



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL:

**Dieta hipercalórica e hipoxia intermitente crónica como
modelos de obesidad y apnea obstructiva del sueño.
Significado de la leptina en el control respiratorio**

Presentada por Elena Olea Fraile para optar al grado de
doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dra. Ana Obeso Cáceres
Dra. Sara Yubero Benito

	Página
Abreviaturas	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1.1 Obesidad	7
1.1.1 Aspectos antropológicos y sociológicos de la obesidad	7
1.1.2 Obesidad y síndrome metabólico. Epidemia del siglo XXI	12
1.1.2.1 Epidemiología de la obesidad	12
1.1.2.2 Fisiopatología de la obesidad	14
1.1.2.3 Tipos de obesidad	16
1.1.2.4 Síndrome metabólico	19
1.1.2.4.1 Definición del síndrome metabólico	19
1.1.2.4.2 Fisiopatología del síndrome metabólico	21
1.2 La Apnea obstructiva del sueño	26
1.2.1 Fisiología del control respiratorio	27
1.2.1.1 El control respiratorio durante el sueño	31
1.2.2 Definición y clasificación de la apnea obstructiva del sueño	33
1.2.3 Especies reactivas de oxígeno	36
1.2.4 Diagnóstico y tratamiento de la apnea obstructiva del sueño	40
1.3 Modelos experimentales: obesidad y apnea obstructiva del sueño	41
1.3.1 Modelos animales de obesidad	41
1.3.2 Modelos animales de apnea obstructiva del sueño	44
1.4 Apnea obstructiva del sueño y obesidad	45
1.5 La leptina	45
1.5.1 Resistencia a la leptina	48
1.6 El cuerpo carotídeo	49
1.6.1 Localización y estructura del cuerpo carotídeo	49
1.6.2 Quimiorrecepción en el cuerpo carotídeo	52
1.6.2.1 Transducción a la hipoxia en el cuerpo carotídeo	54
1.7 El cuerpo carotídeo y la leptina	58
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO GENERAL	61
3. CAPÍTULO 1	65
3.1 Introducción	65
3.2 Hipótesis de trabajo	67
3.3 Objetivos específicos	68
3.4 Materiales y métodos	68
3.4.1 Modelo animal	68
3.4.1.1 Animales y diseño experimental	68
3.4.1.2 Hipoxia intermitente crónica	71
3.4.2 Parámetros generales	72
3.4.3 Parámetros respiratorios. Pletismografía	73

3.4.4	Parámetros relacionados con la actividad simpática	74
3.4.4.1	Presión arterial sistémica y frecuencia cardíaca	74
3.4.4.2	Catecolaminas en plasma	75
3.4.4.3	Contenido y síntesis de catecolaminas en arteria renal	76
3.4.5	Medida de proteínas: Método Bradford	77
3.4.6	Estrés oxidativo	77
3.4.6.1	Superóxido dismutasa. Western Blot	78
3.4.6.2	Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa	79
3.4.6.3	Niveles de peróxidos lipídicos en hígado	81
3.4.6.4	Medida de la actividad aconitasa y fumarasa en hígado	82
3.4.6.5	Niveles de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina en plasma	83
3.4.7	Activación del Factor Nuclear Kappa B en el hígado	84
3.4.8	Proteína C reactiva	85
3.4.9	Niveles de leptina en plasma	85
3.4.10	Parámetros metabólicos. Metabolismo de lípidos y glúcidos	86
3.4.10.1	Metabolismo de lípidos	86
3.4.10.1.1	Niveles de colesterol y triglicéridos	86
3.4.10.1.2	Contenido total de lípidos en hígado	87
3.4.10.2	Metabolismo de glúcidos	88
3.4.10.2.1	Glucemia basal y test de tolerancia a la glucosa	88
3.4.10.2.2	Niveles de insulina en plasma	88
3.4.10.2.3	Índice HOMA-IR	89
3.4.10.2.4	Consumo de glucosa en músculo esquelético	89
3.4.11	Análisis de datos	90
3.5	Resultados	90
3.5.1	Evolución del peso corporal y acumulación de grasa visceral	90
3.5.2	Parámetros respiratorios	91
3.5.3	Estudio de la actividad simpática	94
3.5.3.1	Presión arterial sistémica y frecuencia cardíaca	94
3.5.3.2	Contenido de catecolaminas en plasma. Contenido y síntesis de catecolaminas y en Arteria Renal	96
3.5.4	Estrés oxidativo: SOD, LPO, Aconitasa/Fumarasa y 8OHdG	98
3.5.5	Activación del Factor Nuclear Kappa B en hígado	101
3.5.6	Proteína C Reactiva	103
3.5.7	Niveles de leptina en plasma	103
3.5.8	Estudio de parámetros metabólicos	104
3.5.8.1	Metabolismo de lípidos	104
3.5.8.2	Metabolismo de la glucosa	105
3.6	Discusión	108
3.6.1	Modelos animales	109

3.6.2	Parámetros ventilatorios	110
3.6.3	Activación simpática y cambios en la presión arterial	111
3.6.4	Estrés oxidativo y marcadores inflamatorios	113
3.6.5	Alteraciones metabólicas	116
4.	CAPÍTULO 2	121
4.1	Introducción	121
4.2	Hipótesis de trabajo	122
4.3	Objetivos específicos	123
4.4	Material y métodos	123
4.4.1	Animales y anestesia	123
4.4.2	Protocolos <i>in vivo</i> . Efecto agudo de la leptina sobre la ventilación	124
4.4.2.1	En animales anestesiados: administración de leptina por vía intravenosa	125
4.4.2.2	En animales anestesiados: administración de leptina por vía subcutánea	127
4.4.2.3	En animales sin anestesiarse. Pletismografía: administración de leptina por vía subcutánea	128
4.4.3	Protocolos <i>in vitro</i> . Efecto agudo y crónico de la leptina sobre el cuerpo carotídeo	129
4.4.3.1	Liberación de ³ H-catecolaminas en el cuerpo carotídeo	129
4.4.3.2	Medida de calcio citosólico en células del cuerpo carotídeo	132
4.4.3.2.1	Disociación y cultivo de las células del cuerpo carotídeo	132
4.4.3.2.2	Sistema de medida de calcio citosólico	133
4.4.3.2.3	Carga de las células con Fura-2-AM	133
4.4.3.2.4	Medida de calcio citosólico	134
4.4.4	Análisis de datos	135
4.5	Resultados	136
4.5.1	Protocolos <i>in vivo</i> . Efecto agudo de la leptina sobre la ventilación	136
4.5.1.1	Parámetros de la ventilación basal en animales controles anestesiados	136
4.5.1.2	Efecto de la leptina administrada por vía intravenosa en ratas anestesiadas	136
4.5.1.3	Efecto de la leptina administrada por vía subcutánea en ratas anestesiadas	138
4.5.1.4	Efecto de la administración de leptina por vía subcutánea en animales sin anestesiarse. Pletismografía	139
4.5.2	Leptina y glucosa en plasma	141
4.5.3	Efecto de la leptina sobre la liberación de ³ H-catecolaminas	142
4.5.4	Efecto de leptina sobre el calcio intracelular en células quimiorreceptoras	145
4.6	Discusión	147
5.	DISCUSIÓN GENERAL	155
5.1	Perspectivas de futuro	159
6.	CONCLUSIONES	163
7.	BIBLIOGRAFÍA	167

ABREVIATURAS

Ach – Acetilcolina
ADN – Ácido desoxirribonucleico
ADP – Adenosina-5-difosfato
AOS – Apnea obstructiva del sueño
AP1 – Activador de la proteína 1
AR – Arteria renal
ATP – Adenosina trifosfato
BSA – Seroalbúmina bovina
CA – Catecolaminas
Ca²⁺ – Calcio
CC – Cuerpo carotídeo
cHDL – Colesterol de las lipoproteínas de alta densidad
CPAP – Presión positiva continua en la vía aérea
CO₂ – Dióxido de carbono
CQ – Células quimiorreceptoras
Cu,Zn-SOD – Enzima superóxido dismutasa citoplasmática
DAP – Dihidroxiacetona fosfato
2DG – 2-desoxi-D-glucosa
DTT – Ditioneitol
E – Epinefrina
EDTA – Ácido etildiaminotetraacético
EPOC – Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERN – Especies reactivas de nitrógeno
ERO – Especies reactivas de oxígeno
ESM – Error estándar de la media
FC – Frecuencia cardíaca
FR – Frecuencia respiratoria
FTO – Gen asociado con la masa grasa y la obesidad
G3P – Glicerol-3-fosfato
GK – Glicerol quinasa
GLUT4 – Transportador de glucosa tipo 4
GPO – Glicerofosfato oxidasa
GPx – Glutación peroxidasa

Abreviaturas

GSH – Glutati3n
GRD – Grupo respiratorio dorsal
GRV – Grupo respiratorio ventral
³H – Tr3t3o
HbO₂ – Oxihemoglobina
³H-CA – Catecolaminas marcadas con tr3t3o
HI – Hipoxia intermitente
HIC – Hipoxia intermitente cr3nica
HDL – Lipoprote3nas de alta densidad
HIF – Factor inducible por hip3xia
HIF1 α – Factor inducible por hip3xia 1 α
4-HNE – 4-hidroxi-alquenos
H₂O₂ – Per3xido de hidrogeno
HO \cdot – Radical hidroxilo
HOMA-IR – Homeostasis model assessment of insulin resistance
HPLC – Cromatograf3a l3quida de alta presi3n
HPLC-ED – Cromatograf3a l3quida de alta resoluci3n-detecci3n electroqu3mica.
HRP – Peroxidasa de r3bano
HTA – Hipertensi3n arterial
IAH – 3ndice de apnea hipopnea
ICC – 3ndice cintura cadera
IL-6 – Interleuquina 6
IMC – 3ndice de masa corporal
i.v. – Intravenoso
K⁺ – Potasio
LCR – L3quido cefalorraqu3deo
LDL – Lipoprote3na de baja densidad
LPL – Lipoproteinlipasa
LPO – Per3xidos lip3dicos
MC4R – Receptor 4 de la melacortina
MDA – Malonaldeh3do
MeOH – Metanol
Mn-SOD – Enzima super3xido dismutasa mitocondrial
Na⁺ – Sodio

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NE – Norepinefrina
NF-kB – Factor Nuclear Kappa B
NOX-2 – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa-2
NREM – Sueño sin movimientos oculares rápidos
NSC – Nervio del seno carotídeo
NTS – Núcleo del tracto solitario
 O_2^- – Radical superóxido
 O_2 – Oxígeno
Ob-R – Receptores de leptina
OCC – Oclusión de las arterias carótidas
8-OHdG - 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina
OMS – Organización mundial de la salud
OSS – ácido 1-octanosulfónico sal sódica
PA – Presión arterial sistémica
 $PaCO_2$ – Presión parcial de dióxido de carbono en sangre arterial
PAI-1 – Activador del plasminógeno 1
 PaO_2 – Presión parcial de oxígeno en sangre arterial
PCA – Ácido perclórico
 PCO_2 – Presión parcial de dióxido de carbono
PCR – Proteína C reactiva
PCSK – Subtilisina convertasa proproteína/kexina
PI3K – Fosfatidilinositol-3-kinasa
 PO_2 – Presión parcial de oxígeno
POMC – Proopiomelanocortina
PPARGC – Receptor activado por proliferadores peroxisomales γ , coactivador
PVDF – Fluoruro de polivinilideno
RBP4 - Proteína transportadora de retinol tipo 4
REM – Sueño con movimientos oculares rápidos
RI – Resistencia a la insulina
SAHS – Síndrome de apnea hipopnea del sueño
SAOS – Síndrome de apnea obstructiva del sueño
SAS – Síndrome de apnea del sueño
 $SatHbO_2$ – Saturación de la oxihemoglobina

Abreviaturas

s.c. – Subcutáneo

SDS – Dodecilsulfato sódico

SEEDO – Sociedad Española para el estudio de la obesidad

SHO – Síndrome de hipoventilación y obesidad

SM – Síndrome metabólico

SNC – Sistema nervioso central

SNS – Sistema nervioso simpático

SOD – Superóxido dismutasa

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

TNF α – Factor de necrosis tumoral- α

TTBS – Buffer Tris salino tamponado y Tween-20

UCPS – Proteínas desacoplantes mitocondriales

VAS – Vías aéreas superiores

VC – Volumen corriente

VLDL – Lipoproteínas de muy baja densidad

VM – Volumen minuto

WST-1 – (2-(4-Yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio

XO – Xantina oxidasa

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 OBESIDAD

1.1.1 Aspectos antropológicos y sociológicos de la obesidad

Hace aproximadamente 3.800 millones de años surgió la vida en nuestro planeta y nuestra especie apareció hace tan sólo 200.000 años. Pertenecemos al orden de los primates, suborden de los antropoides, infraorden de los catarrinos, superfamilia de los hominoides, familia de los homínidos, subfamilia de los homininos, género *homo* y especie *sapiens*. Los seres humanos han cambiado considerablemente con el transcurso del tiempo. Las características más importantes que nos distinguieron del resto de especies fueron la postura bípeda y el mayor tamaño del cerebro, siendo ésta última la que hizo que nuestros antepasados sobrevivieran, y se extendieran por todo el mundo. En el siglo (V a.C.) Hipócrates, médico de la antigua Grecia y reconocido por muchos como el “padre de la medicina” fue el primero que asoció la obesidad y la muerte súbita diciendo que “la muerte súbita es más frecuente en los obesos que en los delgados” ya entonces comenzó a interesarse por la dietética y la forma de ingerir los alimentos, relacionando la alimentación con la salud. Desde entonces han sido muchos filósofos, pintores, médicos de distintos lugares del mundo los que han mostrado interés por la obesidad y lo han dejado patente en sus obras. Los problemas de salud derivados de la obesidad han ido en aumento con el transcurso de los años llegando al siglo XXI a hablar de una epidemia de obesidad según la Organización Mundial de la Salud (OMS). El aumento de la ingesta calórica, el sedentarismo o inactividad física, la genética y el estilo de vida son factores determinantes en la patogenia de la obesidad y el sobrepeso. Para poder abordar este gran problema de salud en nuestra sociedad actual es importante echar la vista atrás y estudiar cómo ha ido evolucionando la alimentación, el estilo de vida y la genética desde nuestros antepasados hasta nuestros días. La dieta de una especie determinada se asocia con su morfología, la tasa metabólica, el comportamiento, el sistema social, y las habilidades cognitivas (Milton 1988; McNab and Brown 2002). En el transcurso de nuestra evolución la dieta ha cambiado mucho al igual que la forma de adquirir los alimentos. En el libro “El mono obeso”, José Enrique Campillo hace una descripción pormenorizada de los cambios que han ido aconteciendo en la alimentación y el estilo de vida desde nuestros antepasados

a nuestros días. Las condiciones climatológicas en las distintas etapas de la evolución fueron determinantes en estos cambios. Nuestros antecesores pasaron de vivir de manera cómoda y sedentaria en zonas cálidas y húmedas de las selvas tropicales de África donde abundaban principalmente las frutas y los vegetales, a vivir bajo condiciones climáticas extremas con escasez de alimentos, teniendo que desplazarse largas distancias para conseguirlos y por lo tanto gastando más energía para poder alimentarse. Ante la dificultad para encontrar alimentos fue cambiando su estilo de vida y su alimentación comenzando a comer tejidos animales (Shipman and Walker 1989; Foley 2001), lo que requería de esfuerzo y gasto energético para obtenerlos. Para ello desarrollaron herramientas adecuadas para la caza comenzando así a trabajar la piedra. Fue cambiando poco a poco el aparato digestivo para adaptarse a la nueva alimentación, principalmente los dientes que tenían que adecuarse a cortar y a desgarrar, y también el tracto digestivo cambiando las digestiones de hojas y vegetales por las de tejidos animales. La llegada del neolítico hace aproximadamente unos 10.000 años trajo consigo una nueva etapa para nuestros ancestros (Campillo 2007). Surgió la agricultura, mediante la observación del crecimiento de las plantas, aprendieron a plantar semillas, y a cultivar (trigo, cebada, arroz, maíz...). También tuvo origen la ganadería por medio de la observación de las costumbres de los animales, empezaron a criarlos y a domesticarlos. Con el inicio de la agricultura y la ganadería el ser humano pasó de ser depredador a producir sus propios alimentos, regresando así la dieta en abundancia, una dieta omnívora muy distinta a la de nuestros antepasados de las selvas tropicales. De nuevo el estilo de vida había cambiado volviendo al sedentarismo, asentándose en lugares fijos y estables.

Con la llegada de la revolución industrial a finales del siglo XVIII, la dieta siguió cambiando, los alimentos cada vez eran más abundantes y con el paso de los años los presentaban más apetecibles y fáciles de conservar. La forma de cultivar la tierra y de criar los animales para el consumo pasó a tener como principal objetivo el mejor rendimiento económico, tratando de abaratar el producto y mejorar la eficiencia con el uso de la tecnología. Así fuimos pasando de una sociedad de cazadores y recolectores que se preocupaba por sobrevivir, a una sociedad de consumo donde el exceso de la ingesta de alimentos junto con el cambio en el estilo de vida (sedentarismo) se relaciona

con enfermedades crónicas que muestran altos índices de morbi-mortalidad (enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y diversos tipos de cáncer).

Ha habido muchos cambios en el área de la nutrición y de la medicina en los últimos años. Antes de la segunda guerra mundial, la importancia de la nutrición estaba centrada en promover el normal crecimiento de los niños mediante un adecuado aporte energético, de vitaminas y proteínas (Serrano-Ríos et al. 2011). Tras la segunda guerra mundial la preocupación en el área de la medicina se centró en el desarrollo de las enfermedades cardíacas coronarias, diversos estudios comenzaron a relacionar el tabaco, la hipertensión arterial, los niveles altos de colesterol y la dieta con estas enfermedades (Keys et al. 1986). Nuestra sociedad ha pasado de preocuparse por paliar el problema de la malnutrición a intentar frenar el gran problema de salud que presenta el sobrepeso y la obesidad.

Daniel E. Lieberman explica con gran elocuencia este aspecto en su libro la historia del cuerpo humano: *“Esta sobreabundancia puede ser un problema porque ingerir más calorías de las que se gastan durante largos periodos de tiempo hace que el cuerpo almacene más grasa. Pero la cuestión es mucho más compleja porque buena parte de esta comida está muy procesada y contiene grandes cantidades de azúcar y grasa, y poca fibra.”* La falta de fibra hace que las calorías se absorban más rápido de lo que el hígado y el páncreas pueden hacer frente y por lo tanto este exceso se envía a la grasa visceral *“Un poco de grasa visceral no es ningún problema, pero por desgracia, en exceso provoca una serie de síntomas que se conocen colectivamente como síndrome metabólico.”* (Lieberman 2013).

En la actualidad el comer fuera de casa de manera habitual, el aumento de la ingesta de bebidas azucaradas y de alimentos procesados junto con el bajo gasto energético parece estar estrechamente relacionados con el aumento de peso. Además el Instituto médico Europeo de la Obesidad cita la existencia de componentes de alimentos comunes cada vez más utilizados en la industria alimentaria que pueden ser negativos para la salud, como la harina blanca refinada, aceites hidrogenados, organismos genéticamente modificados, carnes procesadas y azúcares refinados.

En cuanto a la genética, James V. Neel en 1962 formuló por primera vez la hipótesis del “genotipo ahorrador” planteando que el ser humano posee genes que hacen muy eficiente al organismo para la utilización de la energía, permitiendo almacenar grandes cantidades de energía en forma de grasa, que podían ser utilizadas en las épocas en las que escaseaban los alimentos. A esta característica metabólica se la denominó genotipo ahorrador. Este genotipo, conforme al tipo de vida de nuestros antepasados, con condiciones de vida de escasez de alimentos y elevado gasto energético, parece que no ha cambiado prácticamente en siglos, sin embargo sí que lo ha hecho nuestro estilo de vida y nuestras características en cuanto a la alimentación y la actividad física, hemos pasado de pasar hambre a tener comida en abundancia, de recorrer kilómetros para conseguir comida a andar unos pocos metros y estos cambios están derivando en serios problemas para la salud. Este exceso de grasa, la inactividad física junto con la genética heredada de nuestros ancestros son factores determinantes relacionados estrechamente con la actual “epidemia de la Obesidad del siglo XXI”. Sin embargo en el área de la genética parece que los últimos estudios se centran en determinar la susceptibilidad genética que puede definir el mayor o menor riesgo de padecer obesidad. Se sabe que existen defectos en genes implicados en la obesidad humana que afectan a la ingesta de los alimentos: MC4R (receptor 4 de la melancortina), POMC (proopiomelanocortina), PCSK (Subtilisina convertasa proproteína/kexina), leptina, receptor de leptina y otros en cambio que afectan al gasto energético: PPAR γ (receptor activado por proliferadores peroxisomales γ , coactivador) y UCPS (proteínas desacoplantes mitocondriales) (Mataix Verdú 2009).

Recientemente han aparecido trabajos en los que se relacionan alteraciones genéticas con la obesidad poligénica, más concretamente en el año 2007 se publicó el primer trabajo que muestra una fuerte asociación entre modificaciones en el gen FTO “fat mass and obesity associated” y la obesidad poligénica en humanos (Dina et al. 2007). Estas modificaciones en el gen FTO son susceptibles de producir diabetes tipo 2, afectando al índice de masa corporal (IMC). En el año 2014, investigadores españoles en colaboración con otros centros de Chicago y Toronto descubrieron que el verdadero protagonista relacionado con la obesidad es el gen IRX3, el cual es activado por variantes

del gen FTO cuya activación es la responsable de la obesidad (Smemo et al. 2014). En torno al 16% de la población europea podría tener mayor riesgo de sufrir obesidad debido a esta mutación del gen FTO, según un estudio que analizó 40.000 personas (Frayling et al. 2007). Estos trabajos dan un paso más en el estudio de la obesidad, sin embargo no hay que olvidar las interacciones con los factores ambientales (alimentación y actividad física) que se superponen a esta base genética. La Dra. Dolores Corella, de la Universidad de Valencia nos explica al respecto la importancia de la nutrigenómica para investigar las interacciones entre la dieta, la genética y la obesidad subrayando que la relación entre la genética y la obesidad no es determinista, sino que está modulada por la dieta (Corella 2011).

También recientemente encontramos en la bibliografía trabajos sobre la epigenética y la obesidad, que estudian alteraciones en la metilación del ADN, con el fin de encontrar biomarcadores para la detección de la obesidad a edades muy tempranas pudiendo predecir el riesgo que tiene una persona de sufrir obesidad antes de que se desarrolle el fenotipo. Estas investigaciones abrirían la posibilidad de realizar estrategias de prevención precisas y cambios en el estilo de vida antes de que se desarrolle la obesidad (Huang et al. 2015; van Dijk et al. 2015).

Son muchas las referencias que se han hecho a lo largo de los años sobre el sobrepeso y la obesidad, remontándonos a la sabiduría popular encontramos el refrán que dice: “desayunar como reyes, comer como príncipes y cenar como mendigos”, una buena recomendación para conseguir una dieta saludable y evitar futuros problemas de salud que está aún de actualidad. De hecho el profesor Pereira, de la Universidad de Harvard, ha presentado recientemente un trabajo sobre la frecuencia y la calidad del desayuno, concluyendo que el desayuno puede ser la comida más importante del día, ya que tiene efectos beneficiosos sobre el control del apetito, y disminuye el riesgo de obesidad y de diabetes tipo 2 (Pereira et al. 2011). También la doctora Garaulet, catedrática de Fisiología de la Universidad de Murcia, nos comenta la importancia de cambiar los hábitos en nuestra alimentación recomendando realizar el desayuno más fuerte y adelantando las horas de las comidas (antes de las 15.00h) y de las cenas (antes de 2h y media de acostarse), para evitar que la tolerancia a la glucosa disminuya, afectando a nuestro metabolismo y

pudiendo producir futuros problemas de obesidad e incluso de diabetes (Bandín et al. 2015).

Lo que queda patente es que a pesar de la diversidad de opiniones o teorías, actualmente la obesidad y el sobrepeso son temas que preocupan mucho a la sociedad y que están en pleno auge de investigación con el objetivo común de encontrar soluciones a esta gran epidemia del Siglo XXI.

1.1.2 Obesidad y síndrome metabólico. Epidemia del siglo XXI

1.1.2.1 Epidemiología de la obesidad

Mediante una relación entre el peso y la talla de las personas podemos definir el Índice de Masa Corporal, $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura (m}^2\text{)}$ (Keys et al. 1972; Gallagher et al. 2000). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) un IMC igual o superior a 25 determina sobrepeso y un IMC igual o superior a 30 determina obesidad.

En el año 2014, la OMS advertía que más de 1.900 millones de personas adultas en el mundo tenían sobrepeso y de ellas al menos 600 millones de personas presentaban obesidad (aproximadamente un 39% de personas adultas sufren sobrepeso y un 13% padecen obesidad). Cada año, casi 3 millones de personas mueren por causas relacionadas con el sobrepeso, víctimas de las múltiples complicaciones que pueden acompañar a la obesidad como son enfermedades cardíacas, derrames cerebrales, apneas del sueño y diabetes entre otras (Stetka 2015). En Europa en torno al 20% de los hombres y un 23% de las mujeres son obesos según la OMS, y concretamente en España, el estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular (ENRICA) realizado durante los años 2008-2011 en una muestra de 12.000 personas ≥ 18 años la prevalencia de obesidad fue del 22.9% (24.4% en hombres y 21.4% en mujeres) (Gutiérrez-Fisac et al. 2012).

En cuanto a los niños, datos del 2013 hablan de 42 millones de niños menores de 5 años con problemas de sobrepeso. La obesidad infantil está considerada como la enfermedad crónica más prevalente en el mundo occidental entre niños y adolescentes (Martos-Moreno et al. 2009) y los pediatras comienzan a hablar cada vez con más frecuencia del síndrome metabólico en estas edades (Argente 2011). Con estos datos entendemos porqué la OMS ha definido la obesidad como la 'epidemia del siglo XXI'.

Centrándonos en nuestro país, encontramos datos sobre la prevalencia de la obesidad, clasificados por sexo y por edades. Observamos que desde los 18 hasta los 44 años de edad los hombres presentan un porcentaje más elevado de prevalencia de la obesidad respecto a las mujeres de la misma edad, sin embargo a partir de los 45 años, esta diferencia empieza a disminuir, siendo mayor en mujeres que en hombres a partir de los 65 años (Figura 1B). La prevalencia de sobrepeso se mantiene durante todas las edades más aumentada en hombres que en mujeres (Figura 1A) (Gutiérrez-Fisac et al. 2012).

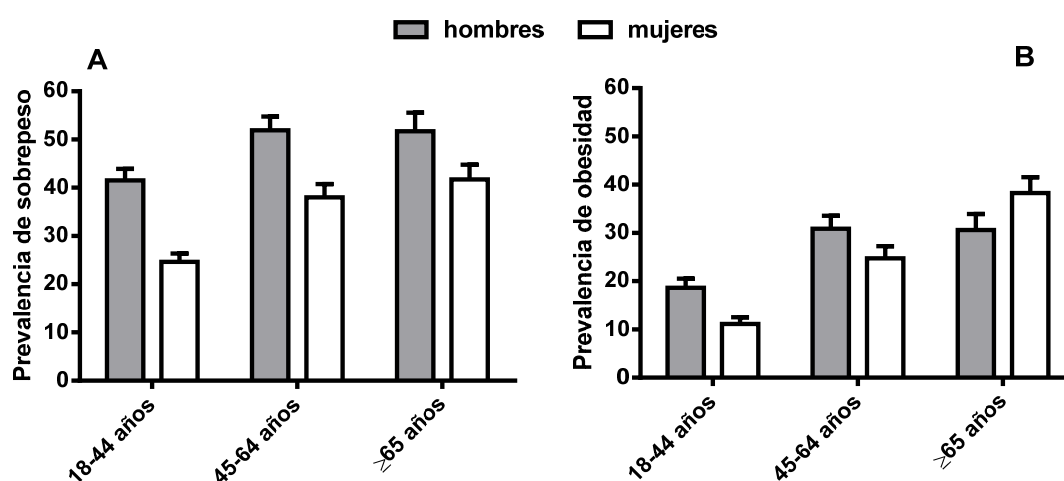


FIGURA 1: Prevalencia del sobrepeso (A) y de la obesidad (B) en España por grupos de edad y sexo (Gutiérrez-Fisac et al. 2012).

La prevalencia de la obesidad en España varía mucho de unas comunidades a otras, en la Figura 2 mostramos las proporciones de obesidad por regiones en hombres y mujeres adultos, observando que la prevalencia de la obesidad es mayor por lo general en las comunidades del sur de España y en Canarias (Gutiérrez-Fisac et al. 2012).

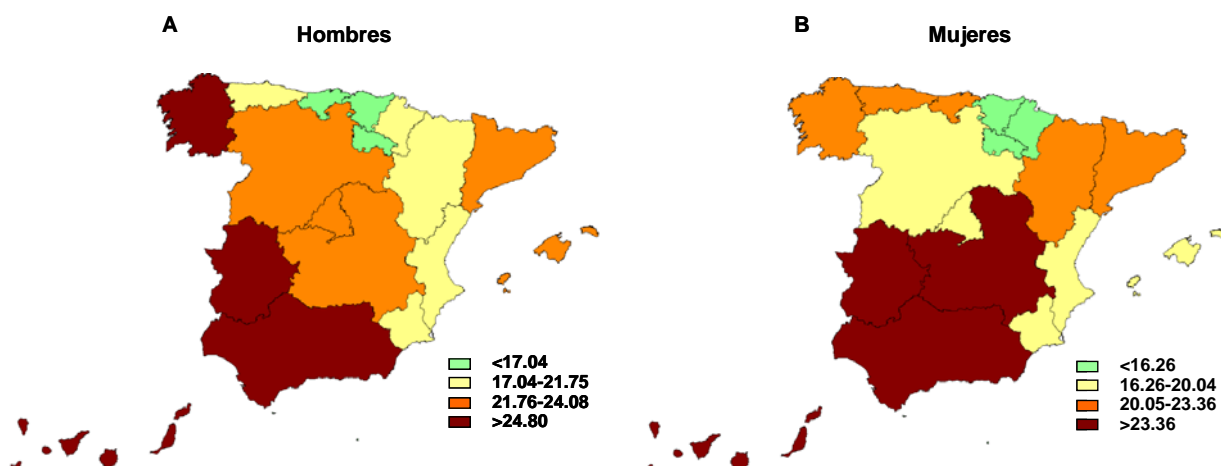


FIGURA 2: Distribución de la prevalencia de obesidad en España (IMC ≥ 30 kg/m²) por regiones y por sexos (A. Hombres y B. Mujeres). (Gutiérrez-Fisac et al. 2012)

Comparándonos con el resto de países a nivel mundial, encontramos que la prevalencia de la obesidad en personas adultas en España se sitúa en un punto intermedio entre países del norte de Europa, con los datos más bajos de obesidad, y los países del este de Europa y EE.UU. que presentan las tasas más elevadas. Sin embargo, en la obesidad infantil la prevalencia de sobrepeso y obesidad en nuestro país, al igual que los países mediterráneos, es de las más altas dentro de los países de Europa estando a la altura de países como EE.UU y el Reino Unido, siendo los países del norte de Europa los que presentan menos tasa de obesidad infantil (Aranceta et al. 2005).

1.1.2.2 Fisiopatología de la obesidad

Las causas de la obesidad pueden ser muy diversas pudiendo estar relacionadas con la genética, factores ambientales, cambios en el estilo de vida (ingesta alimentaria y actividad física) y cambios en la calidad de las dietas. Teniendo en cuenta la ley de la termodinámica que dice que la energía no se crea ni se destruye sólo se transforma, en el contexto de la alimentación podemos decir que la energía que se ingiere es igual a la energía que se gasta más la energía que se almacena, por lo tanto cuando la ingesta es mayor al gasto nos encontraremos ante problemas de sobrepeso y obesidad. La sobrealimentación produce un exceso de grasa en el organismo que se va a depositar en los adipocitos aumentando su tamaño para poder almacenar el

exceso de grasa. Hay evidencias de que el tejido adiposo visceral representa un depósito patológico de grasa que se acumula cuando los depósitos subcutáneos resultan sobrepasados o no están disponibles para el almacenamiento. Se ha visto que este tejido adiposo visceral segrega más citoquinas inflamatorias (como la interleuquina 6 y el factor de necrosis tumoral α) que el tejido subcutáneo pudiendo participar en reacciones inflamatorias crónicas ligadas a eventos cardiovasculares (Chandra et al. 2014). El balance entre la entrada y la salida de energía se conoce con el nombre de homeostasis calórica o energética y en este equilibrio encontramos señales a corto plazo que son activas durante la comida y señales a largo plazo que informan del estado energético global del cuerpo y de determinados aspectos metabólicos. Estas señales se originan en el tracto gastrointestinal y van a actuar sobre el cerebro principalmente en el núcleo arcuato del hipotálamo. Entre las señales a corto plazo destacan los péptidos gastrointestinales (Colecistoquinina, péptido similar al glucagón tipo 1, péptido similar al glucagón tipo 2, amilina, somatostatina, bombesina, enterostatina apolipoproteína A-IV, péptido inhibidor gástrico y la grelina) que regulan la ingesta de los alimentos, y que son principalmente señales que suprimen el apetito salvo la secreción de grelina que es una señal que aumenta el apetito. Las señales a largo plazo que controlan la homeostasis energética son controladas por la leptina segregada por el tejido adiposo, la insulina segregada por las células β del páncreas y otras adipoquinas. La leptina informa sobre las grasas almacenadas en el tejido adiposo en forma de triacilgliceroles, de tal forma que cuanto más grasa hay en el organismo, más leptina se segrega. Se ha demostrado que las dietas ricas en grasas pueden atenuar el efecto central de la leptina y la insulina sobre la ingesta de alimentos y la homeostasis energética debido a una alteración en la interacción entre el tejido adiposo y el sistema nervioso central (SNC) (Figlewicz and Benoit 2009).

Por otro lado es importante hablar de la calidad de la dieta, José Enrique Campillo en su libro “El mono obeso” explica que durante 6 millones de años de evolución la cantidad de los hidratos de carbono que formaban parte de la dieta cambiaba de unos años a otros, sin embargo a partir de la revolución industrial en el siglo XVII fue la calidad de los hidratos de carbono la que comenzó a cambiar. Hasta ese momento predominaban los hidratos de carbono de

absorción lenta y a partir de entonces surgieron los hidratos de carbono de absorción rápida, de elevado índice glucémico, tales como los azúcares refinados y los cereales modificados, a los que se les retiraba el salvado y las partes de fibra difíciles de digerir para mejorar su digestión. Principalmente fue este cambio en la calidad de los hidratos de carbono, junto con la llegada de los alimentos ricos en grasas saturadas y el aumento del sedentarismo lo que hizo que comenzaran a aparecer los problemas de obesidad y sobrepeso. También el mantenimiento del genotipo ahorrador, que hasta ese momento había sido tan efectivo para la supervivencia de nuestros ancestros, hace que la insulinoresistencia no sea tan buena aliada como lo fue en las épocas de hambruna convirtiéndose en un posible desencadenante del síndrome metabólico (SM) (Campillo 2007).

Por lo tanto, una dieta abundante y una vida sedentaria son factores ambientales que favorecen los problemas de sobrepeso y obesidad. Dentro de estos factores ambientales es importante destacar los malos hábitos en la alimentación que pueden adquirirse durante la niñez; el aumento de alimentos muy apetecibles producidos por la industria alimentaria, donde predominan los azúcares refinados y las grasas que otorgan una gran densidad energética a estos alimentos convirtiéndose en alimentos con gran proporción de calorías y poca cantidad de nutrientes; las dietas ricas en alimentos con elevado índice glucémico producen un aumento de la glucemia y de la insulina produciendo una disminución de la oxidación de las grasas y estas grasas que no se oxidan se almacenan en el organismo

1.1.2.3 Tipos de obesidad

La obesidad se puede definir como una enfermedad crónica multifactorial que consiste en un exceso de peso por una acumulación de grasa excesiva, desencadenada por un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético, que genera un desbalance positivo de energía, y que puede ser perjudicial para la salud.

Podemos clasificar la obesidad en función del IMC, de la distribución de la grasa corporal y de la etiología:

- Según el IMC podemos observar la siguiente clasificación del peso corporal en esta tabla:

	IMC (kg/m²)
Peso insuficiente	< 18.5
Normopeso	18.5-24.9
Sobrepeso de grado I	25-26.9
Sobrepeso de grado II (preobesidad)	27-29.9
<u>Obesidad de tipo I</u>	30-34.9
<u>Obesidad de tipo II</u>	35-39.9
<u>Obesidad de tipo III (mórbida)</u>	40-49.9
<u>Obesidad de tipo IV (extrema)</u>	>50

TABLA 1: Clasificación de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO, 2000) del peso corporal según el IMC (Tomada de (Cortijo and Blanco 2014))

- Según la distribución de la grasa corporal, la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO 2007) clasifica tres tipos de obesidad. Para ello tiene en cuenta los siguientes parámetros: el perímetro de la cintura o circunferencia abdominal y el índice cintura-cadera (ICC) que es la relación entre el perímetro de la cintura y el perímetro de la cadera. Estos perímetros también son buenos indicadores del riesgo de sufrir alteraciones metabólicas siendo los valores en España del ICC > 1 en el hombre y > 0.90 en mujeres ICC.

Obesidad abdominal, central o superior (androide), llamada así porque es mucho más frecuente en varones. También se conoce como “tipo manzana” donde la grasa se acumula principalmente en la región cervical, tronco y abdomen superior, y está compuesta por grasa subcutánea y perivisceral. Esta obesidad se asocia a un mayor riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas y cardiovasculares.

Obesidad periférica (ginoide) es más frecuente en las mujeres, también conocida como “tipo pera”. Este tipo de obesidad se caracteriza porque el exceso de grasa subcutánea se deposita principalmente en la zona glúteo-femoral, es decir en las caderas, glúteos y muslos, siendo menor la grasa que

se acumula alrededor de las vísceras. Esta obesidad se asocia con trastornos venosos periféricos (varices).

Obesidad de distribución homogénea, existe un exceso de grasa corporal distribuido de forma generalizada por todo el organismo.

- Según la etiología de la obesidad, podemos clasificarla: en obesidad común, que se considera una enfermedad poligénica, multifactorial sobre la que actúan factores genéticos y ambientales; la obesidad monogénica, sobre la que actúan solamente las mutaciones genéticas; y la obesidad secundaria, consecuencia de otras enfermedades independientemente de la genética y los factores ambientales.

La obesidad común o poligénica es el tipo de obesidad más frecuente, por un lado actúa el estilo de vida, hábitos alimenticios y actividad física, y por otro lado la genética también juega un papel importante, debido a que no todas las personas que están expuestas al mismo estilo de vida desarrollan obesidad. Existe una asociación entre la obesidad de los niños y el IMC que presentan sus padres (Svensson et al. 2011) por lo tanto parece que los estímulos ambientales actúan sobre la genética de cada individuo y es ésta la que hace al individuo más o menos susceptible de desarrollar obesidad. Los genes relacionados con este tipo de obesidad tienen una función importante en el control del peso a nivel del hipotálamo (Martos-Moreno et al. 2014)

La obesidad monogénica se caracteriza por presentar mutaciones en un único gen. Este tipo de obesidad se caracteriza porque los niños nacen con un peso normal pero rápidamente muestran una ganancia excesiva de peso, presentan intensa hiperfagia acompañada de comportamiento agresivo cuando se les niega la comida. Podemos diferenciar 3 grupos dentro de este tipo de obesidad (Martos-Moreno et al. 2014):

1. Alteraciones en los genes relacionados con el sistema de la leptina melanocortina a través de su influencia en la ingesta de nutrientes, acumulación de grasa y gasto energético. Dentro de este grupo la alteración más frecuente es la que presenta mutación en el gen MC4R (receptor 4 de melanocortina). Otras alteraciones, como las mutaciones en el gen de la leptina *ob*, son poco frecuentes y responden muy bien al tratamiento con leptina (Farooqi and O'Rahilly 2014).

2. Alteraciones en los genes implicados en el desarrollo hipotalámico.
3. Obesidad asociada a síndromes polimalformativos en los que la causa del aumento de la grasa corporal puede ser debida a factores ambientales y al tratamiento farmacológico o a alteraciones hipotalámicas que desencadenan hiperfagia y por lo tanto obesidad.

Este tipo de obesidad, en la que los genes serían los responsables directos de su etiología en los primeros meses de vida, se observa en un porcentaje de entre el 0.5-5% de los casos de obesidad mórbida, con un IMC superior a 35kg/m². Por lo tanto, la herencia propiamente genética tiene una escasa influencia en la epidemia de la obesidad (Mardones 2014)

La obesidad secundaria a otras enfermedades, principalmente se debe a enfermedades endocrinas y a causas yatrogénicas de obesidad. Entre las enfermedades endocrinas que predisponen a la obesidad encontramos el hipotiroidismo, hipercortisolismo, hiperinsulinismo neonatal, deficiencia de la hormona del crecimiento y la obesidad hipotalámica debida a afectaciones en el área hipotálamo-hipofisaria (Martos-Moreno et al. 2014).

Recientemente se han llevado a cabo estudios genéticos en la obesidad monogénica y poligénica, identificando nuevos genes en humanos y en ratones que han permitido crear nuevos modelos animales con el objetivo de comprender mejor la etiología de la obesidad (Yazdi et al. 2015).

