome de apnea/hipopnea del sueño, intestino delgado, yeyuno, inflamación, CD68, IL-1, IL-6

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	4
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	4
<b>ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1.1. Apnea obstructiva del sueño (AOS) y Síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS).....	6
1.2. Hipoxia intermitente.....	7
1.3. Intestino delgado.....	8
1.3.1. Anatomía e histología.....	9
1.3.2. Sistema inmune de la mucosa intestinal.....	11
1.3.3. Inflamación en el intestino.....	13
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	15
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	16
4.1. Diseño.....	16
4.2. Muestra.....	16
4.3. Metodología.....	17
4.3.1. Inclusión de las muestras de yeyuno de rata control y experimental en parafina.....	17
4.3.2. Tinción con hematoxilina-eosina de muestras de yeyuno de rata control y experimental.....	17
4.3.3. Inmunofluorescencia sobre muestras de yeyuno de rata control y experimental.....	18
4.3.4. Visualización de las muestras de yeyuno de rata control y experimental al microscopio.....	18
4.3.5. Análisis estadístico.....	18
<b>5. RESULTADOS</b> .....	19
5.1. Histología.....	19
5.2. Estudio morfométrico.....	21
5.2.1. Altura vellosidades intestinales.....	21
5.2.2. Anchura media vellosidades intestinales.....	23
5.2.3. Anchura pico vellosidades intestinales.....	26
5.3. Inmunofluorescencia.....	28
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	30
<b>7. LIMITACIONES</b> .....	31
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	32
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33
<b>ANEXOS</b> .....	35
ANEXO I. PROCESADO DE LOS TEJIDOS.....	36
ANEXO II. PROTOCOLO TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA.....	37
ANEXO III. PROTOCOLO TINCIÓN INMUNOFLUORESCENCIA.....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Valores medios de la altura de la vellosidad del yeyuno, desviación estándar y error de la media del grupo control (A) y del grupo experimental (B).....	21
<b>TABLA 2.</b> Valores medios de la anchura media de la vellosidad del yeyuno, desviación estándar y error de la media del grupo control (A) y del grupo experimental (B) .....	24
<b>TABLA 3.</b> Valores medios de la anchura del pico de la vellosidad del yeyuno, desviación estándar y error de la media del grupo control (A) y del grupo experimental (B).....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Niveles de respuesta a la hipoxia.....	8
<b>FIGURA 2.</b> Estructura y capas del ID .....	9
<b>FIGURA 3.</b> Vista general de un corte longitudinal de ID de rata teñido con H/E .....	9
<b>FIGURA 4.</b> Representación de los elementos que integran el tejido linfoide en la mucosa intestinal .....	12
<b>FIGURA 5.</b> Vías de interacción de la AOS .....	13
<b>FIGURA 6.</b> a) Patrón de concentración de oxígeno (O <sub>2</sub> ) en el aire respirado por ratas sometidas a hipoxia intermitente leve y grave. b) Mínimos y máximos de recuperación en los ciclos de saturación de oxígeno arterial (SpO <sub>2</sub> ) causados por la respiración de los patrones de hipoxia intermitente leve y grave .....	16
<b>FIGURA 7.</b> Tinción con H/E de una sección circular de un segmento de yeyuno de rata experimental con objetivo 10x en la que se detallan las diferentes medidas realizadas en el análisis morfométrico: altura (1), anchura media (2), anchura pico (3). .....	19
<b>FIGURA 8.</b> A) Tinción con H/E de una sección longitudinal de un segmento de yeyuno de rata control (A) objetivo 10x y (B) Tinción con H/E de una sección longitudinal de un segmento de yeyuno de rata control objetivo (40x). Barra de calibración a 100 µm.....	19
<b>FIGURA 9.</b> A) Tinción con H/E de una sección circular de un segmento de yeyuno de rata experimental (A) objetivo 10x B) Tinción con H/E de una sección circular de un segmento de yeyuno de rata experimental objetivo (40x). Barra de calibración a 100 µm.....	20
<b>FIGURA 10.</b> Tinción con H/E de una sección circular de un segmento de yeyuno de rata experimental.....	20
<b>FIGURA 11.</b> Diagrama box-plot que compara el grupo control (A) frente al grupo experimental (B).....	22
<b>FIGURA 12.</b> Diagramas de dispersión del grupo control (A) y del grupo experimental (B) .....	23
<b>FIGURA 13.</b> Diagrama box-plot que compara el grupo control (A) frente al grupo experimental (B).....	25
<b>FIGURA 14.</b> Diagramas de dispersión del grupo control (A) y del grupo experimental (B) .....	25
<b>FIGURA 15.</b> Diagrama box-plot que compara el grupo control (A) frente al grupo experimental (B).....	27
<b>FIGURA 16.</b> Diagramas de dispersión del grupo control (A) y del grupo experimental (B) .....	28
<b>FIGURA 17.</b> Sección circular de un segmento de yeyuno de rata experimental objetivo 10x. A) DAPI y Alexa 594 con CD68 B) DIC con CD68 .....	29
<b>FIGURA 18.</b> Sección circular de un segmento de yeyuno de rata control objetivo 40x. A) DAPI y FITC con IL-1 B) DIC con IL-1. Barra de calibración 10 µm .....	29
<b>FIGURA 19.</b> Sección circular de un segmento de yeyuno de rata control objetivo 40x. A) DAPI y FITC con IL-6 B) DIC con IL-6. Barra de calibración 10 µm .....	29

## **ABREVIATURAS**

**AOS:** apnea obstructiva del sueño

**AS:** apnea del sueño

**H/E:** tinción hematoxilina-eosina

**HI:** hipoxia intermitente

**HIC:** hipoxia intermitente crónica

**IAH:** índice apnea-hipopnea del sueño

**ID:** intestino delgado

**GALT:** gut-associated lymphoid tissue, tejido linfoide asociado con el intestino

**HIF-1:** factor inducible por hipoxia 1

**ME:** media

**NGS:** suero normal de cabra

**PBS:** buffer de fosfato salino

**PSG:** polisomnografía

**SD:** desviación estándar

**SEM:** error de la media

**TFG:** trabajo fin de grado

**SAHS:** síndrome de apnea hipopnea del sueño

**SAOS:** síndrome de apnea obstructiva del sueño

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Apnea obstructiva del sueño (AOS) y Síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS)

La apnea del sueño (AS) es un trastorno común en el cuál la respiración se interrumpe o se hace muy superficial durante el sueño. Estas interrupciones pueden durar desde pocos segundos a minutos y pueden aparecer más de 30 veces por hora. El tipo más común es la apnea obstructiva del sueño (AOS).

El síndrome de apnea/hipopnea obstructiva del sueño (SAOS), es una entidad caracterizada por episodios repetidos de obstrucción de la vía aérea superior (VAS) durante el sueño (apneas del sueño); esta situación provoca caídas de la saturación arterial de oxígeno y despertares repetidos, dando lugar a un sueño no reparador condicionando, de forma secundaria, un cuadro de hipersomnia diurna así como trastornos cardiorrespiratorios, metabólicos y neuropsiquiátricos (1). Todas estas alteraciones son las que conforman el SAOS.

En el año 2005 el documento Nacional de Consenso sobre el síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS) recomienda usar el concepto de "SAHS", frente a SAOS, debido a que el primero: incluye una referencia específica a las hipopneas (de importancia creciente); evita el término "obstructiva", lo que permite incluir también las mixtas y las centrales y, finalmente, porque estas siglas definen tanto la traducción española como la anglosajona (2).

Su primera descripción se remonta a la literatura del SXIX, concretamente en la primera novela de Charles Dickens, publicada en 1835 "The Posthumous Papers of the Pickwick club" (3) aunque como trastorno se documentó por primera vez en la década de 1960. Desde entonces, sus impactos en la salud han recibido una creciente atención por parte del público y la comunidad de la salud. La fragmentación del sueño, la hipoxia intermitente, la hipercapnia y los esfuerzos respiratorios ineficaces representan la mayoría de los trastornos fisiológicos en la AOS (4).

De acuerdo con la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) el SAOS es el desorden respiratorio del sueño más común, afectando entre el 6 y el 20% de los hombres, entre el 6 y el 9% de las mujeres de mediana edad y a más del 20% de las personas mayores de la población general (5).

La sospecha clínica es fundamental en el diagnóstico del SAHS. La alta prevalencia, morbilidad y mortalidad de este síndrome ha provocado un incremento de los métodos que se han desarrollado tanto para el diagnóstico como para su tratamiento.

Uno de los métodos diagnósticos más característicos es la polisomnografía (PSG). La PSG convencional incluye registro de electroencefalograma, electroftalmograma, electromiograma, electrocardiograma y frecuencia cardíaca, flujo aéreo, esfuerzo respiratorio y saturación de O<sub>2</sub> en sangre durante toda la noche. Todo esto permite detectar y cuantificar los eventos respiratorios principales, apneas e hipoapneas. La apnea se define como el cese completo del flujo de aire a través de las vías aéreas durante más de 10 segundos e hipoapnea como la disminución de dicho flujo entre el 30% y 90%, durante más de 10 segundos, asociado a desaturación de O<sub>2</sub> en sangre  $\geq 3\%$  y a microdespertares (6).

La gravedad de la AOS se define por el índice de apnea hipopnea (IAH), calculándose a través de la suma de apneas e hipoapneas entre el número de horas de sueño. El IAH de 5-15 eventos/h, 15-30 eventos/h y  $>30$  eventos/h son indicativos de AOS leve, moderada y grave, respectivamente. Se considera que un IAH de 0 a 4 eventos/h es normal (7). La sola existencia de un IAH anormal no es sinónimo de SAHS, sino que debe coexistir con síntomas (sobrepeso u obesidad, ronquidos progresivos cada vez más intensos, cansancio, excesiva somnolencia durante el día...). La gravedad clínica del SAHS debe considerar varios aspectos (6).

## **1.2. Hipoxia intermitente**

Definimos hipoxia intermitente (HI) como desaturaciones recurrentes de oxígeno en la sangre. Generalmente, suele caracterizarse por ciclos cortos de hipoxia y reoxigenación pero, los patrones de HI distan mucho entre los pacientes con AS. Por esta razón, a la hora de realizar comparaciones entre sujetos o situaciones experimentales, la HI debe definirse por: duración de cada ciclo, intensidad de la hipoxemia en cada ciclo, duración de la HI por día y el número total de días/años en los cuáles la HI se encuentra presente.

Atendiendo a la duración de los episodios de HI, podemos diferenciar hipoxia intermitente aguda o hipoxia intermitente crónica (HIC). La HIC es característica en patologías como la AOS, donde se producen episodios de hipoxia durante el sueño generados por obstrucciones en la vía aérea de manera intermitente mientras que el resto del día el sujeto no sufre apneas ni hipoxia, pues respira en un ambiente normóxico. En el trabajo se emplea el término HI en lugar de HIC, con el fin de simplificar.

Se han estudiado los diferentes efectos que puede producir la HI, distinguiendo entre efectos protectores y perjudiciales. El favorecimiento hacia uno u otro se explica por diferentes circunstancias, como una buena o mala adaptación de todo el organismo, tiempo de exposición a la hipoxia, % de O<sub>2</sub> al que se somete, etc. (8).

La respuesta a la hipoxia puede esquematizarse en tres niveles (FIGURA 1): de detección o sensor de oxígeno, de regulación (mediante el control de la expresión de una amplia serie de genes) y efector múltiple (incluye múltiples cambios funcionales como la estimulación de biomoléculas). El sistema regulador está modulado directamente por el sensor, el elemento organizador principal es un factor de transcripción específico, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) (9).

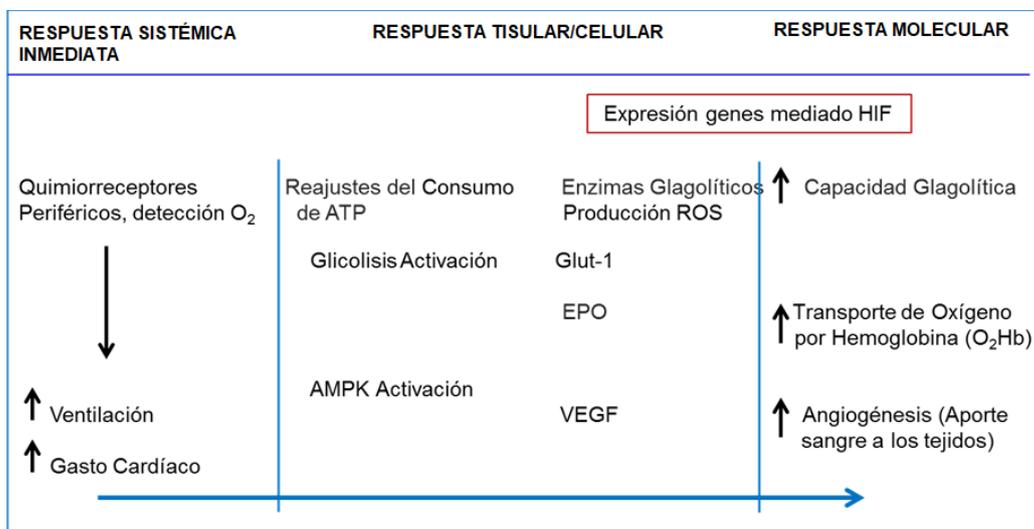


FIGURA 1. Niveles de respuesta a la hipoxia

En el presente trabajo se ha simulado la HI como modelo de AS, con el fin de observar las posibles repercusiones de ésta en intestino delgado (ID).

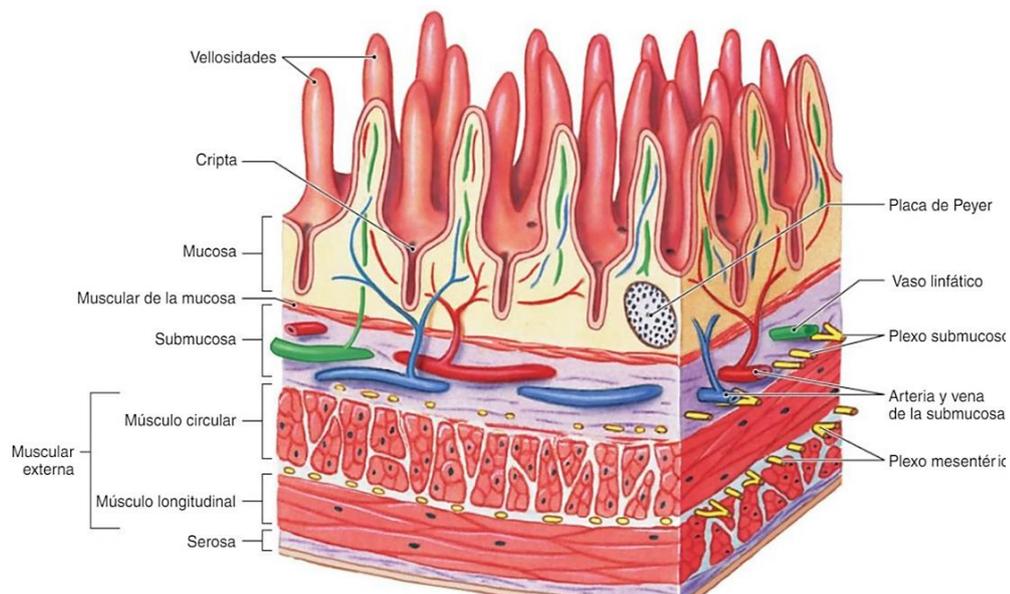
### 1.3. Intestino delgado

El ID es la porción tubular del aparato digestivo que proximalmente está separado del estómago por el esfínter pilórico y distalmente del intestino grueso por la válvula íleocecal. Mide unos 6 metros de longitud y sus funciones principales son la digestión y absorción de alimentos. Estas funciones son asistidas por las secreciones de las glándulas del estómago y las glándulas anejas a este tubo digestivo: las glándulas salivares, páncreas exocrino y el hígado con la secreción biliar, controlado por el sistema nervioso entérico y autónomo (10).

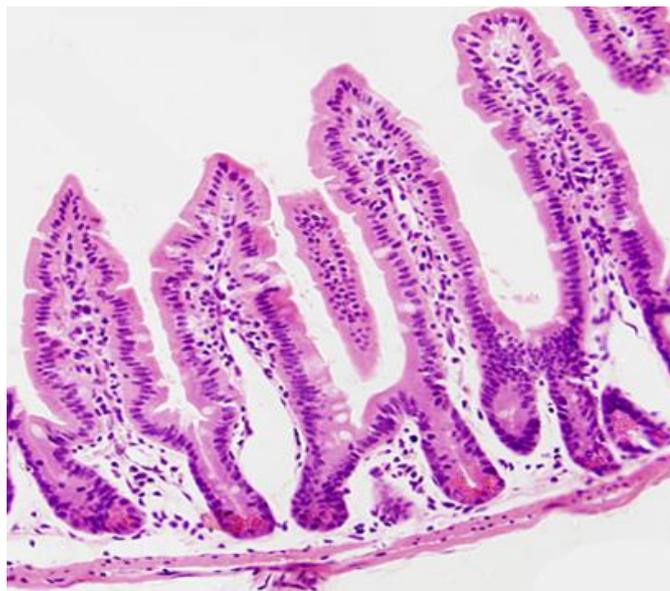
### 1.3.1. Anatomía e histología

Anatómicamente el ID, se encuentra dividido en tres segmentos, no muy bien delimitados entre sí: duodeno, yeyuno e íleon.

Histológicamente, y de forma general, podemos distinguir la capa mucosa, lámina propia, muscular de la mucosa, submucosa, muscular externa y serosa, como se detalla en la FIGURA 2 (11). En la FIGURA 3 (12) se observa un corte longitudinal perteneciente al ID de rata, en el que se observan las diferentes partes histológicas de las vellosidades intestinales.



**FIGURA 2.** Estructura y capas del ID



**FIGURA 3.** Vista general de un corte longitudinal de ID de rata teñido con H/E

La capa **MUCOSA** está muy ampliada por las siguientes estructuras, aumentando así la extensión de la superficie absorbente del ID:

- Pliegues circulares: también conocidos como válvulas de Kerckring, son repliegues transversales permanentes. Son muy abundantes en la porción distal del duodeno y en el inicio del yeyuno.
- Vellosidades: evaginaciones digitiformes de la mucosa que se extienden dentro de la luz intestinal.
- Microvellosidades: pertenecientes a los enterocitos, producen la principal amplificación de la superficie luminal.

Además, en el epitelio de la mucosa del ID aparecen los siguientes tipos celulares:

- Enterocitos: células cilíndricas con función absorbente especializadas en el transporte de sustancias desde la luz del intestino al sistema circulatorio.
- Células caliciformes: glándulas unicelulares mucossecretoras dispersas entre las células del epitelio intestinal.
- Células de Paneth: localizadas en las glándulas intestinales cuya función es mantener la inmunidad innata de la mucosa.
- Células enteroendocrinas: producen diversas hormonas endocrinas y paracrinas.
- Células M (células con micropliegues): enterocitos modificados que cubren grandes nódulos linfáticos de la lámina propia.

La **LÁMINA PROPIA** rodea las glándulas intestinales y contiene numerosas células del sistema inmunitario. Además, posee numerosos nódulos de tejido linfático, componentes principales de GALT (tejido linfático asociado con el intestino). Estas aglomeraciones nodulares se denominan placas de Peyer.

La **MUSCULAR DE LA MUCOSA** consiste en dos capas delgadas de células musculares lisas, una circular interna y una longitudinal externa. En esta capa es necesario destacar las glándulas intestinales o criptas de Lieberkühn, estructuras tubulares simples que se extienden hasta la superficie luminal del intestino. Están compuestas por un epitelio simple cilíndrico que es continuo con el epitelio de las vellosidades.

La **SUBMUCOSA** está formada por un tejido conjuntivo denso que en algunos sitios focalizados contiene acumulaciones de adipocitos.

La **MUSCULAR EXTERNA** está compuesta por una capa interna de células musculares lisas de disposición circular y una capa externa con células en sentido longitudinal. Entre estas dos capas están situados los componentes del plexo de Auerbach. En el intestino delgado tienen lugar dos tipos de contracciones musculares: contracciones de segmentación y peristálticas (11).

Dado que el ID es primariamente de ubicación intraperitoneal, posee una capa **SEROSA** con epitelio peritoneal. Sólo la mayor parte del duodeno es secundariamente retroperitoneal (13).

El yeyuno, parte del intestino en la que se centra esta investigación, mide alrededor de 2.5 metros de longitud. Desde el punto de vista estructural, todas las partes del ID son semejantes, distinguiéndose entre ellas algunas diferenciaciones. Los pliegues circulares son abundantes en la mitad distal del duodeno y en la parte proximal del yeyuno. En la mitad distal del yeyuno se vuelven más pequeños y menos numerosos y, prácticamente, desaparecen en la mitad del íleon. Las vellosidades adquieren un aspecto más digitiforme (suelen tener configuración foliada) conforme se aproximan al íleon. También es importante destacar la ausencia de glándulas de Brunner en yeyuno e íleon, se ausentan en el tercio distal del duodeno (14).