1.1.2.4 Síndrome metabólico

1.1.2.4.1 Definición del síndrome metabólico

La Real Academia Española define síndrome como el conjunto de síntomas característicos de una enfermedad o un estado determinado. Han sido muchos los autores que desde principios del siglo XX han definido el síndrome metabólico (SM) haciendo diferentes asociaciones entre la obesidad, enfermedades cardiovasculares y anormalidades metabólicas. En 1988 el profesor Reaven describió una agrupación de factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular y la diabetes tipo 2 que denominó “síndrome X”, y que más tarde fue llamado “síndrome de resistencia a la insulina” y hoy conocemos como “síndrome metabólico” (Reaven 1988).

El SM se define como una constelación de factores fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos, que se encuentran interconectados, y que directamente incrementan el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (Kaur 2014).

Para su diagnóstico las bases son las siguientes:

En 1998, la Organización Mundial de la Salud consideró que una persona con diabetes presenta SM si cumple 2 o más de los criterios siguientes (Alberti and Zimmet 1998):

- Hipertensión arterial (HTA) > 160/90 mmHg.
- Dislipemia (triglicéridos > 150 mg/dl; colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad [cHDL] < 35 mg/dl).
- Obesidad (índice de masa corporal [IMC] > 30).
- Cociente cintura-cadera > 0,9 en varones y > 0,85 en mujeres.
- Microalbuminuria.

En mayo de 2001, se publicó la actualización de las guías clínicas para el diagnóstico y tratamiento de las dislipemias elaboradas por el National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP-III) que establece el diagnóstico de SM cuando hay tres o más de los siguientes hallazgos (Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults 2001) :

- Obesidad abdominal (circunferencia de cintura > 102 cm en varones y > 88 cm en mujeres).
- Hipertrigliceridemia (> 150 mg/dl).
- cHDL bajo (< 40 mg/dl en varones; < 50 mg/dl en mujeres).
- HTA (> 130/85 mmHg).
- Glucemia en ayunas elevada (> 110 mg/dl).

En el año 2005, la Federación Internacional de la Diabetes (IDF) define el SM como obesidad central (circunferencia de la cintura >94 cm en hombres y > 80 cm en mujeres) más otros dos de los siguientes factores:

- Glucosa plasmática >100 mg/dl
- Presión arterial: sistólica \geq 130 mmHg; diastólica \geq 85mmHg
- Triglicéridos > 150 mg/dl
- Colesterol HDL bajo (< 40 mg/dl en hombres y < 50 mg/dl en mujeres)

Basándonos en esta última definición, el 20–25% de la población mundial presenta SM. Las personas con síndrome metabólico tienen el doble de riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y cinco veces más riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Kennedy et al. 2010).

1.1.2.4.2 Fisiopatología del síndrome metabólico

La insulina segregada por las células β pancreáticas provoca la retirada de la glucosa de la sangre y estimula la síntesis de glucógeno y de lípidos. El glucagón es segregado por las células α del páncreas y tiene efectos opuestos a la insulina ya que aumenta la glucosa en sangre al estimular la ruptura del glucógeno y la gluconeogénesis (Figura 3).

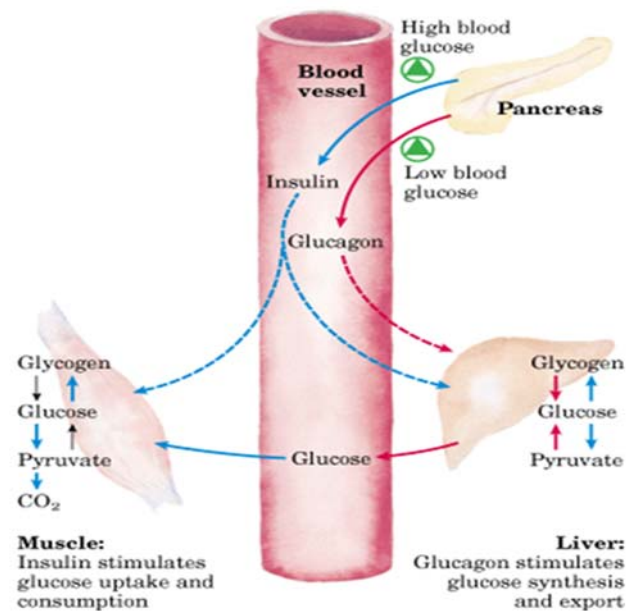


FIGURA 3: Esquema del funcionamiento de la insulina y del glucagón segregado por las células β y α del páncreas respectivamente (Nelson and Cox 2013)

Cuando existe una disregulación del peso corporal y aparece la obesidad, se produce un exceso de energía que se almacena en forma de triacilglicéridos y desencadena una hiperplasia e hipertrofia del tejido adiposo que va a producir alteración en el metabolismo de los ácidos grasos y en la liberación de adipoquinas, ambas alteraciones van a participar en el desarrollo del SM (Figura 4). Cuando la grasa excede la capacidad de almacenaje del tejido adiposo comienza a acumularse en otros tejidos principalmente en el

hígado y en el músculo (Figura 5) favoreciendo la aparición de la resistencia a la insulina que puede conllevar al SM.

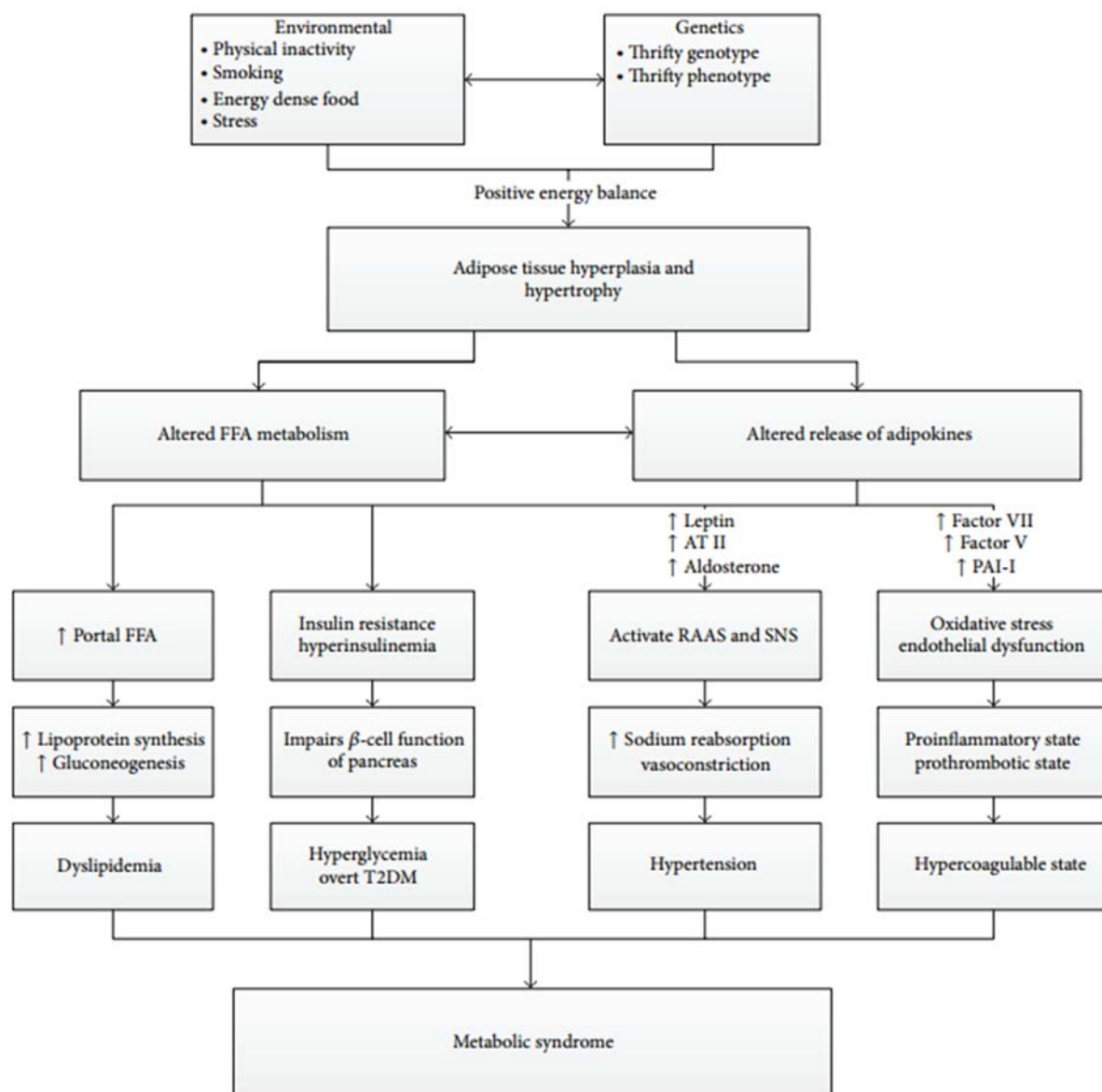


FIGURA 4: Esquema de la fisiopatología del Síndrome Metabólico (FFA: free fatty acid, ATII: angiotensin II, PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1, RAAS: renin angiotensin aldosterone system, SNS: sympathetic nervous system.) Tomada de (Kaur 2014).

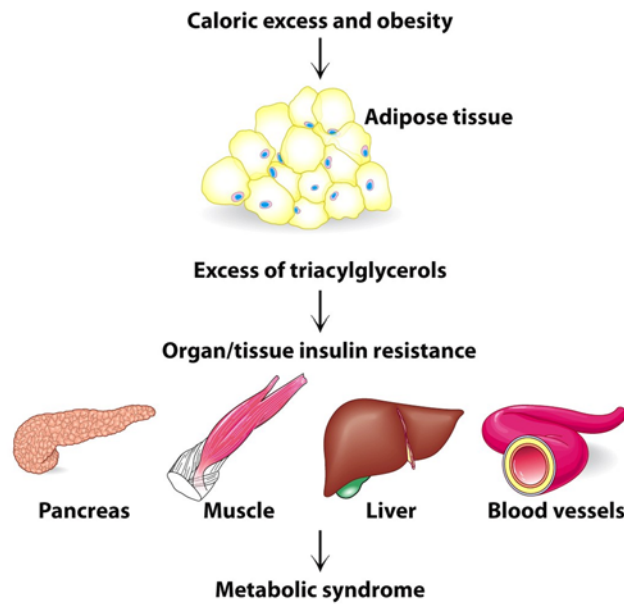


FIGURA 5: Exceso calórico que supera la capacidad de los adipocitos acumulándose la grasa en otros tejidos afectando a su funcionamiento bioquímico y pudiendo originar síndrome metabólico. (Figura tomada del libro Biochemistry, Seventh Edition 2011 W.H. Freeman and Company).

Alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos:

En el músculo esquelético la elevada concentración de grasa aumenta la velocidad de β -oxidación, las mitocondrias no pueden procesar todos los ácidos grasos lo que provoca la reincorporación de los ácidos grasos a triglicéridos y la acumulación de la grasa en el citoplasma. En el citoplasma también aumentan los niveles de diacilglicerol y ceramida, el diacilglicerol es un segundo mensajero que activa la proteína quinasa C que cuando se activa es capaz junto con otras proteínas quinasas Ser/Thr de fosforilar al receptor de insulina reduciendo su capacidad de propagar la señal de la insulina. Por su parte, la ceramida inhibe la captación de la glucosa y la síntesis de glucógeno. Todo ello va a provocar una situación de resistencia a la insulina.

La insulina cuando se une a su receptor activa dos vías de transducción: la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas). Cuando se produce resistencia a la insulina se afecta sólo la vía PI3K-Akt, cuya inhibición provoca una disminución de la producción de óxido nítrico, que desencadena una disfunción endotelial, y la disminución de translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática disminuyendo la entrada de glucosa en el músculo y en

el tejido adiposo. Esta resistencia a la insulina va a producir un fallo de las células β del páncreas, que va a tratar de compensar la ausencia de los efectos de la insulina sintetizando más insulina, lo que va a provocar estrés del retículo endoplásmico y como consecuencia activación de las vías apoptóticas que provocan la destrucción de estas células. La incapacidad de las células β -pancreáticas para compensar el estado de resistencia insulínica conlleva a una hiperglucemia y al desarrollo de diabetes tipo 2 (Petersen and Shulman 2006). En base a esto, y según el Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes (SED): “La resistencia a la insulina (RI) se define como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo” (Consenso del Grupo de Trabajo: Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes 2002).

Por otro lado, cabe hablar de la dislipemia que tiene lugar en el SM caracterizada por un aumento de triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), aumento de los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y disminución de niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL). En condiciones normales, en el metabolismo lipídico se liberan ácidos grasos libres desde los adipocitos a la sangre circulante hacia el hígado y el músculo. En el hígado, una parte es oxidada y la mayoría reesterificada a triglicéridos. La insulina en condiciones normales disminuye la lipólisis en los adipocitos y degrada apoB (lipoproteína VLDL) a través de la vía PI3K, por lo que los pacientes con RI van a presentar un aumento de ácidos grasos libres, de triglicéridos y de lipoproteínas VLDL en el hígado (Lewis and Steiner 1996). Es por tanto que la dislipemia asociada con la RI es una consecuencia directa del aumento de la secreción de la VLDL en el hígado (Ginsberg et al. 2005). Estas alteraciones están asociadas con un aumento de estrés oxidativo y disfunción endotelial (Rodríguez-Rodríguez et al. 2009). Cabe decir que el aumento de las lipoproteínas circulantes (VLDL y LDL) que tienen lugar en estos pacientes y, que pueden acumularse debajo de la capa de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, promueven la formación de placas de ateroma, asociada con el incremento del riesgo de aterosclerosis, que es la consecuencia patológica primaria del SM (Laclaustra-Gimeno et al. 2005).

Liberación de adipocinas:

En la obesidad los adipocitos aumentan su tamaño y esto hace que disminuya la llegada de oxígeno a estas células que se encuentra en una cierta situación de hipoxia (Trayhurn and Wood 2004) favoreciendo la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo implicada en las alteraciones metabólicas de la obesidad. Esto conduce a una sobreproducción de adipocinas que incluyen glicerol, ácidos grasos libres, mediadores proinflamatorios como el TNF α e interleuquina 6 (IL-6), el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), y la proteína C reactiva (PCR) (Lau et al. 2005). Como consecuencia de este aumento de adipocinas se produce una inflamación localizada en el tejido adiposo que se propaga a una inflamación sistémica asociada con el desarrollo de las comorbilidades relacionadas con la obesidad. Las adipocinas median múltiples procesos incluyendo la sensibilidad a la insulina, el estrés oxidativo, metabolismo energético, coagulación sanguínea y respuestas inflamatorias estando implicadas en la función endotelial a través de sus propiedades proinflamatorias (Kaur 2014).

La hipertensión arterial hemos visto que es uno de los criterios que define el SM. La hiperglucemia y la hiperinsulinemia activan el sistema Renina Angiotensina, aumentando la expresión de angiotensiógeno, angiotensina II, y del receptor de angiotensina I que pueden contribuir al desarrollo de la hipertensión en pacientes con resistencia a la insulina (Malhotra et al. 2001). Por su parte la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia activan el sistema nervioso simpático aumentando la reabsorción de sodio en el túbulo contorneado proximal renal. Además, la resistencia a la insulina deteriora la función endotelial debido a la inhibición del efecto vasodilatador del óxido nítrico. Por otro lado la leptina también va a estar involucrada en el aumento de la presión sanguínea, ya que el aumento de esta hormona en la obesidad aumenta el tono simpático renal observado en sujetos obesos, siendo dichos efectos mediados por el hipotálamo dorsomedial y ventromedial (Marsh et al. 2003). Los niveles de leptina en plasma se correlacionan con la adiposidad y la hiperleptinemia se considera un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular (Considine et al. 1996).

El síndrome metabólico se puede definir como un estado de inflamación crónica de baja intensidad con efectos sistémicos importantes a nivel renal,

hepático, de la piel, oculares, del sueño (apnea obstructiva del sueño), del sistema reproductivo, del sistema cardiovascular y de aparición de cáncer (Kaur 2014). Su diagnóstico y tratamiento es importante para disminuir o evitar el riesgo de padecer otras enfermedades. El SM al estar constituido por muchos factores es difícil de tratar y los médicos suelen centrarse en sus componentes por separado, aunque parece que las modificaciones en el estilo de vida constituyen la primera intervención para estos pacientes (Kaur 2014).

1.2 LA APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO

En 1837 Charles Dickens publicó su primera novela "Los papeles Póstumos del club Pickwick" donde se empezó a asociar la obesidad de un joven personaje del Club Pickwick, Joe ("Fat boy" "el gordito"), con la somnolencia describiendo trastornos respiratorios del sueño, pero no fue hasta 1956 cuando se comenzó a hablar del síndrome de Pickwick (Bickelmann et al. 1956), en este trabajo se estudió la relación de la obesidad extrema (IMC >43) con la hipoventilación alveolar y la apnea obstructiva del sueño en un hombre de 51 años de edad, estudiando los síntomas de la enfermedad que ya había descrito Charles Dickens en su personaje Joe. Los estudios poco a poco comenzaron a centrarse en los trastornos del sueño y en las alteraciones respiratorias, siendo en 1976 cuando se comienza a hablar del "Síndrome de Apneas del Sueño" (Guilleminault et al. 1976). Poco después comenzó a introducirse el término hipopnea (Kurtz and Krieger 1978; Block et al. 1979) como un cese parcial de la respiración acompañada de desaturaciones de oxígeno durante el sueño, diferenciándolo así de la apnea definida como un cese total de la respiración de al menos 10 segundos de duración.

El síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) fue definido por la SEPAR (Sociedad Española de Neumología y Cirugía torácica) a principios de los años 90 en una normativa realizada sobre el diagnóstico y tratamiento del SAOS como "pausas respiratorias como consecuencia de la obstrucción parcial (hipopneas) o completa (apneas) de las vías aéreas superiores (VAS) de más de 10 segundos de duración, en número de 10 o más cada hora, que provocan casi siempre una reducción de la saturación arterial de oxígeno" (Marín Trigo et al. 1993).

En el año 2005 el documento Nacional de Consenso sobre el síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS) lo define como un “cuadro de somnolencia excesiva, trastornos cognitivo-conductuales, respiratorios, cardíacos, metabólicos o inflamatorios secundarios a episodios repetidos de obstrucción de la vía aérea superior durante el sueño” (Durán-Cantolla et al. 2005) en el que los mecanismos fisiopatológicos no son plenamente conocidos y parece que hay un origen multifactorial donde interaccionan factores anatómicos y funcionales. Por tanto, estos episodios repetidos de obstrucciones de las VAS parecen ser los responsables de las patologías asociadas que conforman el SAHS y que son las que repercuten directamente en la salud de estos pacientes.

Hasta este momento el SAHS se denominaba SAOS (síndrome de apneas obstructivas del sueño) o simplemente SAS (síndrome de apnea del sueño), sin embargo a partir de este Consenso se incluye en la nomenclatura la referencia de hipopnea, y engloba todos los tipos de apneas tanto obstructivas, como centrales y mixtas. Teniendo en cuenta este consenso, en esta tesis doctoral hablaremos de apnea obstructiva del sueño (AOS) y de síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS) ya que revisando la bibliografía parece que es la nomenclatura más adecuada y actualizada para el estudio que hemos llevado a cabo.

1.2.1 Fisiología del control respiratorio

Las concentraciones de oxígeno (O_2), dióxido de carbono (CO_2), y el pH de la sangre arterial regulan la ventilación. Una respiración adecuada mantiene una concentración normal de O_2 y CO_2 en la sangre, con el objetivo de cubrir las necesidades de oxígeno del organismo eliminando el CO_2 generado por el metabolismo celular. Para que esto se lleve a cabo, el aire entra por la zona de conducción del sistema respiratorio que está formada por la boca, nariz, faringe, laringe, tráquea, bronquios principales y bronquiolos terminales, en este recorrido el aire es humidificado, calentado y filtrado llegando a la zona respiratoria a la temperatura corporal de $37^\circ C$, produciéndose el intercambio gaseoso en esta zona formada por los bronquiolos respiratorios y los alveolos (Ira Fox 2008). Existen dos tipos de células alveolares que se denominan células alveolares tipo I y células alveolares tipo II. Las células tipo I se

encargan del intercambio de gases entre el aire y la sangre mientras que las células tipo II se encargan de la producción de surfactante y de reabsorber el Na^+ y el agua evitando que se acumule líquido dentro de los alveolos. Las paredes de los alveolos son muy delgadas para permitir la difusión rápida de los gases entre el aire y la sangre, y el surfactante ayuda a evitar que durante la espiración los alveolos se colapsen, ya que esta sustancia compuesta por proteínas y lípidos reduce la tensión superficial del medio acuoso en los alveolos. El intercambio de gases entre el aire y la sangre se denomina respiración externa y se produce al difundir el O_2 desde el aire inspirado hacia la sangre y el CO_2 desde la sangre hacia el aire de los pulmones. La sangre rica en O_2 llega a los tejidos donde se produce el intercambio de gases. A este intercambio entre la sangre y los tejidos de O_2 y CO_2 se le denomina respiración interna.

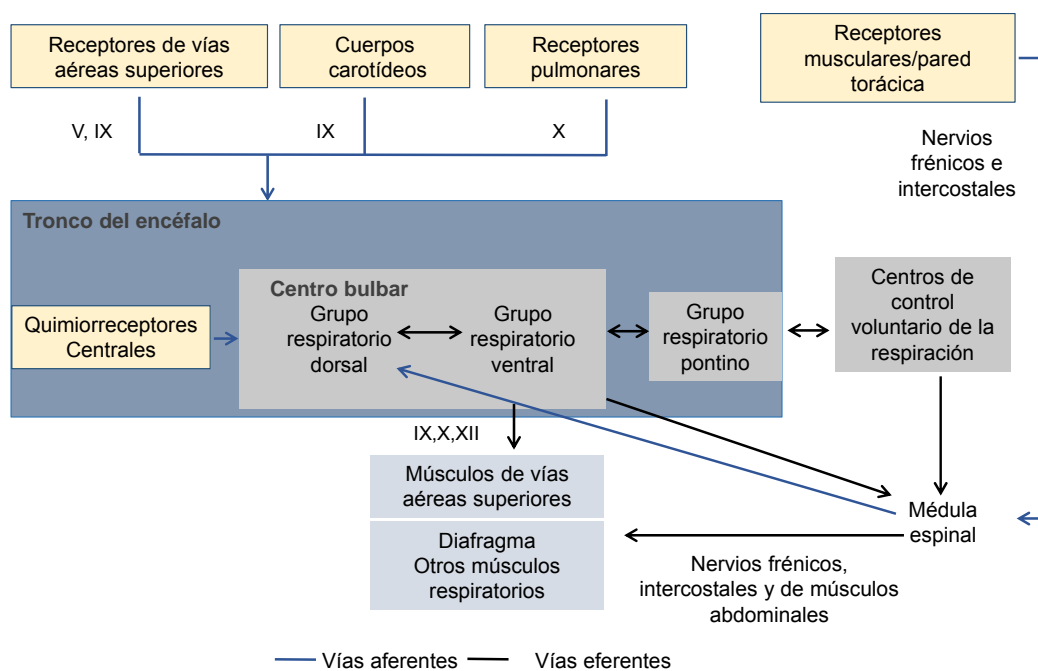


FIGURA 6: Esquema del control respiratorio. Tomada de (Montserrat and Puertas-Cuesta 2015) V: nervio trigémino; IX: nervio glossofaríngeo; X: nervio vago; XII: nervio hipogloso

En el control de la respiración intervienen tres elementos: el centro de control respiratorio, un conjunto de receptores entre los que se encuentra los quimiorreceptores centrales y periféricos, y los músculos respiratorios (Figura

6). El centro de control respiratorio está formado por dos sistemas interrelacionados entre sí uno automático o metabólico que refleja el metabolismo celular y la ventilación alveolar y se localiza en el tronco del encéfalo, específicamente en los centros bulbares y pontinos. El segundo sistema que realiza un control voluntario de la respiración, se localiza en la corteza cerebral y en otras zonas subcorticales, como el estado límbico y el hipotálamo y va a ejercer su función sobre el sistema automático en el tronco del encéfalo o directamente sobre las motoneuronas de los músculos respiratorios (Montserrat et al. 2015).

En el tronco del encéfalo, en la formación reticular del bulbo raquídeo, se encuentran el grupo respiratorio dorsal (GRD) y el grupo respiratorio ventral (GRV). El GRD está formado por neuronas inspiratorias que proyectan sus axones hacia la médula espinal contralateral estimulando las motoneuronas del nervio frénico hacia el diafragma para que se produzca la inspiración. El GRV está constituido por neuronas inspiratorias y espiratorias, estas neuronas espiratorias inhiben a las motoneuronas del nervio frénico en la espiración. Estos grupos respiratorios (GRD y GRV) junto con el centro apnéustico y el centro neumotáxico localizados en la protuberancia, intervienen en el control del ritmo de la respiración. Mientras el centro apnéustico induce la inspiración estimulando las neuronas inspiratorias del bulbo raquídeo, el centro neumotáxico inhibe su función.

Los quimiorreceptores también intervienen en el control automático de la respiración. Dentro de ellos se encuentran los quimiorreceptores centrales localizados en la región ventrolateral del bulbo raquídeo y los quimiorreceptores periféricos, que son los cuerpos aórticos situados en el cayado aórtico y los cuerpos carotídeos (CC) situados en la bifurcación de la arteria carótida común (Figura 7).

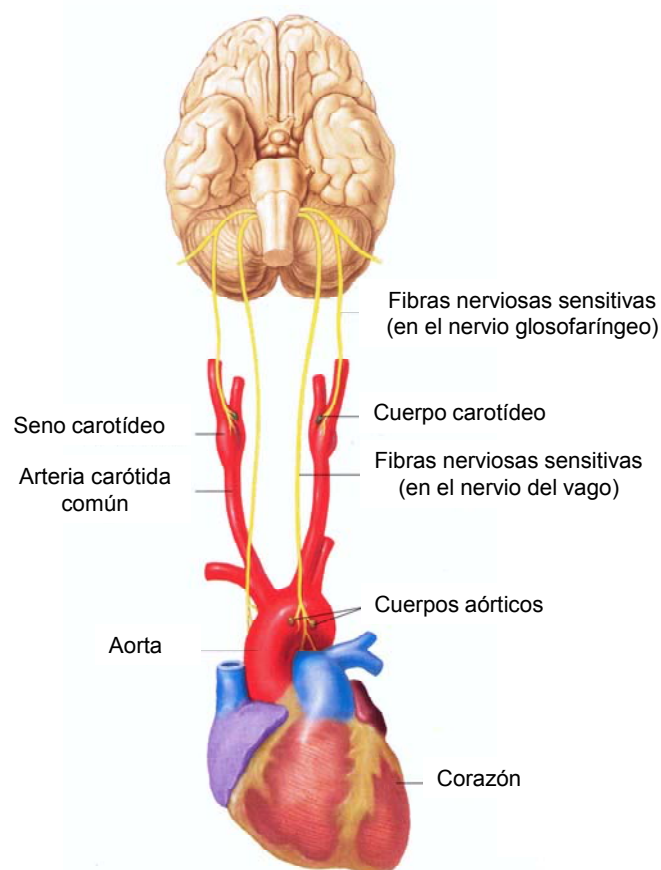


FIGURA 7: Localización y conexiones aferentes de los quimiorreceptores periféricos: cuerpo carotídeo y cuerpos aórticos. Imagen tomada de (Ira Fox 2008).

Los quimiorreceptores centrales son capaces de detectar modificaciones en el pH del líquido extracelular y del líquido cefalorraquídeo. También son sensibles a los cambios que se producen en la presión parcial de dióxido de carbono en sangre arterial (PaCO_2), ya que cuando hay modificaciones en la PaCO_2 se produce también una modificación en la PCO_2 del líquido cefalorraquídeo lo que produce cambios en el pH que estimulan a los quimiorreceptores centrales. Los quimiorreceptores periféricos son sensibles a los cambios de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial (PaO_2), PaCO_2 y pH en sangre arterial, transmitiendo esta información al centro de control respiratorio central para que desde allí se produzcan las modificaciones necesarias en la ventilación para que los valores de pH, PaCO_2 y PaO_2 arteriales sean los adecuados y permanezcan estables. Las terminaciones nerviosas aferentes hacen sinapsis con las células quimiorreceptoras transmitiendo la información desde el CC y desde los cuerpos aórticos al tronco

del encéfalo a través del nervio del seno carotídeo y del nervio vago respectivamente.

Los músculos respiratorios presentan distintos tipos de receptores que participan en el control de la respiración a través de las fibras sensitivas de los nervios vagos. Entre ellos se encuentran, los receptores de irritación o receptores de adaptación rápida, situados entre las células epiteliales de la vía respiratoria que tienen una función defensiva en respuesta al humo del tabaco, aire contaminado y a partículas inhaladas haciendo que se produzca un aumento de la resistencia de la vía respiratoria, apnea refleja y tos. Los receptores de distensión pulmonar o de adaptación lenta se localizan entre las células del músculo liso de la vía respiratoria y se activan cuando el volumen corriente aumenta por encima de los valores normales (500mL por respiración) impidiendo que se produzca una distensión excesiva de los pulmones. Y los receptores J o yuxtacapilares, son terminaciones nerviosas sensoriales que se localizan en las paredes alveolares y son estimulados por procesos químicos o mecánicos.

1.2.1.1 El control respiratorio durante el sueño

El sueño es un estado fisiológico reversible y cíclico en el que el cerebro es más sensible a estímulos internos que externos. Existen dos tipos de sueños: el sueño sin movimientos oculares rápidos NREM (nonrapid eye movement sleep) y el sueño con movimientos oculares rápidos REM (rapid eye movement sleep) (Aserinsky and Kleitman 1955). De acuerdo con la Academia Americana de Medicina del Sueño el sueño NREM se divide en 3 fases:

Fase N1: es la fase más superficial y la más corta

Fase N2: es la fase más larga del sueño NREM

Fase N3: es la más profunda y reparadora

El sueño REM se caracteriza por ser una etapa que presenta gran actividad neuronal y en la que aparecen las ensoñaciones (Iber et al. 2007). Un adulto cuando duerme comienza teniendo sueño NREM (~80minutos), distribuidos en las distintas fases (N1:5%; N2:50% y N3:20%), y le sigue el sueño REM (~2-10 minutos). Durante la noche se alternan entre 4-6 ciclos de sueño REM y NREM (Sinton and McCarley 2004).

Cuando se inicia el sueño aparecen cambios en la regulación de la ventilación que van a ser distintos según la fase del sueño en la que nos encontremos. Durante el sueño aparecen respuestas ventilatorias disminuidas ante situaciones de hipoxia y de hipercapnia (Douglas et al. 1982), esta reducción de la respuesta ventilatoria frente a estos estímulos es más acusada durante el sueño REM que en las fases de sueño NREM. La actividad muscular mientras dormimos, especialmente en la fase REM, también está disminuida principalmente en los músculos de la vía aérea superior, esta hipotonía hace que aumenten las resistencias de la vía respiratoria (Wiegand et al. 1990) lo que favorece la aparición de obstrucciones. Por lo tanto, durante esta fase del sueño la ventilación va a ser mantenida por las contracciones del diafragma, ya que es el único músculo respiratorio que mantiene su actividad muscular mientras dormimos. La causa de esta hipotonía en los músculos respiratorios durante el sueño es debida a una disminución de la actividad respiratoria estimulante troncoencefálica hacia los músculos inspiratorios y a los músculos dilatadores de las VAS (Dempsey et al. 1997; Kubin et al. 1998) disminuyendo la potencia de bombeo de aire hacia los pulmones y aumentando las resistencias al flujo inspiratorio en las VAS. Este patrón de actividad de los músculos durante el sueño es fisiológico, pero una disminución anormal de estas señales respiratorias estimulantes hacia los músculos dilatadores, o una respuesta anómalamente baja de éstos a las órdenes motoras troncoencefálicas, produce una obstrucción de las vías respiratorias durante la inspiración (Morrison et al. 1993). A este respecto, se sabe que la actividad electromiográfica del geniogloso (músculo que ensancha la lumen faríngea y agranda la comunicación entre la orofaringe y la laringofaringe) en pacientes con apnea obstructiva del sueño (AOS) está disminuida y esta disminución causa que la lengua se caiga hacia atrás y que obstruya las vías aéreas superiores (Ryan and Bradley 2005; Eisele et al. 2003). El lugar más común de la obstrucción es el paladar blando, extendiéndose hasta la base de la lengua: en estas áreas no hay estructuras rígidas, hueso o cartílago, que mantengan las vías aéreas abiertas. Durante el día, los músculos de la región mantienen la vía aérea abierta, pero cuando un paciente con AOS se duerme los músculos se relajan hasta un punto en que la vía aérea se colapsa y se obstruye. Cuando las vías aéreas se obstruyen, el flujo de aire hacia y desde los pulmones se

detiene, y el enfermo se despierta para abrir sus vías aéreas. El despertar es transitorio, dura unos pocos segundos, pero estos despertares continuos rompen el ritmo normal de sueño e impiden al enfermo el descanso necesario y la recuperación de fuerzas para la jornada siguiente.

1.2.2 Definición y clasificación de la apnea obstructiva del sueño

La apnea obstructiva del sueño (AOS) se define como una parada de la respiración que ocurre de forma repetida durante el sueño con una frecuencia de hasta 30 (o más) veces/hora, esto es 240 veces/noche. La duración de cada episodio apneico-obstrutivo es variable, pero puede alcanzar >30-40 segundos. Si la obstrucción de las vías aéreas es incompleta se habla de hipopnea del sueño, y pueden coexistir a lo largo de la noche episodios de apnea y de hipopnea. Existen tres tipos de apnea del sueño: obstructiva, central y mixta (Tabla 2).

Apnea obstructiva	Ausencia o reducción >90% de la señal respiratoria de >10 segundos de duración <u>en presencia de esfuerzo respiratorio</u> detectado por las bandas tóraco-abdominales.
Apnea central	Ausencia o reducción >90% de la señal respiratoria de >10 segundos de duración <u>en ausencia de esfuerzo respiratorio</u> detectado por las bandas tóraco-abdominales.
Apnea mixta	Es un evento respiratorio que, habitualmente, comienza con un componente central y termina en un componente obstructivo

TABLA 2: Clasificación de las apneas del sueño. Tomado de Normativa SEPAR 2010 sobre el diagnóstico y tratamiento del síndrome de apneas-hipopneas del sueño.

En la apnea obstructiva hay un esfuerzo respiratorio toracoabdominal que se produce para vencer la obstrucción de la VAS, es decir existen órdenes motoras a los músculos inspiratorios para restablecer la respiración. Sin embargo en la apnea central no existen dichas órdenes motoras hacia los

músculos inspiratorios y esto se traduce en una ausencia de esfuerzo respiratorio toracoabdominal. También existen otros criterios para la clasificación de la AOS como son el índice de apnea-hipopnea (IAH) (Butt et al. 2010) y el grado de desaturación de la oxihemoglobina (HbO_2) .

La AOS es la más frecuente y se estima que ocurre en el 2% de las mujeres y en el 4% de los hombres de más de 35 años, aunque hay estudios que elevan esta frecuencia hasta el 9-24% para hombres y el 4-9% para mujeres de entre 30 y 60 años (Young et al. 2009). Las causas de la AOS no son conocidas, pero existe un gran interés sociosanitario y económico en esta patología debido principalmente a su elevada frecuencia y a su relación con otras patologías. En las personas mayores de 65 años la frecuencia de SAHS aumenta, su clínica es menos definida y su costo sanitario es el doble que en controles de las mismas edades (Martínez-García et al. 2010).

El cuadro clínico de esta patología está conformado por los ronquidos producidos por el paso de los flujos de aire por las vías aéreas estrechadas y la hipotonía de los músculos de dichas vías. Los ronquidos producen discomfort para el compañero de cama y un estado de somnolencia durante el día que lleva asociado un bajo rendimiento profesional y un alto índice de accidentes de tráfico (Terán-Santos et al. 1999). También puede formar parte de la clínica cuadros de ansiedad desencadenados por la carencia de sueño reparador y la sensación de cansancio, que con frecuencia desembocan en el desarrollo de patologías neuropsiquiátricas que incluyen cuadros de depresión y déficits cognitivos (Kjelsberg et al. 2005). Asociados a estos síntomas primarios hay una elevada prevalencia de enfermedades cardiovasculares, hipertensión sistémica, accidentes cerebrovasculares y alteraciones hepato-metabólicas tales como la obesidad, RI, esteatosis hepática no alcohólica y diabetes (Yaggi et al. 2005; Thomas and Ren 2012). Dichas alteraciones hepato-metabólicas conforman el denominado SM. Todo este cuadro clínico es lo que desencadena el desarrollo del SAHS, y es desde esta perspectiva clínica desde donde es importante considerar la fisiopatología de la AOS y de sus patologías asociadas.

En cada episodio de obstrucción se produce un aumento de la $PaCO_2$ y una disminución de la PaO_2 activando los quimiorreceptores del CC que responden a esas modificaciones de las presiones de gases en menos de 10

segundos (Gonzalez et al. 1994). Este aumento de la actividad del CC se transmite a través del nervio del seno carotídeo (NSC) al núcleo del tracto solitario (NTS) y finalmente a los controladores centrales del ritmo respiratorio y a los centros que controlan el ritmo sueño vigilia (Bowes et al. 1981; Chenuel et al. 2005) generando un aumento de actividad en los músculos inspiratorios y en los dilatadores de las VAS. Este proceso habitualmente está asociado con una reacción de despertar que aumenta las órdenes motoras de dichos músculos, y la obstrucción cesa produciéndose la inspiración “salvadora”, los gases sanguíneos se normalizan en unas pocas inspiraciones, el enfermo vuelve a dormirse y un nuevo ciclo de obstrucción se inicia en el curso de un par de minutos o menos en los enfermos severos. La activación intermitente de los quimiorreceptores del CC todas las noches con cada episodio de obstrucción acaba generando un estado de sensibilización de los quimiorreceptores, que producen una activación permanente del sistema nervioso simpático, que a su vez parece representar el origen de la patología cardiovascular asociada al SAHS (Lattimore et al. 2003; Peng and Prabhakar 2004). Además, el estado de ansiedad producido por la falta de sueño contribuiría al aumento del tono simpático, que además de ser el desencadenante de las enfermedades cardiovasculares asociadas al SAHS, parece contribuir a la alta prevalencia de diabetes tipo 2 asociada al SAHS (Boethel 2002). De hecho, parece que independientemente del IMC los pacientes con SAHS presentan RI y diabetes tipo 2 (West et al. 2007).

Como detallaremos más adelante, la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) junto con la activación de ciertas vías proinflamatorias que tienen lugar en la fisiopatología del AOS, también están involucradas en las patologías cardiovasculares asociadas (Lavie 2003) (Figura 8).

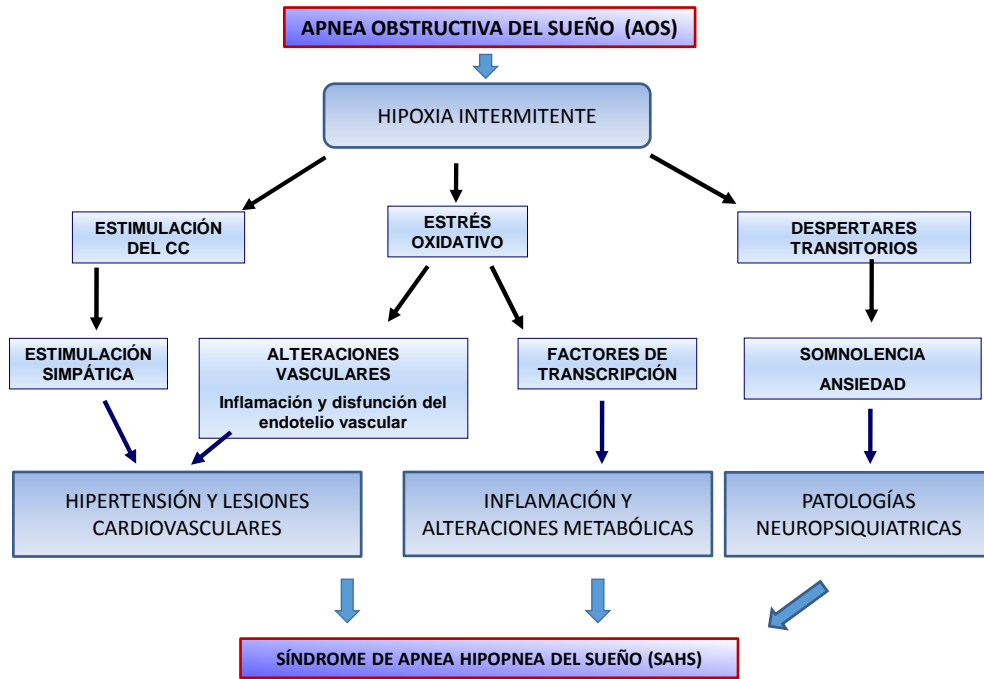


FIGURA 8: Esquema de las alteraciones que se producen en la AOS y que van a conformar el SAHS.