### 1.3.2. Sistema inmune de la mucosa intestinal

Se estima que una persona adulta posee 400 m<sup>2</sup> de superficie mucosa que proporciona a los microorganismos patógenos una amplia área potencialmente colonizable.

Los epitelios que recubren los tractos no presentan una organización única. Concretamente el **EPITELIO INTESTINAL** se compone de una única capa de células epiteliales cilíndricas con un medio interno densamente poblado por microorganismos. Estos microorganismos integran, mayormente, la flora comensal. Su aporte a la fisiología del tubo digestivo es importante en varios aspectos, como la maduración de las células epiteliales o el desarrollo de los órganos linfoides asociados con la mucosa intestinal.

La continuidad del epitelio constituye una barrera frente a los microorganismos. Esta continuidad involucra diferentes **UNIONES** entre las células epiteliales adyacentes (estrechas, adherentes y desmosomas). El complejo sistema de uniones garantiza la continuidad del epitelio y su funcionalidad como barrera. No obstante, la permeabilidad selectiva que imponen estas uniones suele modificarse en el transcurso de fenómenos

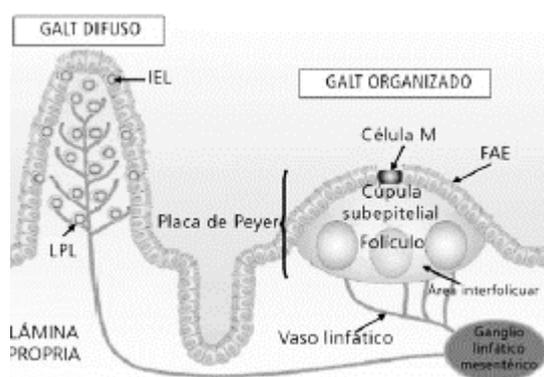
inflamatorios mediante la acción de citocinas inflamatorias, como puede ser TNF- $\alpha$  y el interferón- $\gamma$  que, a través de diferentes mecanismos, incrementan su permeabilidad.

Además, el epitelio asociado con las mucosas produce un líquido viscoso, el **MOCO**, caracterizado por la presencia de glucoproteínas de alto peso molecular, denominadas mucinas. Las células de Goblet son las principales productoras de mucinas en el epitelio intestinal. Las propiedades adhesivas y elásticas del moco permiten que sea retenido en la superficie epitelial y, por tanto, que cumpla un papel crítico en la protección antimicrobiana de las mucosas. Las secreciones mucosas asociadas con el epitelio contienen también altas concentraciones de anticuerpos, fundamentalmente **IgA SECRETORA** (IgAs). La mayoría es producida localmente por plasmocitos especializados en la producción de anticuerpos IgA (15).

La actividad microbiana no guarda sólo relación con su continuidad y la producción de secreciones mucosas, sino también con su capacidad de producir un conjunto de sustancias con capacidad microbicida. Entre ellas destacan, primeramente, los **PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS** (defensinas y catelicidinas), que son producidos por los enterocitos en ausencia de procesos infecciosos. Las células de Paneth son las principales productoras de estos en la mucosa intestinal. Además, cabe mencionar las acciones locales mediadas por la lisozima y la lactoferrina, producidas también por los enterocitos.

Sin embargo, la barrera más efectiva está constituida por el tejido linfoide asociado al intestino o **GALT** (Gut-Associated Lymphoid Tissue). Anatómicamente, el GALT se divide en dos compartimentos, reflejados en la FIGURA 4 (16):

- a) GALT organizado, inductor de la respuesta inmunitaria intestinal: constituido por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados o placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos.
- b) GALT difuso, efector de la respuesta inmunitaria: integrado por poblaciones de linfocitos dispersas en el entramado epitelial o la lámina propia (16).



**FIGURA 4.** Representación de los elementos que integran el tejido linfoide en la mucosa intestinal

### 1.3.3. Inflamación en el intestino

La inflamación es un mecanismo de defensa necesario contra la invasión de patógenos del ambiente exterior y otras situaciones de agresión al organismo. Varias células inmunitarias se infiltran en el área inflamada después de la detección de la situación agresiva. Entre estas células inmunitarias, los macrófagos desempeñan un papel central en la respuesta inflamatoria. Los macrófagos intestinales proceden de los monocitos circulantes, los cuales se diferencian en el ID.

Los macrófagos se acumulan en el tejido inflamado, eliminando agentes infecciosos, resolviendo la inflamación o eliminando las células muertas, intentando minimizar y/o eliminar esa agresión. También reparan el tejido dañado durante el proceso inflamatorio mediante la secreción de múltiples mediadores inflamatorios, que incluyen citoquinas, quimiocinas y proteasas (17).

Algunos estudios clínicos en sujetos con AOS han mostrado aumento de diferentes biomarcadores inflamatorios o la disminución de estos tras el tratamiento de esta patología. Se han desarrollado modelos animales que involucran la exposición de roedores o células a la HI, característica distintiva de la AOS. Varios de estos experimentos demuestran que la HI puede estimular las vías inflamatorias y conducir a patología cardiovascular o metabólica (4). A continuación se muestra la FIGURA 5 (4), donde se resume, en forma de esquema, las vías de interacción de la AOS:

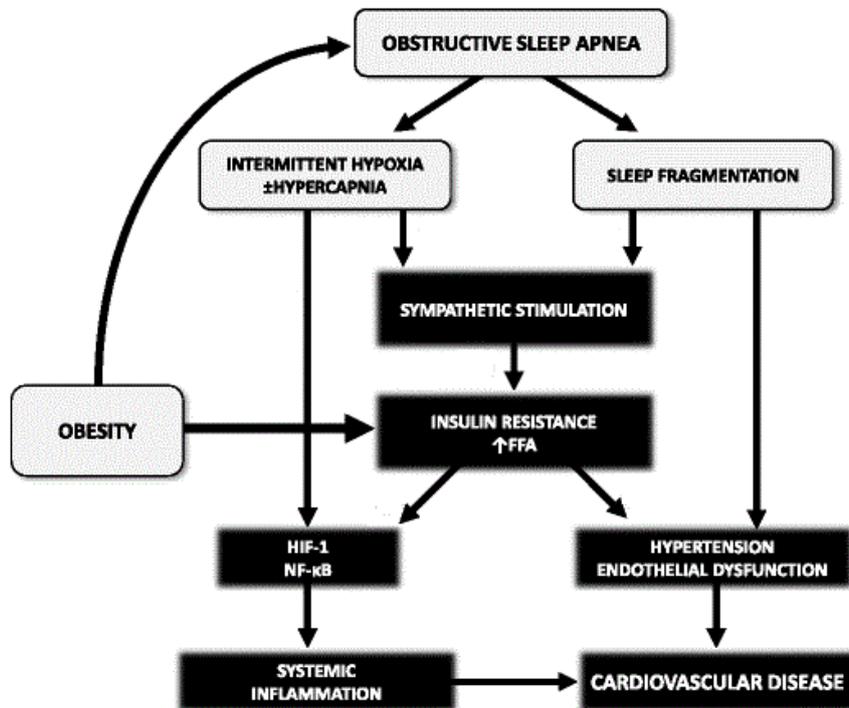


FIGURA 5. Vías de interacción de la AOS

## 2. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo fin de grado (TFG) surge por un interés científico, académico y personal.

El SAHS es una entidad compleja, de elevada prevalencia y asociada a numerosos procesos biológicos que pueden desencadenar, a su vez, una serie de problemas cardiovasculares, metabólicos y cognitivos. A pesar de que es un síndrome en continua investigación, tras una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos (PubMed, SciELO, ScienceDirect etc.) y revisiones sistemáticas como Cochrane, solamente se encontró un estudio de la influencia de la HI en ID, concretamente en duodeno (18) y algunos en hígado (19,20). Como futura Dietista-Nutricionista, considero que es de gran importancia conocer las repercusiones de los diferentes síndromes/enfermedades en el aparato digestivo, tanto en su arquitectura, histología como en la posible limitación de algunas de sus funciones.

Además, este trabajo surge como complemento al TFG del año pasado “Cambios inmunohistológicos en intestino delgado de ratón expuesto a dieta rica en grasa”, realizado por Beatriz Manso Gamazo y presentado el 27 de junio de 2018. En este TFG la alumna consideró la iniciativa de nuevas vías de investigación en sujetos con alteración del sueño, considerando la AOS como un estado inflamatorio generalizado por la exposición a HI.

El interés personal es debido a que soy Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citología. Al presentar este trabajo para optar al Grado en Nutrición Humana y Dietética quería combinar ambas formaciones, además de aplicar los conocimientos adquiridos en Nutrición y Dietética al ámbito de la investigación. Quería integrarme en un grupo de investigación consolidado, utilizar nuevas técnicas y realizar un trabajo de esta índole con las pautas adquiridas en el grado.

Por tanto, la finalidad de este trabajo es conocer las posibles repercusiones de la HI, como signo característico de la AOS en el ID en un modelo experimental murino.

### 3. OBJETIVOS

El objetivo principal de la asignatura TFG en el Grado de Nutrición Humana y Dietética es desarrollar las competencias generales, incluidas en la Orden CIN/730/2009, de 18 de marzo, las competencias específicas y transversales. Además, aplicado a mi trabajo, aprender la capacidad de trabajo en equipo y organización en el laboratorio, realizar un trabajo de investigación acorde a las normas establecidas e incorporar los conocimientos adquiridos durante los estudios de Grado con autonomía y bajo supervisión de las tutoras.

Concretando más en este estudio, el objetivo principal de “Repercusiones de la hipoxia intermitente en intestino delgado. Estudio en un modelo experimental animal” es dilucidar las posibles repercusiones de la exposición a la HI características de la AOS en ID en un modelo experimental de rata.

Como objetivos específicos:

1. Analizar si la exposición a HI produce cambios en la estructura histológica del ID (yeyuno) comparado con animales controles.
2. Identificar la presencia de marcadores específicos reactivos a la inflamación en ID (yeyuno) como posible consecuencia de la HI comparado con animales controles.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Diseño

El diseño del presente estudio, experimental de experiencias controladas, se basa en una primera parte de búsqueda bibliográfica y una segunda experimental.

La búsqueda bibliográfica se ha realizado en bases de datos (PubMed, SciELO, Elsevier, Dialnet...), libros de texto, revisiones sistemáticas como Cochrane... en todas ellas, se ha buscado los conceptos mencionados anteriormente, (HI, ID, SAHS, AOS...) y artículos que, posiblemente, los relacionase entre sí.

Posteriormente, se realizó la parte experimental, empleando un modelo animal murino sometido a HI.

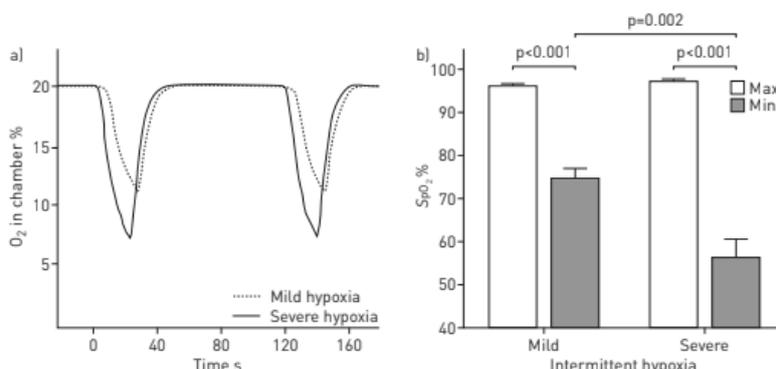
### 4.2. Muestra

El estudio, previamente aprobado por el Comité Ético de Investigación de la Universidad de Valladolid, se realizó con ratas de raza Wistar, de 3 meses de edad mantenidos hasta la edad de 4 meses de edad en las instalaciones, aptas para animales, situadas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Se mantuvieron en un régimen general, es decir, en jaulas estándar a 20-24°C.

Las ratas (n=15) se dividieron en dos grupos, de forma aleatoria:

- Grupo control (n=8): fue sometido a condiciones de oxígeno normales (21 % O<sub>2</sub>).
- Grupo experimental (n=7): fue sometido a situación de HI.

A continuación, en la FIGURA 6 (21) se presentan gráficamente las condiciones de HI a las que ha sido sometido el grupo experimental durante 4 semanas. En este caso, los sujetos han sido sometidos a hipoxia grave (severe hypoxia) que se refleja en ambas gráficas.



**FIGURA 6.** a) Patrón de concentración de oxígeno (O<sub>2</sub>) en el aire respirado por ratas sometidas a hipoxia intermitente leve y grave. b) Mínimos y máximos de recuperación en los ciclos de saturación de oxígeno arterial (SpO<sub>2</sub>) causados por la respiración de los patrones de hipoxia intermitente leve y grave

Tras la finalización del tiempo de exposición las ratas fueron eutanasiadas. Posteriormente se realizó la cirugía para extracción de la sección yeyunal.

### 4.3. Metodología

#### 4.3.1. Inclusión de las muestras de yeyuno de rata control y experimental en parafina

Las muestras de yeyuno, pertenecientes al grupo control y experimental, tras ser extraídas se fijaron por inmersión en paraformaldehído (PF) al 4% en un buffer de fosfato (PB) 0.1M.

Consecutivamente, de cada segmento de yeyuno se obtuvieron dos cassetes que contenían, respectivamente, una sección circular (CIRC) y una longitudinal (LONG).

Los cassetes se identificaron de la siguiente manera, correspondiendo cada número a un sujeto (animal) diferente:

- Controles: C9 (CIRC Y LONG), C10 (CIRC Y LONG), C11 (CIRC Y LONG) etc.
- Experimentales: HI1 (CIRC Y LONG), HI2 (CIRC Y LONG), HI3 (CIRC Y LONG) etc.

En cada cassette a esta identificación anterior se añadió la fecha de inclusión.

A continuación, se procesaron las muestras contenidas en cada cassette mediante un procesador de tejidos (*Procesador de Tejidos STP-120*) localizado en el IBGM (Instituto de Biología y Genética Molecular) siguiendo el protocolo adjunto en el ANEXO I.

Una vez finalizado el procesado de las muestras, estas se incluyeron en parafina (formando bloques) por medio del *centro de inclusión EC 350*. Los cassetes fueron conservados en una caja a temperatura ambiente hasta que fueron cortados.

#### 4.3.2. Tinción con hematoxilina-eosina de muestras de yeyuno de rata control y experimental

De cada uno de los bloques de parafina se realizaron cortes histológicos de 6 µm de espesor mediante un microtomo de rotación manual *HistoCore BIOCUT*. Se obtuvieron 103 portaobjetos de muestras control y 100 de muestras experimentales, colocándose, aproximadamente, 3 cortes por portaobjetos. Posteriormente, 99 portaobjetos de muestra control y 96 de muestra experimental fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H/E), atendiendo al protocolo adjunto en el ANEXO II.

#### 4.3.3. Inmunofluorescencia sobre muestras de yeyuno de rata control y experimental

La técnica de inmunofluorescencia se realizó sobre 4 portaobjetos que contenían muestra control y sobre 4 portaobjetos que contenían muestra experimental.

Se emplearon 4 tipos de anticuerpos frente a receptores de TNF- $\alpha$ , CD68 e interleucinas IL-1 e IL-6. Se realizó el mismo número de técnicas para cada uno de los anticuerpos, una muestra control y otra experimental.

El protocolo que se ha seguido para realizar esta técnica se adjunta en el ANEXO III.

#### 4.3.4. Visualización de las muestras de yeyuno de rata control y experimental al microscopio

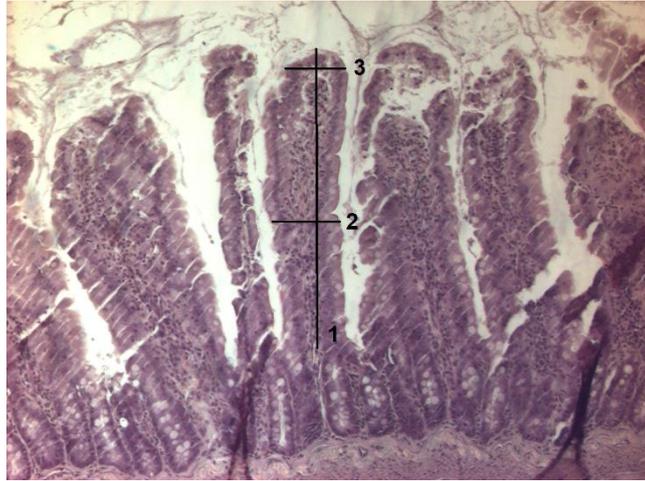
Tanto las muestras teñidas con H/E como las sometidas a inmunofluorescencia, fueron observadas con el microscopio *Carl Zeiss Axioskop 2 mot plus* equipado con luz de fluorescencia y filtros adecuados para cada fluoróforo. Se realizó un estudio histológico, incluyendo el recuento por campo de eosinófilos y linfocitos. Además, fueron fotografiadas con la cámara digital *Cool SNAP Photometric, Roper Scientific* acoplada al microscopio. Estas imágenes fueron analizadas mediante un programa de análisis de imagen *Metamorph 6.3 software*.

#### 4.3.5. Análisis estadístico

Se realizó un estudio morfométrico de las vellosidades del yeyuno pertenecientes a ambos grupos de los parámetros de altura, anchura media y anchura del pico, los cuales se detallan en la FIGURA 7.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico. Se ha realizado un estudio descriptivo en el que se incluye el cálculo de la media (ME), desviación estándar (DS) y error de la media (SEM) además de diferentes diagramas asumiendo normalidad. Para todo ello se empleó el programa *GraphPad Prism 6.3*.

También se realizó estadística inferencial mediante la formulación de hipótesis a través del programa *Statgraphics 18*, utilizando un valor de  $p < 0,05$  como umbral para significancia.



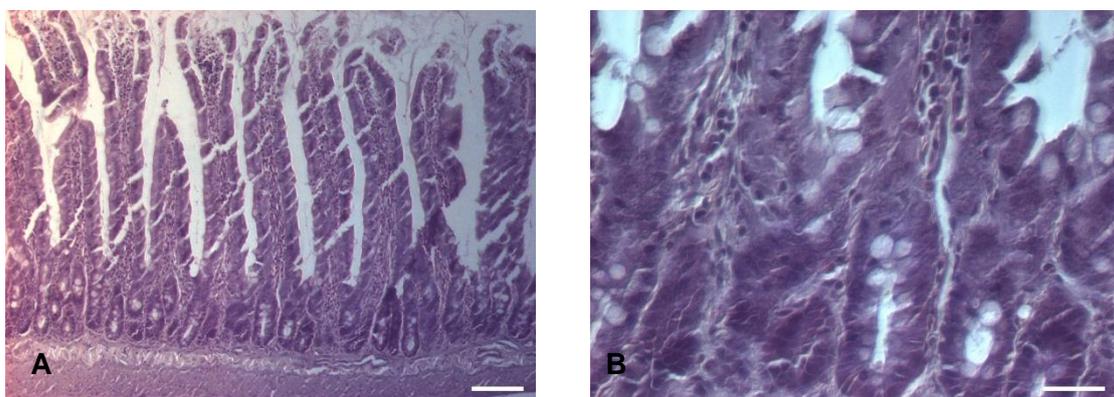
**FIGURA 7.** Tinción con H/E de una sección circular de un segmento de yeyuno de rata experimental con objetivo 10x en la que se detallan las diferentes medidas realizadas en el análisis morfométrico: altura (1), anchura media (2), anchura pico (3).

## 5. RESULTADOS

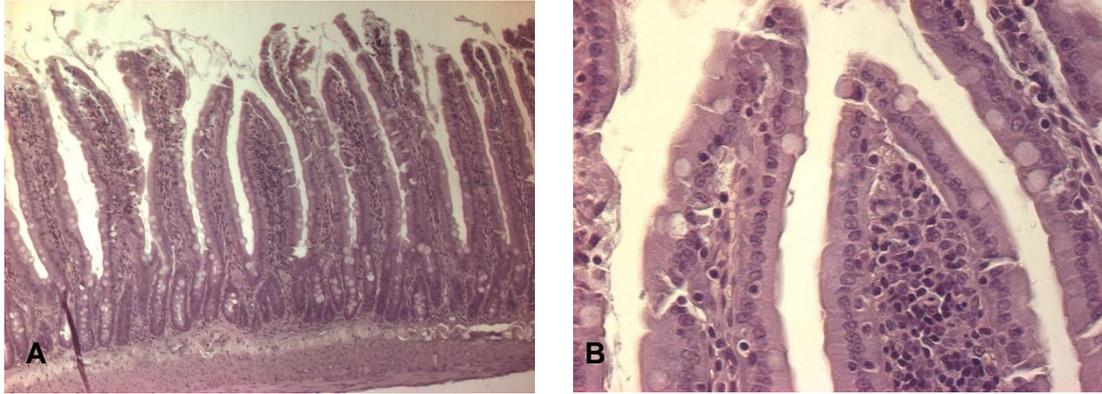
### 5.1. Histología

A continuación, se presentan los resultados del estudio histológico de las muestras pertenecientes a los grupos control y experimental.