1.2.3 Especies reactivas de oxígeno

Se denomina oxidación a los procesos que se producen cuando hay una pérdida de electrones, captación de O₂ o cesión de hidrógeno, mientras que la reducción es el proceso en el que hay una captación de electrones o pérdida de oxígenos. Ambos procesos forman las reacciones de óxido-reducción o reacciones redox. A partir de estas reacciones los seres vivos obtienen gran parte de la energía libre que necesitan para realizar sus procesos vitales. Sin embargo, la oxidación también puede producir enfermedades cuando se rompe el equilibrio entre los prooxidantes y los antioxidantes a favor de los prooxidantes. Esto ocurre cuando se generan los radicales libres.

Un radical libre, es un átomo o molécula que contiene un electrón o más desapareados en su orbital más externo, son muy reactivos y muy inestables, reaccionando muy deprisa para conseguir que los electrones estén apareados. Entre estos radicales libres se encuentran las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y las Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN: óxido nítrico, radical peroxinitrito). En biología los radicales más importantes son los radicales libres de oxígeno, que son especies moleculares en las que es un átomo de O₂ el que contiene el electrón desapareado. Se producen generalmente en los procesos

redox celulares durante el metabolismo mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía, siendo la principal fuente de producción la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Cadenas and Sies 1998). En torno al 1-3% del O_2 que se consume en la respiración mitocondrial en condiciones de PaO_2 normal escapa como radical libre $O_2^{\cdot-}$. Otras fuentes donde se generan radicales libres son los lisosomas, peroxisomas, membrana nuclear, citoplasmática y del retículo endoplásmico. También la enzima xantina oxidasa (responsable de la conversión de hipoxantina en ácido úrico) genera radicales libres (radicales superóxido). Otra fuente de radicales libres está constituida por el metabolismo de los fagocitos (neutrófilos y macrófagos), dotados de enzimas líticas (proteasas, lipasas, nucleasas), así como de vías metabólicas (mieloperoxidasa en el caso de neutrófilos) que generan diversas especies químicas agresivas (peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo).

Las ERO se producen naturalmente dentro de las células regulando procesos celulares como la secreción y acción de la insulina, factores de transcripción, producción de citoquinas, unión de proteínas G a sus receptores, entre otras (Bartosz 2009). Las células poseen antioxidantes para inactivar las ERO evitando su acumulación y sus efectos tóxicos. Sin embargo cuando son producidas en exceso y los antioxidantes no consiguen inactivarlas resultan nocivas, dañando macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alterando los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.). Este estrés oxidativo producido por una sobreproducción de las ERO o por un déficit de antioxidantes va a estar asociado a diversas patologías como enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, la diabetes tipo 2, patologías cardiovasculares, la obesidad y el envejecimiento (Paredes Salido and Roca Fernández 2002; Kawser Hossain et al. 2016).

Las principales ERO son el anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ que se forma a partir del O_2 normal al captar un electrón, este radical superóxido tiene un único electrón desapareado y es considerado como la ERO primaria y de la cual derivan las siguientes ERO, formándose el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) este último es uno de los más perjudiciales ya que ataca las proteínas y los lípidos de las membranas celulares, mientras que el H_2O_2 es

su precursor inmediato (Figura 9). Por otro lado, los principales antioxidantes pueden ser sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx) y sistemas no enzimáticos entre los que encontramos el glutatión (GSH), la vitamina C, vitamina E y el ácido lipoico.

Para poder estudiar el estrés oxidativo, los análisis se centran en la detección específica e inespecífica de los productos de oxidación de las macromoléculas como la peroxidación lipídica, la glucoxidación, la oxidación de proteínas y del ADN al igual que el estudio de los antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos. Cuando hay una afectación de los lípidos por la peroxidación lipídica, se altera la estructura celular alterándose la membrana celular. En las proteínas el daño oxidativo produce modificaciones enzimáticas, afectando a la transducción de señales intercelulares e intracelulares (Wolff et al. 1986) y en el ADN puede causar alteraciones genéticas, mutaciones, enfermedades autoinmunes, cáncer y estar involucrado en procesos de envejecimiento (Elejalde Guerra 2001).

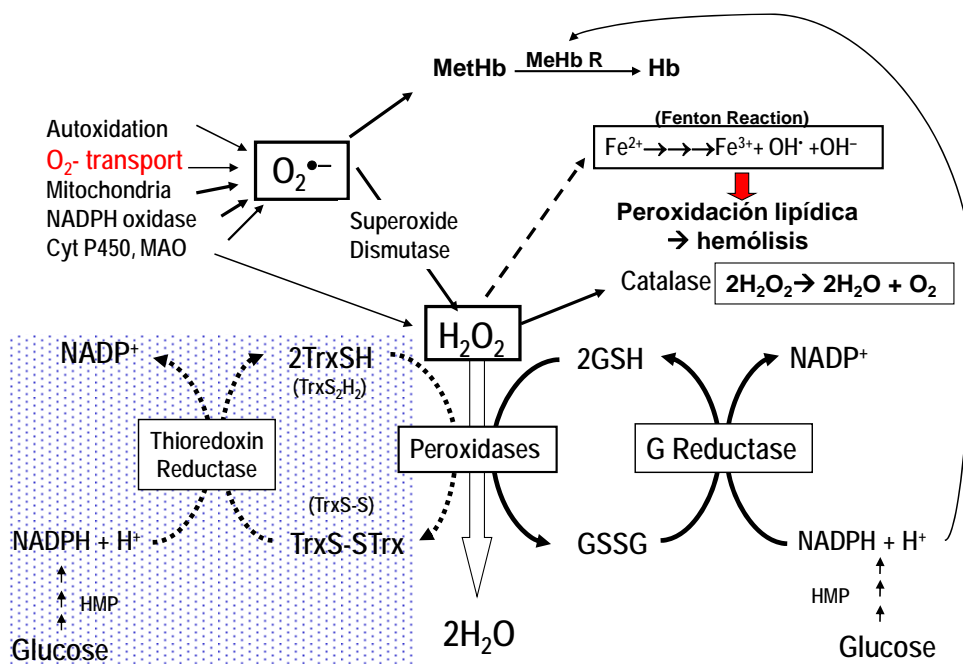


FIGURA 9: Principales especies reactivas de oxígeno (ERO) y mecanismos antioxidantes.

Respecto a la implicación que tienen las ERO en la fisiopatología del AOS, se sabe que la hipoxia intermitente crónica (HIC) que se produce en esta

patología, conlleva a episodios rápidos de hipoxia y reoxigenación imitando a la isquemia reperfusion que ocurre en los tejidos y que genera la formación de ERO durante el período de reperfusion (Eltzschig and Eckle 2011). Las ERO modulan diferentes factores de transcripción y vías de señalización, entre las que destacan en relación con la AOS el Factor inducible por la hipoxia 1α (HIF- 1α); el Factor Nuclear Kappa B (NF-kB), el Activador de la proteína 1 (AP1) y el factor nuclear Nrf2 (Reuter et al. 2010). En la HIC se produce una disregulación de las isoformas del factor inducible por la hipoxia (HIF) que va a participar en el aumento de la producción de ERO, debido al desbalance entre las enzimas pro y antioxidantes (Kumar et al. 2015). Este desbalance se traduce en un aumento de la expresión de HIF 1α que induce las enzimas pro-oxidantes como la NADPH oxidasa-2 (NOX2) (Yuan et al. 2011) y una disminución de la expresión de HIF- 2α que induce las enzimas antioxidantes como la SOD (Nanduri et al. 2009).

NF-kB es considerado el factor de transcripción fundamental implicado en la regulación de genes inflamatorios en respuesta a cambios en el estado de oxidación-reducción celular. Después de la activación de los procesos oxidativos dentro de las células, la subunidad inhibidora I-kappa B es fosforilada y NF-kB se transloca al núcleo (Wang et al. 2002). Este factor de transcripción puede ser inducido entre otros factores por la hipoxia, aumentando la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y de interleuquina 6 (IL6) (Semenza 2001), estas citoquinas pueden estar aumentadas en el SAHS y se correlacionan positivamente con el aumento del IMC (Cherniack 2004). La activación de NF-kB está implicada en numerosas patologías entre las que destacan enfermedades inflamatorias (Tak and Firestein 2001) y alteraciones metabólicas como la diabetes (Itani et al. 2002). Por lo tanto la inflamación puede ser un terreno común donde encontramos la asociación entre la obesidad, el SAHS y el SM (Alam et al. 2007).

Además en los episodios de isquemia reperfusion se produce una depleción celular de ATP que conlleva a un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en el citosol, que activa proteasas dependientes de calcio (Ca^{2+}), transformando la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa (XO) la cual va a producir el anión superóxido $O_2^{\cdot-}$. Por lo tanto en los episodios de hipoxia reoxigenación de la

AOS la XO estaría aumentada estando implicada en la producción de ERO en esta patología (ver (Lavie 2015)).

La HIC produce aumento de la producción de ERO, inflamación y daño endotelial en modelos animales (Kohler and Stradling 2012), sin embargo en pacientes esta asociación no parece tan evidente (Oztürk et al. 2003; Svatikova et al. 2005). En nuestro laboratorio hemos observado que las ERO son unos mediadores principales en la patogénesis de las comorbilidades presentes en el SAHS (Quintero et al. 2013) que junto con la sensibilización del CC en la HIC contribuyen al aumento de la actividad simpática y al desarrollo de patologías cardiovasculares y metabólicas (Figura 8).

1.2.4 Diagnóstico y tratamiento de la apnea obstructiva del sueño

Para realizar el diagnóstico de esta enfermedad el método más preciso es la polisomnografía que permite mediante una monitorización continua, estudiar el electroencefalograma, el electrooculograma, el electromiograma, electrocardiograma, la oximetría, el CO₂ transcutáneo y los esfuerzos respiratorios durante el sueño, es decir se analizan simultáneamente las variables neurofisiológicas y cardiorrespiratorias. Con esta técnica se evalúan la repercusión de las apneas y/o hipopneas sobre la función cardiorrespiratoria y la organización del sueño. El principal tratamiento del SAHS es la CPAP (*Continuous Positive Airway Pressure*), basado en la eliminación de la HIC en los pacientes. La CPAP consiste en aplicar durante el sueño una presión inspiratoria positiva mediante una mascarilla adecuadamente conectada al paciente y al respirador que hace fluir el aire a los pulmones a pesar de las obstrucciones y que mejora parte de la patología asociada del SAHS. El uso de la CPAP disminuye la frecuencia de los episodios de apneas mejorando la saturación de O₂ en los pacientes. Algunos autores muestran que el tratamiento es efectivo en patologías asociadas a la AOS como la hipertensión arterial (Narkiewicz et al. 1999b), los problemas neuropsiquiátricos, también reduce los accidentes de tráfico y laborales, disminuyendo la mortalidad y mejorando la calidad de vida de estos pacientes (Al-Barrak et al. 2003).

El mayor problema con la CPAP es que el número de pacientes que la siguen correctamente (> 4 h/noche, el 70% de las noches) es muy bajo, estimándose de un 30-60% ya que los pacientes rehúsan dormir “conectados a

la máquina” (Weaver and Sawyer 2010). Además otros autores han descrito baja efectividad de la CPAP en distintas alteraciones vasculares y metabólicas del SAHS, entre ellas la hipertensión, la RI y la diabetes tipo 2 (Campos-Rodriguez et al. 2006; West et al. 2007). Estos hechos nos llevan a seguir estudiando los mecanismos fisiopatológicos que produce la HIC para entender mejor estas patologías y poder buscar otros posibles tratamientos.

1.3 MODELOS EXPERIMENTALES: OBESIDAD Y APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO

Los roedores pequeños (rata y ratón) son el modelo animal más utilizado en experimentación animal para el estudio de enfermedades, debido principalmente a la similitud de su genoma con el de los humanos. Estos modelos animales comparten características fisiológicas y de sus comorbilidades con los seres humanos, ayudando a la búsqueda de tratamientos que permitan mejorar la salud en estos pacientes. Además los roedores nos proporcionan información en periodos cortos de tiempo ya que aproximadamente 10 días de vida en una rata equivalen a un año en los seres humanos cuando estudiamos cambios en el peso corporal (Gonzalez 2010), pudiendo también estudiar la evolución de las enfermedades a lo largo de toda su vida ya que tienen una esperanza de vida de aproximadamente 24 meses.

1.3.1 Modelos animales de obesidad

La obesidad en los modelos animales se puede producir mediante manipulaciones genéticas, modificaciones en la alimentación con dietas hipercalóricas y alteraciones quirúrgicas a nivel del hipotálamo.

Existen numerosos modelos animales utilizados en el estudio de la obesidad, entre ellos los más utilizados son los ratones con déficit de leptina *ob/ob*, ratones con déficit de receptor de leptina *db/db*, ratas Zucker con mutación en el receptor de leptina, modelos con mutaciones en los receptores de la melanocortina (MC4) y animales obesos inducidos por la dieta (Lutz and Woods 2012). Estos últimos son los que mejor imitan a la obesidad común que padecen los humanos.

Clasificación etiológica de los modelos de obesidad experimental más utilizados:

1. Modelos animales de obesidad genética

Estos modelos animales pueden presentar defectos a nivel central (SNC) o a nivel periférico, al no llegar correctamente las señales desde los órganos periféricos al cerebro, siendo los más importantes los que presentan defectos en el SNC. Entre estos modelos los más utilizados son aquellos que presentan mutaciones en la vía de señalización de la leptina en el hipotálamo, entre ellos encontramos los animales que presentan déficit en la producción de leptina y mutaciones en los receptores de leptina.

- ✓ Los ratones *ob/ob* (Lep^{ob}/Lep^{ob}) presentan una mutación espontánea en el gen *ob* que es el responsable de producir la leptina sintetizada principalmente en el tejido adiposo blanco. En este modelo de obesidad la administración de leptina es efectiva para el tratamiento de la obesidad y de las complicaciones asociadas (Zhang et al. 1994; Halaas et al. 1995)
- ✓ Los ratones *db/db* (Lep^{db}/Lep^{db}) se denominan ratones diabéticos y presentan mutaciones en el gen *db* que producen alteraciones en el receptor de leptina *ObRb* siendo insensibles a la leptina exógena y endógena y mostrando por tanto resistencia a la leptina. Ésta es la principal característica que les diferencia de los ratones *ob/ob*. Es un modelo utilizado para el estudio de diabetes tipo 2.
- ✓ Ratas Zucker (*fa/fa*) y Ratas Koletsly (mutación nula), presentan una mutación en el dominio extracelular de los receptores de leptina. Las ratas Zucker (*fa/fa*) es un modelo animal utilizado para el estudio de obesidad y de diabetes tipo 2, presentan una disminución de la expresión de los receptores de leptina en la superficie celular, disminuyendo la unión de la leptina al receptor y por tanto las señales de transducción (Crouse et al. 1998). Las ratas Koletsly es un buen modelo para el estudio de la resistencia a la leptina ya que muestran una mutación sin sentido, nula en la que no se originan niveles detectables de ARNm para el receptor de leptina (Chua et al. 1996; Wu-Peng et al. 1997).

Encontramos otros modelos de animales monogénicos que muestran alteraciones en la cascada de transducción que se activa tras la unión de la leptina con el receptor ObRb a nivel del hipotálamo. Entre ellos cabe destacar el ratón knockout MC4R (principal receptor de la melanocortina) que es la mutación monogénica que causa obesidad en humanos más frecuentemente.

2. Modelos de obesidad inducidos por la dieta (DIO, diet-induced obese)

La dieta es uno de los principales factores ambientales que influyen de manera importante en el desarrollo de la obesidad. Este modelo de obesidad es el que más se parece a la obesidad que aparece en los seres humanos y tiene la ventaja de que es muy fácil de conseguir.

Tipos de dietas para inducir estos modelos:

- ✓ Dietas de cafetería. Este tipo de dieta es variada, con alto valor calórico y muy apetecible produciendo hiperfagia, aumento de peso y de los depósitos de grasa. Los animales pueden elegir los alimentos que más les gusta con la desventaja de que esto hace que sean experimentos difíciles de repetir en futuros procedimientos.
- ✓ Dietas con alto contenido en grasa. Estas dietas pueden tener entre 30% y 60% de kcal de grasa, siendo las más utilizadas para inducir obesidad en roedores las de 60% de kcal de grasa. En esta alimentación hay que tener en cuenta el tipo de grasa de la que está compuesta siendo las grasas saturadas más nocivas que las grasas insaturadas. Estas dietas ricas en grasa disminuyen la acción central de la insulina y la leptina presentando estos animales hiperinsulinemia, hiperleptinemia y RI (Woods et al. 2004; Lutz et al. 2012). En estos modelos animales es recomendable utilizar como dieta control una dieta baja en grasa que contenga los mismos ingredientes que la formulación cerrada con alto contenido en grasa.

3. Obesidad por lesiones quirúrgicas o producidas por sustancias químicas

Las principales lesiones son las que se realizan en el hipotálamo y pueden ser producidas:

- ✓ por la administración de sustancias como el glutamato monosódico que provocan una destrucción de los núcleos ventromedial y arcuato del hipotálamo cuando se administra en ratas recién nacidas. Los

mecanismos involucrados en este modelo de obesidad se desconocen, aunque se están realizando muchos estudios con estos modelos animales al ser una sustancia muy utilizada en la industria alimentaria como potenciador de sabor.

- ✓ por la lesión quirúrgica del hipotálamo ventromedial, que provoca obesidad con hiperfagia, aumento de peso corporal y de tejido adiposo y en la que se produce un aumento de los niveles de leptina, y una disminución de neuropéptido Y. También las lesiones del hipotálamo paraventricular y del núcleo arcuato van acompañadas de obesidad con hiperfagia e hiperinsulinemia (Gonzalez 2010).

1.3.2 Modelos Animales de apnea obstructiva del sueño

En 1992 Fletcher diseñó un modelo animal de SAHS, sometiendo a ratas durante 35 días a hipoxias de 3-5%O₂ durante 12 segundos cada 30 segundos, 7 horas/día (Fletcher et al. 1992), con estos experimentos demostró que los episodios repetidos de hipoxia intermitente (HI) vistos en la AOS contribuían a un aumento de la presión arterial sanguínea diurna. En 1995 Fletcher también demostró que la incorporación de CO₂ en los episodios de hipoxia, creando una leve hipercapnia como ocurre en los pacientes con SAHS, no aumentó la hipertensión arterial descrita previamente. Estos modelos experimentales no muestran el esfuerzo respiratorio que sufren los pacientes para superar la obstrucción durante los episodios de apneas por tanto no imitan perfectamente la patología en los humanos, aunque parece que la HI es la característica más importante en el SAHS, siendo capaz de generar por si sola hipertensión en los animales de experimentación ver (Troncoso Brindeiro et al. 2007; Allahdadi et al. 2008; Zoccal et al. 2008).

En la literatura existen muchos modelos animales de HI que presentan características muy diferentes entre sí, como son el porcentaje de O₂ en los episodios de hipoxia, la duración de la hipoxia, los ciclos de hipoxia realizados cada hora, los días de exposición a la HI y las especies de animales utilizadas. Todo ello hace muy difícil la comparación de los resultados entre los distintos autores (ver (González-Martín et al. 2009)).

En nuestro laboratorio pensamos que los ciclos de HI deben ser lo más parecidos a los que presentan los pacientes con AOS, por ello realizamos

durante las 8h del periodo de sueño de las ratas ciclos que constan de 40s de hipoxia al 5%O₂ seguido de 80s de aire. Cada ciclo dura 2 minutos que corresponde con 30 ciclos/hora. Esta exposición se realiza durante 14-15 días que correspondería en los humanos aproximadamente a 19-20 meses y que según el índice de apnea hipopnea (IAH) imitaría a una AOS clasificada entre moderada y severa (IAH entre 15-30 AOS moderada) y un (IAH > de 30 AOS severa).

1.4 APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO Y OBESIDAD

La mayoría de los pacientes que sufren AOS presentan sobrepeso u obesidad, este aumento de peso contribuye a la obstrucción de las VAS probablemente debido a la acumulación de grasa alrededor del cuello (Hoffstein and Mateika 1992), afectando por tanto en la calidad del sueño. Como hemos comentado, la prevalencia de ambas patologías en nuestra sociedad actual es muy elevada. Entre el 60 y el 90% de los pacientes con SAHS son obesos (Anstead and Philips 1999), y además un aumento de peso del 10% está asociado con un aumento de seis veces el riesgo de desarrollar SAHS (Svatikova et al. 2005). Está documentado que aparte de lo unidas que están estas dos patologías también existe una correlación entre el SAHS, la obesidad, la inflamación y las alteraciones en el metabolismo de los glúcidos y de los lípidos (Alam et al. 2007).

Nuestro interés ha sido estudiar la obesidad y la AOS con el fin de entender mejor los mecanismos fisiopatológicos de estas enfermedades. El estudio de las dos patologías de manera independiente y su interrelación se va a estudiar en el Capítulo 1 de esta tesis prestando especial atención al papel de la obesidad en el cuadro clínico producido por la HIC en animales de experimentación.

1.5 LA LEPTINA

La leptina (de *leptos* = delgado en griego) es una hormona peptídica de 16-kDa producida por el gen *ob*, que interviene en múltiples funciones en el organismo desde el mantenimiento de la homeostasis en el sistema inmune, hasta funciones reproductivas y de angiogénesis. Es considerada un importante regulador del balance energético y es producida principalmente por

el tejido adiposo blanco de manera directamente proporcional a la masa del tejido adiposo (Cao 2014). Aunque también es sintetizada por otros tejidos entre los que encontramos el tejido adiposo pardo, la placenta, el estómago y el ovario (Marwarha and Ghribi 2012).

En 1994, con el descubrimiento de la leptina comenzó a considerarse al tejido adiposo, aparte de un almacén de energía, un importante órgano endocrino productor de hormonas peptídicas conocidas como adipoquinas (Zhang et al. 1994). Estas adipoquinas pueden actuar de manera local (autocrinas y paracrinas) o de manera sistémica (endocrina), llevando información sobre las reservas energéticas almacenadas en el tejido adiposo a otros tejidos y al cerebro. La leptina por tanto es una adipoquina que llega a todos los tejidos periféricos y atraviesa la barrera hematoencefálica, esto hace que tenga una acción central, disminuyendo la ingesta de alimentos al activar los centros de saciedad a nivel del hipotálamo, y una acción periférica, facilitando la oxidación de los nutrientes. Cuando la leptina se une a sus receptores en los tejidos diana (Ob-R) aumenta la sensibilidad a la insulina del músculo y del hígado, estimulando la β -oxidación de los ácidos grasos y disminuyendo la síntesis de triglicéridos. A nivel central también activa el sistema nervioso simpático, actuando en el núcleo arcuato y en el NTS (Mark 2013), activación que también va a contribuir a aumentar el metabolismo oxidativo en los tejidos periféricos (Aguer and Harper 2012), la presión arterial y contribuye también a la aparición de un cierto estado de RI. A esta acción se sumarían los adipocitos que también segregan hormonas como la resistina y la proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4) que facilitan dicha RI.

Existen seis isoformas del receptor Ob-R de leptina:

- 4 (isoformas cortas) Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Rf que facilitan el paso de leptina al cerebro.
- 1 (isoforma larga funcional) Ob-Rb que es esencial para que se lleve a cabo la transducción de la señal, ya que contiene un dominio de señalización intracelular para la vía JAK/STAT (Janus activated kinase/signal transducer activator of transcription). Predomina en el hipotálamo.
- 1 receptor soluble Ob-Re, que circula en el plasma uniéndose a la leptina circulante e inactivándola (inhibidor fisiológico de la leptina).

Se han localizado receptores de leptina en el tracto gastrointestinal, páncreas, hígado, corazón, pulmones, riñón, próstata, ovarios, tejido adiposo e hipotálamo. La leptina secretada por el tejido adiposo circula por el torrente sanguíneo y atraviesa la barrera hematoencefálica para actuar principalmente en el hipotálamo uniéndose al receptor de leptina. Los receptores OB-Rb están presentes en los núcleos arcuato, paraventricular, ventromediales y dorsomediales siendo el principal sitio de acción de la leptina en el hipotálamo el núcleo arcuato dónde actúa sobre dos grupos de neuronas:

- Neuronas que liberan neuropéptido Y (NPY) y péptido relacionado con el gen agouti (AgRP, *Agouti-Related Peptide*) que representa la vía orexigénica (inductora del apetito), aumentando la ingesta de alimentos y estimulando la secreción de insulina.

- Neuronas que secretan proopiomelanocortina (POMC) y el transcriptor regulado por cocaína-anfetamina (CART, *Cocaine Amphetamine Regulated Transcription*) que representa la vía anorexigénica (inductora de saciedad). A través de esta vía, la leptina disminuye la ingesta y por lo tanto el peso corporal, aumentando la oxidación de grasa y el gasto energético favoreciendo así la pérdida de peso.

La activación del receptor de leptina conduce a la fosforilación y activación del factor de transcripción STAT3 que se dimeriza y se transloca al núcleo donde activa el gen de transcripción POMC (proopiomelanocortina) (Figura 10). La POMC produce péptidos de melanocortina, uno de los cuales es la hormona estimulante del melanocito (MSH, *melanocyte-stimulating hormone*) que actúan sobre los receptores MC4R en la superficie de las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo. Cuando se activa el receptor MC4R se produce una disminución en la ingesta de comida. Mutaciones del gen POMC están asociadas con la aparición temprana de obesidad. En el hombre las alteraciones en el gen POMC producen hiperfagia y obesidad grave de aparición temprana, debido a que no se produce melanocortina y no se une al receptor MC4R y por lo tanto no se reduce la ingesta de alimentos (Krude et al. 1998).

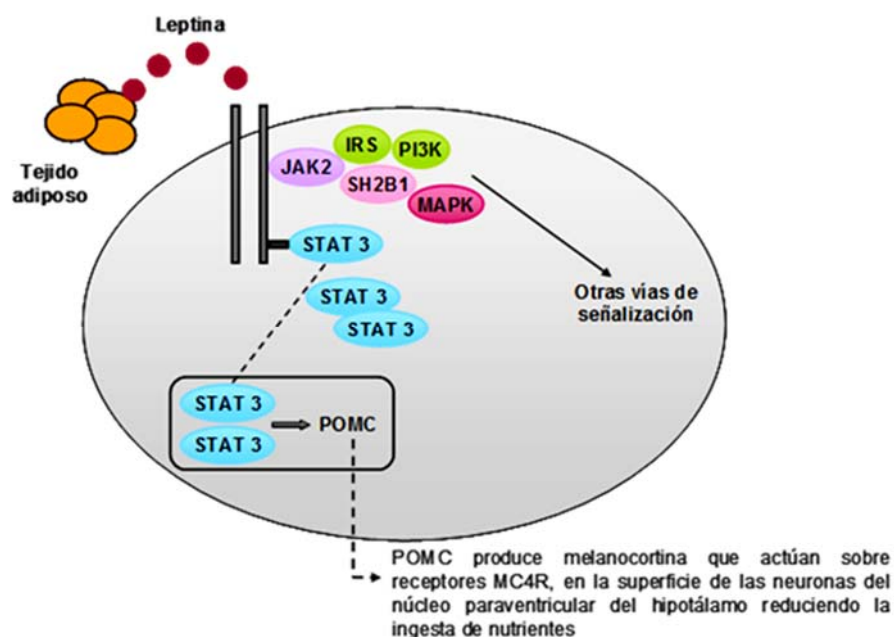


FIGURA 10: Esquema de la vía de señalización de la leptina en una neurona en el núcleo arcuato del hipotálamo, tomada de (Farooqi et al. 2014).

Por lo tanto, la leptina disminuye la ingesta de alimentos, activando neuronas productoras de POMC, que promueve la saciedad y el incremento del gasto de energía e inhibiendo neuronas NPY/AgRP, las cuales estimulan la ingesta de alimentos y suprimen el gasto de energía.

1.5.1 Resistencia a la leptina

D.L Coleman en 1973, tras realizar experimentos con ratones delgados y obesos llegó a la conclusión de que los ratones obesos carecían de una hormona que previene la obesidad actuando a nivel central para regular la ingesta de alimentos, el catabolismo energético, la termogénesis y el metabolismo basal (Coleman 1973). El descubrimiento de la leptina en 1994 (Zhang et al. 1994) generó una esperanza para el tratamiento de la obesidad, se estudió su administración de manera exógena en ratones ob/ob, que carecen de leptina sérica y que muestran un fenotipo de obesidad, mostrando una mejoría significativa en el sistema reproductor y endocrino así como la reducción de la ingesta de alimentos y la pérdida de peso en estos animales (Halaas et al. 1995). Sin embargo, al medir las concentraciones de leptina en plasma en humanos se observó que había una estrecha correlación entre el IMC y las concentraciones de leptina en plasma (Considine et al. 1996). Esto

hizo pensar que existía una resistencia a la leptina y que la obesidad en los seres humanos sería más parecida a la encontrada en los ratones mutantes db/db que carecen de receptores funcionales de leptina (Chen et al. 1996; Chua et al. 1996). Aunque la resistencia a la leptina es raramente debida a la ausencia de receptores, podría ser el resultado de alteraciones de acoplamiento de los receptores a las vías de transducción intracelular o a las dificultades de la leptina para entrar en el cerebro (Mark 2013). Por lo tanto, el tratamiento con leptina sólo era efectivo para un pequeño número de pacientes con obesidad y déficit de leptina (Farr et al. 2015). En los pacientes que presentaban obesidad típica, caracterizada por hiperleptinemia y resistencia a la leptina, esta hormona no fue capaz de inducir una pérdida de peso, pero podría ser útil combinada con otros tratamientos o como mantenimiento de la pérdida de peso.

1.6 EL CUERPO CAROTÍDEO

1.6.1 Localización y estructura del cuerpo carotídeo

Desde el siglo XVIII hasta principios del siglo XX, el Cuerpo Carotídeo (CC) fue considerado una glándula o un ganglio simpático, con innervación secreto-motora al que le atribuyeron numerosos nombres (*ganglion minutum*, *ganglion exiguum*, *ganglion parvum*, *gangliolum intercaroticum*, *glandula intercarotica*, *glomeruli arteriosi intercarotici*) según su estructura, localización y tamaño (ver revisión (Gonzalez et al. 2014)).

En 1928 Fernando de Castro, discípulo de Santiago Ramón y Cajal, demostró, gracias a sus estudios histológicos, que el CC era un órgano sensorial (De Castro 1928), y en 1938 Corneille Heymans, siguiendo las propuestas de Fernando de Castro, recibió el premio Nobel de Medicina por sus estudios sobre la influencia que en el reflejo respiratorio tenían los cambios detectados por el CC en la composición de la sangre.

Hoy en día podemos decir que el CC es un pequeño órgano par, que pertenece al sistema nervioso periférico y está situado en el cuello, en la bifurcación de la arteria carótida común (Figura 11A). El CC es capaz de detectar cambios en la composición química de la sangre (niveles de O₂, CO₂ y pH) y está innervado por el nervio del seno carotídeo (NSC) o nervio de Hering.

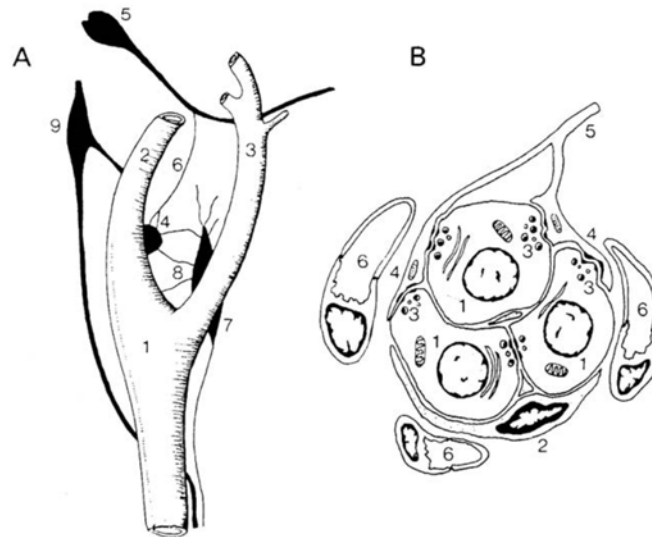


FIGURA 11: Esquema de la bifurcación carotídea de conejo (A) y de un islote celular de cuerpo carotídeo (B). **A.** 1. Arteria carótida común; 2. Arteria carótida interna 3. Arteria carótida externa; 4. Cuerpo carotídeo; 5 y 6. Ganglio petroso y nervio del seno carotídeo; 7 y 8. Ganglio cervical superior y nervios ganglioglomerulares; 9. Ganglio nodoso. **B.** 1. Célula quimiorreceptora; 2. Célula sustentacular; 3. Vesículas sinápticas en las CQ; 4 y 5. Terminaciones y fibra sensorial; 6. Capilares sanguíneos. (Gonzalez et al. 1994).

El CC se organiza en glomérulos o glomoides compuestos por islotes celulares y rodeados por una densa red de capilares. En estos islotes o *clusters* celulares (Figura 11B) encontramos dos tipos de células: células quimiorreceptoras (células tipo I) y células sustentaculares o de soporte (células tipo II).

- a) Las células glómicas, quimiorreceptoras o tipo I (CQ): son las más abundantes (la proporción frente a las células sustentaculares oscila entre 5:1) y las más importantes desde el punto de vista funcional. Su forma es redondeada u ovoidea, tienden a ocupar el centro de los islotes y poseen un núcleo redondeado y claro y un citoplasma rico en mitocondrias y vesículas de núcleo denso que contienen neurotransmisores. Son células cromafines que derivan embriológicamente de la cresta neural (Pearse et al. 1973) y poseen norepinefrina, dopamina, serotonina, acetilcolina (ACh), ATP y péptidos opioides. Estas células, por tanto, son muy ricas en catecolaminas (CA), principalmente dopamina, y la tirosina hidroxilasa, que es la enzima

limitante en la síntesis de estas aminas biógenas, es un marcador específico de las CQ (Figura 12)

- b) Las células sustentaculares, de soporte o tipo II: son células aplanadas, sin especializaciones citoplasmáticas, situadas en la periferia de los islotes rodeando de forma incompleta a las CQ (Verna 1997), tienen un papel de sostén nutritivo y metabólico de las células tipo I. Se las ha considerado como células de soporte de naturaleza neuroglial, pero recientemente se ha sugerido que podrían actuar como células madre precursoras de las células quimiorreceptoras que contribuyen al crecimiento del CC en respuesta a la hipoxia crónica (Pardal et al. 2007).

Los islotes celulares están separados por tejido conectivo y su densa red de capilares facilita la presentación de los estímulos transmitidos por la sangre a las células quimiorreceptoras, ya que la proximidad de los capilares a estas células es inferior a $20\mu\text{M}$. El CC está muy vascularizado, recibe irrigación de la arteria glómica que emerge de la arteria carótida externa o del propio seno carotídeo. Es el órgano con mayor flujo del organismo, en proporción a su tamaño ($1.3\text{l}/100\text{g}/\text{min.}$) y tiene un consumo de O_2 aproximado de $1.5\text{ml}/100\text{g}/\text{min.}$, lo que implica que la diferencia arteriovenosa de O_2 en el CC es mínima (Obeso et al. 1997b).

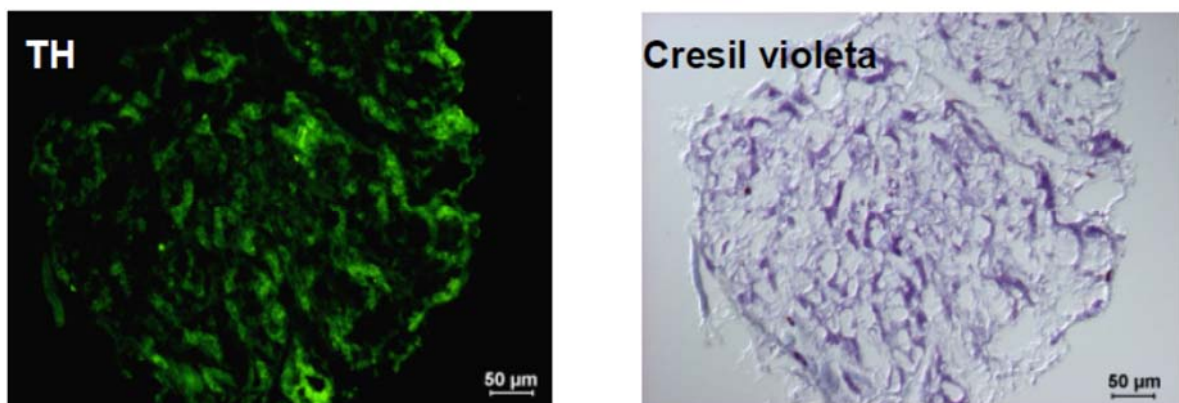


FIGURA 12: Corte histológico de CC de rata. La imagen de la izquierda es un corte de tejido al que se le ha realizado una inmunocitoquímica para tirosina hidroxilasa (TH), mostrándose en verde las células positivas. A la derecha vemos el mismo corte contrateñido con cresil violeta para ver la estructura general del CC. Los espacios vacíos en esta imagen representa la gran densidad de capilares en el tejido.

Esta gran irrigación es lo que le da a este órgano su apariencia esponjosa y su característico color rosado. En la superficie del CC encontramos venas que se encargan del drenaje de este tejido hacia la vena yugular interna. El responsable de la inervación sensorial del CC es el NSC, es una rama del nervio glosofaríngeo cuyos somas se encuentran en el ganglio petroso (Figura 11A). A las fibras sensoriales del NSC se le unen fibras que proceden del nervio vago. El CC también recibe inervación simpática y parasimpática, que se origina en las neuronas del ganglio cervical superior (GCS), en la superficie del CC y en otras neuronas del NSC. Estas fibras son noradrenérgicas y colinérgicas y controlan el flujo sanguíneo del CC, es decir, su actividad funcional (Verna 1997).

1.6.2 Quimiorrepción en el cuerpo carotídeo

Podemos definir la quimiorrepción como la respuesta fisiológica de un órgano sensorial a un estímulo químico. Para que se produzca esta respuesta en el CC las células quimiorreceptoras detectan de forma rápida los cambios en la composición química de la sangre: presión arterial de O₂, CO₂ y pH (DETECCIÓN). Los estímulos que activan al CC se pueden dividir en: estímulos naturales (hipoxia, hipercapnia, acidosis, variaciones de temperatura y osmolaridad de la sangre e hipoglucemia) y estímulos farmacológicos (venenos metabólicos, neurotransmisores). Una vez que el CC detecta el estímulo le sigue la TRANSDUCCIÓN de la señal, es decir la transformación del estímulo en una respuesta secretora, produciéndose la liberación de neurotransmisores. Esta señal química de los neurotransmisores se va a transformar en una señal eléctrica en las terminaciones nerviosas sensoriales por lo tanto la NEUROTRANSMISIÓN sería el paso que comunica las células quimiorreceptoras con las terminaciones nerviosas sensoriales a través de los neurotransmisores liberados, modificando la frecuencia de descargas del NSC (Figura 13). Estas fibras sensoriales provienen de las neuronas del ganglio petroso, y sus proyecciones terminan, junto al nervio glosofaríngeo, en el tronco del encéfalo, en el NTS, situado entre la protuberancia y el bulbo raquídeo (Figura 7) donde se integra la actividad del NSC y desde donde parten las órdenes a los aparatos respiratorios y cardiovasculares (Figura 14)

(EFECTORES), que van a modificar su función para corregir las alteraciones detectadas por el CC.

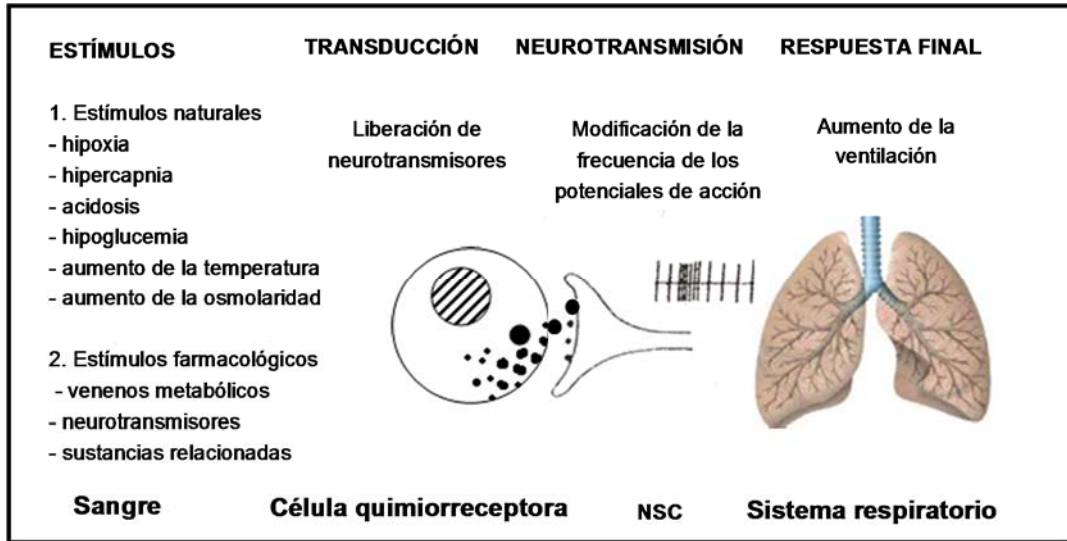


FIGURA 13: Organización funcional del CC y esquema de la quimiorrecepción. Adaptado de (Gonzalez et al. 1994).