Las vellosidades intestinales de los animales experimentales presentan una mayor longitud y diámetro transversal en el tercio distal que las pertenecientes al grupo experimental. Este aumento se encuentra a expensas de una lámina propia expandida, por incremento en el número de linfocitos y células plasmáticas (FIGURAS 8 y 9).



**FIGURA 8.** A) Tinción con H/E de una sección longitudinal de un segmento de yeyuno de rata control (A) objetivo 10x y (B) Tinción con H/E de una sección longitudinal de un segmento de yeyuno de rata control objetivo (40x). Barra de calibración a 100  $\mu$ m

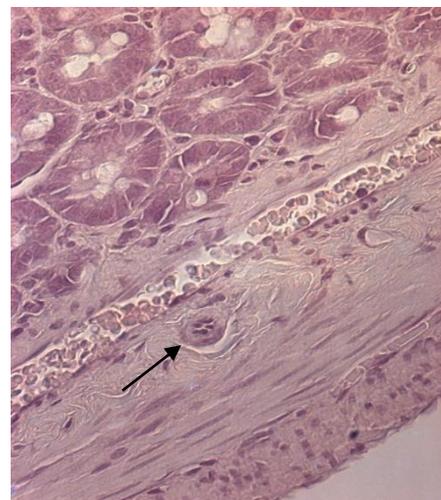


**FIGURA 9.** A) Tinción con H/E de una sección circular de un segmento de yeyuno de rata experimental (A) objetivo 10x B) Tinción con H/E de una sección circular de un segmento de yeyuno de rata experimental objetivo (40x). Barra de calibración a 100  $\mu$ m

El recuento de eosinófilos tuvo como resultado por campo de gran aumento un máximo de 10 eosinófilos/campo en el grupo experimental contra 2 eosinófilos/campo en el grupo control. Por tanto, existe un aumento en el número de eosinófilos en el grupo experimental frente al grupo control. También se encuentran incrementados los linfocitos a nivel intraepitelial en el grupo experimental con respecto al grupo control: 3 linfocitos intraepiteliales/10 enterocitos en el grupo experimental versus 1 linfocito/50 enterocitos en el grupo control, existiendo zonas de las vellosidades sin linfocitos intraepiteliales en las vellosidades de animales control. Asimismo, se observa un incremento en el número de células caliciformes con presencia de amontonamiento de estas en las vellosidades y criptas intestinales de los animales experimentales en referencia a los animales controles.

La capa submucosa, la muscular propia y la serosa no presentan alteraciones histológicas relevantes ni diferencias morfológicas significativas entre los animales controles y experimentales.

Durante la exploración histológica se observó un engrosamiento de los vasos sanguíneos pertenecientes al grupo experimental, como se contempla en la FIGURA 10.



**FIGURA 10.** Tinción con H/E de una sección circular de un segmento de yeyuno de rata experimental

## 5.2. Estudio morfométrico

De forma previa a la presentación de los resultados del estudio morfométrico es preciso resaltar que, de los 16 sujetos de experimentación, finalmente solamente se pudieron medir 13 debido a problemas en el procesamiento.

### 5.2.1. Altura vellosidades intestinales

Se midió la altura desde la base de la vellosidad hasta el pico. Se obtuvieron 67 medidas de muestra control y 98 medidas de muestra experimental, las cuales se agruparon en base a los diferentes sujetos de estudio. A continuación, se presenta un resumen en forma de tabla (TABLA 1) en el que se aportan datos sobre el número de medidas, ME, SD y SEM.

<b>GRUPO CONTROL (A)</b>				
<b>SUJETO</b>	<b>NÚMERO DE MEDIDAS</b>	<b>ME</b>	<b>DS</b>	<b>SEM</b>
<b>9</b>	8	466.6	55.90	19.76
<b>11</b>	5	489.8	66.65	29.81
<b>12</b>	3	396.7	29.41	16.98
<b>13</b>	19	344.9	65.03	14.92
<b>14</b>	3	535.4	13.52	7.80
<b>15</b>	7	467.9	66.75	25.23
<b>16</b>	22	395.2	39.37	8.39
<b>TOTAL</b>	67	442.4	48.09	17.56

<b>GRUPO EXPERIMENTAL (B)</b>				
<b>SUJETO</b>	<b>NÚMERO DE MEDIDAS</b>	<b>ME</b>	<b>DS</b>	<b>SEM</b>
<b>2</b>	35	233.9	151.9	25.68
<b>3</b>	3	617.2	9.645	5.569
<b>4</b>	4	397.8	228.0	114.0
<b>5</b>	8	395.1	135.9	48.05
<b>6</b>	14	460.7	125.5	33.54
<b>7</b>	34	543.8	66.49	11.40
<b>TOTAL</b>	98	441.4	119.57	39.7

**TABLA 1.** Valores medios de la altura de la vellosidad del yeyuno, desviación estándar y error de la media del grupo control (A) y del grupo experimental (B)

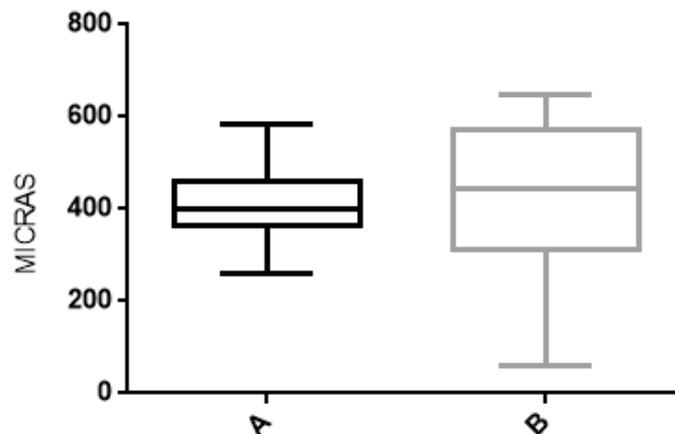
En la TABLA 1 se observa que las medias de ambos grupos (A y B) son similares, sin embargo, la desviación estándar del grupo B es muy superior a la del grupo A. Dados estos hechos, se enunció la hipótesis siguiente: la media de altura del grupo A es igual a la media de altura del grupo B ( $H_0$ ) frente a que la media de altura del grupo A es diferente a la media de altura del grupo B ( $H_1$ ).

$$H_0: \mu_A = \mu_B$$

$$H_1: \mu_A \neq \mu_B$$

En relación a la hipótesis formulada, el p-valor obtenido es de 0.802843 lo que nos lleva a concluir que no se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) con un 95% de nivel de confianza.

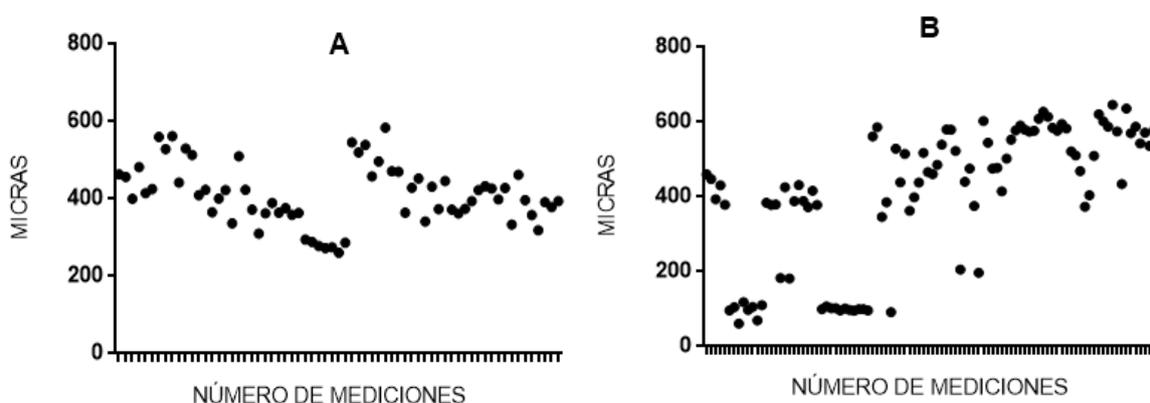
Al obtener los resultados de esta hipótesis junto con los de la TABLA 1 se planteó la posibilidad de que la dispersión de los datos en cada uno de los grupos fuese diferente. Por tanto, se procedió a la inclusión del diagrama box-plot (FIGURA 11) y diagramas de dispersión (FIGURA 12). Además, se calculó el coeficiente de variación (CV).



**FIGURA 11.** Diagrama box-plot que compara el grupo control (A) frente al grupo experimental (B)

Las cajas del diagrama, que aparecen en la FIGURA 11, representan el 50% de los datos de cada uno de los grupos. Teniendo en cuenta esto y que la caja del grupo A es más estrecha que la del grupo B, los datos del primer grupo están más concentrados que los del segundo. Además, la distancia entre el mínimo y el máximo (recorrido) del grupo A es menor a la del grupo B, lo que indica una mayor dispersión de los datos de este último grupo.

Como segunda medida de dispersión de datos se realizaron dos diagramas de dispersión de datos, uno para cada grupo, como se muestra en la FIGURA 12. En ella, se observa gráficamente una mayor dispersión de datos en el grupo B.



**FIGURA 12.** Diagramas de dispersión del grupo control (A) y del grupo experimental (B)

La tercera medida de dispersión fue el cálculo del CV. El CV representa el porcentaje que supone la desviación típica con respecto a la media, por lo que permite comparar la dispersión de distintas variables. Habitualmente, el valor del CV se compara con 0,5: si el coeficiente es inferior a dicho valor, se considera que la media es una medida representativa de la variable y los valores no están muy dispersos; si es superior, se considera no representativa y los valores están muy dispersos. Se obtuvo un CV de 0.19 para el grupo A y un CV de 0.45 para el grupo B. Aunque ambos valores son inferiores a 0.5, los valores del grupo B están más dispersos que los del grupo A.

### 5.2.2. Anchura media vellosidades intestinales

Se midió la altura anchura media de las vellosidades. Se obtuvieron 76 medidas de muestra control y 99 medidas de muestra experimental, las cuales se agruparon en base a los diferentes sujetos de estudio. A continuación, se presenta un resumen en forma de tabla (TABLA 2) en el que se aportan datos sobre el número de medidas, ME, SD y SEM.