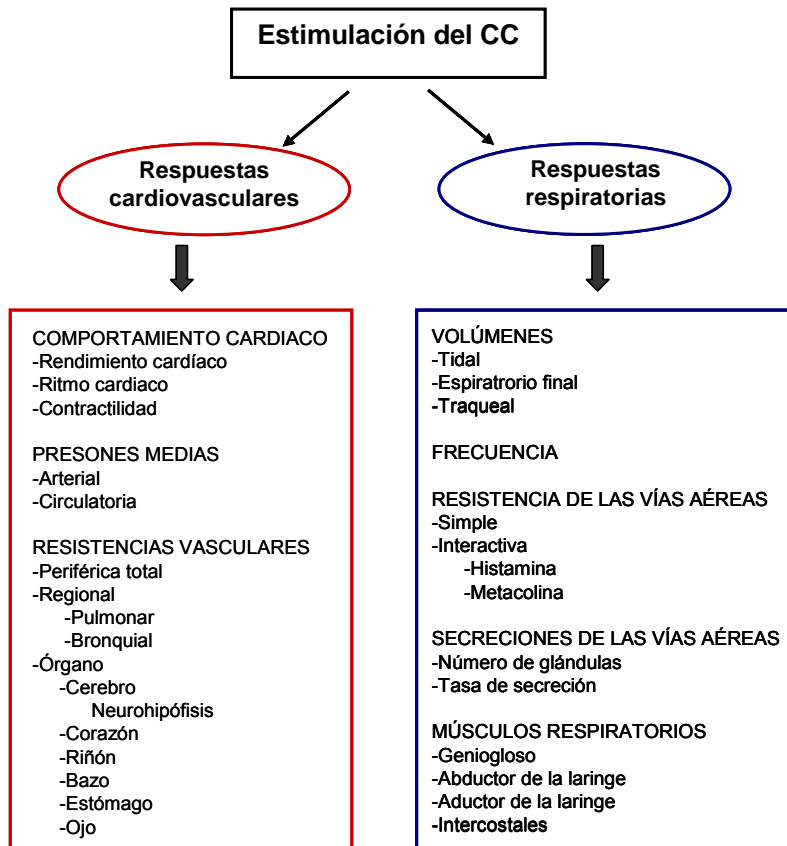


FIGURA 14: Respuestas compensatorias cardiovasculares y respiratorias inducidas por la estimulación del CC (adaptado de (Fitzgerald 2000)).

Teniendo en cuenta este esquema de la quimiorrecepción del CC, en el laboratorio se puede estudiar la respuesta o la función del CC frente a diferentes estímulos en las distintas etapas de la quimiorrecepción. También se puede medir la liberación de neurotransmisores (catecolaminas) (TRANSDUCCIÓN) en las células quimiorreceptoras del CC, la frecuencia de los potenciales de acción del nervio del seno carotídeo (NEUROTRANSMISIÓN) y los efectos a nivel sistémico de parámetros ventilatorios y cardiovasculares (EFECTORES).

1.6.2.1 Transducción a la hipoxia en el cuerpo carotídeo

La hipoxia es un estímulo natural que activa al CC. En los animales terrestres el aporte de O₂ desde la atmósfera hasta las células se realiza a través del aparato respiratorio y circulatorio, en las siguientes etapas: bombeo de aire rico en O₂ desde la atmósfera a los alveolos, difusión del O₂ desde los alveolos a la sangre, unión del O₂ a la hemoglobina, circulación de la sangre rica en O₂ a todos los capilares arteriales del organismo, disociación del O₂ de la hemoglobina, y difusión del O₂ al medio interno, al interior de las células y de ahí a las mitocondrias, donde se oxidan los nutrientes. El CO₂ sigue el recorrido inverso desde la mitocondria a la atmósfera siendo el resultado de este intercambio gaseoso que se produce en la respiración una PaO₂ de 100mmHg y una PaCO₂ entre 35-45mmHg. Por lo tanto, la respiración celular se lleva a cabo en las mitocondrias donde el O₂ es utilizado por las células para oxidar los nutrientes y obtener la energía necesaria (ATP) para la función de la célula, originándose como productos de desecho CO₂ y agua.

Cuando la utilización del O₂ por las células es insuficiente para mantener su función normal hablamos de hipoxia. Hay varios tipos de hipoxia: la hipoxia hipóxica, es la más común y se produce por un aprovisionamiento inadecuado de O₂ a la sangre debido a una disminución de O₂ en el aire inspirado o a la incapacidad del O₂ de pasar a través de la membrana respiratoria pulmonar. La hipoxia anémica, presenta una disminución de la capacidad de transporte del O₂ por la sangre. La hipoxia de éstasis se produce por una disminución del flujo sanguíneo; y la hipoxia histotóxica ocurre cuando las células son incapaces de utilizar el O₂. Fisiológicamente sólo la hipoxia hipóxica es posible en un individuo sano, debido a una disminución de la PO₂ en la atmósfera, como

ocurre a grandes alturas al disminuir la presión barométrica, siendo el límite una disminución de hasta 380mmHg en la presión barométrica, equivalente a una altura de alrededor de 5300m. La hipoxia hipóxica que se produce en las enfermedades pulmonares es patológica, muchas enfermedades cardiorrespiratorias cursan con hipoxia (hipoxia intermitente crónica o hipoxia sostenida crónica) como por ejemplo la AOS y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), entre otras. La hipoxia crónica de estas patologías puede producir modificaciones en la expresión génica de proteínas relacionadas con la homeostasis del O₂.

Las respuestas del organismo ante una hipoxia hipóxica fisiológica se denominan adaptativas y son distintas que las respuestas que se originan ante hipoxias patológicas (Figura 15). En este caso las respuestas son compensatorias de un proceso patológico y una compensación produce un aumento en el tamaño o actividad de una parte de un organismo o un órgano para restablecer la pérdida de función. En cambio las respuestas adaptativas son propias de organismos sanos.

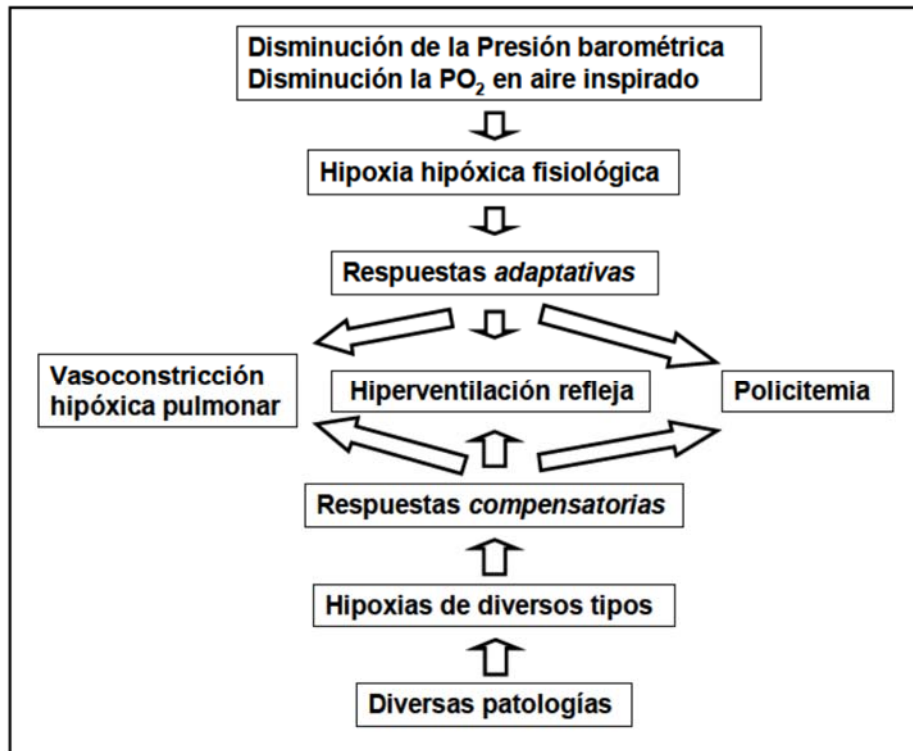


FIGURA 15: Respuesta a la hipoxia hipóxica fisiológica y a la hipoxia patológica en el animal adulto. (Obeso et al. 2006)

En el organismo adulto existen células sensibles a la hipoxia entre las que encontramos:

- Células musculares lisas de las arterias pulmonares, que detectan la hipoxia alveolar y al activarse se contraen para que el flujo sanguíneo se dirija hacia las zonas más oxigenadas (vasoconstricción pulmonar hipóxica)
- Células productoras de eritropoyetina del riñón, que en respuesta a la hipoxia aumentan la producción de eritropoyetina, mejorando la capacidad de la sangre en el transporte del O₂.
- Células quimiorreceptoras de los cuerpos carotídeos y en menor grado los cuerpos aórticos (quimiorreceptores arteriales), encargadas de desencadenar hiperventilación en respuesta a niveles bajos de O₂ en sangre.

Centrándonos en el CC, encontramos varias hipótesis de transducción a la hipoxia: hipótesis metabólica, hipótesis ácida (Winder 1937; Anichkov and Belen'kii 1963), siendo en la actualidad la más aceptada la “hipótesis de membrana” (Figura 16) que propone que las células quimiorreceptoras detectan la disminución de la PaO₂, inhibiéndose los canales de potasio (K⁺) y despolarizándose las células. Esta despolarización de la membrana celular activa la apertura de canales de Na⁺ y Ca²⁺ dependientes de voltaje, que conduce a un aumento de la concentración de Ca²⁺ en el citoplasma, lo cual desencadena la liberación de neurotransmisores y el aumento de la frecuencia de descargas de potenciales de acción del NSC (González et al. 1992). Este aumento de la frecuencia de potenciales de acción se integra a nivel del tronco del encéfalo en el NTS y desde aquí parten las órdenes a los sistemas respiratorios y cardiovasculares que modifican su función, aumentando la ventilación, estimulando el sistema nervioso simpático, modulando el flujo sanguíneo y el rendimiento cardíaco (Gonzalez et al. 1994), con el fin de corregir las alteraciones detectadas por el CC y normalizar los gases sanguíneos arteriales. El umbral fisiológico para la hipoxia se corresponde con una PaO₂ de 70-75mmHg, a partir de esta PaO₂ la pendiente entre la PO₂ y las descargas en el NSC y la ventilación aumentan exponencialmente.

En esta hipótesis de membrana aún hay varios aspectos en la cascada de transducción a la hipoxia sin resolver ya que no se sabe cómo las células quimiorreceptoras detectan la disminución de PO_2 , es decir no se sabe cuál es el sensor de O_2 ; ni cómo se produce el acoplamiento de los mecanismos de detección a los canales de potasio K^+ que van a participar en la despolarización inicial de las células quimiorreceptoras; ni la identidad molecular exacta de los canales de K^+ sensibles a PO_2 implicados en la respuesta a la hipoxia ya que hay variabilidad de especie.

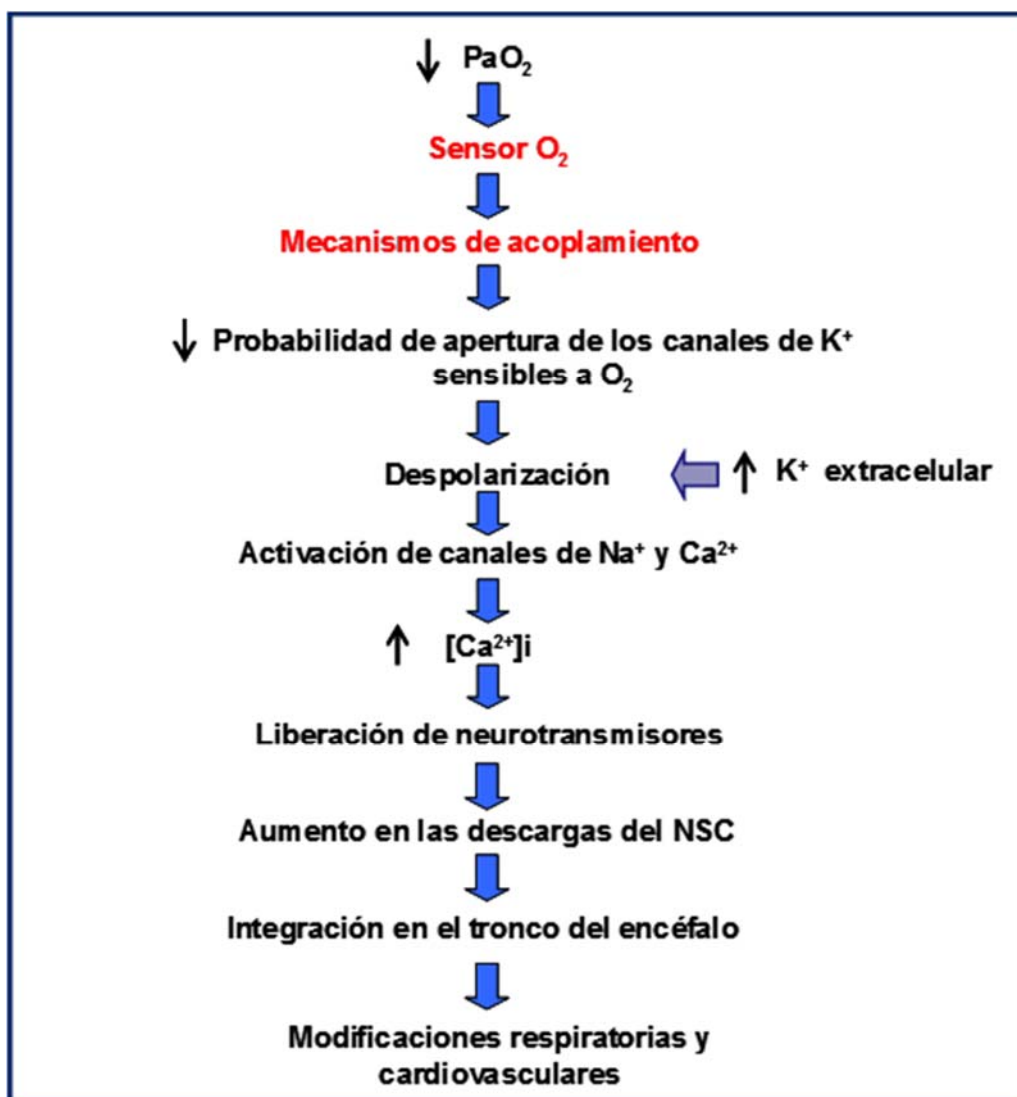


FIGURA 16: Esquema de la cascada de transducción a la hipoxia en el CC según la hipótesis de membrana. En rojo se destaca los pasos aún por definir. Adaptada de (González et al. 1992)

1.7 EL CUERPO CAROTÍDEO Y LA LEPTINA

En dos laboratorios diferentes se ha demostrado la presencia de leptina y receptores de leptina en las células quimiorreceptoras del CC (Porzionato et al. 2011; Messenger et al. 2012). Estos receptores también están presentes en el NTS (Mercer et al. 1998), donde se encuentra el grupo respiratorio dorsal y se localizan los quimiorreceptores centrales respiratorios (Guyenet et al. 2010). Ciriello y Moreau también han demostrado la existencia de neuronas que expresan receptores de leptina en el NTS, estas neuronas reciben señales de los quimiorreceptores del CC y proyectan a áreas vasopresoras de la médula rostroventrolateral (Ciriello and Moreau 2013).

Últimamente, el número de estudios que investigan el papel de la leptina en el sistema respiratorio (Malli et al. 2010) ha ido aumentando, indicando la importancia fisiopatológica de la leptina en la función respiratoria. La administración de leptina por vía subcutánea (O'Donnell et al. 1999) o por vía intravenosa (Chang et al. 2013) parecen estimular la ventilación en modelos animales de ratón y rata, efecto que también se observa cuando la administración de leptina se realiza a nivel central mediante microinyecciones en el NTS (Inyushkin et al. 2009). Teniendo en cuenta estos hechos, en el capítulo 2 de este trabajo de tesis doctoral, hemos querido indagar en el papel de la leptina en el CC estudiando la función de las células quimiorreceptoras y las posibles respuestas en el organismo dado el importante papel fisiológico que parecen tener en la ventilación.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO GENERAL

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO GENERAL

Esta tesis doctoral está dividida en dos capítulos diferentes que presentaremos de manera independiente. Por un lado, el Capítulo 1 titulado “Parámetros metabólicos, estado oxidativo y actividad simpática en modelos experimentales de apnea obstructiva del sueño y obesidad”, y por otro lado el Capítulo 2 que lleva por título “Significado de la leptina en el cuerpo carotídeo. Efectos sobre la ventilación”.

Dada la estructura de esta tesis doctoral exponemos en este apartado una hipótesis y un objetivo general, detallando más adelante en cada capítulo la hipótesis y los objetivos específicos de cada uno de ellos.

HIPÓTESIS

“El estudio de la fisiopatología de la apnea obstructiva del sueño y de la obesidad, así como de la función de la leptina en el cuerpo carotídeo, pueden ser muy útiles para comprender la aparición de alteraciones cardiovasculares, metabólicas, y el papel de la leptina en la ventilación”.

OBJETIVO GENERAL

“Estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la apnea obstructiva del sueño, de la obesidad y de la interacción de ambas patologías y definir la función de la leptina en el cuerpo carotídeo sobre la ventilación”.

CAPÍTULO 1

3. CAPÍTULO 1. PARÁMETROS METABÓLICOS, ESTADO OXIDATIVO Y ACTIVIDAD SIMPÁTICA EN MODELOS EXPERIMENTALES DE APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO Y OBESIDAD

3.1 INTRODUCCIÓN

La apnea obstructiva del sueño (AOS) se caracteriza por obstrucciones repetitivas, totales (apnea) o parciales (hipopnea) de las VAS que ocurren durante el sueño. La duración de cada obstrucción es de 20 a 40 s y pueden producirse más de 60 obstrucciones por hora. La frecuencia de estas obstrucciones o el índice de apnea-hipopnea (IAH) es el criterio clasificatorio más común de la gravedad de la AOS, cuando este índice es mayor de 5 por hora de sueño se diagnostica la AOS, por lo que un IAH inferior a 5 se considera normal, entre 5-15 hablamos de AOS leve, entre 15-30 moderada y más de 30 severa (Butt et al. 2010). Dado que con cada obstrucción la PaO_2 y la saturación de la oxihemoglobina ($SatHbO_2$) disminuyen, hay otros criterios clasificatorios de la gravedad de la AOS basados en el grado de desaturación de la oxihemoglobina (HbO_2) aunque no siempre coinciden con el IAH. La hipoxia (disminución de PaO_2) producida en cada obstrucción activa el CC (Gonzalez et al. 1994) que a su vez activa a las motoneuronas de los músculos inspiratorios y de los músculos dilatadores de las VAS y a las áreas del control sueño-vigilia. La acción muscular y la reacción de despertar vencen la obstrucción y se recupera la PaO_2 . Estos despertares rompen el poder reparador del sueño y generan somnolencia diurna. Los esfuerzos inspiratorios con las vías aéreas obstruidas alteran la presión intratorácica y causan alteraciones hemodinámicas cíclicas. Esta estimulación repetitiva del CC produce una sensibilización de los quimiorreceptores generando una hiperactividad simpática observada tanto en pacientes con síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS) (Punjabi and Polotsky 2005; Bradley and Floras 2009) como en los modelos animales de hipoxia intermitente crónica (HIC) (Fletcher et al. 1992 ; Gonzalez-Martín et al. 2011). Dicho aumento del tono simpático parece ser el origen de la patología cardiovascular asociada a la AOS y ser un posible mecanismo por el cual la AOS aumenta la RI (Lattimore et al. 2003). Los episodios de hipoxia-reoxigenación que imitan la isquemia-reperusión, son los responsables de generar ERO y daño del endotelio vascular (Lavie 2003; Lavie and Lavie 2012) en cuya cascada de señalización

podrían estar involucrados factores de transcripción como el factor NF- κ B implicado en procesos inflamatorios (Bowie and O'Neill 2000; Quintero et al. 2013). Podemos decir que el aumento de las ERO generan un estado permanente de inflamación y disfunción del endotelio vascular, disminuyendo su fenotipo vasodilatador y antiagregante, y facilitando la aparición de dislipemias y procesos aterogénicos, hipertensión y accidentes cardiovasculares, todas ellas patologías encontradas en pacientes con AOS. Por lo tanto, la hipertensión simpática junto con el daño oxidativo producido por la isquemia reperfusión, serían factores primordiales en la génesis de la patología cardiovascular y metabólica asociada a la AOS (Lavie 2015).

Aunque las causas de la AOS son desconocidas, los efectos adversos que generan están bien establecidos. Muchos de los pacientes con AOS presentan patologías asociadas, cardiovasculares, metabólicas (Thomas and Ren 2012) y neuropsiquiátricas (ansiedad, depresión y deterioro cognitivo) (Sateia 2003) las cuales constituyen el SAHS. En este sentido, las alteraciones metabólicas, que en su conjunto conforman el SM y en el que la obesidad es uno de sus componentes principales, constituyen un factor de riesgo claro para el desarrollo del SAHS y el SAHS por si mismo es un factor de riesgo para padecer el SM (Vgontzas et al. 2005). El número y la gravedad de las comorbilidades asociadas a la AOS varía entre unos pacientes y otros y los mecanismos patogénicos que las vinculan siguen sin resolverse. Por lo tanto debido a que la HIC es la consecuencia más directa de la AOS, queremos estudiar la vinculación de la HIC con estas patologías.

Por otro lado, la obesidad está fuertemente ligada a enfermedades respiratorias entre las que encontramos el SAHS. Existen condiciones anatómicas craneofaciales que disminuyen los diámetros de las VAS y que constituyen factores de riesgo para la AOS. En este sentido, la obesidad predispone al desarrollo de la AOS, pudiendo jugar un papel etiológico importante en el desarrollo de la obstrucción, donde además de las anomalías craneofaciales que puedan existir, se suman los factores mecánicos propios de la obesidad. El aumento de las resistencias al flujo de aire debido a la grasa retrofaríngea, estrecharía las vías respiratorias superiores y facilitaría la génesis de la obstrucción produciendo diversos efectos adversos en la ventilación y adquiriendo un patrón ventilatorio restrictivo debido a la grasa

abdominal intratorácica e intraabdominal (Dwivedi et al. 2008; Rabec et al. 2011). Por lo tanto las personas obesas y con sobrepeso son más propensas a tener síntomas respiratorios que los individuos con un IMC normal (Zammit et al. 2010). La frecuencia y la gravedad de la AOS se correlaciona con el IMC y con el peso del sujeto, de hecho la cirugía bariátrica mejora los trastornos del sueño (Sutherland et al. 2012). Es bien conocido la existencia de patologías cardiovasculares y metabólicas en el SAHS asociadas a la obesidad (Duvnjak and Duvnjak 2009) y la existencia de una elevada prevalencia de SAHS entre pacientes obesos (Zammit et al. 2010; Sutherland et al. 2012). Este hecho nos plantea una interrelación bidireccional entre ambos procesos; la obesidad genera o empeora la AOS y/o la AOS agrava la obesidad y las patologías asociadas. Sin embargo, a parte de los factores mecánicos, se sabe poco sobre los mecanismos que vinculan la obesidad y la AOS (Zammit et al. 2010); (Sutherland et al. 2012).

3.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la obesidad, de la AOS y de la interacción entre ambas patologías puede ser experimental y clínicamente muy útiles para prevenir las alteraciones cardiovasculares y metabólicas asociadas a la AOS y a la obesidad.

Con el fin de estudiar estos mecanismos y con el conocimiento de que actualmente estamos ante una "epidemia de obesidad" en curso y una incidencia y prevalencia de la AOS en aumento, nos planteamos las siguientes preguntas a las que queremos dar respuesta

1. ¿Son la obesidad y la AOS factores independientes en la producción de patologías metabólicas y cardiovasculares?
2. ¿La obesidad y la AOS comparten mecanismos patogénicos como el estrés oxidativo y la hiperactividad simpática?
3. ¿La interacción entre la obesidad y la AOS empeora el estrés oxidativo y el tono simpático, agravando las patologías metabólicas y cardiovasculares?

Para poder dar respuesta a estas preguntas proponemos los siguientes objetivos específicos.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Comprobar si los modelos animales elegidos (HIC=AOS y dieta rica en grasa=Obesidad) son los adecuados para este estudio.
- 2) Definir los mecanismos fisiopatológicos de la obesidad y de la AOS estudiando los efectos que producen la HIC y la dieta rica en grasa en ratas sobre:
 - ventilación
 - actividad simpática
 - estado redox (estrés oxidativo) y parámetros inflamatorios
 - metabolismo de lípidos y glúcidos
- 3) Estudiar los efectos de la asociación de la HIC y la dieta rica en grasa sobre la ventilación, alteraciones cardiovasculares, estrés oxidativo y alteraciones metabólicas (estudiando todos los parámetros descritos en el objetivo 2)

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Modelo animal

3.4.1.1 Animales y diseño experimental

En este trabajo se han utilizado un total de 160 ratas Wistar machos de 24 semanas de edad alojadas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, con libre acceso a agua y comida, bajo condiciones controladas de luz, humedad y temperatura cumpliendo la legislación actual vigente sobre bienestar animal (Real Decreto 53/2013, Artículo 6). Todos los animales se alimentaron con dieta control (Teklad Global Rodent Maintenance Diet, 3.5% grasa HARLAN) hasta que alcanzaron las 12 semanas de edad (200-300g), momento en el cual los animales fueron divididos de forma aleatoria en cuatro grupos según la dieta y el protocolo específico establecido de HIC (Figura 17): 1) Controles (C, n=40 ratas) alimentados con dieta control (3.8 kcal/g con 10% kcal de grasa; D12450B; Open Source Diets), hasta que las ratas alcanzaron las 24 semanas de edad; 2) Controles sometidos a HIC (CHI, n=40 ratas) alimentados con dieta control hasta las 24 semanas de edad y expuestos a HIC (40s,5%O₂/80s, 30 episodios/h; 8h/día) las dos últimas semanas (de la semana 22 a la 24); 3) Grupo Obeso (O, n=40 ratas), alimentados desde la semana 13 hasta la semana 24 (12 semanas) con una

dieta rica en grasa (5.2 kcal/g con 60% kcal de grasa; D12492; Open Source Diets); 4) Grupo Obeso sometidos a hipoxia intermitente crónica (OHI, n=40 ratas) alimentados con la misma dieta que el grupo Obeso durante el mismo tiempo (de la semana 13 hasta la semana 24 de edad; 12 semanas) y además expuestos a HIC (40s,5%O₂/80s, 30 episodios/h; 8h/día) las dos últimas semanas (de la semana 22 a la 24 de edad).

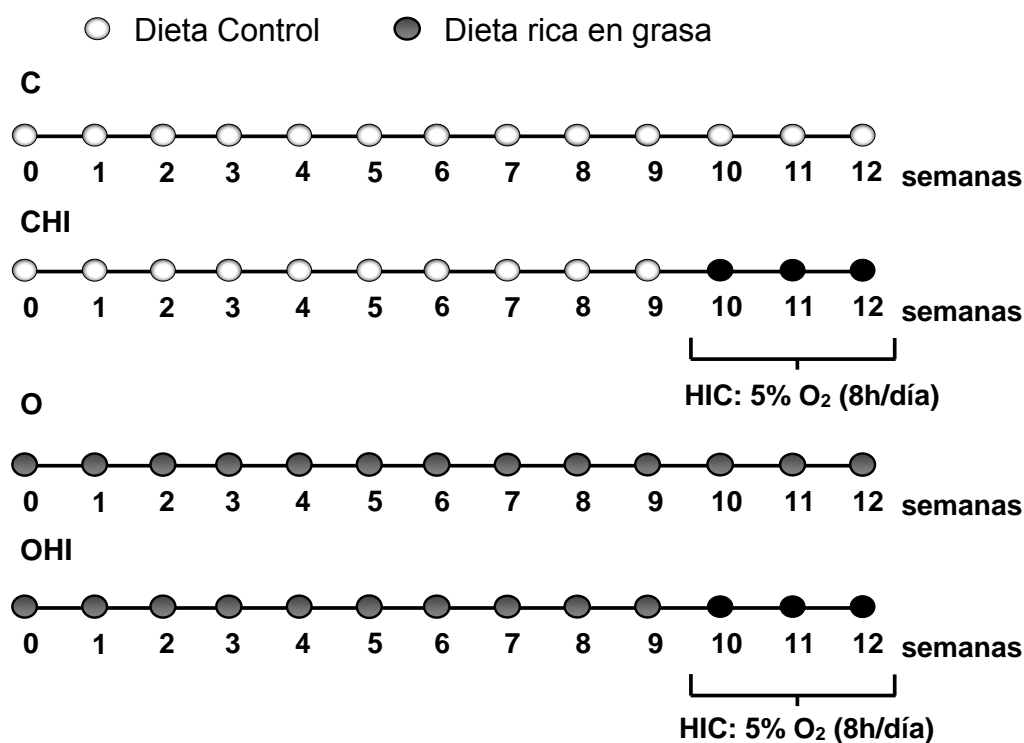


FIGURA 17: Grupos y protocolos experimentales: C (animales alimentados con dieta control, no expuestos a HIC); CHI (animales alimentados con dieta control expuestos a HIC (5%O₂) durante las 2 últimas semanas); O (animales alimentados con dieta rica en grasa, no expuestos a HIC); OHI (animales alimentados con dieta rica en grasa expuestos a HIC (5%O₂) durante las 2 últimas semanas)

A) Procedimientos con animales sin anestésicos

En todas las ratas de los distintos grupos experimentales hemos analizado:

- El peso corporal semanalmente desde la semana 13 hasta la 24 de edad, con el fin de valorar en los distintos grupos experimentales el efecto de las dietas y de la HIC sobre el peso de cada animal.

- Parámetros ventilatorios mediante la realización de pletismografía en las semanas 0, 5, 10 y 12 para medir el VC, la FR y el VM en situaciones de normoxia, diferentes intensidades de hipoxia aguda (12, 10 y 7% O₂) e hipercapnia (5%CO₂ en aire).

B) Procedimientos con animales anestesiados

Debido a la incompatibilidad de realizar ciertas determinaciones en los mismos animales, y con el fin de no interferir en las medidas a realizar según nuestro diseño experimental, cada uno de los distintos grupos experimentales, C, CHI, O y OHI, formado por 40 ratas cada uno, se dividieron en subgrupos de ratas destinados a la realización de los diferentes tipos de procedimientos experimentales:

- Medidas de PA y peso de grasas
- Estudio de diversos tejidos in vitro.
- Estudio de la tolerancia a la glucosa
- Medida de CA en plasma

Al finalizar las 12 semanas de dieta (24 semanas de edad), coincidiendo con el último día de exposición a HIC de los animales de los grupos CHI y OHI, y tras realizar en el animal despierto la pletismografía correspondiente y el control de peso, los animales se mantuvieron en ayunas (8-12 horas) durante la noche. Al día siguiente por la mañana, se procedió a realizar las cirugías correspondientes para los distintos procedimientos de análisis, previa anestesia de cada animal. El subgrupo de animales de cada grupo experimental destinado para la medida de PA, se anestesió con ketamina (100 mg/Kg) y diazepam (1.7mg/Kg) vía intraperitoneal. Para el resto de medidas todos los animales se anestesiaron con pentobarbital (60 mg/kg peso; i.p.). Para que la recogida de muestras y medida de distintos parámetros no se viera condicionada por un número excesivo de animales, los experimentos se diseñaron para trabajar con cuatro a seis ratas cada día. Para ello, el inicio de la alimentación con cada dieta específica y la exposición a HIC se hizo de forma escalonada y progresiva. Los animales controles siguieron la misma cadencia que los experimentales para hacer los datos comparables entre los distintos grupos. Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción cardíaca en el ventrículo izquierdo tras hacer una toracotomía en los animales

anestesiados. El anticoagulante utilizado fue EDTA-K₂ (Venosafe), excepto para la determinación de las CA en plasma que utilizamos citrato sódico [85mM] en una proporción (1mL de citrato por 5mL de sangre total). Al finalizar todos los procedimientos experimentales y siguiendo la normativa, se llevó a cabo la eutanasia de los animales mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg/kg de peso). Todos los procedimientos y protocolos diseñados para la realización de este trabajo, fueron autorizados por el Comité de Ética en Experimentación y Bienestar Animal (CEEBA) que es el órgano encargado del Bienestar de los Animales (OEBA) de la Universidad de Valladolid. Todos los protocolos se realizaron siguiendo la normativa vigente conforme lo dispuesto en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero.

3.4.1.2 Hipoxia intermitente crónica

El protocolo de hipoxia intermitente crónica (HIC) utilizado en el presente estudio (Figura 18) consistió en ciclos de exposición a 5%O₂; 40s (desde que se inicia la hipoxia hasta la recuperación), seguido de 80s de aire. Cada ciclo dura 2 minutos que corresponde con 30 ciclos/hora y se repiten durante 8 horas al día (de 8:00-16:00h, que es el tiempo de inactividad de las ratas) durante 14 días. Tras las ocho horas de HIC los animales se devolvían a sus jaulas donde respiraban aire ambiente (21% O₂) hasta el día siguiente.

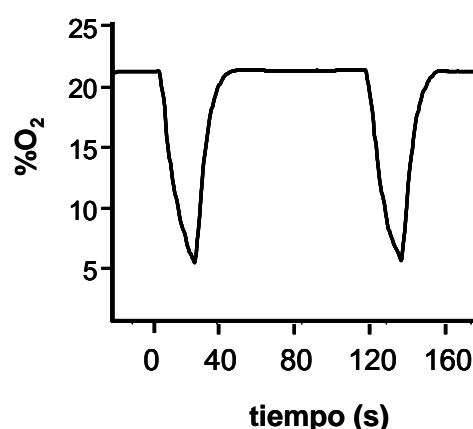


FIGURA 18: Equipo y jaulas de exposición a la hipoxia intermitente crónica (imagen de la derecha). Gráfico de dos ciclos de HIC representando los % de O₂ en el eje Y, y los tiempos de exposición en segundos (s) en el eje X.

Las cámaras empleadas para la HIC tienen unas dimensiones de 34 x 28 x 20 cm, donde los animales se mueven libremente con acceso a agua y comida *ad libitum*. El sistema tiene 3 electroválvulas que controlan la entrada en las cámaras de aire o de nitrógeno según el momento del ciclo en que se encuentre. La válvula 1 consigue que el interior de la cámara alcance el punto más bajo de O₂ (hipoxia 5%O₂) en 22s, la válvula 2 permite restablecer en 18s la situación de normoxia (20-21% O₂), y la válvula 3 se encarga de mantener la situación de normoxia hasta el comienzo del nuevo ciclo durante 80s. Para controlar en todo momento el porcentaje de O₂ al que la ratas están expuestas conectamos un detector de O₂ (Oxydig Dräger) a una de las cámaras y registramos la señal en un ordenador a través de una tarjeta de adquisición de datos que nos permite ver a tiempo real los cambios en el porcentaje de O₂ que ocurre en cada uno de los ciclos durante las 8 horas que dura el experimento.

En experimentos recientes realizados en nuestro laboratorio hemos estudiado los cambios de la PaO₂ durante los ciclos de HIC 5%O₂, ya que la gravedad de la AOS también se relaciona con la SatHbO₂ (Chaudhary et al. 1998). Para ello introducíamos en la cámara de HIC una rata anestesiada con la arteria carótida previamente canulada para poder obtener muestras de sangre en situaciones de normoxia (21%O₂) y de hipoxia (5%O₂). La sangre fue analizada inmediatamente en un analizador de gases (ABL 5 RADIOMETER COPENHAGEN), comprobando como la PaO₂ disminuía pasando de 84.5 ± 2.6 mmHg (21%O₂) a 37.2 ± 0.9 mmHg (5%O₂) (Quintero et al. 2013).

3.4.2 Parámetros generales. Pesos de animales, grasas retroperitoneal y epididimal

Con el objetivo de asegurarnos que teníamos un buen modelo de animal obeso, se controló el peso de los animales desde la semana 13 cuando empiezan a tomar las dietas específicas para cada grupo experimental (rica en grasa para los grupos O y dieta control para los grupos C), hasta la semana 24 cuando finaliza el estudio (12 semanas en total). Tras las 12 semanas de dieta controlada en las ratas anestesiadas recogimos la grasa retroperitoneal y epididimal en los cuatro grupos de animales, colocándolas sobre unas placas de petri para posteriormente pesarlas en una balanza. En estudios recientes se ha demostrado una asociación entre la hipertensión arterial y la grasa visceral,

especialmente la grasa retroperitoneal, que rodea los riñones y las glándulas adrenales (Chandra et al. 2014).

3.4.3 Parámetros respiratorios. Pletismografía

Para evaluar la función respiratoria en las ratas sin anestesiarse, se estudió la respuesta ventilatoria a la hipoxia e hipercapnia en animal despierto mediante técnicas de pletismografía (no invasivas) (Gonzalez-Martín et al. 2011). Utilizamos un pletismógrafo de cuerpo completo (EMKA, Technologies) compuesto de cuatro cámaras de metacrilato de 5 litros de capacidad cada una a las que administramos un flujo continuo de una mezcla de gases determinada según el protocolo experimental de 2 l / min, a través de un caudalímetro (Key Instruments). El sistema se calibraba todos los días inyectando un volumen de 5mL de aire en cada cámara, lo que permite al equipo estimar el VC. Una vez calibrado se colocó una rata en cada cámara del pletismógrafo, respirando aire durante 30 minutos para su adaptación a la cámara y adquisición de un comportamiento de reposo. Tras este periodo de adaptación o aclimatación al entorno se les sometió al siguiente protocolo experimental (Figura 19):

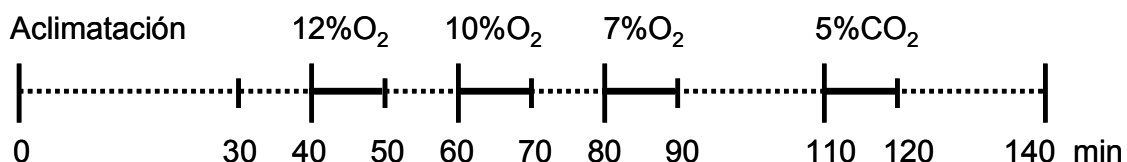


FIGURA 19: Protocolo de pletismografía para medir los parámetros ventilatorios en respuesta a aire (línea discontinua) y a diferentes intensidades de hipoxia (12%O₂; 10%O₂ y 7%O₂) e hipercapnia (línea continua).

Se analizó la FR, el VC y el VM (FR x VC) mientras los animales respiraban aire (línea discontinua), diferentes situaciones de hipoxia aguda o hipercapnia (línea continua). Entre cada episodio de hipoxia las ratas respiraban aire durante 10 minutos excepto después de la hipoxia del 7% de O₂ y de la hipercapnia donde el tiempo de recuperación respirando aire fue de 20 minutos. Las señales registradas por el pletismógrafo se monitorizaron mediante un analizador de la marca Buxco (Buxco gas Analyzer) y los datos se

guardaron para su visualización y análisis posterior con el software Buxco FinePointe Review. La temperatura en las cámaras fue monitorizada y mantenida dentro de un rango neutro (26-29°C) (Gordon)

3.4.4 Parámetros relacionados con la actividad simpática

3.4.4.1 Presión arterial sistémica y frecuencia cardíaca

Para realizar el registro de la PA, los animales fueron anestesiados con ketamina + diazepam (100 mg/Kg + 1.7mg/Kg; i.p), manteniendo estable la temperatura del animal durante todo el experimento gracias a una Manta Calefactora con Termorregulador modelo RTC1 (CIBERTEC). Una vez anestesiada la rata se le colocaba sobre la manta térmica conectando el termómetro rectal para controlar la temperatura del animal, posteriormente se le hacía una traqueotomía a través de la cual mediante una cánula se le ventilaba aire ambiente con un respirador Harvard Rodent Ventilator Model 683 a una frecuencia de 60 ventilaciones por minuto. El volumen tidal fue ajustado teniendo en cuenta el peso del animal aproximadamente 2.4mL para una rata de 300g. Una vez ajustados estos parámetros se localizaba la arteria carótida común donde introducíamos un catéter (SELDICATH 3F plastimed PRODIMED) conectándolo a un transductor de presión (TRANSPAC IV, ICU Medical, Inc. San Clemente, CA 92673 USA). Tras tener al animal conectado al respirador aproximadamente 5 minutos para su estabilización, se realizaba una extracción de sangre de 0.2mL en la arteria carótida común previamente canulada para hacer una gasometría (ABL 5, RADIOMETER COPENHAGEN), y comprobar que los valores eran adecuados y que la rata estaba bien ventilada. A continuación, se le dejaba unos minutos respirando aire, y cuando el registro de presión arterial era estable (aproximadamente 2 minutos), se ventilaba con hipoxia 10%O₂ durante 3 minutos para estudiar el reflejo barorreceptor, tiempo suficiente para que se estabilizara la presión. Después se ventilaba de nuevo con aire para ver la recuperación continuando con el registro hasta que se estabilizaba. Este protocolo fue diseñado para estudiar en nuestros modelos experimentales los posibles cambios en la presión arterial y para explorar el reflejo barorreceptor, fundamental en el control de la FC y de la presión arterial. La señal fue detectada por el sistema BIOPAC MP150 conectado a una tarjeta de adquisición de datos PowerLab 16SP

AdInstruments transformando la señal analógica en digital. Los datos de la PA y de la FC se registraron y analizaron utilizando el programa Chart 4.

3.4.4.2 Catecolaminas en plasma

La estabilidad de las catecolaminas (CA) y sus metabolitos en plasma es muy lábil, por lo que cuando se recogen las muestras de plasma para la determinación de CA debemos de tener en cuenta variables que pueden alterar su estabilidad, entre ellas el estrés que puede sufrir el animal durante el experimento. Para minimizar este estrés acostumbrábamos a los animales a nuestra manipulación intentando que estuvieran lo más tranquilos y evitando en todo momento cualquier posible sufrimiento, a continuación les anestesiábamos con pentobarbital sódico (60mg/kg i.p.). También tuvimos en cuenta la hora de la extracción de las muestras, realizándose siempre por la mañana, una vez que estaban bien anestesiados accedíamos al corazón haciendo una toracotomía y tomábamos la muestra de sangre siempre del ventrículo izquierdo, ya que las concentraciones de CA varían si la sangre es arterial o venosa (Peaston and Weinkove 2004). La sangre fue recogida en tubos con anticoagulante, en este caso citrato sódico 0.085M (1mL/5mL de sangre), y fue centrifugada a 1000g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a tubos eppendorf que contenían metabisulfito sódico (0.06mg/mL de plasma) y posteriormente se congeló a -80°C hasta su análisis en HPLC-ED. Para la determinación de CA en plasma, es necesario acondicionar la muestra mediante el uso de unos cartuchos de la marca comercial Waters (Oasis-HLB de 1mL) que contienen un adsorbente de fase inversa polimérica universal (30mg) para la extracción de una amplia gama de compuestos entre los que se encuentran las aminas. Tras el adecuado tratamiento de los cartuchos, se cargaba la muestra que finalmente se eluía con ácido cítrico 26.7 mM, pH = 2.9 y 2.5% metanol (MeOH) (Raggi et al. 1999) consiguiendo una recuperación del 98%. Posteriormente se inyectaba directamente en el HPLC-ED o se congelaba de nuevo a -80°C hasta su análisis. El sistema HPLC-ED está compuesto por una bomba Waters 600 Controller, un inyector automático de Waters 717 plus Autosampler, una columna de Phenomenex Gemini 5u C18 110A (150x4.60mm), un detector electroquímico BAS LC-4C con celda electroquímica CC-5E y una tarjeta de

adquisición de datos Peak Simple Chromatography Data System SRI Model 202. Los datos son registrados y analizados con el programa informático Peak Simple 3.29. La identificación y cuantificación de las CA en plasma, se realizó utilizando estándares de concentraciones conocidas inyectados previamente en el HPLC-ED (voltaje 0.65 V y sensibilidad 1 nA). La fase móvil utilizada fue 25mM Na₂HPO₄, 0.65mM OSS (ácido 1-octanosulfónico sal sódica), 0.1mM EDTA pH = 3.6 y 6% MeOH, con flujo de 1mL/minuto.

3.4.4.3 Contenido y síntesis de catecolaminas en arteria renal

Para estudiar el contenido y la síntesis de CA en arteria renal (AR), se extrajeron mediante cirugía las AR y se realizó una microcirugía para retirar el tejido graso y conectivo circundante. A continuación se incubaron las AR durante 2 horas a 37°C en un vial con medio de incubación que consistió en solución Tyrode (NaCl, 140mM; KCl, 5mM; CaCl₂, 2mM; MgCl₂, 1.1mM; HEPES, 10mM; glucosa, 5mM; pH 7.40) con 30μM de 3,5-³H-tirosina (precursor natural de las CA; con una actividad específica de 6Ci/mmol Perkin Elmer) con 0.1mM de DL-metil-tetrahidrobiopterina y 1mM de ácido ascórbico (cofactores de la tirosina hidroxilasa y de la dopamina β-hidroxilasa respectivamente); la presencia de estos dos cofactores optimiza el marcaje de los depósitos de CA (Fidone and Gonzalez 1982 ; Vicario et al. 2000). Finalizada la incubación, las AR se transfirieron a viales con 10mL de solución Tyrode libre de precursores durante 5 minutos a 4°C para lavar la ³[H]-tirosina no incorporada a CA, presente en el medio extracelular. A continuación las AR se pusieron en un *ependorf* con 200μl de PCA 0.1N / EDTA 0.1mM, se pesaron y homogeneizaron en frío con un homogeneizador de tejidos vidrio/vidrio en un volumen final de 300μl. Posteriormente se centrifugaron a 16000g durante 10 minutos y el sobrenadante se congeló a -80°C para su posterior determinación por HPLC-ED. En la misma muestra se analizó el contenido y la síntesis de CA. Se inyectó 50μl de muestra en el sistema HPLC-ED y mediante estándares externos previamente preparados e inyectados en el sistema, se determinó el contenido de las CA. La síntesis de CA se midió colectando fracciones de 1mL de la muestra previamente inyectada en el HPLC en viales a los que luego se añadía 4mL de líquido de centelleo para medir su

marcaje radiactivo en un contador de centelleo (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer). En estos experimentos era muy importante la separación de las CA en el cromatograma para poder identificar y coleccionar bien cada fracción, para ello utilizamos las siguientes condiciones cromatográficas: fase móvil 25 mM Na₂HPO₄, pH =3.35 y 4% MeOH; Voltaje 0.85V sensibilidad 1nA; flujo de 1mL/min.

3.4.5 Medida de proteínas: Método Bradford

La determinación de proteínas en nuestras muestras es necesaria para la correcta cuantificación de algunos de los parámetros estudiados (actividad enzimática de la SOD, medida de LPO, actividad aconitasa/fumarasa y activación del NF-kB en extractos nucleares), para ello seguimos el método de Bradford (Bradford 1976) utilizando bradford comercial (Brilliant Blue G, SIGMA). El procedimiento está basado en la formación de un complejo entre el colorante, Brilliant Blue G, y las proteínas en solución. El complejo colorante-proteína produce un cambio en la absorbancia máxima del colorante de 465 a 595nm, siendo la cantidad de absorción proporcional a las proteínas presentes en la muestra. El rango de concentración lineal va de 0.1-1.4mg/mL de proteína, utilizando BSA (albúmina de suero bovino) como estándar de proteínas. El procedimiento consistió en mezclar 1 parte de muestra donde se quiere medir las proteínas con 30 partes del reactivo de Bradford. En cada determinación se hizo un blanco y una curva patrón de concentraciones de proteínas conocidas. El ensayo se realizó a temperatura ambiente midiendo la absorbancia a 595nm y determinando la concentración de proteínas por interpolación en nuestra curva patrón.

3.4.6 Estrés oxidativo

Para determinar el daño oxidativo, causado por la HIC y/o por la dieta rica en grasa en nuestros grupos de animales, se estudió en el tejido hepático el posible aumento de estrés oxidativo a nivel mitocondrial, midiendo el cociente aconitasa/fumarasa; a nivel lipídico, determinando los LPO; y a nivel del ADN, valorando el 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina. También se han tenido en cuenta enzimas antioxidantes como la SOD, estudiando su actividad

enzimática y su expresión para tener una visión global del equilibrio entre radicales libres y antioxidantes.

3.4.6.1 Superóxido dismutasa. Western Blot

La enzima SOD fue descubierta por McCord y Fridovich en 1969 (McCord and Fridovich 1969) y constituye la primera línea de defensa antioxidante en los tejidos ya que cataliza la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en oxígeno molecular (O_2) y H_2O_2 , siendo una de las enzimas antioxidantes más importantes. El citosol de prácticamente todas las células eucariotas contiene una enzima SOD con cobre y zinc (Cu,Zn SOD) y las mitocondrias contienen una forma con manganeso (Mn-SOD). Mediante Western Blot se estudió la expresión de estas dos enzimas en muestras de hígado de los distintos grupos de animales. Para ello se homogeneizó el hígado de las ratas en un buffer de lisis (100mg tejido / 300 μ l de buffer; compuesto por 250mM de sacarosa; 1mM EDTA; 10mM Hepes; pH 7.5) que contenía inhibidores de proteasas y de fosfatasa. Tras homogeneizar se centrifugó inicialmente a baja velocidad (2900g, 20min. 4°C) para desechar la fracción nuclear, y el sobrenadante resultante se volvió a centrifugar a (16100g, 45min., 4°C) para obtener un nuevo sobrenadante que correspondía a la fracción citoplasmática para el ensayo de Cu,Zn-SOD. El pellet fue resuspendido en buffer de lisis (4°C) con 1%SDS+1mM de ditioneitol, mediante agitación con vortex frecuentemente durante 30 minutos, la muestra se volvió a centrifugar (16100g, 30min., a temperatura ambiente) y el sobrenadante (fracción mitocondrial) se guardó para el ensayo de Mn-SOD. Las proteínas de muestras con 50 μ g (fracción citoplasmática) y 25 μ g (fracción mitocondrial) de proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 12%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno PVDF (InmobilonTM-P, Millipore) con un buffer de transferencia (25mM Tris Base, 190mM Glicina y 20% MeOH), en un Mini Trans-Blot (Bio-Rad). Después de bloquear la membrana con 5% de leche en polvo desnatada diluida en buffer TTBS (buffer Tris salino 20mM Tris Base, 500mM NaCl y 0.1% Tween-20 a pH 7.5), la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario según la proteína a estudiar: anti Cu,Zn-SOD (antisuero de conejo;

Millipore; 1:5000), anti-Mn-SOD (antisuero de conejo 0.5 μ g/mL; Millipore) y anti β -actina (antisuero de ratón 1:5000; SIGMA). Tras una serie de lavados con TTBS, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (1:20000 para SODs), y con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón (BD Pharmingen 1:1000, para β -actina). Todos los anticuerpos fueron resuspendidos en TTBS con 0.1%BSA. Habitualmente, después de una primera incubación con los anticuerpos de interés y el revelado para ver la expresión de la proteína a estudiar, se realizó un *stripping* de la membrana y una segunda incubación de la misma con el anticuerpo anti β -actina. De este modo nos asegurábamos que la cantidad de proteínas era exactamente la misma en ambos casos, y que tanto la electroforesis como la transferencia de las proteínas a la membrana se habían realizado de forma simultánea. El protocolo de *stripping* de la membrana consistió en dos incubaciones con agitación durante 15 minutos cada una a temperatura ambiente con la solución de *stripping* (200mM Glicina 3.47mM SDS; 1% Tween 20 pH 2.2), la membrana se lavó con TTBS, quedando libre de anticuerpos y lista para ser reutilizada.

Para la visualización de las bandas de proteínas la membrana se reveló mediante un sistema de quimioluminiscencia, (ECL; Perkin Elmer); para analizar los resultados detectamos el aumento de la quimioluminiscencia de las bandas automáticamente con Versadoc; Quantity One 4.5.2.; Bio-Rad o de forma manual utilizando películas sensibles a sistemas de quimioluminiscencia como es el ECL Amersham Hyperfilm. La densidad óptica de las bandas fue determinada con el software ImageJ. Una vez normalizados los valores con la banda de β -actina para corregir las posibles desviaciones en la carga de proteínas se hizo un promedio de todos los geles y se analizó el cambio de expresión de la enzima en las muestras de cada grupo de animales. Las densidades ópticas de las bandas correspondientes a los tejidos experimentales se compararon con las de los controles.

3.4.6.2 Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa.

Además de estudiar la expresión de las enzimas Cu,Zn-SOD y Mn-SOD, se determinó su actividad enzimática debido a su importancia en la

defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. Para ello se utilizaron piezas de hígado, que tras ser pesadas, fueron homogeneizadas en frío en buffer 10mM Tris HCl (pH7.4), 1mM de EDTA, 0.25M sacarosa, añadiendo un volumen 5 veces el peso del hígado. Se tomó una alícuota del homogeneizado para determinar proteínas según el método de Bradford (Bradford 1976) y el resto se centrifugó recogiendo el sobrenadante. La actividad de la SOD se determinó mediante un kit comercial (Ref.:19160 Fluka/Sigma-Aldrich) que permite realizar las medidas en placa de 96 pocillos realizando diferentes diluciones según la determinación de SOD total (1:200) o SOD mitocondrial (1:20). Para la determinación de la forma mitocondrial de la SOD (MnSOD), se le añadió a la muestra cianuro potásico 3mM, que inhibe la actividad de la forma citosólica (Cu,Zn-SOD). La actividad de la enzima Cu,Zn-SOD, se obtuvo simplemente por diferencia entre la SOD total y la Mn-SOD. La determinación tanto de la SOD total como de la Mn-SOD se basa en el empleo de una sal de tetrazolio muy soluble en agua, WST-1(2-(4-Yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) en forma de sal monosódica, que al reducirse con el anión $O_2^{\cdot-}$ produce un dieno-formazan que es medible espectrofotométricamente a 450nm. La velocidad de reducción con el O_2 está directamente relacionada con la actividad de la xantina oxidasa (XO) y está inhibida por la SOD (Figura 20). De modo que es posible determinar la actividad enzimática de la SOD en función del % de inhibición de la formación del formazan, interpolándolo en una curva patrón realizada con diferentes unidades enzimáticas de una enzima SOD comercial.

$$\% \text{ Inhibición} = [(A_o \text{ B1}-A_o \text{ B3})-(A_o \text{ muestra} - A_o \text{ B2}) / (A_o \text{ B1}-A_o \text{ B3})] \times 100.$$

Absorbancia (A_o) B1 = absorbancia máxima que presenta el WST-1 presente en la reacción en ausencia de SOD (200 μl WST+ 20 μl agua + 20 μl enzima).

A_o B3 = absorbancia del blanco (200 μl WST + 20 μl agua + 20 μl buffer de dilución).

A_o muestra = absorbancia de la muestra (200 μl WST + 20 μl muestra + 20 μl enzima).

Ao B2 = absorbancia del blanco de la muestra (200 μ l WST + 20 μ l muestra + 20 μ l agua).

Posteriormente se calcularon las unidades enzimáticas / mg proteína (definiendo una unidad como la cantidad de enzima que inhibe un 50% la reducción del citocromo c producida por el anión $O_2^{\cdot-}$ generado mediante la reacción de acoplamiento de la XO a 25°C por minuto y a un pH 7.8).

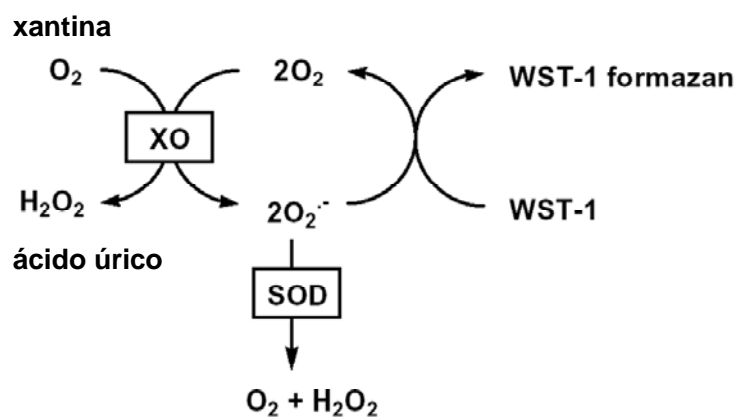


FIGURA 20: Esquema del principio del kit comercial utilizado para la determinación de SOD.

3.4.6.3 Niveles de peróxidos lipídicos en hígado

Los LPO producidos por la reacción de ácidos grasos insaturados con las ERO, preferencialmente con los radicales hidroxilos ($HO\cdot$), producen alteraciones en estructuras ricas en ácidos grasos insaturados como son las membranas celulares, dañando su permeabilidad y pudiendo producir la muerte celular. Estos LPO no son estables, se destruyen generando malonaldehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HNE), siendo estos dos compuestos los que se miden para valorar LPO en tejidos y células. Para ello se emplearon las instrucciones facilitadas por el fabricante del kit para determinar LPO (BIOXYTECH LPO-586; Oxis Health Products, Portland, USA). El fundamento de esta técnica se basa en la reacción de un cromógeno el N-metil-2-fenilindol con MDA y 4-HNE para producir un compuesto coloreado estable con una absorbancia máxima a 586nm. El tejido fue homogeneizado en un volumen de buffer Tris-HCL (20mM y pH7.4) 5 veces el peso húmedo de tejido tomado para realizar la determinación. Un pequeño volumen del homogeneizado se separa para la posterior determinación de proteínas. A 1mL del homogeneizado se

añaden 10 μ l de hidroxitolueno butilado 0.5M en acetonitrilo para prevenir la oxidación de la muestra. Los homogeneizados fueron centrifugados (3000g; 4°C; 10min.) y el sobrenadante se empleó inmediatamente para la determinación o se almacenó a -80°C. A 200 μ l de sobrenadante (microsomas) se le añaden 650 μ l del cromógeno (N-metil-2-fenilindol, 10.3mM en acetonitrilo) y se agita enérgicamente. Posteriormente se añaden 150 μ l de ácido metanosulfónico 15.4M, se agita y se incuba 40min. a 45°C. Tras esto las muestras se introducen en hielo durante 5min. para parar la reacción y a continuación se centrifugan a 15000g durante 10min. a 4°C. Los sobrenadantes se transfieren a una cubeta y se lee la intensidad de color a 586nm, ajustando el espectrofotómetro a 0 con el blanco. La interpretación de los resultados se realizó en función del coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{586} = 0.1505\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de MDA y 4-HNE. También se realizaron blancos de las muestras, sustituyendo el cromógeno por 650 μ l de una mezcla 75% acetonitrilo: 25% metanol. Los resultados se expresaron como nmol/mg proteína.

3.4.6.4 Medida de la actividad aconitasa y fumarasa en hígado

La aconitasa es una enzima que contiene $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ como grupo prostético, susceptible a la inactivación por el anión superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$ y por los H_2O_2 . Estos junto a otras ERO conducen a liberar Fe- α de la enzima $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ y a formar un cluster $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$, haciendo que la enzima sea incapaz de convertir el citrato en isocitrato, por lo tanto la determinación de la actividad de la aconitasa puede ser un adecuado indicador de daño oxidativo mitocondrial (Bulteau et al. 2003). Por otro lado, la fumarasa, otro enzima del ciclo de Krebs, es resistente al daño oxidativo (Yarian et al. 2006), por lo que la relación de las actividades aconitasa / fumarasa medida en las mismas muestras de tejido son un índice muy fiable de daño oxidativo mitocondrial (Quintero et al. 2013).

La actividad de ambas enzimas fueron determinadas según describe (Couplan et al. 2002). El hígado fue homogeneizado sobre hielo en buffer TES (10mM Tris, pH7.4, 250mM sacarosa y 1mM EDTA; 10mL por gramo de tejido) y las mitocondrias fueron aisladas siguiendo el método descrito por (Pecqueur et al. 2001) realizando todas las etapas a 4°C. Para aislar las mitocondrias centrifugábamos el homogeneizado a 1000g-5min., a continuación el

sobrenadante lo volvíamos a centrifugar a 10000g-10min. El precipitado lo lavábamos en buffer TES y centrifugábamos de nuevo a 10000g-10min. y el pellet resultante lo resuspendíamos en 0.5mL de buffer TES+0.2%Triton X-100 para lisar las mitocondrias. Valoramos las proteínas según el método Bradford (Bradford 1976) y congelamos las mitocondrias aisladas hasta la valoración de la actividad enzimática aconitasa y fumarasa. La reacción enzimática se mide durante 3 minutos en los medios apropiados para cada enzima: 30mM de isocitrato sódico, 50mM Tris-HCl, pH7.4, 0.6mM MnCl₂ para la determinación de aconitasa (Hausladen and Fridovich 1996) y 50mM de malato de sodio, 50mM buffer fosfato sódico, pH7.4 para la determinación de fumarasa (Racker 1950). Las actividades enzimáticas se midieron por espectrofotometría siguiendo el aumento de la densidad óptica a 240nm. El ratio aconitasa/fumarasa fue expresado como la razón de la densidad óptica medida en el tercer minuto.

$$\text{RATIO A/F} = \Delta \text{ D.O. Aconitasa} / \Delta \text{ D.O. Fumarasa}$$

El coeficiente de extinción molar es el mismo para el fumarato y para el cis-aconitato: $\epsilon_0 = 3.6\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3.4.6.5 Niveles de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina en plasma

El estrés oxidativo es capaz de lesionar las diferentes macromoléculas celulares, incluyendo el ADN. En este trabajo hemos estudiado el daño oxidativo del ADN midiendo 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina (8-OHdG) en el plasma de los distintos grupos de animales experimentales mediante un Kit de ELISA (Cloud-Clone Corp. Houston; USA). El ensayo consistió en la técnica de inhibición competitiva entre 8-OHdG marcado con biotina y 8-OHdG no marcado (estándares o muestras) con el anticuerpo específico para 8-OHdG fijado en la placa. Tras los lavados indicados se añadió avidina conjugada con HRP, siendo la cantidad de HRP que se unía inversamente proporcional a la concentración de 8-OHdG en la muestra, por lo que tras añadir el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) la intensidad de color fue menor cuanto mayor fue la concentración de 8-OHdG en las muestras. La reacción se paró añadiendo la solución Stop y leyéndose inmediatamente a 450nm.

3.4.7 Activación del factor nuclear kappa B en el hígado

El factor de transcripción Nuclear Kappa B (NF- κ B) es un heterodímero cuyas principales proteínas son p65 y p50 presentes en el citosol ligadas a una proteína inhibidora I κ B. Entre la amplia variedad de activadores de este factor de transcripción encontramos las ERO, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la interleucina 1-beta (IL-1 β) (Renard et al. 1997; Chandel et al. 2000) que son capaces de activar esta vía por la fosforilación de I κ B y su posterior degradación a través del proteosoma permitiendo así la liberación y translocación de NF- κ B al núcleo donde activa la expresión de los genes específicos que tienen cerca sitios de unión de ADN para NF κ B. La activación del factor de transcripción NF- κ B está implicada en la regulación de muchos genes claves en procesos inflamatorios y en la inmunidad innata y adaptativa. Para poder estudiar si en nuestros grupos experimentales había activación del factor NF- κ B, posiblemente mediada por las especies reactivas de oxígeno generadas por la HIC y/o por la dieta rica en grasa, se utilizó un kit p65 TransAM transcription factor assay kit (40096; Active Motif), que valora la unión específica de la subunidad p65 al ADN de la muestra cuando dicho factor se ha activado. Las medidas se realizaron en hígado, que por estudios previos se ha visto que es el principal tejido involucrado en los procesos de estrés oxidativo e inflamación. Para ello, en primer lugar, aislamos extractos nucleares en las muestras de hígado de los distintos grupos experimentales, procesando el tejido siguiendo las instrucciones de un kit de extracción nuclear (Nuclear Extract kit 40010; Active Motif, Rixensart, Belgium). El protocolo consistió en homogeneizar el tejido en 3mL de buffer hipotónico suplementado con 3 μ l de Dithiothreitol (DTT) y 3 μ l de detergente suministrado por el comercial por gramo de tejido, y se incubó en hielo durante 15 minutos, seguido de varias centrifugaciones (10min. 850g 4°C; 30s 14000g 4°C; 14000g 10min. 4°C) para separar la fracción citoplasmática (sobrenadante) de la nuclear (pellet) obteniendo así el extracto nuclear. Al finalizar se midió el contenido de proteínas de las muestras mediante el método de Bradford (Bradford 1976). En este punto las muestras se pueden congelar a -80°C hasta el análisis del factor de transcripción NF- κ B mediante el kit p65 TransAM transcription factor assay kit (40096; Active Motif). Siguiendo las instrucciones del fabricante, la activación de NF- κ B es detectada por incubación del anticuerpo primario

antiNF- κ B con la muestra, que reconoce específicamente un epítipo de la proteína p65 sólo cuando el factor está activado y se une al ADN. El anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con HRP permite su detección por espectrofotometría midiendo la absorbancia de las muestras a 450nm. Los datos se expresaron como veces respecto al control.

3.4.8 Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína plasmática circulante producida principalmente en el hígado por los hepatocitos, que aumenta sus niveles durante los procesos inflamatorios de fase aguda. Los niveles de PCR en plasma se midieron mediante un kit de ELISA específico para rata de la marca comercial (bioNova Científica, Madrid, España). El ensayo consistió en la unión del anticuerpo primario específico fijado en la microplaca a la proteína C Reactiva presente en las muestras y estándares. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con biotina, y con el conjugado avidina-peroxidasa. Finalmente se añadió el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) que da una intensidad de color proporcional a la cantidad de PCR en la muestra. Mediándose la absorbancia en el espectrofotómetro a 450nm y restándose la absorbancia medida a 540nm para corregir posibles imperfecciones ópticas según las indicaciones del fabricante. Los resultados se expresaron como μ g/mL de plasma.

3.4.9 Niveles de leptina en plasma

Hemos estudiado los niveles de leptina en plasma en nuestros grupos experimentales ya que tanto en pacientes con SAHS como en personas con obesidad esta hormona aparece alterada en plasma (Harsch et al. 2003) (Taheiri et al. 2004).

Los niveles de leptina en plasma se midieron mediante un kit de ELISA específico para ratas de la casa comercial (Ray Biotech, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ensayos consistieron en el empleo de un anticuerpo primario específico de rata que se une a la leptina presente en la muestra. Posteriormente un anticuerpo secundario biotinilado se añade a los pocillos y tras los lavados correspondientes para eliminar el anticuerpo que no se ha unido, se incubó con el conjugado HRP-estreptavidina. Finalmente se

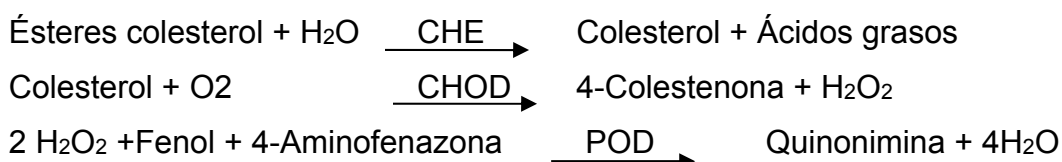
añade el sustrato TMB que nos da la intensidad de color en proporción a la cantidad de leptina que hay en la muestra y al añadir la solución de parada (ácido sulfúrico 0.2M) se produce un cambio de color de azul a amarillo cuya intensidad se mide a 450nm.

3.4.10 Parámetros metabólicos. Metabolismo de lípidos y glúcidos

3.4.10.1 Metabolismo de lípidos

3.4.10.1.1 Niveles de colesterol y triglicéridos

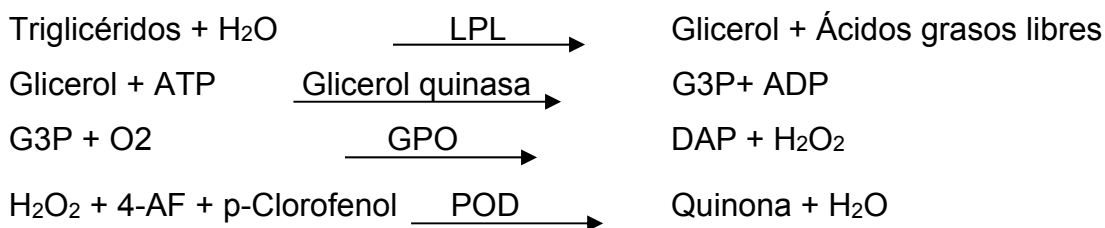
Los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma fueron determinados mediante kits comerciales de ensayo enzimático colorimétrico (Chemelex Labkit; Barcelona, España). El método para determinar los niveles de colesterol se basa en la formación de un compuesto coloreado, la quinonimina, en presencia del colesterol que hay en la muestra según la siguiente reacción:



Colesterol estearasa (CHE); Colesterol oxidasa (CHOD); Peroxidasa (POD)

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada (Meiattini et al. 1978).

El principio del método para determinar los niveles de triglicéridos se basa en incubar los triglicéridos con lipoproteinlipasa (LPL) para que liberen glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerofosfato deshidrogenasa y por el ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y H₂O₂ por la enzima glicerofosfato oxidasa (GPO). Al final, el H₂O₂ reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja (Quinona):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada (Bucolo and David 1973)

3.4.10.1.2 Contenido total de lípidos en hígado

Para obtener el contenido total de lípidos en hígado se siguió el método de extracción descrito por Folch (Folch J et al. 1957). Se pesó el hígado y se troceó añadiéndose 3mL de reactivo de Folch (Cloroformo:Metanol 2:1 v/v) por cada 0.5g de tejido, se agitó durante 2h, y se filtró recogiendo el filtrado en un tubo de vidrio. Al tejido que quedó en el filtro se le añadió de nuevo reactivo de Folch (2.5mL), agitándose 2h y filtrando de nuevo, este procedimiento se repitió 2 veces. A continuación se juntaron todos los filtrados en un mismo tubo y se añadió 2mL de NaCl 0.73%, agitándose para mezclarlo bien y se dejó reposar toda la noche separándose el contenido del tubo en dos fases (Figura 21).

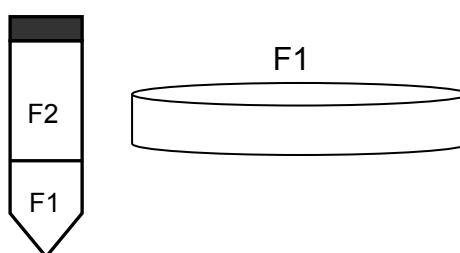


FIGURA 21: Esquema del protocolo para medir el contenido total de lípidos en hígado mediante el método de Folch. La fase 1 (F1) en la parte inferior del tubo es la fase orgánica que tenemos que pesar en la placa de petri para la determinación del contenido de los lípidos totales.

Se separó la fase 1 (F1) orgánica colocándola en una placa de petri previamente tarada. La fase 2 (F2) se lavó de nuevo con 2.5mL de reactivo de Folch: NaCl 0.58% (80:20). Se agitó para mezclar bien y se dejó reposar 2h

volviéndose a recoger la fase orgánica F1 y añadiéndola sobre la placa de petri. El contenido de esta placa de petri se dejó secar hasta conseguir dos veces consecutivas el mismo valor de peso. Los resultados fueron expresados como % grasa respecto al peso total de hígado.

3.4.10.2 Metabolismo de glúcidos

3.4.10.2.1 Glucemia basal y test de tolerancia a la glucosa

La glucemia basal se determinó tomando una gota de sangre de la cola de la rata que previamente había estado en ayunas. Para ello se utilizó un glucómetro (Ascensia Breeze 2; Bayer) con sus correspondientes tiras reactivas. El análisis de la glucemia se basa en la medición de la corriente eléctrica causada por la reacción de la glucosa de la muestra con la glucosa oxidasa y el ferrocianuro potásico, reactivos de la tira reactiva, generando una corriente que es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra.

Para hacer el test de tolerancia a la glucosa, se inyectaron a las ratas 2g/kg de D-glucosa en solución salina por vía intraperitoneal. A continuación se midió la glucemia a distintos tiempos: 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos en la sangre obtenida de la cola del animal sin anestésicar, siguiendo el mismo método descrito para la medida de la glucemia basal.

3.4.10.2.2 Niveles de insulina en plasma

Los niveles de insulina en plasma se midieron mediante un kit comercial de ELISA específico para ratas de la casa comercial (DRG Instruments GmbH; Alemania). El ensayo está basado en la técnica de sandwich directo en la cual dos anticuerpos monoclonales se unen a las moléculas de insulina presentes en la muestra. Durante la incubación la insulina en la muestra reacciona con anticuerpo anti-insulina conjugado con peroxidasa y con anticuerpos anti-insulina unidos a los pocillos de la placa. Tras los lavados, el conjugado unido es detectado por la reacción con TMB. La reacción se para al añadir ácido sulfúrico 0.5M y la intensidad de color proporcional a la cantidad de insulina en la muestra se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm.

3.4.10.2.3 Índice HOMA-IR

El índice de HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) es un método descrito por (Matthews et al. 1985) utilizado para realizar estimaciones de resistencia insulínica utilizando las concentraciones de la glucosa en sangre y la insulina plasmática en ayunas. Los niveles de glucosa en sangre se midieron con un glucómetro (Ascensia Breeze2; Bayer) y la insulina en plasma fue medida mediante un kit de ELISA para rata (DRG Diagnostics; Germany). Este índice se calculó siguiendo la siguiente fórmula: $\text{HOMA-IR} = [\text{glucosa en ayunas (mM)} \times \text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/mL}) / 22.5]$

3.4.10.2.4 Consumo de glucosa en músculo esquelético

El consumo de glucosa en el músculo esquelético de rata se midió en muestras de músculo superficial del glúteo de los distintos grupos experimentales viendo la captación de ^{14}C -2-desoxi-D-glucosa (^{14}C -2DG) (310mCi / mmol (Perkin Elmer). Estas muestras de tejido se colocaron en viales de vidrio de 20mL con 4mL de solución Tyrode bicarbonato (NaHCO_3 , 24mM; KCl, 5mM; CaCl_2 , 2mM; MgCl_2 , 1.1mM; HEPES, 10mM; glucosa, 5mM; pH7.40) a 37°C y con gaseo continuo de 20% O_2 /5% CO_2 equilibrado con N_2 , saturado con vapor de agua. La captación basal de ^{14}C -2DG fue medido en tejidos de cada grupo experimental preincubándolos durante 30min. en Tyrode sin insulina. Para estudiar los efectos de la insulina, otras muestras de tejido de cada grupo experimental se pre-incubaron 15min. en Tyrode + 15min en Tyrode con insulina (20mU/mL). En ambos casos, se continuó la incubación añadiendo ^{14}C -2DG para tener una concentración final 1,55 μCi / mL. Al finalizar la incubación, los tejidos se lavaron durante 5min. a 0-4°C en Tyrode para eliminar el exceso de isótopo radiactivo no captado por las células musculares y a continuación se pesaron y se homogeneizaron los tejidos en 1mL de PCA 0,4N. Los homogenizados se centrifugaron en una microcentrifuga Ependorf a 15.000rpm durante 10min. La radiactividad fue medida en 800 μl del sobrenadante en un contador de centelleo (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer). El consumo de glucosa se expresa como nanomoles / miligramo de tejido.

3.4.11 Análisis de datos

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico Graph Pad Prism versión 6 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Todos los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (ESM) y las diferencias entre grupos fueron calculadas según la presentación y comparación de los datos utilizando t-test para datos no pareados, One way ANOVA con test de comparación múltiple (Newman-Keuls o Dunnett) o Two way ANOVA con test de comparación múltiple (Bonferroni). Valores de $p < 0.05$ representan diferencias estadísticamente significativas.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Evolución del peso corporal y acumulación de grasa visceral: grasa retroperitoneal y epididimal

Se controló el peso de las ratas alimentadas con dieta control y dieta rica en grasa durante las 12 semanas de administración de las dietas. La figura 22A muestra la evolución del peso corporal durante el tiempo que duraron los experimentos, donde se puede ver como hasta la 6^a semana, los pesos de las ratas alimentadas con las dos dietas siguieron la misma tendencia. Sin embargo, a partir de la 7^a semana las ratas alimentadas con dieta rica en grasa aumentaron su peso de manera significativa (** $p < 0.01$ vs. dieta control), aumento que se acentuó en las semanas siguientes (** $p < 0.001$ vs. dieta control) hasta el final del experimento. En la Figura 22B se muestra el incremento de peso medio alcanzado por los animales durante las 12 semanas de dieta normal o rica en grasa en los cuatro grupos de ratas de este estudio (C, CHI, O, OHI). Las ratas alimentadas con dieta rica en grasa incrementaron su peso medio en 329 ± 10.9 g mientras que las alimentados con dieta control el incremento fue de 200.1 ± 4.1 g, siendo esta diferencia en la ganancia de peso significativa (** $p < 0.001$). La HIC tendió a disminuir ligeramente el peso de los animales tanto en CHI vs. C como en OHI vs. O, sin ser esta disminución estadísticamente significativa.

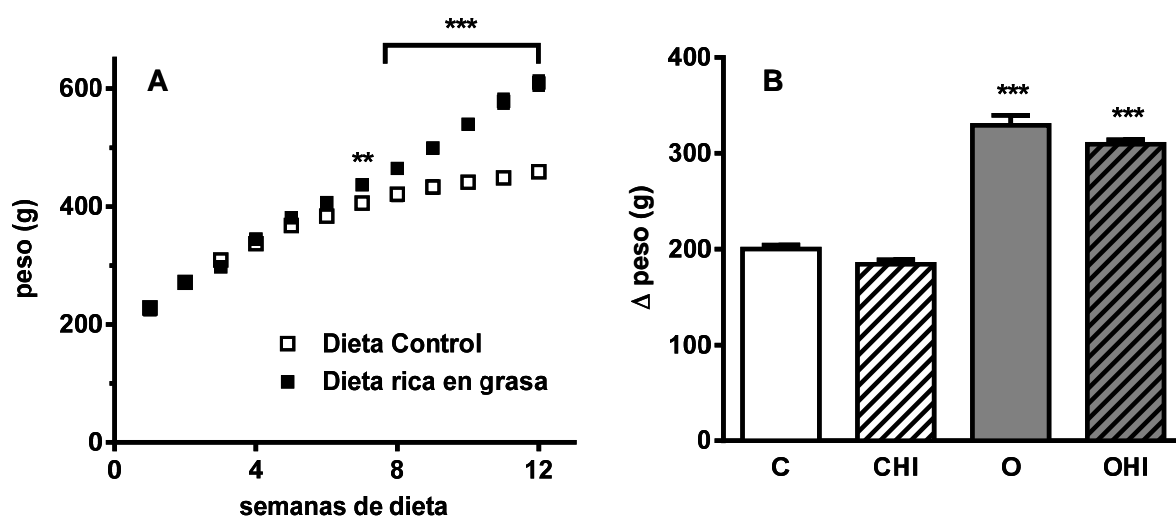


FIGURA 22: A) Evolución del peso durante las 12 semanas de dieta en ratas alimentadas con dieta control □ y con dieta rica en grasa ■. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. dieta control (Two Way ANOVA). B) Incremento del peso medio de las ratas después de las 12 semanas de dieta en los cuatro grupos experimentales (C, CHI, O, OHI) *** $p < 0.001$ vs. C (One way ANOVA). Los datos están expresados como la media \pm ESM (n=12).

El peso de la grasa retroperitoneal (Figura 23A) y epididimal (Figura 23B) aumentó significativamente en los animales alimentados con dieta rica en grasa O y OHI respecto a los animales con dieta control C y CHI (** $p < 0.001$ O y OHI vs. C). La exposición a HIC no modificó la acumulación de grasa visceral.

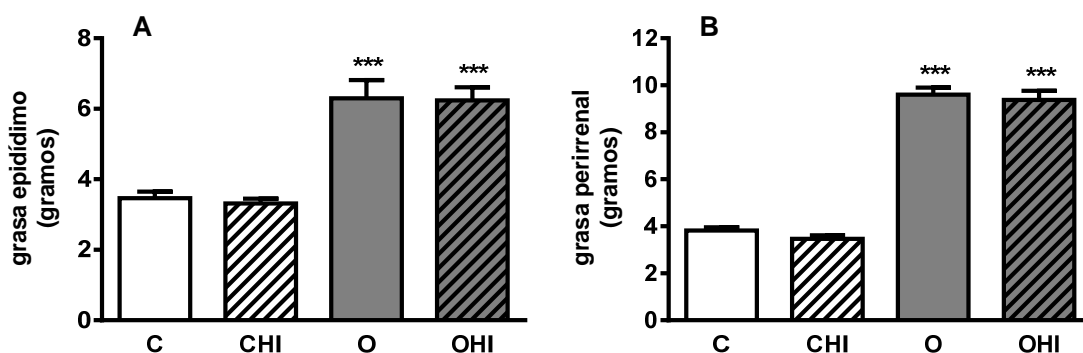


FIGURA 23: A) Peso en gramos de la grasa del epidídimo y B) de la grasa perirrenal en los cuatro grupos experimentales (C, CHI, O, OHI). Los datos se presentan como la media \pm ESM. (n=9-10); *** $p < 0.001$ vs. C (One way ANOVA)

3.5.2 Parámetros respiratorios

Se estudió la ventilación pulmonar mediante pletismografía en los cuatro grupos experimentales (C, CHI, O, OHI), mientras respiraban aire, distintas intensidades de hipoxia (12%O₂, 10%O₂ y 7%O₂) e hipercapnia (5%CO₂

20%O₂ resto nitrógeno). En la figura 24A se muestra que la FR, expresada como respiraciones por minuto, aumentó en todos los grupos experimentales en respuesta a las diferentes situaciones hipóxicas y a la hipercapnia respecto a la situación de normoxia. Los animales del grupo control expuestos a HIC (grupo CHI) no cambiaron su FR o tendió a disminuir respecto a los controles. Por el contrario, los animales Obesos (grupo O) aumentaron la FR (*p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 vs. C) en todas las situaciones (aire, hipoxias e hipercapnia). La HIC tendió a disminuir la FR en los animales obesos (grupo OHI) siendo estadísticamente significativo en respuesta a la hipercapnia (+p<0.05 vs. O). El VC (Figura 24B), expresado como mL/kg de peso, aumentó en animales controles (grupo C) cuando respiraban distintas mezclas de gases hipóxicas e hipercápnica respecto al VC en aire, alcanzando el máximo valor de VC (8.7±0.36mL/kg) cuando respiraban 7%O₂. La HIC en las ratas controles (grupo CHI) tendió a disminuir el VC en las distintas situaciones respiratorias de hipoxia e hipercapnia, siendo estadísticamente significativo para la hipoxia del 7%O₂ (**p<0.01 CHI vs. C). Los animales del grupo O presentaron un VC disminuido respecto a los controles en todas las atmósferas respiratorias estudiadas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa cuando los animales respiraban hipoxia del 12%O₂ y del 7%O₂ (*p<0.05; **p<0.01) y en situación de hipercapnia (**p<0.01). En los animales obesos expuestos a HIC (grupo OHI) el VC disminuyó aún más que en los obesos (+p<0.05 en 7%O₂ y 5%CO₂ vs. O); por lo tanto parece que la HIC tanto en animales Controles como en Obesos disminuye el VC ante situaciones de hipoxia intensa e hipercapnia.