<b>GRUPO CONTROL (A)</b>				
<b>SUJETO</b>	<b>NÚMERO DE MEDIDAS</b>	<b>ME</b>	<b>DS</b>	<b>SEM</b>
<b>9</b>	8	70.15	7.716	2.728
<b>11</b>	6	73.09	19.92	8.132
<b>12</b>	8	66.25	8.613	3.045
<b>13</b>	14	85.23	13.59	3.632
<b>14</b>	2	84.09	20.20	14.29
<b>15</b>	23	58.55	8.358	1.743
<b>16</b>	15	77.18	12.64	3.264
<b>TOTAL</b>	76	73.51	13.01	5.262

<b>GRUPO EXPERIMENTAL (B)</b>				
<b>SUJETO</b>	<b>NÚMERO DE MEDIDAS</b>	<b>ME</b>	<b>DS</b>	<b>SEM</b>
<b>2</b>	36	69.99	50.69	8.449
<b>3</b>	3	95.85	6.830	3.943
<b>4</b>	4	96.24	83.04	41.52
<b>5</b>	8	102.3	20.67	7.309
<b>6</b>	14	104.6	31.05	8.299
<b>7</b>	34	118.6	35.35	6.063
<b>TOTAL</b>	99	97.93	37.938	12.60

**TABLA 2.** Valores medios de la anchura media de la vellosidad del yeyuno, desviación estándar y error de la media del grupo control (A) y del grupo experimental (B)

Como se puede comprobar en la TABLA 2, tanto las medias de ambos grupos como sus desviaciones estándar son diferentes, siendo superiores ambos parámetros en el grupo B.

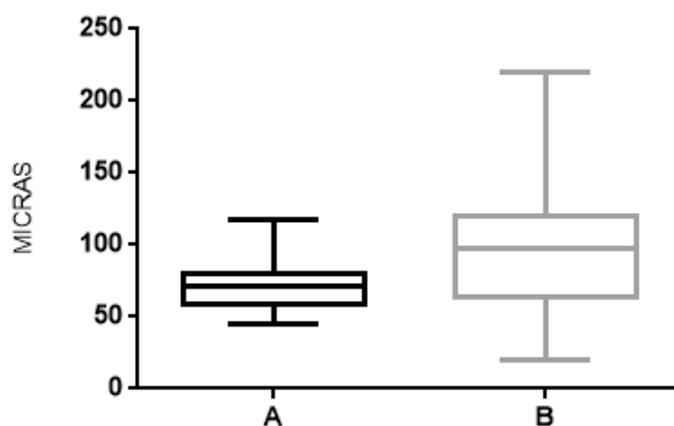
Se procedió de la misma manera que el apartado anterior, formulándose la siguiente hipótesis: la media de la anchura media del grupo A es igual a la media de la anchura media del grupo B ( $H_0$ ) frente a que la media de anchura media del grupo A es diferente a la media de anchura media del grupo B ( $H_1$ ).

$$H_0: \mu_A = \mu_B$$

$$H_1: \mu_A \neq \mu_B$$

En relación a la hipótesis formulada, el p-valor obtenido es de  $4,73172 \times 10^{-7}$ , puesto que el p-valor para la prueba es menor que 0,05, puede rechazarse la hipótesis nula con un 95,0% de nivel de confianza.

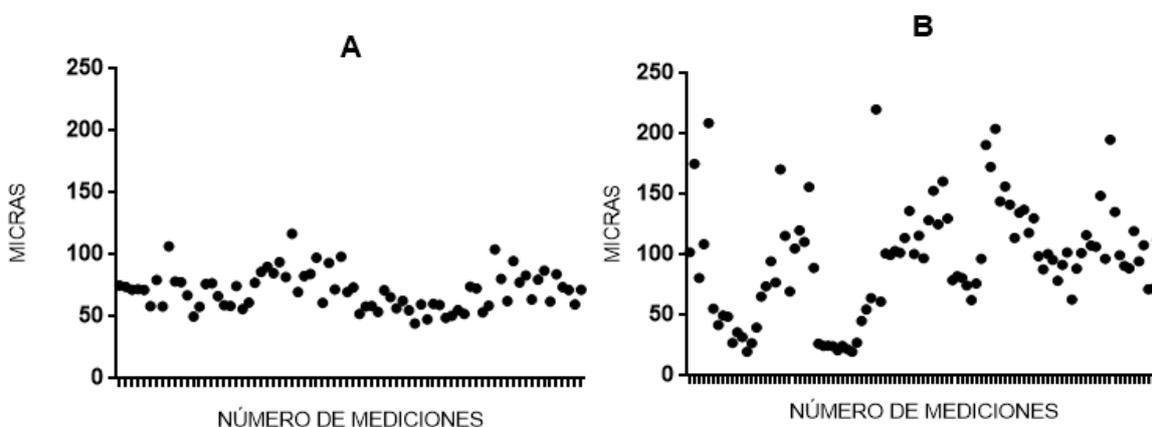
Del mismo modo, se procedió a la inclusión del diagrama box-plot (FIGURA 13), diagramas de dispersión (FIGURA 14) y el cálculo del CV.



**FIGURA 13.** Diagrama box-plot que compara el grupo control (A) frente al grupo experimental (B)

En el diagrama correspondiente a la FIGURA 13, tanto la anchura de las cajas como la distancia entre el máximo y el mínimo, indican una mayor dispersión de los datos en el grupo B.

A continuación, se presenta la segunda medida de dispersión realizada, los diagramas de dispersión correspondiente a cada uno de los grupos.



**FIGURA 14.** Diagramas de dispersión del grupo control (A) y del grupo experimental (B)

En la FIGURA 14 también se observa gráficamente una mayor dispersión de los datos en el grupo B, al igual que a través del cálculo del CV, obteniéndose, como resultado un CV de 0.21 para el grupo A y un CV de 0.48 para el grupo B, indicando todo ello, una mayor dispersión de datos en el grupo B.

### 5.2.3. Anchura pico vellosidades intestinales

Se midió la anchura del pico de las vellosidades. Se obtuvieron 59 medidas de muestra control y 97 medidas de muestra experimental, las cuales se agruparon en base a los diferentes sujetos de estudio. A continuación, se presenta un resumen en forma de tabla (TABLA 3) en el que se aportan datos sobre el número de medidas, ME, SD y SEM.

<b>GRUPO CONTROL (A)</b>				
<b>SUJETO</b>	<b>NÚMERO DE MEDIDAS</b>	<b>ME</b>	<b>DS</b>	<b>SEM</b>
<b>9</b>	6	42.37	7.736	3.158
<b>11</b>	7	57.03	18.60	7.028
<b>12</b>	7	33.11	13.77	5.206
<b>13</b>	9	48.65	11.51	3.836
<b>14</b>	2	65.92	13.17	9.315
<b>15</b>	12	43.90	10.76	3.107
<b>16</b>	16	59.32	10.34	2.584
<b>TOTAL</b>	59	50.04	12.27	4.89

<b>GRUPO EXPERIMENTAL (B)</b>				
<b>SUJETO</b>	<b>NÚMERO DE MEDIDAS</b>	<b>ME</b>	<b>DS</b>	<b>SEM</b>
<b>2</b>	34	42.22	27.68	4.747
<b>3</b>	3	50.45	4.143	2.392
<b>4</b>	4	72.16	55.47	27.73
<b>5</b>	8	105.6	83.91	29.67
<b>6</b>	14	62.18	21.52	5.751
<b>7</b>	34	82.23	31.51	5.404
<b>TOTAL</b>	97	69.14	37.37	12.62

**TABLA 3.** Valores medios de la anchura del pico de la vellosidad del yeyuno, desviación estándar y error de la media del grupo control (A) y del grupo experimental (B)

En la TABLA 3 donde se resumen los datos correspondientes a la anchura del pico de las vellosidades del yeyuno, se comprueba también una diferencia de medias y DS, siendo más elevadas ambas en el grupo experimental.

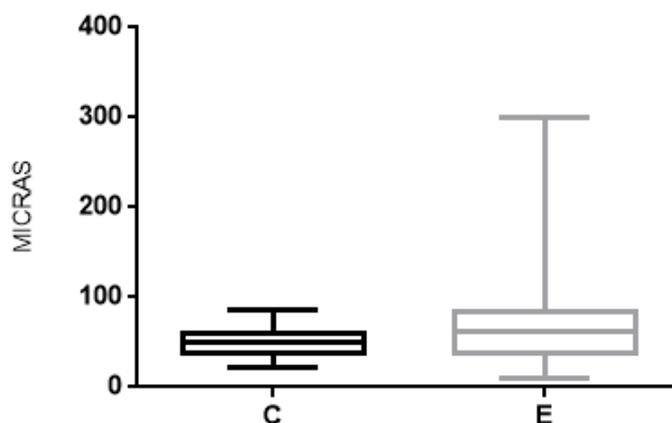
Se procedió de igual manera que en el análisis de altura y anchura media, formulándose la siguiente hipótesis: la anchura del pico del grupo A es igual a la media de la anchura del pico del grupo B ( $H_0$ ) frente a que la media del grupo A es diferente a la media de la anchura del pico del grupo B ( $H_1$ ).

$H_0: \mu_A = \mu_B$

$H_1: \mu_A \neq \mu_B$

En relación a la hipótesis formulada, el p-valor obtenido es de 0,000468717, puesto que el p-valor para la prueba es menor que 0,05, puede rechazarse la hipótesis nula con un 95,0% de nivel de confianza.

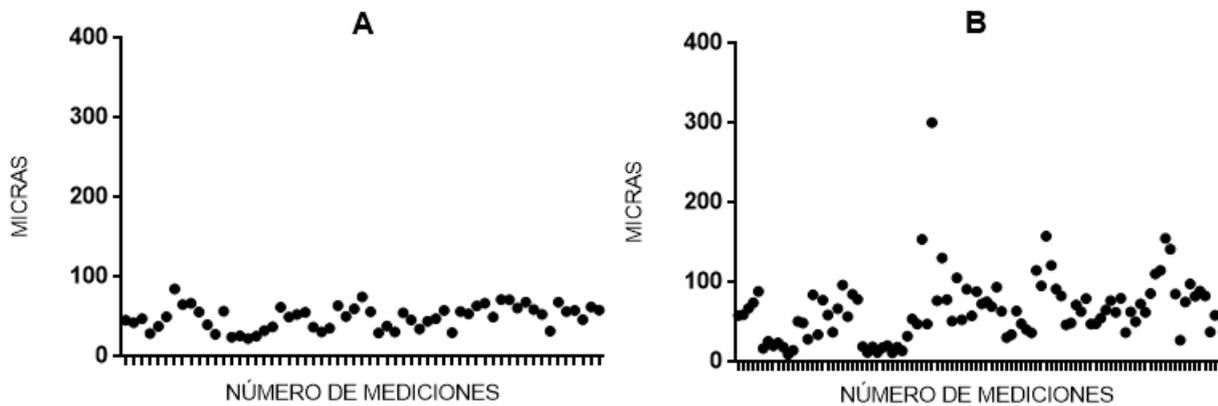
A continuación, se muestra el diagrama box-plot (FIGURA 15), los diagramas de dispersión (FIGURA 16) y el cálculo del CV.