El VM o ventilación pulmonar minuto expresado como mL/min/kg de peso, representa el producto de la FR y el VC expresado por kilogramo de peso. La Figura 24C muestra que en todos los grupos experimentales la ventilación pulmonar aumentó en las diferentes atmósferas de hipoxia e hipercapnia respecto a la situación de normoxia, aunque si se compara por grupos experimentales si que vemos que se comportan de manera diferente. En los animales controles el VM mientras respiran aire es de 395±22.2 mL/min/kg y aumentó hasta 904.3±29.6 mL/min/kg respirando 7%O₂. La HIC en los animales con dieta control (grupo CHI), disminuyó significativamente el VM en las tres situaciones de hipoxia y en la hipercapnia (*p<0.05; **p<0.01 vs. C).

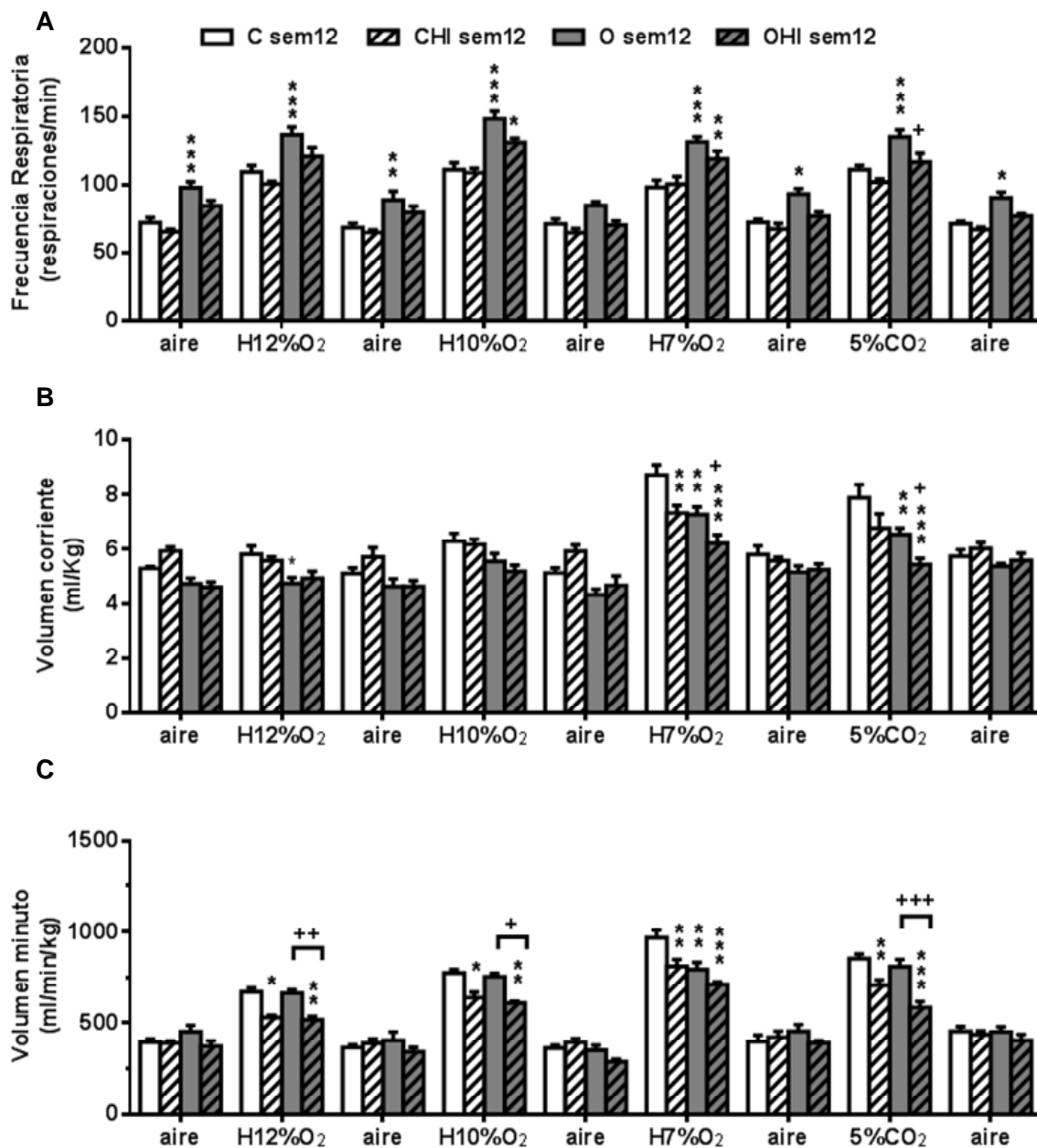


FIGURA 24: Parámetros ventilatorios en la semana 12 del estudio: A) Frecuencia Respiratoria (rpm) B) Volumen corriente (ml/Kg) y C) Volumen minuto (ml/min/Kg), medidos en los cuatro grupos experimentales (C, CHI, O, OHI), mientras respiran aire, diferentes intensidades de hipoxia e hipercapnia según el protocolo descrito anteriormente. Datos expresados como la media \pm ESM (n=8). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. grupo control (C); + p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 OHI vs. O (Two way ANOVA).

En el grupo O, el VM fue comparable al de los animales controles excepto en respuesta al 7%O₂ que disminuyó significativamente (**p<0.01 vs. C). Por último, la obesidad junto con la HIC (grupo OHI) disminuyó significativamente el VM cuando se compara con el grupo de animales controles en las distintas situaciones de hipoxia y en la hipercapnia (**p<0.01; ***p<0.001 vs. C). Además en este grupo (OHI), se ha visto una disminución del VM estadísticamente significativa respecto a los animales obesos (+p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001 vs. O) en las situaciones de hipoxia menos intensas (12 y 10%O₂) y en hipercapnia. Por lo que podemos decir que la HIC disminuye la ventilación en los animales controles y en los obesos.

3.5.3 Estudio de la actividad simpática

3.5.3.1 Presión arterial sistémica y Frecuencia cardíaca

Para estudiar la actividad simpática en todos los grupos experimentales de este estudio se midió la presión arterial sistémica (PA) media y la frecuencia cardíaca (FC), para comprobar si en nuestros modelos de obesidad y apnea obstructiva del sueño aparecía hipertensión arterial, confirmando así la asociación descrita en trabajos previos entre la AOS y la hipertensión (Wolf et al. 2010). Para ello, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de material y métodos, se midió la PA en situación de normoxia, seguido de un test de hipoxia aguda para explorar el reflejo barorreceptor y finalmente se midió la recuperación de la PA mientras la rata respiraba aire. La Figura 25 muestra la PA sistémica en los distintos grupos experimentales; en animales controles la PA durante la normoxia fue de 88±2 mmHg aumentando hasta 120±4 mmHg en las ratas del grupo CHI, hasta 135±4 mmHg en las ratas del grupo O, y hasta 147±4 mmHg en OHI (*p<0.05 ***p<0.001 vs. C; + p<0.05 O vs. OHI). El test hipóxico causó una disminución significativa en la PA en todos los grupos experimentales (42% a 47%; p<0.001 vs. aire) no habiendo diferencias significativas entre ellos (Figura 26A). La frecuencia cardíaca en situación de normoxia (antes del estímulo hipóxico) fue en los controles 332±10 latidos/minuto y aumentó ligeramente de manera significativa en todos los grupos experimentales (*p<0.05; **p<0.01; vs. C) (Figura 26B). No se observaron diferencias en la FC cuando los animales estuvieron sometidos al test de hipoxia aguda en ningún grupo experimental (no mostrado).

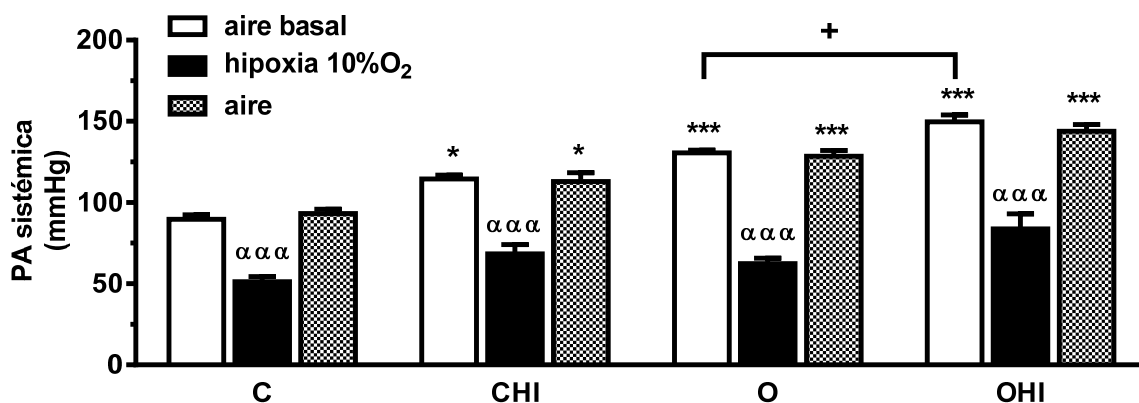


FIGURA 25: Medida de la presión arterial media en los cuatro grupos de animales (C, CHI, O, OHI) mientras respiran aire basal, 10%O₂ y aire. Los datos se presentan como la media ± ESM n=8-10. * p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 vs.C; ααα p<0.001 vs. aire basal de cada grupo experimental. + p<0.05 aire basal O vs. OHI (Two way ANOVA)

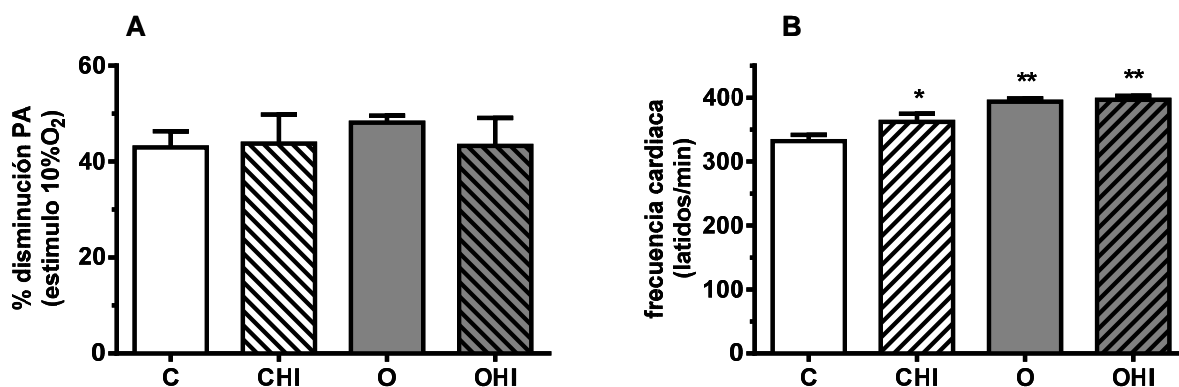


FIGURA 26: A) % de disminución de la PA en respuesta al estímulo hipóxico (10%O₂) en C, CHI, O, OHI. B) Frecuencia cardíaca en situación de normoxia en todos los grupos experimentales. Los datos se presentan como la media ± ESM n=8-10. *p<0.05, **p<0.01 vs. C (One way ANOVA).

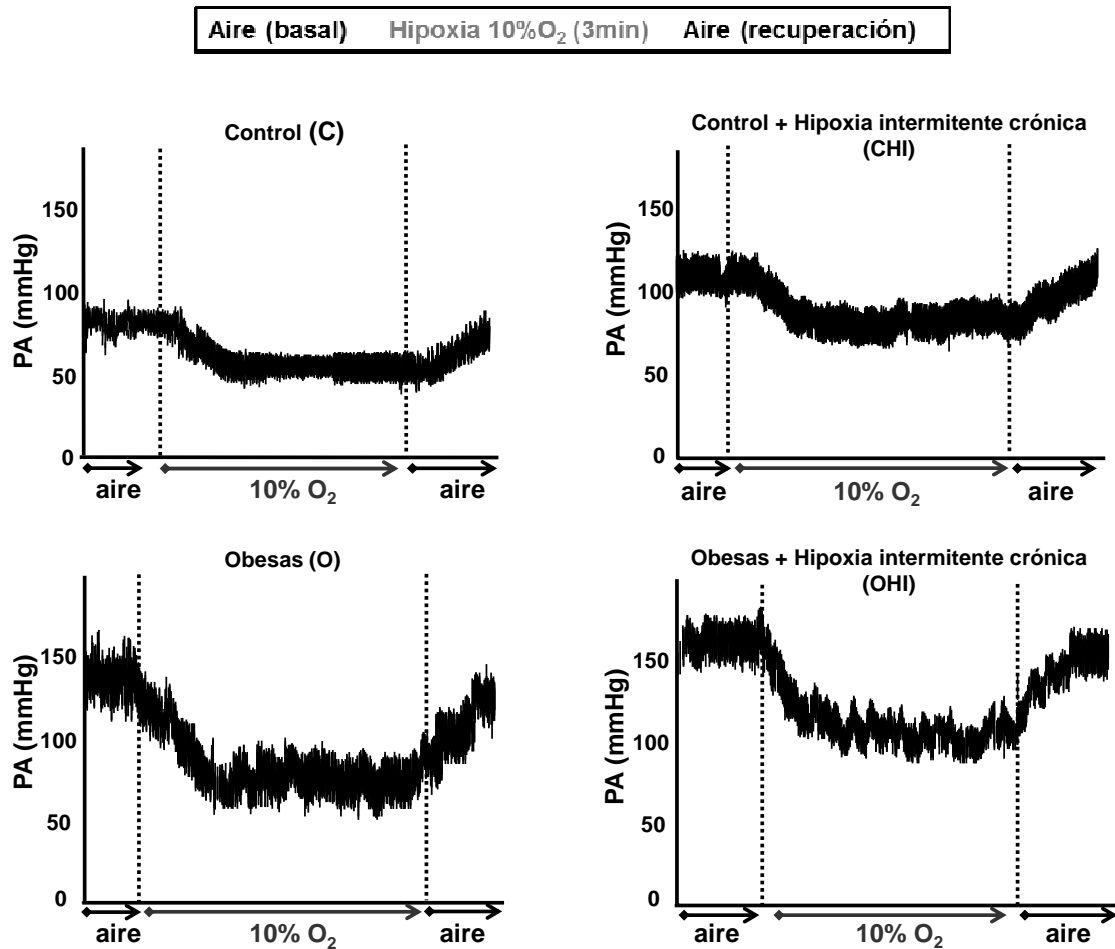


FIGURA 27: Registro representativo de la presión arterial sistémica (mmHg) de cada grupo experimental C, CHI, O y OHI mientras los animales respiran aire (basal), hipoxia 10%O₂ (3 minutos) y aire (recuperación).

3.5.3.2 Contenido de catecolaminas en plasma. Contenido y síntesis de catecolaminas en arteria renal

Las terminaciones simpáticas y la médula suprarrenal son las principales fuentes (>80%) de norepinefrina (NE) y de epinefrina (E) en plasma respectivamente. Por lo tanto los niveles de NE y E pueden representar un buen indicador del tono simpático generalizado, aunque se sabe que los niveles elevados de CA en plasma también pueden ser resultado de una disminución del catabolismo con una actividad simpática normal (Goldstein et al. 2003). En animales controles (C) el contenido de NE fue 19.6 ± 2.9 pmol/mL de plasma, y aumentó significativamente en los tres grupos experimentales (33.94 ± 5.4 pmol/mL CHI vs. C, $p < 0.05$; 43.93 ± 5.0 pmol/mL O vs. C, $p < 0.01$; y

30.46±4.7 pmol/mL OHI vs. C, $p<0.05$) Figura 28A. Los niveles de E en plasma se comportaron de manera similar a la NE, siendo en el grupo control de 27.58±3.9 pmol/mL de plasma y aumentando significativamente en todos los grupos experimentales (47.28±4.2 pmol/mL CHI vs. C, $p<0.05$; 55.97±6.9 pmol/mL O vs. C, $p<0.01$ y 45.83±6.5 pmol/mL OHI vs. C, $p<0.05$) Figura 28B.

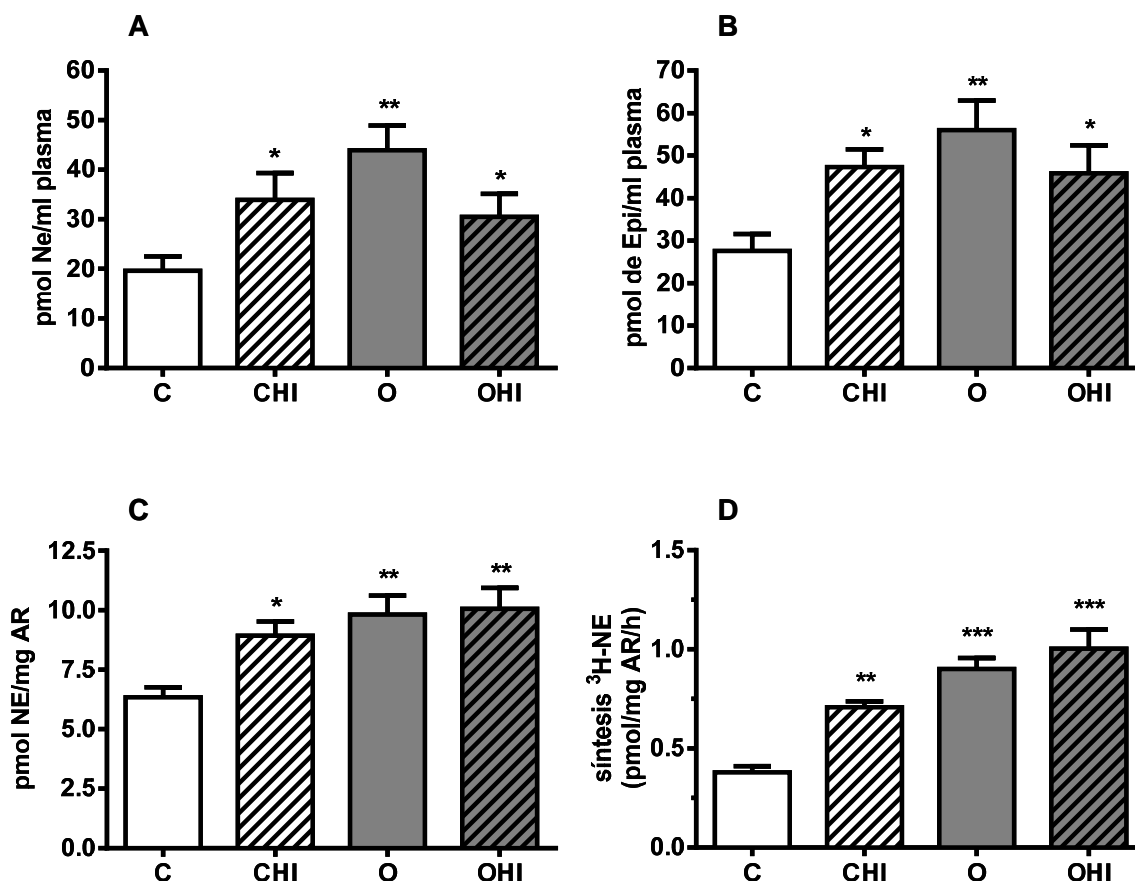


FIGURA 28: Estudio de la actividad simpática en los cuatro grupos de animales (C, CHI, O, OHI). Medida del contenido de norepinefrina NE (A) y epinefrina E (B) en plasma. C) Contenido de NE en arteria renal expresado como pmol/mg AR y D) Síntesis de ³H-NE en AR expresado como pmol/mg AR/h. Los datos se presentan como media ± ESM. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. C. One way ANOVA)

Se estudió también el contenido y la síntesis de CA en AR, datos que verificaron que el aumento de CA en plasma estaba relacionado con una activación del sistema nervioso simpático. En la Figura 28C se muestra que el contenido de NE en AR expresado como pmol/mg de AR aumentó en todos los grupos experimentales respecto al grupo control (6.34±0.4 pmol/mg en C)

alcanzando el valor máximo en el grupo OHI 10.06 ± 0.9 pmol/mg ($p < 0.01$). La síntesis de NE en AR (Figura 28D) mostró un patrón muy similar al contenido de NE en AR, aumentando en los tres grupos experimentales respecto al control (0.38 ± 0.03 pmol $^3\text{H-NE/mg AR/h}$) y siendo este aumento máximo en el grupo OHI (1.004 ± 0.09 pmol $^3\text{H-NE/mg AR/h}$ $p < 0.001$ vs. C). Estos resultados de síntesis de CA representan la cantidad de NE que se sintetizó a partir de la tirosina tritiada en las AR de los distintos grupos experimentales durante una hora de incubación. Los datos indican que tanto la obesidad (O) como la hipoxia intermitente crónica (grupo CHI) aumentan la síntesis de $^3\text{H-NE}$, siendo este aumento mayor en el grupo OHI sugiriendo por tanto, un aumento en el tono simpático.

3.5.4 Estrés oxidativo: SOD, LPO, Aconitasa/Fumarasa y 8OHdG

El grado de estrés oxidativo en los cuatro grupos de animales experimentales, se midió determinando en hígado los siguientes parámetros: la expresión y la actividad de la enzima SOD como medida de la respuesta antioxidante; los niveles de LPO para valorar la acción de las ERO sobre los ácidos grasos; la relación aconitasas/fumarasa para estudiar el daño oxidativo mitocondrial y los niveles en plasma de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina (8-OHdG) para determinar el daño oxidativo a nivel del ADN. La mayoría de estas medidas se hicieron en tejido hepático, porque experimentos previos de nuestro grupo revelaron que el hígado es el tejido más sensible al daño oxidativo causado por la HIC (Quintero et al. 2013).

En la Figura 29A se muestra la actividad enzimática de la SOD citoplasmática y mitocondrial respectivamente (Cu,Zn-SOD; Mn-SOD), ambas disminuyeron de forma significativa en todos los grupos experimentales, siendo esta disminución mayor en los grupos O y OHI (de aproximadamente 60-70%) cuando se compararon con el grupo control (Cu,Zn-SOD 33.71 ± 2.7 U/mg de proteína $n=7$; Mn-SOD 2.68 ± 0.6 U/mg de proteína $n=7$) Estos datos indican una disminución de la función antioxidante tanto a nivel citoplasmático como mitocondrial en el tejido hepático. En la Figura 29B se muestra la expresión a nivel de proteínas de las dos isoformas de SOD estudiadas en el hígado en todos los grupos de animales, se vio una disminución moderada de la Cu,Zn-SOD aunque significativa en los grupos O y OHI respecto al control, la

disminución de la Mn-SOD mitocondrial fue mayor y estadísticamente significativa en todos los grupos experimentales comparados con el control, alcanzando una disminución máxima de aproximadamente un 30% en el grupo O.

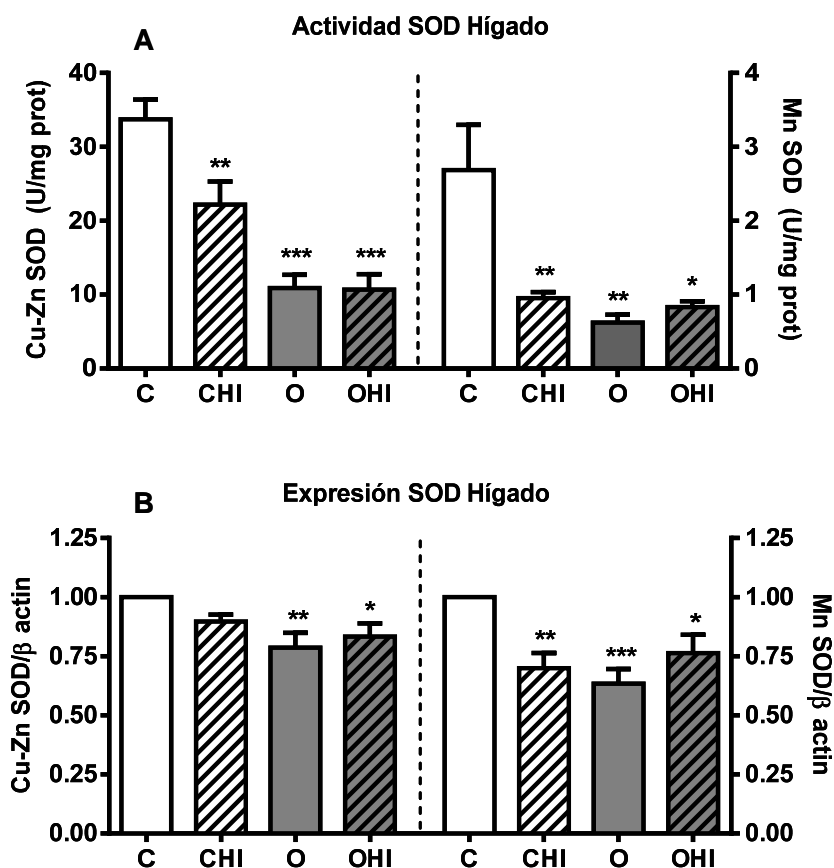


FIGURA 29: Actividad enzimática A) y expresión B) de la SOD, citoplasmática (Cu,Zn-SOD) y mitocondrial (Mn-SOD) en hígado en los cuatro grupos de animales estudiados (C, CHI, O, OHI). Los datos se expresan como el valor de la media \pm ESM. En A) $n=6-8$ y en B) $n=10$; (* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ vs. C; One way ANOVA)

En la Figura 30A se muestran los niveles de LPO en hígado en todos los grupos de animales. Los LPO aumentaron en todos los grupos experimentales respecto al control, siendo el valor del grupo control (0.31 ± 0.07 nmol/mg proteína, $n=5$). Este aumento fue moderado con la HIC en el grupo CHI, mientras que en los grupos alimentados con dieta rica en grasa el aumento fue mucho mayor *** $p<0.001$ vs. C; $n=8$) indicando que hay un aumento claro de estrés oxidativo asociado con la obesidad.

En la Figura 30B se muestra el ratio aconitasa/fumarasa en los distintos grupos de animales. Esta relación indica que hay un aumento de daño oxidativo a nivel mitocondrial en los grupos CHI y O cuando se comparan con el grupo control (0.10 ± 0.006 , $n=10$), ya que la aconitasa que es una enzima del ciclo de Krebs disminuye cuando hay aumento de ERO. La fumarasa en cambio, otra de las enzimas del ciclo de Krebs, resistente al daño oxidativo, permanece estable, por lo que este indicador es una medida bastante fiable del estrés oxidativo mitocondrial.

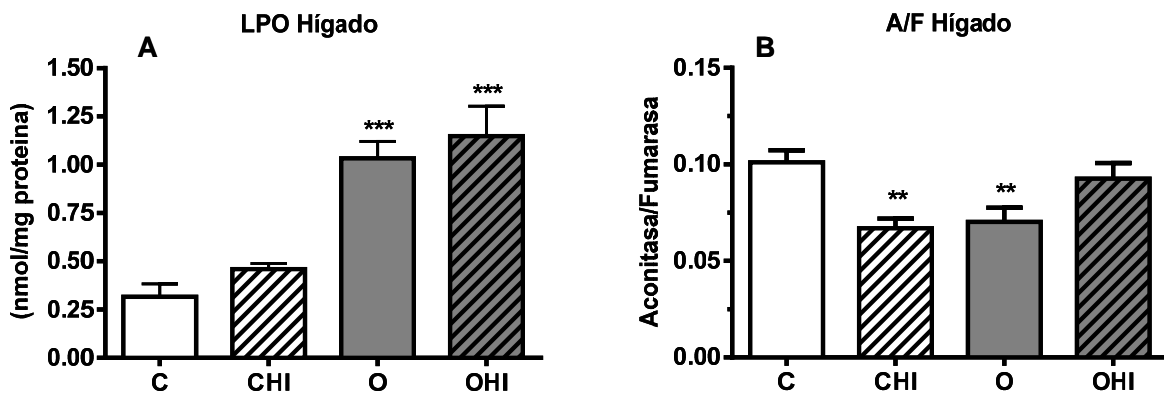


FIGURA 30: A) Medida de LPO y B) ratio aconitasa/fumarasa en hígado en ratas C, CHI, O y OHI. Los datos se presentan como la media \pm ESM. En A) $n=5-8$ y en B) $n=10$. (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. C; One way ANOVA).

Por último se determinaron los niveles de 8-OHdG en plasma por ser el nucleósido oxidado de ADN más frecuentemente detectado y utilizado como biomarcador de estrés oxidativo para estudiar el daño oxidativo a nivel del ADN. Este daño que las ERO producen en el ADN nuclear y mitocondrial, lo hacen fácilmente en las bases de guanosina, las cuales son eliminadas por los mecanismos de reparación del ADN, aumentando en plasma. El aumento de 8-OHdG puede estar asociado a procesos inflamatorios que podrían desencadenar patologías cardiovasculares. Además, este daño en el material genético, puede también estar implicado en el desarrollo de carcinogénesis provocando mutaciones que afectan a oncogenes y genes supresores de tumores (Da Costa et al. 2012), por lo que actualmente el 8-OHdG esta

considerado como un indicador importante en la etiología de muchos cánceres en humanos (Marnett 2000). En la Figura 31 se muestra los niveles de 8-OHdG en plasma de los cuatro grupos de animales. En el grupo CHI comparando con el grupo de animales control, se produjo un aumento significativo (C 230.4 ± 8.7 ; CHI 309.6 ± 15.9 $p < 0.01$ vs. C; $n = 6-8$). En el grupo O, el daño oxidativo a nivel del ADN no fue significativo respecto al control, sin embargo, se encontró un aumento muy significativo de este nucleósido en las ratas alimentadas con dieta rica en grasa y expuestas a hipoxia intermitente crónica (OHI 357.4 ± 13.20 $p < 0.001$ vs. C y O $n = 10$). Ello parece indicar que realmente la HIC específicamente daña el ADN reflejado en el aumento de los niveles de 8-OHdG.

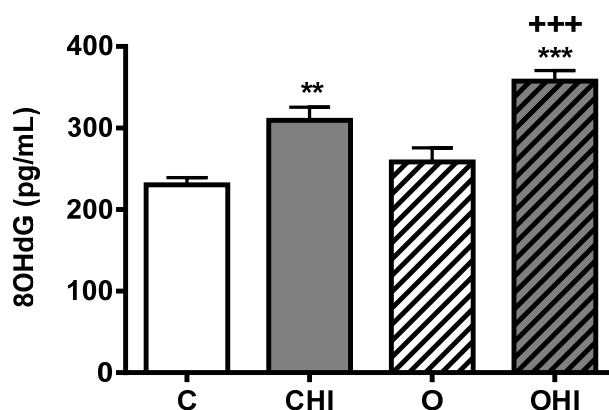


FIGURA 31: Niveles de 8-OHdG en plasma en los cuatro grupos de animales C, CHI, O y OHI. Los datos se presentan como la media \pm ESM. $n = 6-10$ (** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. C; +++ $p < 0.001$ vs. O) One way ANOVA.

3.5.5 Activación del factor nuclear kappa B en hígado

NF- κ B es un factor de transcripción que está implicado en la regulación de numerosos procesos celulares, entre los que destaca la inmunidad y en procesos inflamatorios crónicos, regulando la expresión de diferentes genes, en particular, las citoquinas inflamatorias (Alam et al. 2007; Hayden and Ghosh 2008). Existen muchos estímulos celulares que pueden activar NF- κ B, tales como citocinas, factores de crecimiento o especies reactivas de oxígeno (Renard et al. 1997; Chandel et al. 2000). Este aspecto relacionado con la activación de NF- κ B por las ERO se ha estudiado en este trabajo en los grupos

de animales expuestos a HIC y/o sometidos a dieta rica en grasa, comparándolos con los animales controles. Para ello, se ha utilizado el hígado de las ratas de los diferentes grupos experimentales, ya que es un tejido que se ha demostrado presenta un estrés oxidativo marcado (Quintero et al. 2013) y con un papel clave en los trastornos metabólicos presentes en el SAHS y en la obesidad (Alam et al. 2007). La Figura 32A muestra la activación de NF-kB en nuestros tres grupos experimentales respecto al control, expresado como veces de aumento sobre el control, indicando que efectivamente tanto la HIC como la dieta rica en grasa aumentan los valores de NF-kB. Se puede ver que tanto en el grupo CHI como en el grupo O el aumento fue similar, aproximadamente el doble comparándolo con los controles (** $p < 0.01$ CHI vs. C; *** $p < 0.001$ O vs. C) mientras que en el grupo OHI el aumento de NF-kB fue de 2.5 veces respecto al control y de 0.5 veces respecto al grupo O siendo también estadísticamente significativo (*** $p < 0.001$ vs. C. y + $p < 0.05$ vs. O).

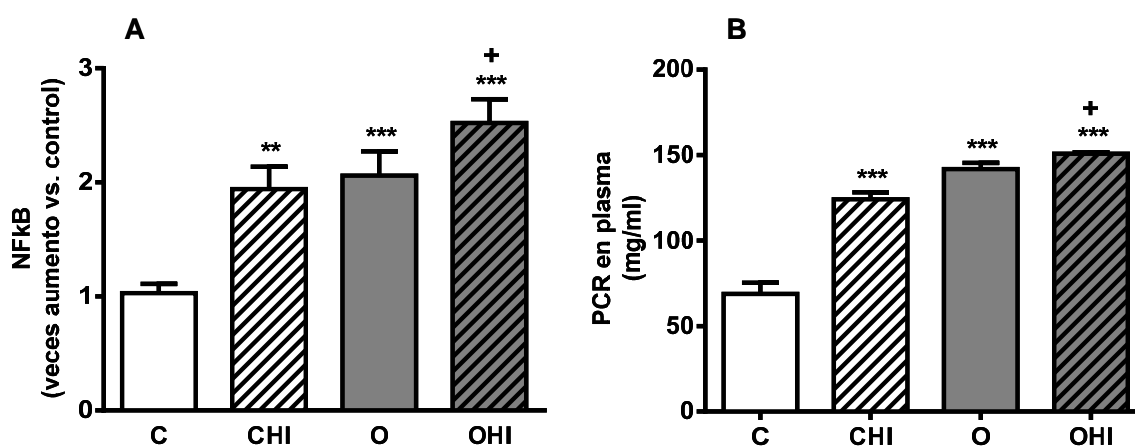


FIGURA 32: A) Niveles de activación del factor nuclear kappa B (NF-kB) en extractos nucleares de hígado y B) Proteína C reactiva (PCR) en plasma en los cuatro grupos de animales (C, CHI, O OHI). Los datos se presentan como la media \pm ESM. $n=8-10$ (*** $p < 0.001$ vs. C; + $p < 0.05$ vs. O). One way ANOVA.

3.5.6 Proteína C reactiva

La proteína C Reactiva (PCR), es una proteína de fase aguda sintetizada por los hepatocitos, cuyos valores plasmáticos aumentan de forma importante en los procesos inflamatorios del organismo, por tanto es un biomarcador de inflamación, de particular interés médico, cuyos niveles aumentan y se correlacionan con otros marcadores de inflamación (Ford 2003) y con componentes del SM, como son las medidas antropométricas, describiéndose que existe una fuerte asociación entre la PCR y el IMC (Danesh et al., 1999; Mark 2003) también se ha descrito que la PCR aumenta en animales de experimentación con la intensidad de la HIC (Quintero et al. 2013). Además parece que promueve la producción de ERO, que crearían un círculo vicioso entre la PCR y las ERO desembocando en el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos (Zhang et al. 2012).

En la Figura 32B se muestra que los niveles plasmáticos de la PCR siguen un patrón de comportamiento muy similar a los datos del NF-kB. En el grupo C los valores de PCR fueron 68.8 ± 6.5 mg/mL, estos niveles aumentaron aproximadamente al doble en los grupos CHI (124.1 ± 4.1 mg/mL *** $p < 0.001$ vs. C) y O (141.8 ± 3.6 mg/mL *** $p < 0.001$ vs. C) siendo el aumento máximo en el grupo OHI (150.7 ± 1 mg/mL *** $p < 0.001$ vs. C; + $p < 0.05$ vs. O).

3.5.7 Niveles de leptina en plasma

Actualmente sabemos que el tejido adiposo no es sólo un depósito de energía sino que también puede funcionar como un órgano endocrino, produciendo adipocinas entre las que encontramos la leptina, que participa en la regulación del apetito y además está relacionada con el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático (Bassi et al. 2015). En la Figura 33 se muestra que la HIC y la obesidad aumentan los niveles de leptina en plasma de manera independiente. En animales controles (C), el valor de leptina fue de 8.9 ± 0.5 ng/mL y aumentó de manera significativa en los grupos experimentales CHI y O, siendo este aumento aún mayor cuando se combinan la obesidad y la HIC (grupo OHI 15.7 ± 0.2 *** $p < 0.001$ vs. C; + $p < 0.05$ vs. O).

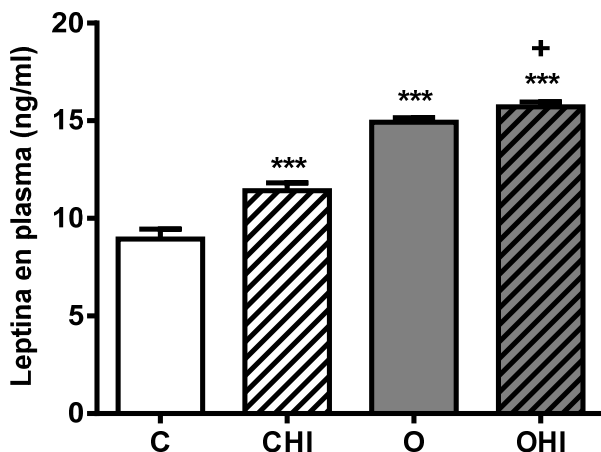


FIGURA 33: Medida de leptina en plasma en los cuatro grupos de animales (C, CHI, O, OHI). Los datos se presentan como la media \pm ESM. $n=8-10$ (** $p < 0.01$ vs. C; + $p < 0.05$ vs. O) One way ANOVA.

3.5.8 Estudio de parámetros metabólicos

3.5.8.1 Metabolismo de lípidos: colesterol y triglicéridos en plasma; contenido total de lípidos en hígado

Para estudiar el metabolismo de los lípidos, se midieron colesterol y triglicéridos en plasma así como el contenido total de lípidos en hígado de los cuatro grupos de ratas en ayunas. Con estas determinaciones se pretendió conocer cómo afecta la HIC y la obesidad de manera independiente y conjunta al metabolismo de los lípidos. En la Figura 34A se presentan los valores de triglicéridos en plasma, la hipoxia intermitente crónica (grupo CHI) aumentó los niveles de triglicéridos de manera significativa ($88.4 \pm 3.1 \text{ mg/dl}$ ** $p < 0.01$ vs. C) respecto a los encontrados en el grupo control ($64.6 \pm 3.65 \text{ mg/dl}$). La dieta rica en grasa (grupo O) y la combinación de los dos factores a estudio (grupo OHI), también mostraron niveles aumentados de triglicéridos (* $p < 0.05$ vs. C).

En cuanto al colesterol en plasma (Figura 34B), los valores controles fueron de $1.15 \pm 0.05 \text{ mmol/l}$, que aumentaron de manera significativa en los tres grupos experimentales (CHI, O, OHI ** $p < 0.001$ vs. C).

Por último se determinó el contenido de lípidos totales en el hígado expresado como % lípidos totales respecto al peso del hígado (Figura 34C). En el grupo control, encontramos un porcentaje de lípidos en el hígado de $4.5 \pm 0.07\%$, que aumentó ligeramente pero de manera significativa con la

hipoxia intermitente crónica (grupo CHI $5.22 \pm 0.17\%$, $*p < 0.05$ vs. C). En los grupos O y OHI, el aumento respecto al grupo control fue del doble llegando a un porcentaje del $9.94 \pm 0.7\%$ y $9.63 \pm 0.8\%$ respectivamente ($***p < 0.001$ vs. C). Con estos resultados podemos decir que el metabolismo lipídico está alterado en los grupo CHI, O y OHI respecto al control, aunque no existe un incremento mayor cuando se combinan la obesidad y la HIC .

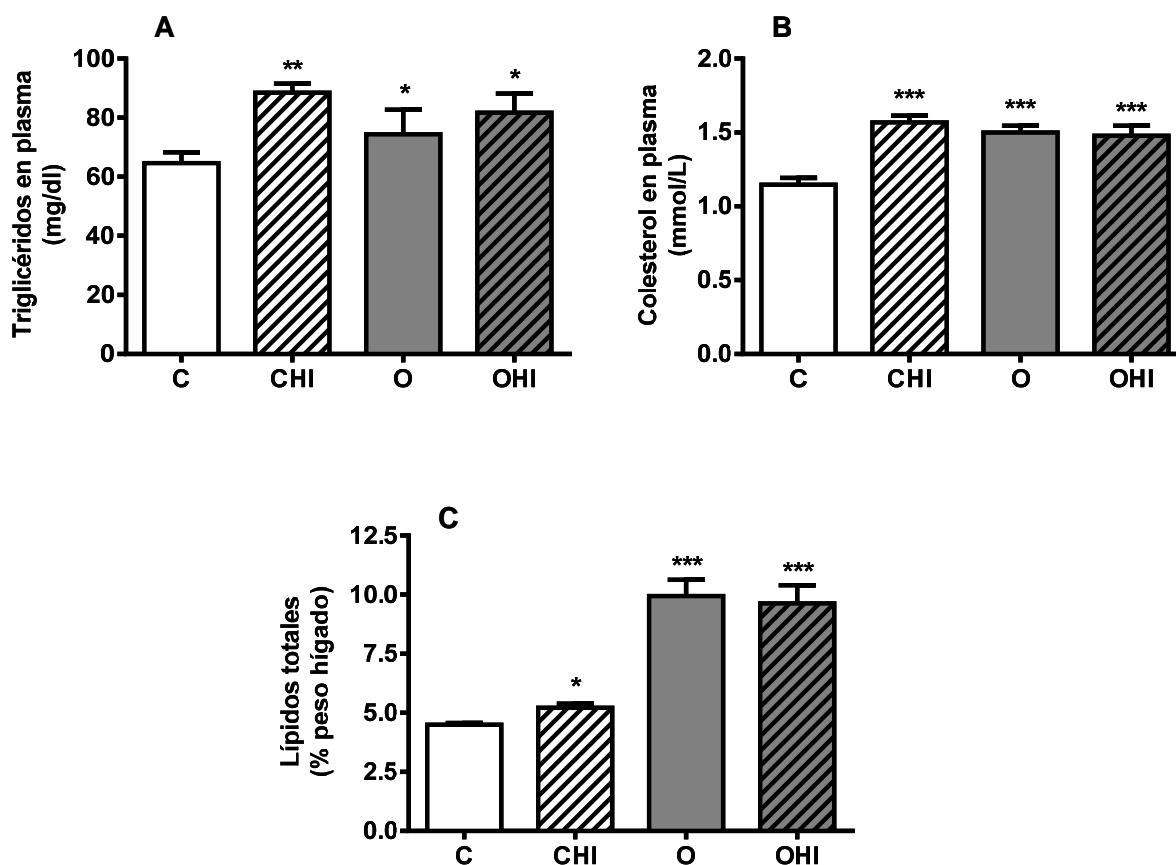


FIGURA 34: A) Triglicéridos en plasma, B) Colesterol en plasma y C) Contenido de lípidos totales en hígado en los cuatro grupos de animales (C, CHI, O, OHI). Los datos se presentan como la media \pm ESM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. C; $n = 10-13$ (One way ANOVA).

3.5.8.2 Metabolismo de la glucosa: glucemia basal, insulina en plasma, índice HOMA-IR, test de tolerancia a la glucosa y consumo de 2-desoxi glucosa en el glúteo

En la Figura 35A, se muestran los valores de la glucemia basal en sangre de todos los grupos de animales tras un ayuno nocturno. La glucemia en el grupo control fue de 75.9 ± 1.1 mg/dl, y los tres grupos experimentales

presentaron un ligero aumento que sólo fue estadísticamente significativo respecto al control en los grupos O y OHI (84.88 ± 1.49 y 89.88 ± 0.99 mg/dl respectivamente; $***p < 0.001$ vs. C). También se observaron diferencias significativas en el grupo OHI vs. O ($+p < 0.05$).

La insulina en plasma Figura 35B, en el grupo C fue de 1.1 ± 0.04 μ g/l, la hipoxia intermitente crónica y la obesidad aumentaron estos valores (2.2 ± 0.07 μ g/l, 4.7 ± 0.11 μ g/l, respectivamente), siendo el aumento aún mayor cuando se combinan ambos factores (grupo OHI 5.2 ± 0.23 μ g/l vs. C), en todos los casos $p < 0.001$ vs. el grupo control. De nuevo se observan diferencias significativas entre el grupo OHI vs. O $++p < 0.01$.

Para evaluar la RI se utilizó el índice de HOMA-IR ($[\text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/mL})] \times [\text{glucosa en ayunas (mM)}] / 22.5$) (Matthews et al. 1985). Según muestra la Figura 35C este índice aumentó significativamente en todos los grupos experimentales (CHI 10.4 ± 0.3 ; O 24.5 ± 0.4 ; OHI 26.7 ± 0.8 respecto al grupo C 4.9 ± 0.1 ; $p < 0.001$ en todos los casos). Además, la obesidad junto con la hipoxia intermitente crónica (OHI) aumentó de manera significativa el índice de HOMA-IR cuando lo comparamos con los animales obesos (O) $+++p < 0.001$.

Para valorar como los grupos experimentales toleraban la glucosa, se les realizó un test administrándoles una sobrecarga de glucosa y valorando la glucemia a distintos tiempos después de la administración. La Figura 35D muestra que los grupos C y CHI alcanzan el punto máximo de glucemia a los 30 minutos y se recuperan completamente a los 120 minutos después de la administración de glucosa, alcanzando a los 30, 60 y 90 minutos una glucemia ligeramente más elevada en el grupo CHI. En los grupos con dieta rica en grasa (O y OHI) encontramos diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales control, la glucemia basal y el punto máximo fueron más altos y no obtuvieron una buena recuperación a los 120min. De nuevo la exposición a HIC en los animales obesos (OHI) eleva ligeramente los valores de la curva respecto al grupo O. La estimación de los valores del área bajo la curva fue 193, 202, 315 y 328 unidades arbitrarias en C, CHI, O y OHI respectivamente.

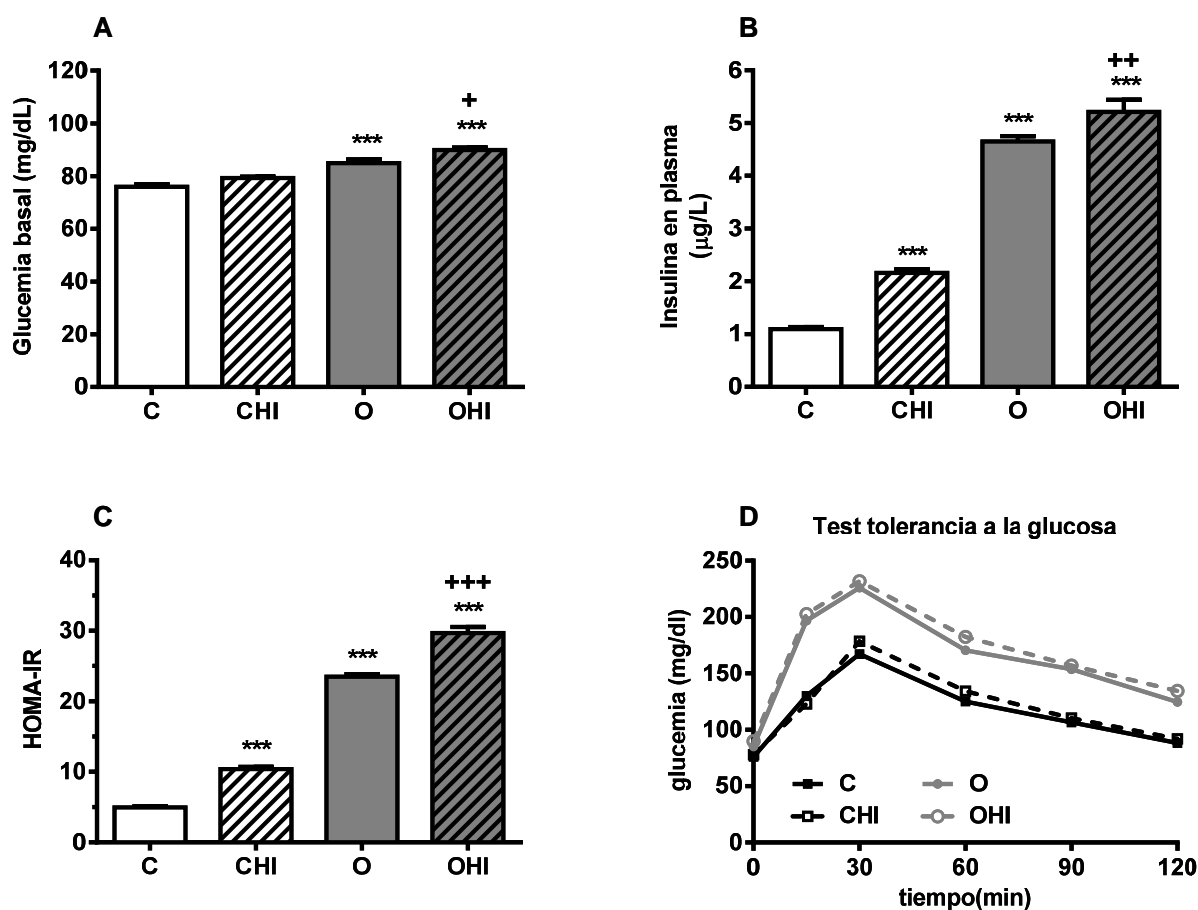


FIGURA 35: A) Niveles de glucemia basal. B) Insulina en plasma. C) Valoración de la resistencia a la insulina mediante el índice de HOMA-IR. D) Test de tolerancia a la glucosa en todos los grupos de animales (C, CHI, O, OHI). Los datos se presentan como la media \pm ESM. $n=8-10$. (** $p<0.001$ vs. C) (+ $p<0.05$; ++ $p<0.01$; +++ $p<0.001$ vs. O). One way ANOVA.

Por último, se estudió la captación de glucosa, utilizando 2-desoxi-D-glucosa (2DG), por el músculo esquelético en el glúteo superficial de las ratas de los distintos grupos experimentales en condiciones basales y en presencia de insulina (20mU/mL), para estudiar la aparición de una posible resistencia a esta hormona. La Figura 36 muestra que el consumo basal de glucosa en el músculo de los animales controles (C) fue de 1.7 ± 0.06 nmol/mg tejido, no observándose cambios significativos en los grupos experimentales (CHI, O, OHI). Cuando se preincubaron los tejidos con insulina, el consumo de 2DG en el glúteo superficial aumentó significativamente en el grupo C (2.5 ± 0.12 nmol/mg *** $p<0.001$ vs. basal). En los animales expuestos a HIC (grupo CHI) se observó también un aumento estadísticamente significativo

cuando se compara la captación de 2DG en condiciones basales y con insulina $**p < 0.01$, siendo este aumento menor que el visto en el grupo C ($\alpha\alpha\alpha p < 0.001$ vs. Control con insulina). En los grupos O y OHI, no se observó ninguna diferencia entre la situación basal e insulina en cuanto a la captación de 2DG, viendo una disminución estadísticamente significativa si se compara con la respuesta a la insulina en el grupo control ($\alpha\alpha\alpha p < 0.001$ vs. Control con insulina). Estos resultados indican que la HIC y la obesidad producen un estado de RI.

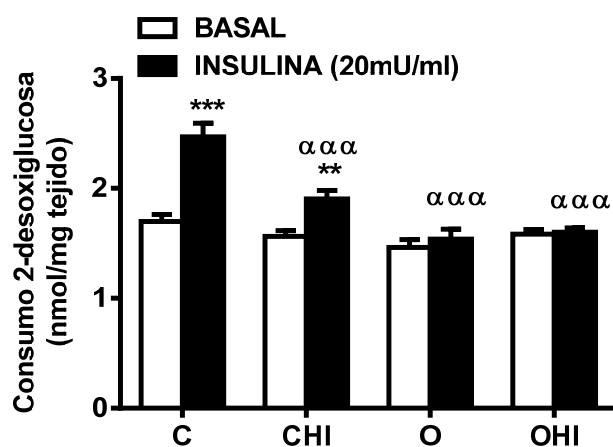


FIGURA 36: Consumo de 2-desoxi-D-glucosa en el músculo glúteo superficial en situación basal y expuestos a insulina 20mU/ml en los grupos de animales C, CHI, O y OHI. Los datos se presentan como media \pm ESM. $n=8-10$; $** p < 0.01$; $***p < 0.001$ vs. situación basal de cada grupo experimental; $\alpha\alpha\alpha p < 0.001$ vs. situación con insulina del grupo control (C). Two way ANOVA.

3.6 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio, demuestran que la exposición a HIC y la dieta rica en grasa, causan patologías cardiovasculares y metabólicas asociadas a una disregulación del estrés oxidativo y de la actividad simpática. De forma resumida, nuestros datos indican que la exposición de HIC y la administración de una dieta rica en grasa de forma individual o conjunta causaron un estado oxidativo (aumento de LPO, 8OHdG y disminución de la SOD y del cociente aconitasa/fumarasa), un estado inflamatorio (aumento de PCR y activación del factor nuclear kappa-B), hipertensión arterial e hiperactividad simpática (niveles de CA aumentados en plasma y en arteria

renal). También provocaron alteraciones en el metabolismo lipídico y glucídico (aumento del contenido de lípidos totales en el hígado, aumento de los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma, de la glucemia y de los niveles de insulina y del índice HOMA-IR), junto con aumento de niveles de leptina en plasma. La mayoría de estos parámetros se agravaron cuando se combinaron ambos tratamientos. Además, la HIC disminuyó la respuesta ventilatoria a la hipoxia e hipercapnia, y la obesidad creó un patrón ventilatorio restrictivo.

3.6.1 Modelos animales

Entre los objetivos específicos planteados en este capítulo lo primero que hemos querido comprobar es si la elección de los modelos animales de HIC y de dieta rica en grasa son los adecuados para el estudio.

Según nuestros resultados, parece que en nuestro modelo animal de HIC si se han observado modificaciones en el sistema cardiovascular, en forma de hipertensión arterial y aumento de la FC; también se han visto alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de los glúcidos, tal como sucede en estudios similares publicados (Iturriaga et al. 2010; Prabhakar and Semenza 2012). Muchas de estas patologías se encuentran en los pacientes con AOS por lo que se podría considerar un buen modelo de estudio para este trastorno del sueño y sus patologías asociadas. De hecho en 1992 Fletcher comenzó a utilizar la HIC como modelo en ratas para estudiar la AOS (Fletcher et al. 1992) y desde entonces han sido muchos los autores que han utilizado este modelo para el estudio de dicha patología y de las alteraciones que conforman el SAHS (Li et al. 2005; Iturriaga et al. 2010; Nair et al. 2012; Quintero et al. 2013; Lavie 2015). Por otro lado, los datos obtenidos en cuanto al aumento de peso y acumulación de grasa epididimal y retroperitoneal que tienen los animales sometidos a dieta con alto contenido en grasa, en comparación con los animales sometidos a la dieta control, indican la efectividad de este protocolo para promover la obesidad, y por tanto éste parece ser un buen modelo de esta patología tal y como queda reflejado en numerosos estudios de investigación (Milagro et al. 2009; Panchal et al. 2012; Ribeiro et al. 2013). Podemos afirmar por tanto, que nuestro diseño experimental es apropiado para el estudio de la obesidad y la AOS y para determinar sus posibles interacciones, ya que imitarían una situación clínica habitual donde están presentes estas dos

condiciones acorde a los datos actuales que indican que la obesidad es uno de los factores de riesgo más importantes que predispone a la aparición de la AOS (Sutherland et al. 2012).

A continuación, se discutirá con detalle los resultados obtenidos en relación con la respuesta ventilatoria en los distintos grupos experimentales, los mecanismos causantes del estrés oxidativo y del aumento del tono simpático, y su relación o participación en la génesis de las alteraciones metabólicas y cardiovasculares encontradas en los grupos experimentales, producidas por la HIC y/o la obesidad.

3.6.2 Parámetros ventilatorios

Las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica (grupo CHI) presentaron un VM disminuido respecto a los animales controles. Esta disminución no concuerda con lo esperado ya que la HIC produce una sensibilización del CC, aumentando las descargas del nervio del seno carotídeo y sin embargo tanto en modelos animales de HIC como en pacientes con SAHS, muchos autores encuentran una disminución de la ventilación (Edge and O'Halloran 2015) (Gonzalez-Martín et al. 2011; Gonzalez et al. 2012). Estos resultados podrían interpretarse como una desviación de las señales que llegan del CC a los núcleos responsables del control de la actividad simpática, con el resultado final de una ventilación disminuida y un aumento del tono simpático (Kline 2010). La ventilación en los animales alimentados con dieta rica en grasa (grupo O) sigue un patrón restrictivo: aumento de la FR y disminución del VC (Zammit et al. 2010), aunque el VM se mantuvo similar a los animales control excepto durante la hipoxia más intensa que disminuyó significativamente. Sin embargo, este patrón ventilatorio daría lugar a una ventilación alveolar disminuida, ya que los animales obesos consumen menos O_2 / Kg de peso a pesar del trabajo respiratorio exagerado que realizan (Gibson 2000). La interacción de la obesidad y la HIC hace que empeore el patrón ventilatorio de estos animales (grupo OHI) disminuyendo el volumen minuto en todas las situaciones hipóxicas (12% O_2 , 10% O_2 y 7% O_2) y en la hipercapnia.

3.6.3 Activación simpática y cambios en la presión arterial

En el estudio de la activación simpática, se vió que los niveles de CA en plasma aumentaron en los grupos CHI, O y OHI alcanzando niveles máximos en el grupo O. Parece que la actividad simpática no aumentó de manera uniforme, ya que los niveles de NE aumentaron ligeramente más que los niveles de E, indicando que la liberación de NE desde las terminaciones simpáticas (principal fuente de NE en plasma) aumenta proporcionalmente más que la liberación de E desde la médula adrenal. La velocidad de síntesis de NE en la AR aumentó proporcionalmente más que el contenido de NE en AR, particularmente en el grupo O y OHI, indicando un aumento de la actividad simpática renal en animales alimentados con dieta rica en grasa. Si se calcula el tiempo de recambio de NE dividiendo el contenido de NE entre la síntesis de NE en AR vemos que los valores disminuyen desde 33 h en el grupo Control y 29 h en el grupo CHI hasta 18 y 20 h en el grupo O y OHI respectivamente. La activación simpática en los animales expuestos a HIC está mediada por el CC (Fletcher et al. 1992 ; Prabhakar 2001; Gonzalez et al. 2012). En los animales O parece que, al menos en parte, esta activación simpática podría estar mediada por la leptina, ya que se han descrito conexiones entre la leptina y la actividad simpática en humanos (Eikelis et al. 2004) y en otras especies (Rahmouni 2010). Además se ha demostrado que la leptina aumenta la activación simpática renal a través del núcleo arcuato del hipotálamo (Harlan et al. 2011). Por otro lado parece que el CC también contribuye a un aumento del tono simpático en animales alimentados con dieta rica en grasa (Ribeiro et al. 2013).

Existen muchos mecanismos involucrados en la génesis de la hipertensión arterial, entre ellos pensamos que la activación simpática mediada por los quimiorreceptores del CC sería el principal responsable (Kohler and Stradling 2012 ; Paton et al. 2013; Ribeiro et al. 2013); también la activación simpática renal que controla en parte la secreción de renina y por lo tanto la actividad del sistema renina-angiotensina, podría contribuir en la génesis de la HTA y otras patologías cardiovasculares en el SAHS (Fletcher et al. 2002).

Por otro lado, el estrés oxidativo y la inflamación presente en nuestros modelos experimentales pueden causar una pérdida progresiva de características fenotípicas del endotelio vascular (vasorelajación,

antiadherencia y antiproliferación) estando también estas alteraciones involucradas en la hipertensión arterial (Aird 2008).

Además, ciertas características que presentan los pacientes con AOS, como son las oscilaciones en la presión intratorácica, despertares repetidos e hipercapnia, podrían ser otros factores importantes en la génesis de la HTA y en las alteraciones cardiovasculares (Gottlieb et al. 2014). Sin embargo no parecen contribuir a la HTA que encontramos en nuestros animales expuestos a HIC ya que nuestro modelo animal no presenta oscilaciones de la presión torácica ni están expuestos a situaciones de hipercapnia. En nuestros animales expuestos a HIC (grupo CHI), observamos un aumento de la PA comparable a la observada por otros autores (Huang et al. 2007; Allahdadi et al. 2008), donde además también vemos que independientemente de los mecanismos implicados, los animales obesos expuestos a HIC (grupo OHI) tienen una HTA más aumentada. Este aspecto se puede relacionar con un estudio reciente de Chirinos y colaboradores que muestra que el tratamiento de manera independiente de la obesidad (con modificaciones de la dieta) y de la AOS (con CPAP) mejora la hipertensión en pacientes con SAHS, siendo esta mejoría aún mayor cuando ambos tratamientos se combinan (Chirinos et al. 2014). En nuestros animales al mismo tiempo que registrábamos la PA en la arteria carótida común también estudiamos el reflejo barorreceptor ya que contribuye al control de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial (PA), jugando un papel importante en la génesis de la hipertensión y de otras alteraciones cardiovasculares en pacientes con AOS. En 1921 Heinrich Ewald Hering mostró la existencia de barorreceptores de alta presión en los senos carotídeos y probó que la estimulación de los nervios aferentes que inervan estos receptores produce bradicardia e hipotensión. Cuando ventilamos a las ratas con hipoxia aguda (3min. 10%O₂) vemos que la PA disminuye en todos los grupos de animales sin que se observen diferencias estadísticamente significativas entre ellos, por lo que nuestros datos no nos indican un papel de disregulación barorreceptora como responsable de la hipertensión encontrada. Los datos al respecto son diversos; encontramos en la bibliografía trabajos de acuerdo a nuestros resultados que apoyan la hipótesis de que parece poco probable que los barorreceptores sean responsables del aumento de la PA en AOS (Dempsey et al. 2010), sin embargo encontramos estudios en ratas en los

que la HIC deteriora y aumenta la sensibilidad del reflejo barorreceptor (Gu et al. 2007; Cui et al. 2012). Por lo tanto, serían necesarios más experimentos para clarificar estos aspectos en modelos animales, donde habría que tener en cuenta además el aumento de la FC encontrada en nuestros grupos CHI, O, OHI ya que podría ser un posible mecanismo involucrado en la génesis de la hipertensión.

3.6.4 Estrés oxidativo y marcadores inflamatorios

En nuestro laboratorio se ha estudiado en profundidad distintos marcadores de estrés oxidativo en animales expuestos a HIC de distinta intensidad (Quintero et al. 2013) concluyendo que estos animales presentan daño oxidativo causado por la HIC moderada y severa. Las mitocondrias, responsables de la oxidación de ácidos grasos y fuente importante de ERO son clave en la génesis del estrés oxidativo, por ello estudiamos el daño mitocondrial centrándonos en el hígado, ya que es un órgano muy susceptible al estrés oxidativo por la HIC (Jun et al. 2008; Quintero et al. 2013) y por la dieta rica en grasa (Raffaella et al. 2008). En las ratas expuestas a HIC y en las ratas alimentadas con dieta rica en grasa se observó una disminución del cociente aconitasa/fumarasa lo que implica daño oxidativo a nivel mitocondrial (Cheng and Ristow 2013). En la misma dirección estaban los datos de la actividad y expresión de la enzima Mn-SOD, que disminuyeron en todos los grupos experimentales aproximadamente un 65% y un 30% respectivamente en comparación con los datos control, confirmando de nuevo la presencia de daño oxidativo mitocondrial. Cuando se analizó la actividad y la expresión de la enzima SOD citoplasmática (Cu,Zn-SOD), se observaron también niveles disminuidos en todos los grupos experimentales siendo más significativo en los animales alimentados con dieta rica en grasa, indicando en este caso daño oxidativo a nivel citoplasmático (Quintero et al. 2013). Este aumento del estrés oxidativo en animales del grupo O, se puede comparar con los encontrados por (Furukawa et al. 2004) que correlacionan de manera positiva el estado oxidativo con el IMC en humanos. Estos autores también vieron un aumento de ERO y una disminución de SOD en ratones obesos KKAy respecto a sus controles C57BL/6. Resultados comparables han sido descritos en ratones ob/ob (Laurent et al. 2004) y en ratas alimentadas con dieta rica en grasa

(Raffaella et al. 2008). Nuestros datos por tanto, estarían de acuerdo con la bibliografía que sugiere que el estrés oxidativo tiene un papel principal en la patogénesis de las comorbilidades presentes en el SAHS (Lavie 2015) y en la obesidad (Nair et al. 2012) pudiendo estar implicado en los mecanismos que conllevan a la aparición de alteraciones cardiovasculares, inflamatorias y metabólicas características en estas patologías.

Es bien conocido que el factor de transcripción NF- κ B puede ser activado por las ERO entre otros factores, dicha activación hace que los dímeros p65/p50 se trasladen al núcleo y se unan a promotores que regulan genes, principalmente aquellos relacionados con procesos inflamatorios y expresión de citoquinas inflamatorias (Korkmaz et al. 2012). En esta línea, Panchal y colaboradores han descrito que la quercetina, un flavonol con alto poder antioxidante, reduce la activación de NF- κ B producida por la dieta rica en grasa, disminuyendo el estrés oxidativo y la inflamación (Panchal et al. 2012). Además, nuestro grupo en estudios previos, constató la activación de NF- κ B en hígado en modelos experimentales de HIC (Quintero et al. 2013). En este trabajo de tesis doctoral se ha observado un aumento de la activación de NF- κ B mayor en el grupo OHI que en los grupos O y CHI aunque no podemos deducir si la dieta rica en grasa y la hipoxia intermitente crónica utilizan diferentes mecanismos para activar NF- κ B. Destacar por tanto, que nuestros resultados, van en la misma dirección que los encontrados por otros autores que muestran la activación de este factor de transcripción favoreciendo la aparición de un estado proinflamatorio en los animales expuestos a HIC y en pacientes con AOS, así como en modelos experimentales de obesidad y en pacientes obesos (Ryan et al. 2005; Kleemann et al. 2010; Quintero et al. 2013; Lavie 2015).

En el estudio de las alteraciones inflamatorias, cabe destacar la importancia de los niveles de PCR liberados en plasma en respuesta a diferentes estímulos, como son las ERO o los mediadores inflamatorios, donde además, su unión a determinadas células puede desencadenar la generación de ERO, creando un círculo vicioso que puede conducir al desarrollo de procesos de inflamación crónica (Zhang et al. 2012). En nuestros animales, los niveles de PCR están aumentados por el efecto de la HIC y de la dieta rica en grasa, siendo este aumento más significativo cuando ambos tratamientos se

combinan (OHI). Estos resultados, los podríamos atribuir al aumento de la PCR en el hígado, órgano que sintetiza esta proteína y principal órgano afectado por las ERO, y a un aumento en el tejido adiposo en los animales alimentados con dieta rica en grasa. De acuerdo con estos resultados, nuestro grupo ha demostrado que los niveles plasmáticos de PCR aumentan con la HIC de manera proporcional a la intensidad de la hipoxia (Quintero et al. 2013). Sabemos además, que el tejido adiposo puede generar citoquinas y moléculas proinflamatorias como la PCR (Ramírez Alvarado and Sánchez Roitz 2012) y que parece que existe una asociación directa y significativa al grado de adiposidad (Acevedo et al. 2007), especialmente al índice de masa corporal.

La leptina es una hormona pleiotrópica que tiene un papel importante como molécula proinflamatoria favoreciendo la liberación de citoquinas como TNF α o IL-6. Debido a la posible implicación de esta hormona en la fisiopatología del SAHS, ha sido estudiada por gran cantidad de autores en modelos animales expuestos a HIC al igual que en pacientes con dicha patología, encontrando en la literatura mucha diversidad en los datos respecto a los niveles de leptina. Messenger y Ciriello, observaron que la hipoxia intermitente de corta duración (80s 6.5%O₂ / 100s 21%O₂, 8h) aumentaba los niveles de leptina en plasma (Messenger and Ciriello 2013). Sin embargo en el trabajo de (Carreras et al. 2012) utilizando dos modelos de HIC de larga duración (90s 6.4%O₂ / 90s 21% O₂, 12h/día; 8% O₂ 12h/ 21% O₂, 12h 5 semanas) vieron una disminución moderada de leptina en plasma en los dos modelos estudiados. En pacientes con SAHS encontramos datos que hablan de niveles aumentados en plasma (Hargens et al. 2013) y por el contrario, otros autores no ven una relación clara entre los niveles de leptina y la HI aunque si que encuentran una asociación con el aumento de grasa corporal (Arnardottir et al. 2013; Testelmans et al. 2013). Nuestros resultados muestran que la HIC utilizada en este estudio aumenta los niveles de leptina en plasma de manera significativa. Debido a que la HIC estabiliza y aumenta el HIF1 α (Prabhakar et al. 2012), pensamos que el aumento de leptina podría estar mediado por HIF1 α (Trayhurn 2013). En los animales obesos (grupo O) los niveles de leptina también aumentaron siendo alrededor del doble que los observados en ratas controles (grupo C). En los animales del grupo OHI el aumento de leptina fue aún mayor que en los animales obesos (grupo O) sugiriendo que tanto el

aumento de tejido graso como la HI contribuyen a la génesis de estos niveles elevados de leptina, estos datos están en la misma línea que los niveles encontrados de PCR. Sin embargo en este grupo OHI esperábamos encontrar que la exposición a la HIC aumentara de manera más significativa la producción de leptina que en los animales obesos, debido a que la densidad de vascularización en el tejido adiposo blanco disminuye (Trayhurn 2013) encontrándose en una situación de hipoxia más intensa.

3.6.5 Alteraciones metabólicas

Estudiando el metabolismo de los lípidos encontramos que la HIC y la dieta rica en grasa inducen una alteración en los niveles lipídicos en plasma y un aumento de la acumulación de lípidos totales en el hígado, principal órgano implicado en el metabolismo. Estos resultados serían comparables a los encontrados en el trabajo de Quintero y colaboradores (Quintero et al. 2013). También de acuerdo con nuestros datos, encontramos que la HIC en ratones aumenta la expresión de esteroil coenzima A desaturasa 1, a través de HIF-1, esta enzima interviene en la biosíntesis de los ácidos grasos monoinsaturados, y actuaría produciendo un aumento de los niveles de colesterol total, fosfolípidos y triglicéridos en suero, mostrando en estos animales más cantidad de lípidos en hígado (Li et al. 2005). La acumulación de los lípidos en el hígado contribuye a que aumenten los lípidos en plasma ya que éstos se incorporan a las lipoproteínas y posteriormente son secretados al torrente sanguíneo. Por otro lado, una disminución del aclaramiento de las lipoproteína ricas en triglicéridos también podría contribuir a la hiperlipidemia observada (Drager et al. 2012; Lanaspá et al. 2012).

Respecto a las ratas alimentadas con dieta rica en grasa, se ha descrito una disminución de la expresión de carnitina palmitoiltransferasa-1 causando una reducción en la oxidación de ácidos grasos y facilitando que se depositen en el hígado (Panchal et al. 2012). La acumulación de grasa en el hígado y el aumento de lípidos en plasma podrían estar relacionados con una disminución de la actividad de la aconitasa encontrada en nuestros modelos experimentales de AOS y de obesidad. La disminución de esta enzima del ciclo de Krebs conduciría a una acumulación de citrato en la mitocondria y su salida al citoplasma, causando una estimulación de la enzima ATP citrato liasa,

aumentando la síntesis de ácidos grasos, lipogénesis de novo y acumulación de grasa en el hígado (Lanaspa et al. 2012). Destacar por último, que en la aparición de esteatosis hepática no alcohólica caracterizada por la acumulación de grasa en el hígado, aunque las causas exactas se desconocen, parece que el estrés oxidativo y la inflamación favorecen su desarrollo, estas situaciones las hemos observado en nuestros grupos experimentales CHI, O y OHI.

Respecto a la acción de la hipoxia sobre el metabolismo de la glucosa en nuestros animales expuestos a HIC, los datos indicarían lo que se podría definir como un estado prediabético de RI. De acuerdo con estos datos hemos encontrado en la literatura estudios en pacientes con AOS que desarrollan diabetes tipo 2 o prediabetes independientes de la obesidad (Kim 2012). La HI aguda en ratones (9h) (Liyori N 2007) y en humanos (8h) (Louis and Punjabi 2009) con niveles de saturación de O₂ comparables a los que hemos utilizado en este estudio causan una disminución en la sensibilidad a la insulina independiente de la obesidad. De la misma manera, estudios en modelo de HIC en ratón han mostrado la presencia de hiperglucemia y un índice de HOMA significativamente aumentado (Drager et al. 2011; Drager et al. 2012). Considerando la bibliografía, cabe pensar en la existencia de uno o más mecanismos implicados en la génesis de las alteraciones del metabolismo glucémico producidas por la HIC. En este sentido pensamos que los mecanismos involucrados podrían estar mediados por el CC, ya que la estimulación hipóxica repetida sensibiliza el CC, esta sensibilización aumentaría las descargas eléctricas en el NSC, que se integran en el NTS en el tronco del encéfalo (Gonzalez-Martín et al. 2011) (Kline 2010) produciendo un aumento de la actividad simpática y una RI. En paralelo las CA particularmente la epinefrina aumenta la gluconeogénesis y glucogenolisis en el hígado desembocando en una situación de hiperglucemia. Las CA afectan la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos y en el hígado llevando a un cuadro de RI (Paton et al. 2013) como el que encontramos en nuestros resultados. De manera similar, en la situación de obesidad, observamos que la actividad del CC está aumentada en animales alimentados con dieta rica en grasa, y que la falta de función del CC (por resección del NSC) hace que desaparezca la RI y la hipertensión arterial, indicando que el CC está implicado en la patogénesis de alteraciones metabólicas y hemodinámicas a través de la

activación simpática (Ribeiro et al. 2013). En cuanto a la interacción entre la dieta rica en grasa y la exposición a HIC (grupo OHI) observamos alteraciones en el metabolismo de la glucosa mayores que cuando se estudia de manera independiente (grupos CHI y O) aunque en ningún caso este aumento es aditivo. Por tanto, extrapolando nuestros resultados a los humanos podemos decir que es importante tener en cuenta la aparición de la AOS en sujetos obesos ya que puede empeorar su metabolismo de la glucosa. Destacar finalmente, que aunque pensamos que el mediador principal de las alteraciones metabólicas de la glucosa es el sistema simpático, podrían existir otros factores importantes como el estrés oxidativo, la inflamación o factores de transcripción como el NF- κ B, involucrados en la génesis de dichas alteraciones metabólicas.

En resumen podemos decir que nuestros datos indican que la HIC y la dieta rica en grasa causan patologías cardiovasculares y metabólicas asociadas a una disregulación del estrés oxidativo y de la actividad simpática. En general en los animales con dieta rica en grasa u obesos (grupo O) todos los parámetros estudiados están más alterados que en los animales expuestos a HIC (grupo CHI) y cuando se combinan ambas situaciones (grupo OHI) la mayoría de las alteraciones observadas (actividad simpática, ventilación, estrés oxidativo, inflamación y metabolismo) tienden a agravarse. Sin embargo no se vieron interacciones positivas estadísticamente significativas entre ambos tratamientos. Basándonos en los resultados de este trabajo parece que es importante a nivel clínico que se preste atención a la aparición de trastornos del sueño en pacientes obesos ya que estas alteraciones con el tratamiento adecuado (CPAP) pueden evitar un empeoramiento de todas las patologías asociadas a la obesidad.

CAPÍTULO 2

4. CAPÍTULO 2. SIGNIFICADO DE LA LEPTINA EN EL CUERPO CAROTIDEO. EFECTOS SOBRE LA VENTILACIÓN

4.1 INTRODUCCIÓN

La leptina, es una hormona pleiotrópica implicada en numerosas funciones, entre las que destaca su papel en el control de la saciedad y el equilibrio energético (Lönnqvist et al. 1995 ; Caro et al. 1996). Además participa modulando la activación de la respiración (Tankersley et al. 1998), y es en esta función del control respiratorio en la que queremos centrar el estudio de este capítulo, ya que desde que fue descubierta en el año 1994 han surgido diversas investigaciones que sugieren un papel de la leptina en las enfermedades respiratorias. Trabajos llevados a cabo en ratones con déficit genético de leptina ob/ob mostraron una alteración marcada del control ventilatorio con desarrollo de insuficiencia respiratoria (Tankersley et al. 1996). Esta disfunción del control ventilatorio se agrava durante el sueño principalmente en el periodo REM, presentando estos animales diversas modificaciones que no aparecen en animales sin déficit congénito de leptina y que se revierten tras la administración de leptina confirmando aún más el papel de esta hormona sobre la respuesta ventilatoria (Tankersley et al. 1998). Más recientemente encontramos en la bibliografía que la leptina está implicada en diversas enfermedades respiratorias como el Síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y cáncer de pulmón (Malli et al. 2010). En el SAHS, el papel de la leptina parece evidente, ya que la hipoxia intermitente (hipoxemia durante el sueño) independientemente del nivel de obesidad, es un potente estimulante de la liberación de leptina (Sanner et al. 2004). Estos pacientes muestran niveles más elevados de leptina que los individuos sin SAHS (Tatsumi et al. 2005), que a su vez se correlaciona con la severidad de esta patología en términos de índice de apnea hipopnea (IAH) (Ulukavak Ciftci et al. 2005 ; Snyder et al. 2008). Asociado al SAHS encontramos el síndrome de hipoventilación y obesidad (SHO), que combina hipoventilación diurna con una $\text{PaCO}_2 > 45\text{mmHg}$ y obesidad ($\text{IMC} > 30$) y en cuya génesis la leptina podría tener un papel fundamental, ya que estos pacientes presentan niveles elevados de leptina, sugiriendo que dicha hipoventilación podría ser el resultado de un estado de resistencia a la leptina (Atwood 2005). Por lo tanto, cuando la

obesidad se une a alteraciones respiratorias durante el sueño los niveles elevados de leptina pueden predisponer al desarrollo del SHO, siendo un buen indicador de esta patología, para algunos autores mejor incluso que el IMC (Phipps et al. 2002).

Por otro lado, sabemos que el CC juega un papel fundamental en las enfermedades respiratorias detectando los cambios en la PaO₂, PaCO₂ y pH, y activándose en estas situaciones de hipoxia, hipercapnia o acidosis. Esta activación produce un aumento en la frecuencia de las descargas en las terminaciones del nervio del seno carotídeo (NSC), cuya actividad está integrada en el núcleo del tracto solitario. Esta respuesta conlleva la activación de reflejos respiratorios encaminados a normalizar los gases sanguíneos a través de la hiperventilación (Gonzalez et al. 1994), y a regular la presión arterial y el rendimiento cardíaco a través de un aumento de la actividad de la rama simpática del sistema nervioso autónomo (Marshall 1994).

Se ha demostrado la presencia de leptina y receptores de leptina (ObRb) en las células quimiorreceptoras del CC (Porzionato et al. 2011; Messenger et al. 2012) y también se ha observado que el aumento de los niveles de leptina circulantes inducen la expresión de pSTAT3 (phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3) y del gen de respuesta temprana Fra-1 (fos-related antigen-1) en estas células quimiorreceptoras (Messenger et al. 2012). Diversos trabajos realizados en animales de experimentación muestran que la administración de leptina aumenta la ventilación (O'Donnell et al. 1999; Inyushkin et al. 2009; Chang et al. 2013).

4.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

En base a lo expuesto anteriormente y sabiendo que aún quedan muchos aspectos por estudiar para poder proporcionar una descripción detallada de la participación de la leptina en los trastornos más comunes del sistema respiratorio, hemos querido investigar en este capítulo el papel de la leptina en la modulación de la función del CC, y por tanto en la ventilación, planteando la siguiente pregunta como hipótesis de trabajo: ¿los efectos de la leptina sobre la ventilación están mediados por el CC?

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el efecto de la leptina administrada de forma aguda sobre la ventilación basal y en respuesta a la hipoxia en animales anestesiados y en animales sin anestésicar.

2. Determinar el efecto agudo (<2h) y crónico (48h) de la leptina en la actividad quimiorreceptora del CC mediante experimentos de liberación de ³H-Catecolaminas ante los estímulos hipóxico y de alto K⁺.

3. Determinar el efecto crónico (48h) de la leptina en el CC midiendo la respuesta de Ca²⁺ intracelular producida por los estímulos hipóxico y de alto K⁺ en células aisladas de CC en cultivo.

4.4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.4.1 Animales y anestesia

Estos experimentos se han llevado a cabo en colaboración con el laboratorio de la Dra. Silvia Vilares Conde de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad NOVA de Lisboa. Todos los procedimientos se realizaron en ratas Wistar adultas macho de 12 semanas de edad (280-320g de peso) siguiendo la normativa vigente conforme lo dispuesto en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero. Las ratas utilizadas se alojaron en los animalarios de la Universidad de Valladolid y de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad NOVA de Lisboa bajo condiciones adecuadas de humedad, iluminación y temperatura. Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico disuelto en solución salina (60mg/kg). Al finalizar todos los procedimientos experimentales tal y como marca la normativa se realizó la eutanasia de los animales mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg/kg de peso).

Para poder alcanzar los objetivos propuestos llevamos a cabo diferentes protocolos experimentales *in vivo* e *in vitro*:

In vivo: procedimientos realizados en animales de experimentación (ratas), para explorar el efecto agudo de la leptina sobre la **ventilación** basal y en respuesta a la hipoxia, utilizando tres protocolos distintos:

- Ratas anestesiadas a las cuales se les administró distintas dosis de leptina (300, 600, 900ng/kg) por vía intravenosa (i.v.)
- Ratas anestesiadas a las que se les administró una única dosis de leptina (1mg/kg) por vía subcutánea (s.c.)
- Ratas sin anestesiar a las que se les administró una única dosis de leptina (1mg/kg) subcutánea para estudiar los parámetros ventilatorios mediante pletismografía.