**FIGURA 15.** Diagrama box-plot que compara el grupo control (A) frente al grupo experimental (B)

En el diagrama box-plot, adjunto como FIGURA 15, se observa un rango de datos muy superior en el grupo experimental frente al grupo control, indicando, así, una mayor dispersión de los datos.

A continuación, se presenta la segunda medida de dispersión realizada, los diagramas de dispersión correspondiente a cada uno de los grupos.



**FIGURA 16.** Diagramas de dispersión del grupo control (A) y del grupo experimental (B)

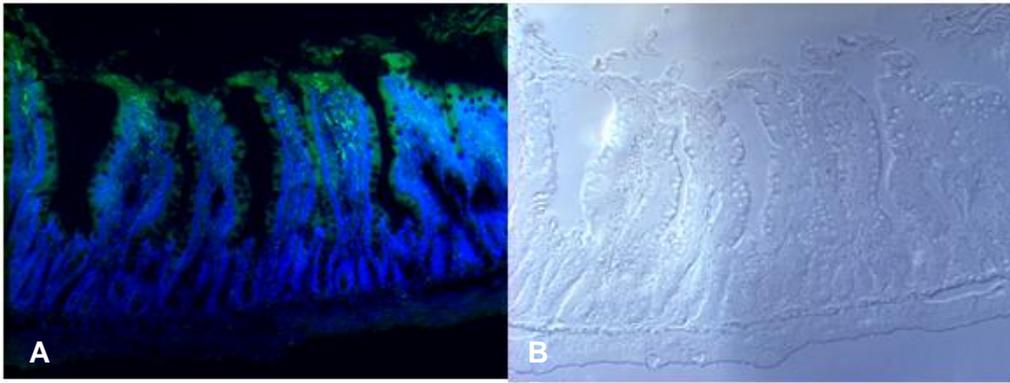
En los diagramas de dispersión representados en la FIGURA 16 se presencia una mayor dispersión de los datos del grupo B respecto a los del grupo A. Para corroborarlo, se calcula el CV, obteniéndose como resultado un CV del grupo control de 0.2975 y un CV para el grupo experimental de 0,6286.

En los dos análisis morfométricos anteriores (altura y anchura media), el CV fue inferior a 0.5, a pesar de que la dispersión del grupo experimental era superior. En este caso, el CV del grupo experimental es superior a 0.5, considerándose unos datos completamente dispersos.

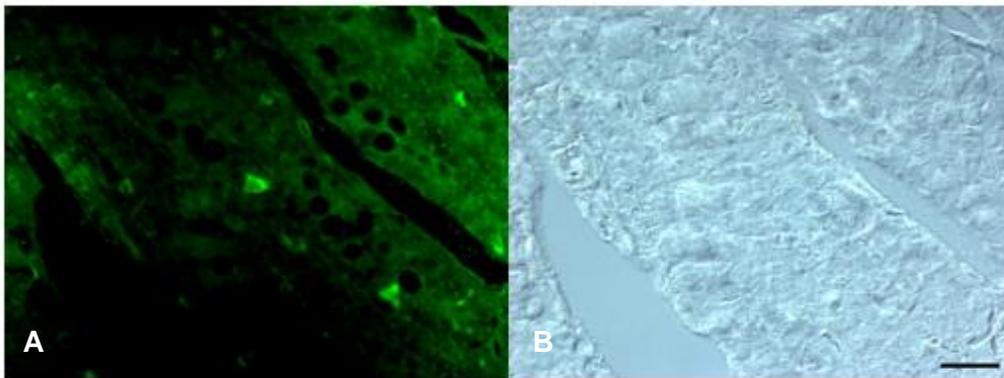
### 5.3. Inmunofluorescencia

Las muestras de inmunofluorescencia para los receptores de CD68 e interleucinas IL-1 e IL-6 fueron examinadas y fotografiadas al microscopio. Las muestras para el receptor de TNF- $\alpha$  fueron sometidas a inmunofluorescencia tres veces sin obtenerse en ninguna de ellas una adecuada visualización, seguramente, por un mal estado de conservación del anticuerpo. Por tanto, solo se muestran los resultados para los receptores de CD68 e interleucinas IL-1 e IL-6.

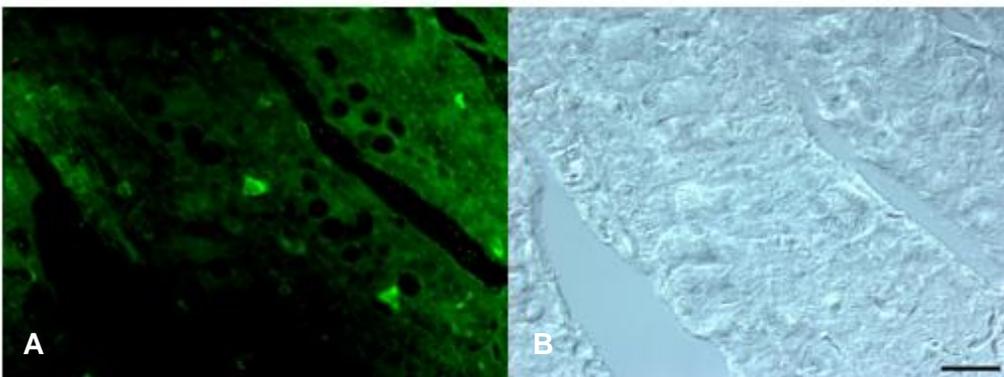
Únicamente se muestran imágenes de un solo grupo (control o experimental) dado que durante el examen de todas las muestras al microscopio no se observaron diferencias entre ambos grupos para cada uno de los receptores. La fotografía correspondiente para el receptor CD68 se muestra en la FIGURA 17, para el receptor de IL-1 en la FIGURA 18 y para el de IL-6 en la FIGURA 19.



**FIGURA 17.** Sección circular de un segmento de yeyuno de rata experimental objetivo 10x. A) DAPI y Alexa 594 con CD68 B) DIC con CD68



**FIGURA 18.** Sección circular de un segmento de yeyuno de rata control objetivo 40x. A) DAPI y FITC con IL-1 B) DIC con IL-1. Barra de calibración 10  $\mu$ m



**FIGURA 19.** Sección circular de un segmento de yeyuno de rata control objetivo 40x. A) DAPI y FITC con IL-6 B) DIC con IL-6. Barra de calibración 10  $\mu$ m

## 6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se pretendía conocer las posibles repercusiones de la HI en el ID.

Conociendo los efectos que produce la HI en diferentes órganos, la afección de la microbiota intestinal por la AOS (22) y que el sistema gastrointestinal es particularmente sensible a la hipoxia tisular, se esperaba que la estructura histológica del intestino también se viese afectada. A través de un estudio histológico y morfométrico, se puede observar cómo la estructura se ve modificada, apareciendo una mayor cantidad de células caliciformes, linfocitos y eosinófilos en el grupo experimental, sometido a HI. La aparición de una mayor cantidad de células caliciformes en el grupo experimental puede que se corresponda con un mecanismo de defensa del propio organismo que sufre un aporte de oxígeno insuficiente a consecuencia de la hipoxia. La arquitectura intestinal en el grupo sometido a HI no es tan homogénea como en el grupo control, especialmente en relación a los parámetros de anchura media y pico de las vellosidades. Por tanto, se observa cierta afectación de la HI en el epitelio del ID. El mecanismo que subyace a los efectos de la AOS en la morfología yeyunal puede que se encuentre asociado a un aumento del estrés oxidativo y la activación de los factores de transcripción, incluyendo el HIF-1, lo que a su vez induce la alteración de las proteínas relacionadas con las uniones estrechas intercelulares intestinales y la lesión intestinal (18).

En contra de lo que se esperaba en el segundo objetivo específico, los datos de inmunofluorescencia no muestran un aumento de los anticuerpos en el grupo experimental frente a receptores de CD68 y de interleucinas IL-1 e IL-6, al contrario que en estudios realizados en otros órganos, como en el corazón (23). Además, otros estudios han demostrado el aumento de algunos de estos anticuerpos en sujetos sometidos a HI, originando así, un preacondicionamiento de desarrollo tumoral (24). Bien es cierto que los sujetos pertenecientes a estudios que demuestran inflamación producida por la HI (4) han sido sometidos durante un periodo más prolongado a HI, por tanto, se puede pensar que la inflamación no ha tenido lugar en los sujetos estudiados por un periodo de exposición a la HI insuficiente.

Todos estos cambios pueden producir limitaciones en las diferentes funciones del ID, como en la absorción intestinal. Son importantes también las comorbilidades asociadas a la AOS tratables desde el punto de vista nutricional, como pueden ser la diabetes, hipertensión, y la más importante por su predisposición a la AOS y agravamiento de esta, la obesidad (25).

## 7. LIMITACIONES

Antes de proceder al planteamiento de las conclusiones, es importante mencionar las limitaciones del presente estudio, con el fin de mejorar la comprensión de los resultados y su corrección en futuras investigaciones.

La principal barrera de este estudio ha sido la extensión de la muestra. El número de sujetos ha sido limitado, por lo que en futuras investigaciones se debería contar con una muestra más amplia, para obtener más resultados y, por tanto, conclusiones más potentes que puedan ser generalizadas.

Respecto al número de mediciones, se ha contado con un número menor de medidas en el grupo control, a consecuencia del estado de estas muestras tras su procesamiento. Los cortes histológicos de este grupo se repitieron tres veces dando en todos los casos el mismo resultado, un estado no óptimo de la calidad histológica. Hubiese sido deseable una mayor calidad de las muestras con el fin de haber obtenido un número mayor de mediciones.

Por otra parte, no se ha podido observar si existen diferencias entre ambos grupos respecto al receptor de TNF- $\alpha$  a consecuencia de un mal estado del anticuerpo. Tampoco se han realizado técnicas de inmunofluorescencia para otros anticuerpos que puede que interfieran en la inflamación intestinal, debido a una limitación económica del estudio. En futuros estudios se aconseja realizar técnicas de inmunofluorescencia para el receptor de TNF- $\alpha$  y técnicas de marcaje cuantitativo como el Western blot, para conocer valores específicos de esas posibles diferencias.

## 8. CONCLUSIONES

En referencia a la asignatura TFG, se han adquirido durante el desarrollo de esta una mayor cantidad de conocimientos, pudiendo asentar las bases del desarrollo de un trabajo de investigación y la puesta en práctica de las diferentes técnicas utilizadas para ello.

Con respecto a las conclusiones del estudio y con todo lo expuesto anteriormente, se puede concluir que:

1. La exposición a la HI produce cambios en la composición celular intestinal, presentándose un aumento de células caliciformes, plasmáticas, linfocitos y eosinófilos en comparación con el grupo control.
2. La capa submucosa, la muscular propia y la serosa no presentan alteraciones histológicas relevantes ni diferencias morfológicas significativas entre los animales controles y experimentales.
3. Existe un aumento del engrosamiento de los vasos sanguíneos del grupo experimental con respecto al grupo control.
4. Se produce una variación en la estructura de las vellosidades intestinales en ratas expuestas a HI, siguiendo un patrón menos homogéneo en comparación con el grupo control, especialmente en cuanto a los parámetros de anchura media y pico.
5. No hay aumento de los marcadores pro-inflamatorios empleados en el estudio: receptores de CD68 e interleucinas IL-1 e IL-6 en el ID de rata expuesta a HI.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hospital Universitario de Valme. El síndrome de apneas obstructivas del sueño. Capítulo 18. *Asoc Neumol y Cirugía Torácica del Sur*. 2004;219–231.
2. Grupo Español del Sueño (GES). Definición y concepto, fisiopatología, clínica y exploración del SAHS. *Arch Bronconeumol*. 2005;41:12–29.
3. Guilleminault C, Parejo-Gallardo KJ. Historia del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHOS). *Rev la Fac Med*. 2017;65:11–16.
4. Unnikrishnan D, Jun J, Polotsky V. Inflammation in sleep apnea: An update. *Rev Endocr Metab Disord*. 2015;16(1):25–34.
5. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Primer estudio comparativo del síndrome de apnea de sueño asociado a dos subtipos de hipertensión de alto riesgo cardiovascular. *Web SEPAR*. 2019.
6. Henry Olivi R. Apnea del sueño: cuadro clínico y estudio diagnóstico. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2015;24(3):359–373.
7. Butt M, Dwivedi G, Khair O, Gregory Y.H. Lip. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 2010;1(1):7–16.
8. Almendros I, Wang Y, Gozal D. The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2014;307(2):129–140.
9. Carmelo C, Angeles C. Respuesta a la hipoxia. Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina Buenos Aires*. 2006;2:155–164.
10. Drenckhahn D, Waschke J, Negrete JH. *Compendio de Anatomía*. Editorial Médica Panamericana; 2010.
11. Ross MH, Pawlina W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana; 2012.
12. Megías Pacheco M, Molist García P, Pombal Diego MÁ. *Atlas de histología vegetal y animal*. 2017.
13. Welsch U. *Sobotta Histología*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana; 2013.
14. Ross MH, Pawlina W, Barnash TA. *Atlas de Histología Descriptiva*. Editorial Médica Panamericana; 2012.
15. Fainboim L. *Introducción a la Inmunología Humana*. 6ª Edición. Buenos Aires; Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2013.
16. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. Editorial Garsi; 2008; 29–34.
17. Lim D, Kim W, Lee C, Bae H, Kim J. Macrophage depletion protects against cigarette smoke-induced inflammatory response in the mouse colon and lung. *Front Physiol*. 2018;9:1–14.
18. Wu J, Sun X, Wu Q, Li H, Li L, Feng J, et al. Disrupted intestinal structure in a rat model of intermittent hypoxia. *Mol Med Rep*. 2016;13(5):4407–4413.
19. Mesarwi OA, Loomba R, Malhotra A. Obstructive Sleep Apnea, Hypoxia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019.

20. Ding H, Huang J feng, Xie HS, Wang BY, Lin T, Zhao JM, et al. The association between glycometabolism and nonalcoholic fatty liver disease in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*. 2019;23(1):373–378.
21. Gallego-Martin T, Farré R, Almendros I, Gonzalez-Obeso E, Obeso A. Chronic intermittent hypoxia mimicking sleep apnoea increases spontaneous tumorigenesis in mice. *Eur Respir J*. 2017;49(2).
22. Ko C-Y, Liu Q-Q, Su H-Z, Zhang H-P, Fan J-M, Yang J-H, et al. Gut microbiota in obstructive sleep apnea–hypopnea syndrome: disease-related dysbiosis and metabolic comorbidities 2019;133(7):905–917.
23. Wei Q, Bian Y, Yu F, Zhang Q, Zhang G, Li Y. Chronic intermittent hypoxia induces cardiac inflammation and dysfunction in a rat obstructive sleep apnea model. *J Biomed Res*. 2016;30(6):490–495.
24. Michiels C, Tellier C, Feron O. Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2016;1866(1):76–86.
25. Silva L, Cunha D, Lopes J, Ramalheira J, Freire M, Novío S, et al. Comorbilidades y gravedad de la apnea del sueño. Estudio en una cohorte de pacientes portugueses. *Rev Neurol*. 2016;62(10):433–438.

# *ANEXOS*

## ANEXO I. PROCESADO DE LOS TEJIDOS

<b>PROCESADOR DE TEJIDOS STP-120</b>			
<i>Programa número (0-10): 4</i>			
<b>VASO</b>	<b>REACTIVO</b>	<b>TIEMPO DE INMERSIÓN HORAS: MINUTOS</b>	<b>REVOLUCIONES POR MINUTO</b>
<b>1</b>	Formol	01:00	60
<b>2</b>	Formol	01:00	60
<b>3</b>	Etanol 70°	01:30	70
<b>4</b>	Etanol 80°	01:30	70
<b>5</b>	Etanol 96°	01:30	70
<b>6</b>	Etanol 100°	01:00	70
<b>7</b>	Etanol 100°	01:00	70
<b>8</b>	Etanol 100°	01:00	70
<b>9</b>	Xileno	01:30	70
<b>10</b>	Xileno	01:30	60
<b>11</b>	Parafina	02:00	60
<b>12</b>	Parafina	02:00	60

## **ANEXO II. PROTOCOLO TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA**

<b>VASO</b>	<b>REACTIVO</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>1</b>	Xilol	6´	<b>DESPARAFINAR</b>
<b>2</b>	Xilol	6´	
<b>3</b>	Xilol	6´	
<b>4</b>	Etanol 100°	5´	<b>HIDRATAR</b>
<b>5</b>	Etanol 100°	5´	
<b>6</b>	Etanol 96°	5´	
<b>7</b>	Etanol 96°	5´	
<b>8</b>	Etanol 70°	5´	
<b>9</b>	Etanol 70°	5´	<b>LAVADO</b>
<b>10</b>	H <sub>2</sub> O corriente	10´´	
<b>11</b>	Hematoxilina Harris	7´	<b>TINCIÓN NUCLEAR</b>
<b>12</b>	H <sub>2</sub> O corriente	10´´	<b>LAVADO</b>
<b>13</b>	Alcohol ácido	5´´	<b>ACENTUAR EL CONTRASTE DEL COLORANTE</b>
<b>14</b>	H <sub>2</sub> O corriente	10´´	<b>LAVADO</b>
<b>15</b>	Eosina	3´	<b>TINCIÓN CITOPASMÁTICA</b>
<b>16</b>	H <sub>2</sub> O corriente	10´´	<b>LAVADO</b>
<b>17</b>	Etanol 70°	2´	<b>DESHIDRATAR</b>
<b>18</b>	Etanol 96°	2´	
<b>19</b>	Etanol 96°	2´	
<b>20</b>	Etanol 100°	2´	
<b>21</b>	Xilol	1´	<b>ACLARAR</b>
<b>22</b>	Xilol	1´	
<b>23</b>	Montaje con Eukitt		Montar cada uno de los portaobjetos, para su posterior observación al microscopio

´= minutos ´´=segundos

### **ANEXO III. PROTOCOLO TINCIÓN INMUNOFLUORESCENCIA**

1. Desparafinar e hidratar las muestras tal y como se muestra a continuación:
  - Xileno. Tres pases durante 10 minutos cada uno.
  - Alcohol 100%. Dos pases durante 5 minutos cada uno.
  - Alcohol 96%. Dos pases durante 5 minutos cada uno.
  - Alcohol 70%. Dos pases durante 5 minutos cada uno.
2. Lavar en Buffer de Fosfato Salino (PBS) 10mM durante 5 minutos.
3. Secar bien los restos de PBS alrededor de las muestras mediante aspiración. Trazar una circunferencia alrededor de cada una de las muestras colocadas en el portaobjetos con ayuda de un lápiz grueso.
4. Permeabilizar las muestras con solución A que contiene PBS 10mM, Tritón x100 al 0.01% y suero normal de cabra (NGS) al 0.02%, prestando atención para que la solución no rebose de la marca de lápiz grueso y que cubra todas las muestras. Dejar reposar con la solución durante 15 minutos.
5. Secar bien los restos de la solución A mediante aspiración, intentando no tocar las muestras.
6. Añadir el anticuerpo primario, en este estudio en concreto anticuerpos anti-receptores de TNF- $\alpha$ , interleucinas IL-1 e IL-6 (*mouse anti-*) y CD68 (*rabbit anti-*), todos ellos a una dilución 1:500 en solución A. Posteriormente, las muestras se introducen en una caja opaca en ambiente húmedo que incluye papel de filtro y esterilla, para que las muestras histológicas no se sequen. Las muestras se dejan incubando en la caja toda la noche a 4°C.
7. Al día siguiente, secar bien los restos de la solución A junto con el anticuerpo.
8. Lavar con PBS durante 5 minutos dos veces.
9. Secar bien los restos de PBS alrededor de las muestras mediante aspiración.
10. Añadir el anticuerpo secundario, *goat-antimouse FITC* para TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL6 y *goat-antirabbit Alexa 594* para CD68. Todos ellos diluidos a 1:500 en solución B que contiene PBS, NGS al 0.02% y el marcador nuclear DAPI diluido a 1:1000. Incubar durante dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad.
11. Lavar con PBS durante 5 minutos dos veces.
12. Lavar con agua destilada.
13. Montar el portaobjetos con Vectashield.
14. Las muestras estarían listas para su observación al microscopio.