In vitro: experimentos realizados en CC, trabajando con el órgano intacto o con células disociadas, para explorar el efecto agudo y crónico de la leptina sobre la función de este órgano quimiorreceptor. Se realizaron dos protocolos experimentales:

- 1) Experimentos de **liberación de catecolaminas (CA)** en CC en situaciones control, de hipoxia 7%O₂ y de 35mM K⁺ en:
 - CC intactos en fresco nada más realizar la cirugía para explorar el efecto agudo (<2h) de distintas dosis de leptina (10, 40 y 80ng/ml) en la liberación de ³H-CA.
 - CC cultivados durante 48h con y sin leptina (40ng/ml) para estudiar su efecto crónico en experimentos de liberación de ³H-CA.
- 2) Experimentos de **medida de Ca²⁺ intracelular** en respuesta a la hipoxia (N₂) y al estímulo de 35mMK⁺
 - En células disociadas de CC cultivadas durante 48h con y sin leptina (40ng/ml) para estudiar el efecto crónico de la leptina.

4.4.2 Protocolos *in vivo*. Efecto agudo de la leptina sobre la ventilación:

Se realizaron dos protocolos diferentes para estudiar el efecto agudo de la leptina sobre la ventilación, uno en ratas anestesiadas y otro en ratas sin anestesiar. También se utilizaron dos vías de administración de leptina, debido a que para estudiar la ventilación en animales despiertos es más cómodo y menos cruento realizar inyecciones de leptina por vía subcutánea que intravenosa, y otro mediante administración por vía intravenosa. El protocolo de administración por vía intravenosa permitió utilizar unas dosis de leptina más bajas, ya que la biodisponibilidad de la leptina administrada de esta forma es

del 100% pudiendo estudiar de manera más completa el efecto de la leptina sobre la ventilación.

4.4.2.1 En animales anestesiados: administración de leptina por vía intravenosa.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60mg/kg de peso) por vía intraperitoneal, y cuando fue necesario se administró un 10% de la dosis inicial por vía intravenosa para mantener el mismo grado de anestesia durante todo el experimento. Una vez que los animales estaban correctamente anestesiados, se realizaba una traqueotomía y se les dejaba respirando aire ambiente de manera espontánea. A continuación se canulaban las dos arterias femorales, una para realizar las medidas de presión arterial y otra para hacer las extracciones de sangre, los catéteres utilizados fueron Vygon 167.07+0.3-0.7mm. También se introdujo un catéter en la vena femoral (Vygon 167.10+0.5-1.0mm) para administrar las distintas dosis de leptina (300; 600 y 900ng/kg de peso) y para administrar los suplementos de anestesia. Tras identificar las dos arterias carótidas comunes se colocaba un hilo en cada arteria para hacer las oclusiones de 5 segundos (OCC5”) y de 15 segundos (OCC15”). La temperatura corporal se mantuvo en 37 ± 1 °C utilizando una manta eléctrica (homeothermic blanket control unit; Harvard apparatus) regulada por una sonda rectal que medía la temperatura de la rata. Estos procedimientos están explicados con detalle en el suplemento on-line de la referencia (Monteiro et al. 2011). Una vez que la rata estaba estable (aproximadamente 1h), se midió la glucemia basal y se extrajo sangre para analizar los niveles de leptina basales. Se monitorizaron los parámetros respiratorios FR y el VC en situación basal con un (Neumotacómetro PTM HSE, transductor de presión diferencial (modelo DP 45-14 Validyne Ingeniería, Norte Northridge, CA) y un amplificador de presión (Plugsys Cajas, modelo 603, HSE-HA GmgH) software HSE-Harvard Pulmodyn® W). El VM fue calculado multiplicando la FR por el VC y ambos volúmenes fueron normalizados por el peso del animal ($VC=mL.Kg^{-1}$; $VM=mL.min^{-1}.Kg^{-1}$). Tras obtener los parámetros basales se realizaban las oclusiones de 5s (OCC5”) y 15s (OCC15”) de las dos arterias carótidas, previo a la administración de leptina. Los protocolos de oclusión elegidos (5s y 15s), se corresponden con el efecto producido ante un estímulo hipóxico (oclusión de

5s, que activa el CC) y ante un estímulo isquémico combinando hipoxia + hipercapnia (oclusión de 15s que activa al CC y a los quimiorreceptores centrales) (Monteiro et al. 2011). Tras las primeras oclusiones y la toma de muestra de sangre en condiciones basales, se comenzó a administrar la dosis más baja de leptina por la vena femoral (300ng/kg), registrando durante 15 minutos y a continuación se volvió a realizar todo el procedimiento de toma de sangre (para el análisis de glucosa y leptina), oclusiones y administración de nueva dosis de leptina. Todo el protocolo se repitió administrando las distintas dosis de leptina hasta alcanzar 900ng/Kg de dosis máxima (Figura 37).

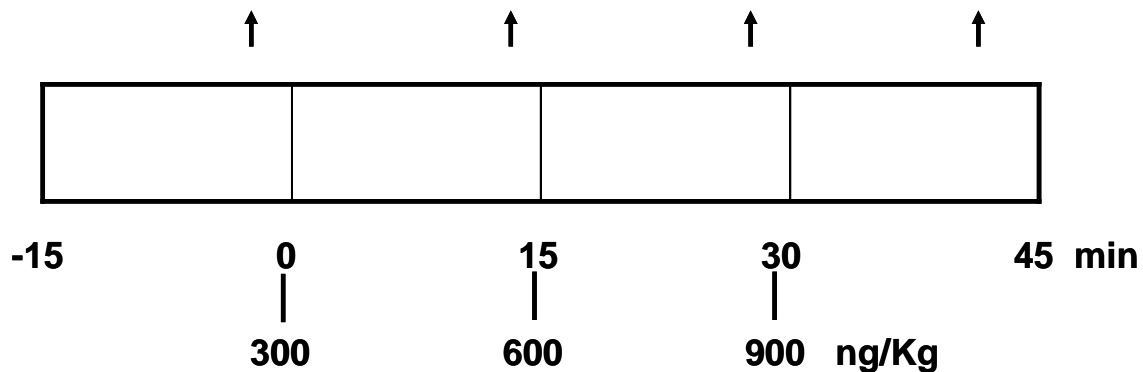


FIGURA 37: Esquema del protocolo experimental de leptina intravenosa en ratas anestesiadas, para estudiar el efecto de las distintas dosis de leptina (300, 600, 900ng/Kg), administradas cada 15 minutos en ratas controladas anestesiadas, sobre la ventilación basal y tras el estímulo hipóxico (OCC 5”) e isquémico (OCC 15”). Las flechas indican el momento de la extracción de sangre para determinar la glucemia y la leptina y el momento de las oclusiones. Los valores basales fueron medidos justo antes de las oclusiones.

Los valores basales de la FR y del VC (registrados para poder calcular el VM) se corresponden con el valor medio medido en un período de 25s, inmediatamente antes de las oclusiones. Después de las oclusiones se tomaron los valores de la FR y VC que correspondían a la media de los efectos máximos medidos durante el período de 25s que siguió a la oclusión, y se compararon con la situación basal. Entre cada oclusión se dejó que el registro se estabilizara. La leptina en plasma fue analizada mediante un kit de ELISA de la marca Cusabio Biotech; bioNova Científica, Madrid, Spain, siguiendo las instrucciones del fabricante. La glucemia se midió en una gota de sangre

obtenida de la cola del animal, mediante tiras reactivas de la marca Freestyle de Abbot.

4.4.2.2 En animales anestesiados: administración de leptina por vía subcutánea

De la misma forma que en el apartado anterior, cuando los animales estaban anestesiados, se canularon las arterias femorales, se identificaron las arterias carótidas comunes para realizar las oclusiones y se esperó hasta la estabilización de todos los parámetros, frecuencia respiratoria, presión arterial y temperatura (aproximadamente 1h). La vena femoral fue canulada también para la administración de suplementos de anestesia. A continuación se midió la glucemia basal y se extrajo sangre para el análisis de leptina en plasma. Posteriormente, una vez que el registro estaba estable, se realizaron las oclusioniones (5 y 15s) y se inyectó una única dosis de leptina en la parte dorsal de la rata por vía subcutánea (1mg/kg peso). El registro duró 60 minutos desde la administración de leptina, cada 15 minutos realizábamos una extracción de sangre para el estudio de la glucemia y la leptina y hacíamos las oclusioniones de 5 y 15s (Figura 38).

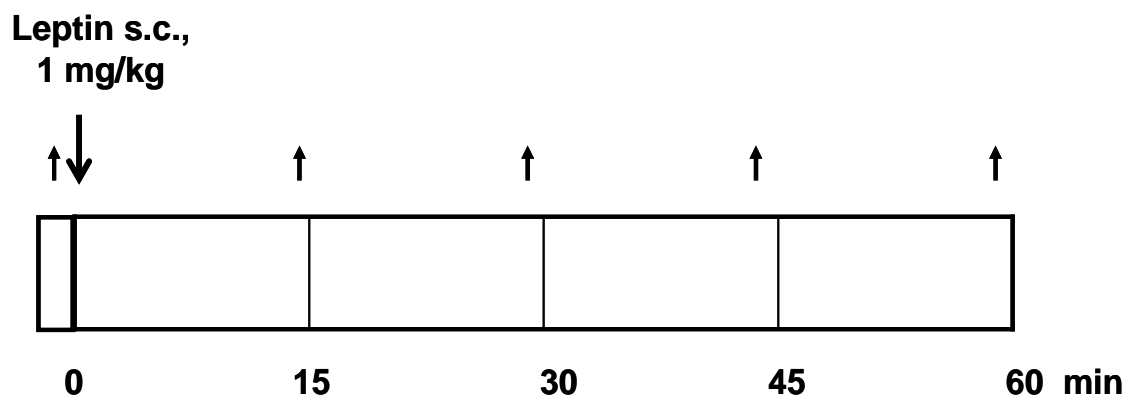


FIGURA 38: Esquema del protocolo experimental de administración de leptina subcutánea en ratas anestesiadas, para estudiar el efecto de una única dosis de leptina (1mg/Kg de peso) en ratas controles, sobre la ventilación tras estímulo hipóxico (OCC 5") e isquémico (OCC 15"). Las flechas indican el momento de la extracción de sangre para determinar la glucemia y los niveles de leptina así como el momento de las oclusioniones realizadas cada 15 minutos durante 60 minutos.

4.4.2.3 En animales sin anestesiar. Pletismografía: administración de leptina por vía subcutánea

Se realizaron pletismografías para estudiar el efecto agudo de la leptina sobre la ventilación en ratas controles de 3 meses de edad sin anestesiar. (Ver detalles pletismografía en apartado 3.4.3). La anestesia deprime la ventilación y las respuestas a la hipoxia y en este caso también a la hipoxia isquémica. Estos efectos se han visto con los barbitúricos como el pentobarbital (Hirshman et al. 1975) así como con otros anestésicos como el halotano, uretano e isoflurano (Hirshman et al. 1977). Por ello es importante estudiar las respuestas ventilatorias en animales conscientes sin anestesiar mediante la técnica de pletismografía.

Las ratas se dividieron de forma aleatoria en dos grupos experimentales:

- Ratas controles, a las que se inyectó solución salina por vía subcutánea.
- Ratas con leptina, a las que se inyectó una única dosis de leptina (1mg/kg de peso) por vía subcutánea.

Previo a la inyección de leptina, las ratas permanecieron dentro de las jaulas del pletismógrafo durante 45min. respirando aire para su adaptación a las cámaras pletismográficas y poder así obtener valores basales de los parámetros (período de aclimatación). Una vez preparada la leptina (1mg/kg de peso) en solución salina atemperada y pasado el periodo de aclimatación se abrían las cámaras para inyectar la leptina a las ratas (efecto sobre la ventilación) o la solución salina (ratas control) por vía subcutánea en la parte dorsal de la rata. En el experimento se siguió el protocolo que se muestra en la Figura 39, y se midió la frecuencia respiratoria, el volumen corriente y el volumen minuto en situaciones de aire, hipoxia (7%O₂ resto N₂) y en hipoxia+hipercapnia (7%O₂ 5%CO₂ resto N₂). El flujo de las diferentes mezclas de gases en las cámaras fue de 1ml/min.

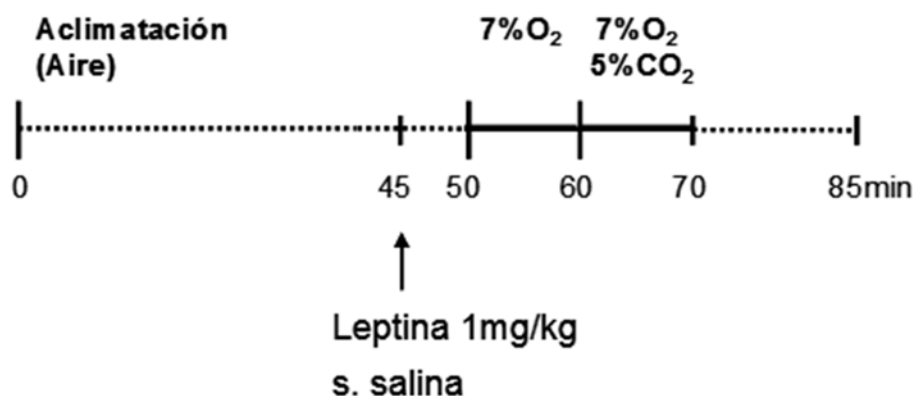


FIGURA 39: Protocolo de plestismografía para estudiar el efecto de la leptina vs. solución salina (administrada tras los 45min. de aclimatación) sobre la ventilación mientras las ratas respiran aire (línea punteada); 7%O₂ resto N₂ y 7%O₂ 5%CO₂ resto N₂ (línea continua).

El protocolo de plestismografía se iniciaba nada más inyectar la leptina o la solución salina a los animales y tenía una duración de 40 minutos, ya que en experimentos previos realizados en ratas anestesiadas, se vio que el efecto de la leptina sobre la ventilación se iniciaba a los 15 minutos de la administración por vía subcutánea y el efecto máximo se alcanzaba entre los 15 y 30 minutos.

4.4.3 Protocolos *in vitro*. Efecto agudo y crónico de la leptina sobre el cuerpo carotídeo

4.4.3.1 Liberación de ³H-catecolaminas en el cuerpo carotídeo: efecto agudo y crónico de la leptina

Para realizar los experimentos de liberación de CA, en las ratas anestesiadas se extraían las bifurcaciones carotídeas, y con la ayuda de una lupa de disección se limpiaron los CC de tejido conectivo circundante. Se realizaron dos tipos de experimentos:

- en CC intactos en fresco nada más realizar la cirugía, para explorar el efecto agudo de distintas dosis de leptina (10,40 y 80ng/ml) en la liberación de ³H-CA.
- en CC cultivados durante 48h (explantes) con y sin leptina 40ng/ml para estudiar el efecto crónico de la leptina en la liberación de ³H-CA.

Los CC cultivados se mantuvieron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina/fungizona y L-Glutamina 2mM en placas de Petri de 35mm de diámetro que se colocaron en un incubador (HERAcell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 37°C con una atmósfera de 5%CO₂, 95% aire y una humedad relativa del 95% hasta el momento de llevar a cabo los experimentos de liberación de ³H-CA (Gallego-Martin et al. 2012). Los CC controles fueron incubados sin leptina en el medio durante 48h y los CC para el estudio del efecto crónico de la leptina fueron incubados con 40ng/ml de leptina en el medio durante 48h, cambiando a las 24h el medio para renovar la leptina. Estos experimentos se realizaron tras haber estudiado previamente el efecto agudo de las distintas dosis de leptina sobre la liberación de ³H-CA, procedimientos que nos hicieron establecer la dosis de 40ng/ml a la que se incubaron los CC.

Una vez que los CC estaban preparados (en fresco o tras las 48h de cultivo) se procedió al marcaje radioisotópico de las CA, incubando los CC en presencia de tirosina tritiada (3,5-³[H]-Tyr). La tirosina es el precursor natural de las CA y, dado que su velocidad de recambio en el CC es elevada, una cantidad importante de los depósitos quedan marcados radiactivamente (Fidone and Gonzalez 1982). Los CC se incubaron a 37°C durante dos horas en viales con medio que contenía 3,5-³[H]-Tyr (30μM, actividad específica de 45Ci/mmol, Amersham Ibérica, Madrid), DL-metiltetrahidrobiopterina 0.1mM y ácido ascórbico 1mM (cofactores de la tirosina hidroxilasa y de la Dopamina-β-hidroxilasa respectivamente). Después del periodo de marcaje, los CC fueron transferidos individualmente a un vial nuevo e incubados en un baño a 37°C con agitación en una solución Tyrode-HCO₃⁻ (previamente gaseado con 20%O₂, 5%CO₂ y resto N₂, para equilibrar su pH a 7.4) (Tabla 3), libre de 3,5-³[H]-Tyr y cofactores. De este modo se realizó un lavado de 1 hora de duración para facilitar la eliminación del exceso del precursor radiactivo. Durante el lavado, la disolución (continuamente gaseada para mantener el pH a 7.4) era renovada a los 30min. y después cada 10min. hasta completar la hora de lavado.

Compuesto	Control	35mM K ⁺
NaCl	116mM	86mM
KCl	5mM	35mM
CaCl ₂ *2H ₂ O	2mM	2mM
MgCl ₂ *6H ₂ O	1.1mM	1.1mM
Glucosa	5mM	5mM
Hepes	10mM	10mM
NaHCO ₃	24mM	24mM

TABLA 3: Composición de las soluciones de Tyrode-HCO₃ Control y con 35mMK⁺ empleadas en los experimentos de liberación de ³[H]-CA y de medida de Ca²⁺ intracelular.

Después del lavado, se comenzó el experimento de liberación de ³H-CA propiamente dicho. Para ello, los CC (en fresco) fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos; un grupo de CC incubados en solución sin leptina (controles) y el otro grupo de CC incubados en solución con leptina (experimentales).

En el protocolo de los CC intactos en fresco, éstos se incubaron desde los 20 minutos antes del estímulo hipóxico hasta el final del experimento con o sin leptina según el grupo experimental, utilizando distintas dosis de leptina (10, 40 y 80ng/ml). Para el estudio de los CC cultivados previamente durante 48 h, los controles no se incubaron con leptina y los experimentales tuvieron leptina 40ng/ml en el medio durante todo el experimento de liberación de ³H-CA.

Tanto en los CC en fresco como en los cultivados previamente 48 h se siguió el siguiente protocolo que se muestra en la Figura 40, cada división representa 10 minutos de tiempo:

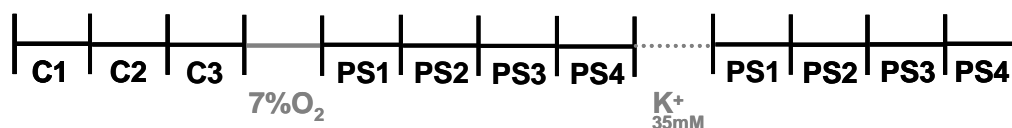


FIGURA 40: Protocolo de liberación de ³H-CA en situaciones control, de 7%O₂ y 35mM de K⁺, en CC frescos y en CC incubados previamente durante 48h con o sin leptina (C= situación control y PS= postestímulo).

Este protocolo consta de 2 ciclos de estimulación: estímulo hipóxico (7%O₂) y estímulo despolarizante (35mMK⁺). Durante todo el protocolo experimental los viales con los CC se mantuvieron con un gaseo superficial constante en una atmósfera de 20%O₂, 5%CO₂ y resto N₂, excepto en el caso de la hipoxia que se gasearon con 7%O₂, 5%CO₂ y resto N₂.

Durante todo el protocolo las disoluciones, que contenían las ³H-CA liberadas por el CC, se recogieron y renovaron cada 10min. utilizando un sistema de jeringas. Las fracciones recolectadas en viales fueron acidificadas a pH 3.2 con una mezcla de ácido acético glacial y ácido ascórbico para evitar la degradación de las CA guardándolas a 4°C para su análisis posterior. Al final de cada experimento se determinó el contenido de ³H-CA en los CC. Los tejidos fueron recogidos en 200µl de PCA 0.6N y pesados en una electrobalanza (Supermicro, Sartorius, Pacisa, Madrid). A continuación fueron homogeneizados (cristal/cristal) y centrifugados a 13000g durante 5min. a 4°C y el sobrenadante fue procesado igual que las fracciones de disolución recolectadas durante los experimentos.

El procedimiento para analizar las ³H-CA presentes en las fracciones recolectadas y en el sobrenadante del CC se llevó a cabo por adsorción de las CA sobre alúmina (100mg) a pH alcalino (obtenido por adicción de 4ml de buffer Tris-HCl 2M, pH 8.7) y posterior elución con 1ml de HCl 1N. Posteriormente la fracción eluida se contó durante 5min. en un contador de centelleo (Tri-Carb 2800TR Perkin-Elmer).

4.4.3.2 Medida de calcio citosólico en células disociadas de cuerpo carotídeo: efecto crónico de la leptina

4.4.3.2.1 Disociación y cultivo de las células quimiorreceptoras de cuerpo carotídeo

Una vez realizada la cirugía y microcirugía, los CC se mantuvieron en un tubo cónico con Tyrode estéril a 4°C (Tabla 4). La disociación de las células se realizó incubando los CC a 37°C utilizando dos disoluciones enzimáticas. Primero se incubaron durante 15min. en 2ml de Tyrode estéril sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ con 2.5mg/ml de colagenasa tipo IV y 6mg/ml de albúmina bovina. A continuación se incubaban durante 10min. en 2ml de Tyrode estéril sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, conteniendo 1mg/ml de tripsina y 6mg/ml de albúmina. Posteriormente,

se inhibió la actividad enzimática añadiendo 2.5ml de medio DMEM a 4°C, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina/fungizona y L-Glutamina 2mM. Las células se dispersaron mecánicamente con una micropipeta y se centrifugaron a 200g durante 5min. Se resuspendieron en medio DMEM suplementado y se sembraron. La siembra se realizó “en gota” (25-30µl), en cristales estériles de 15mm de diámetro recubiertos con poli-L-lisina (0.01mg/ml), en placas de 12 pocillos. Las células se dejaron durante 45min. en el incubador (HERAcell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 37°C con una atmósfera de 5%CO₂, 95% aire y una humedad relativa del 95% para facilitar su adhesión. Pasado ese tiempo se añadió 1ml de medio DMEM suplementado a cada pocillo. En este medio se añadió la leptina 40ng/ml a las células experimentales y medio sin leptina a las células controles. A las 24h de incubación se cambió el medio a las células para renovar la leptina y en el caso de los controles se puso medio sin leptina. Las células controles y experimentales (con leptina) se mantuvieron en el incubador un total de 48 h. hasta el momento de realizar el experimento de medida de Ca²⁺ citosólico.

4.4.3.2.2 Sistema de medida de calcio citosólico

El sistema consta de un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-S (Nikon Corporation, Tokio, Japón) con un objetivo S-flúor 40x de inmersión en aceite, apto para fluorescencia y un bloque de espejos dicróicos adecuado para el uso del fluoróforo Fura 2-AM (dicróico 400, filtro de emisión 525/50); un sistema de iluminación compuesto por una lámpara de xenón acoplada a un monocromador (Cairn Research Ltd, UK) y un sistema de detección compuesto por una cámara CCD-EM modelo C9100-02 (Hamamatsu Photonics KK, Joko-Cho, Japón). El programa empleado para registrar los experimentos fue MetaFluor (Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA, USA) y el análisis *off-line* se realizó con Origin 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) y GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

4.4.3.2.3 Carga de las células con Fura-2-AM

El fluoróforo empleado en los experimentos de microfluorimetría fue el Fura-2 en su forma acetoximetiléster (AM), la cual puede penetrar libremente a

través de la membrana celular. Una vez en el citosol de la célula, el Fura-2-AM es atacado por esterasas citosólicas inespecíficas que hidrolizan el grupo acetoximetiléster, convirtiéndolo en su forma iónica, fluorescente y sensible a Ca^{2+} . Una vez hidrolizado no puede atravesar la membrana plasmática y por lo tanto no puede salir de la célula. Para cargar las células quimiorreceptoras de CC de rata se utilizó Fura-2-AM a una concentración de $2\mu\text{M}$ en disolución Tyrode durante 30-45min., a temperatura ambiente y en agitación orbital continua. Después se lavó el fluoróforo, para eliminar el Fura-2-AM que no se había hidrolizado durante el proceso de carga, con Tyrode durante 30-45min., a temperatura ambiente y en agitación orbital continua (agitador PSU-2T plus, Boeco, Hamburgo, Alemania).

4.4.3.2.4 Medidas de calcio citosólico

Los cristales con las células disociadas adheridas, tras la carga con Fura-2-AM y el lavado de las células, fueron montados en una cámara de perfusión abierta acoplada a una plataforma PH-4 (Warner Instruments Corporation, Handem, CT, USA), que se colocó en el microscopio y se conectó al sistema de perfusión para comenzar el experimento. La perfusión se realizó por gravedad, con un flujo de 3ml/min. de disolución Tyrode- HCO_3^- equilibrada (20% O_2 , 5% CO_2 resto N_2), a través de cuatro canales de vías metálicas que evitan la difusión de los gases a través de su pared y permiten que las disoluciones empleadas lleguen a las células correctamente equilibradas. Cada canal llevaba intercalado una electroválvula que permite el cambio instantáneo de una disolución a otra. La temperatura de las disoluciones se controló mediante precalentamiento en un baño a 37°C y con un sistema de calentamiento en línea (modelo SF28, Warner Instruments Corporation, Handem, CT, USA) acoplado a un controlador automático de temperatura (modelo TC-344B, Warner Instruments Corporation, Handem, CT, USA). Durante el experimento las células fueron sometidas a diferentes estímulos mediante la aplicación de distintas disoluciones (Tabla 3):

- estímulo hipóxico (Tyrode HCO_3^- gaseado con 95% de N_2 y 5% CO_2)
- estímulo despolarizante (Tyrode HCO_3^- con 35mMK⁺)

El Fura-2 es un fluoróforo radiométrico de excitación dual, por lo que se excita a dos longitudes de onda diferentes (340nm y 380nm), y emite en una única longitud de onda (510nm). Cada dos segundos se tomaron un par de imágenes (una para cada longitud de onda) con la cámara CCD-EM. El tiempo de exposición utilizado fue de 100ms. En cada experimento, mediante el uso del programa MetaFluor, se eliminó el *background* y las variaciones en la $[Ca^{2+}]$ citosólico se presentaron como el ratio entre la fluorescencia emitida tras excitar a 340nm y la fluorescencia emitida tras excitar a 380nm (ratio 340nm/380nm).

Compuesto	Tyrode
NaCl	140mM
KCl	5mM
CaCl ₂ *2H ₂ O	2mM
MgCl ₂ *6H ₂ O	1.1mM
Glucosa	5mM
Hepes	10mM

TABLA 4: Composición de la solución de Tyrode empleada en la preparación de las células quimiorreceptoras para medir Ca^{2+} citosólico.

4.4.4 Análisis de datos

Todos los datos han sido analizados usando el programa estadístico Graph Pad Prism versión 6 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). En los experimentos de medida de calcio además se ha utilizado el programa Origin 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Todos los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (ESM) y las diferencias entre grupos fueron calculadas según la presentación y comparación de los datos utilizando One way ANOVA con test de comparación múltiple (Newman-Keuls o Dunnett) o Two way ANOVA con test de comparación múltiple (Bonferroni). Valores de $p < 0.05$ representan diferencias estadísticamente significativas.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Protocolos *in vivo*. Efecto agudo de la leptina sobre la ventilación

4.5.1.1 Parámetros de la ventilación basal en animales controles anestesiados

En la Figura 41 se muestran los parámetros respiratorios basales en los animales anestesiados (previo a la administración de leptina): Frecuencia respiratoria (FR) expresado en respiraciones por minuto (rpm), volumen tidal o volumen corriente (VC) expresado en (ml/kg de peso) y volumen minuto (VM) expresado en (ml/min/kg de peso).

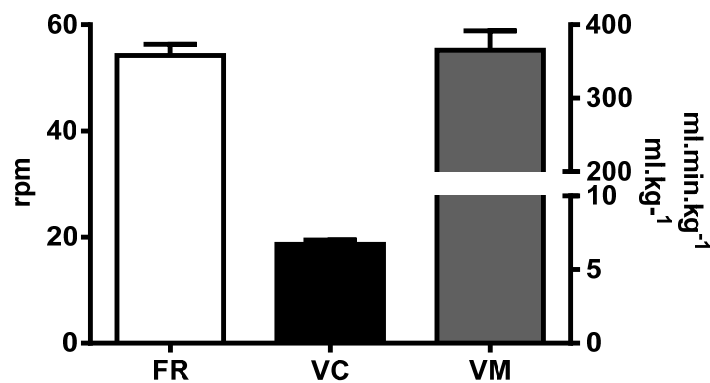


FIGURA 41: Valores basales de la frecuencia respiratoria FR (rpm), volumen corriente VC (ml/kg) y volumen minuto VM (ml/min/kg) en ratas controles anestesiadas. Datos expresados como media \pm ESM.

4.5.1.2 Efecto de la leptina administrada por vía intravenosa en ratas anestesiadas

En la Figura 42 se muestra un registro típico de la FR y del VC de una rata control anestesiada para estudiar el efecto de las oclusiones de las arterias carótidas comunes de 5 y 15 segundos (registro de la izquierda) y el efecto de la leptina, administrada por vía intravenosa, sobre la ventilación basal y tras hacer las oclusiones de 5 y 15 segundos (OCC5" y OCC15") (registro derecha).

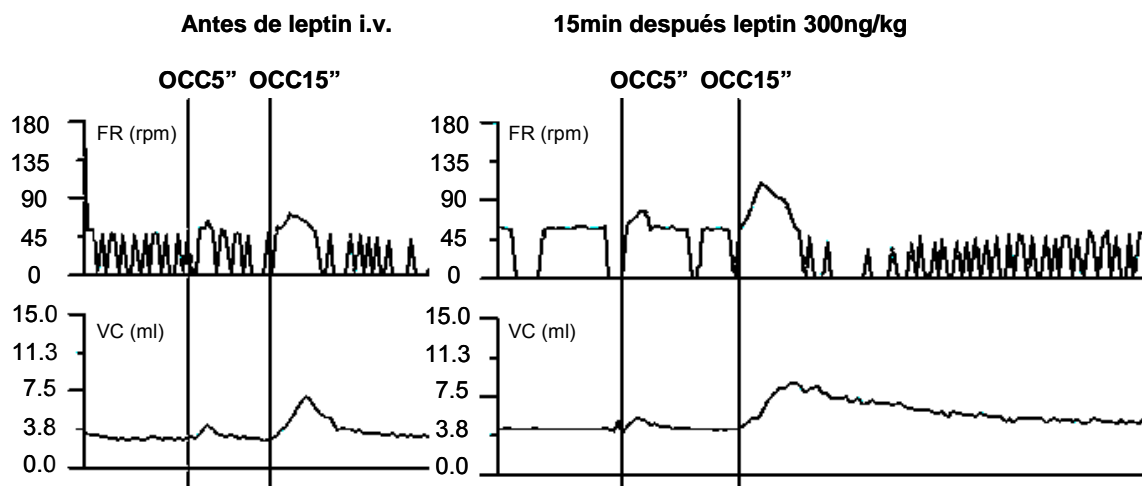


FIGURA 42: Registro ventilatorio de la FR (rpm) y el VC (ml) de una rata control anestesiada para ver el efecto de las OCC5" y OCC15" antes de inyectar leptina i.v. (izquierda) y 15min después de la administración de leptina i.v. (300ng/kg) (derecha).

En base a estos registros se calcula el volumen minuto (VM) multiplicando la FR por el VC y se normaliza teniendo en cuenta el peso de cada rata. El volumen minuto en situación control fue $365.2 \pm 26.67 \text{ ml/min/kg}$ y aumentó significativamente con la administración de leptina de manera dosis dependiente, los datos se expresan como % de aumento respecto al VM basal, aumentando aproximadamente un 30% con la dosis de 900ng/kg ($***p < 0.001$) (Figura 43A). Este aumento del volumen minuto fue debido a un aumento en la FR y en el VC (no mostrado).

En la Figura 43B se muestra el aumento del VM producido por las oclusiones de las arterias carótidas comunes (OCC5" y 15") en ratas controles antes de la administración de leptina i.v. La oclusión de la carótida común durante 5s incrementó el VM un 50% con la dosis más alta de leptina (900ng/kg) y esta respuesta ventilatoria aumentó de manera dosis dependiente con la administración intravenosa de leptina. La oclusión de 15s también incrementó el VM alcanzando un 150% (antes de la inyección de leptina) y de nuevo la leptina aumentó el efecto de la oclusión de manera dosis dependiente.

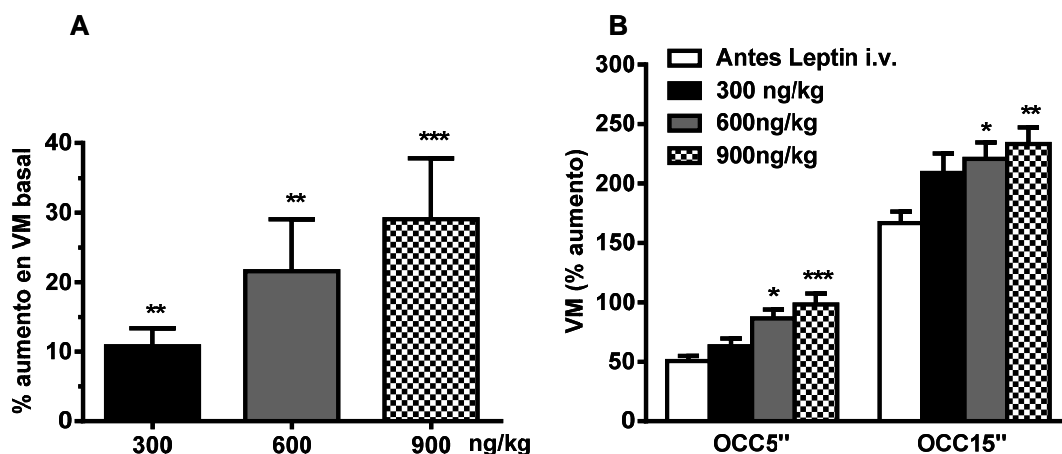


FIGURA 43: Efecto de la administración intravenosa de leptina sobre la ventilación. A) % de aumento del volumen minuto (VM) en respiración basal (normoxia) después de administrar diferentes dosis de leptina (300, 600 y 900ng/kg) en ratas controles. B) Volumen minuto expresado como (% de aumento) en respuesta a las oclusiones de las arterias carótidas comunes (OCC 5" y 15") en condiciones basales y tras la administración de leptina i.v. (300, 600 y 900ng/kg) en ratas controles. Datos expresados como el valor de la media \pm ESM; n=8 (*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001 One way ANOVA).

4.5.1.3 Efecto de la leptina administrada por vía subcutánea en ratas anestesiadas

En la Figura 44, se muestra el efecto de la administración subcutánea de leptina (1mg/kg) en la ventilación. Volumen minuto (VM) expresado como % de aumento en respuesta a las oclusiones de las arterias carótidas comunes (OCC5" y 15") en condiciones basales, antes de la administración de leptina, y a los 15, 30, 45 y 60 min. de la administración de leptina (1mg/kg) en ratas controles. La hipoxia-isquémica producida por las oclusiones de las arterias carótidas (OCC 5" y 15") provocaron un aumento de la ventilación similar al que se muestra en la Figura 43B con el protocolo de administración de leptina intravenoso. La administración de 1mg/kg de leptina por vía subcutánea (Figura 44), aumentó la respuesta ventilatoria producida por la oclusión de 5 segundos a los 15min. de la inyección, siendo este efecto máximo a los 30min. El efecto desaparece a partir de los 45min. de la administración de leptina. Tras la oclusión de 15s de las arterias carótidas comunes, la leptina administrada por vía subcutánea produjo una tendencia a aumentar el VM entre los 15 y 30min. tras la inyección, aunque en este caso el cambio no fue estadísticamente significativo.

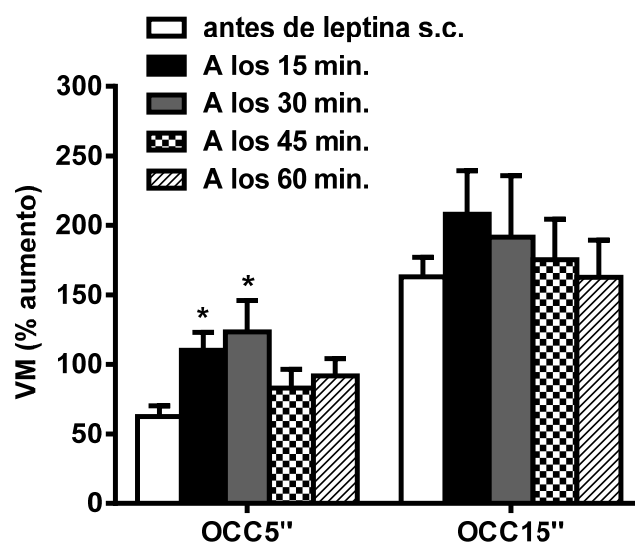


FIGURA 44: Efecto de la administración subcutánea de leptina (1mg/kg) en la ventilación. Volumen minuto (VM) expresado como (% de aumento) en respuesta a las oclusiones de las arterias carótidas comunes (OCC 5 y 15s) en condiciones basales y a los 15, 30, 45 y 60min. de la administración de leptina s.c. (1mg/kg) en ratas controles. Datos expresados como el valor de la media \pm ESM; n=8 (* p <0.05 One way ANOVA).

4.5.1.4 Efecto de la administración de leptina por vía subcutánea en animales sin anestésiar. Pletismografía

En la Figura 45 se muestra el efecto de la leptina administrada por vía subcutánea (1mg/kg) sobre la ventilación en ratas controles sin anestésiar. Como es de esperar la hipoxia y la hipercapnia aumentaron de forma significativa el VM cuando lo comparamos con la situación de normoxia (** p <0.001 vs. Aire). También se observa como el VM, en respuesta a la hipoxia del 7%O₂, aumenta ligeramente pero de manera significativa en los animales a los que se les ha inyectado leptina (columnas rayadas) respecto a los animales que se les ha inyectado solución salina (columnas sin rayas) + p <0.05. Este aumento en el VM es debido principalmente al aumento de VC (Tabla 5). En las otras dos atmósferas estudiadas (aire e hipercapnia) no se observaron modificaciones.

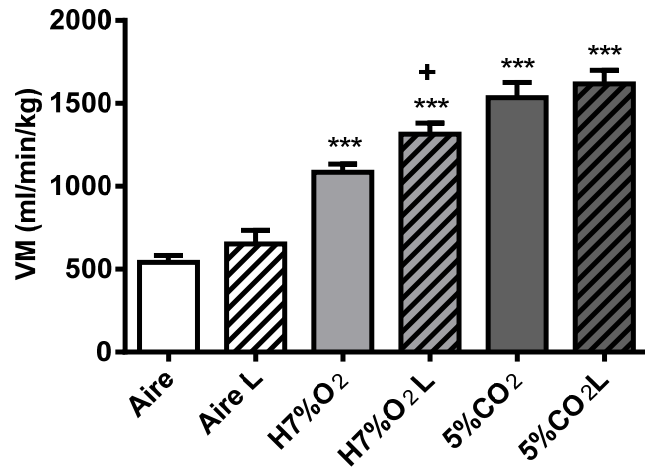


FIGURA 45: Efecto de la leptina sobre la ventilación en animales conscientes sin anestésiar. Volumen minuto (VM) expresado en (ml/min/kg) tras la inyección subcutánea de leptina 1mg/kg (columnas rayadas) o de solución salina (columnas sin rayas) mientras respiran aire, 7%O₂ y 7%O₂5%CO₂. Datos expresados como el valor de la media ± ESM; n=7 (**p<0.001 vs Aire; +p<0.05 vs H7%O₂ One way ANOVA).

FR (rpm)	Controles	Leptina
Aire	95.4±6.6 (n=7)	95.3±8.1 (n=7)
Hipoxia 7%O ₂	129.3±5.4 (n=9)	133.7±8.0 (n=8)
7%O ₂ +5%CO ₂	151.3±4.3 (n=9)	136.4±4.2 (n=8)

VC (ml/kg)	Controles	Leptina
Aire	5.9±0.2 (n=9)	6.1±0.2 (n=8)
Hipoxia 7%O ₂	9.0±0.4 (n=7)	10.3±0.6 (n=8)
7%O ₂ +5%CO ₂	10.7±0.4 (n=9)	11.9±0.7 (n=8)

TABLA 5: Frecuencia respiratoria (FR) y volumen corriente (VC) en ratas sin anestésiar (pletismografía): ratas control (inyección s.c. de solución salina) y ratas con administración de leptina (inyección s.c. leptina 1mg/kg) mientras respiran aire, hipoxia 7%O₂ e hipoxia + hipercapnia 7%O₂+5%CO₂. Datos expresados como el valor de la media ± ESM; n=7-9.

4.5.2 Leptina y glucosa en plasma: niveles basales y tras la administración de leptina intravenosa y subcutánea en ratas anestesiadas.

En la Figura 46 A y B se muestran los niveles de leptina en plasma durante los dos protocolos experimentales de administración de leptina i.v. y s.c. respectivamente en ratas anestesiadas. En la Figura 46A se observan los niveles basales de leptina que son $9.6 \pm 1 \text{ ng/ml}$ ($n=6$), y tienden a aumentar con la administración de las distintas dosis de leptina i.v. aunque este aumento es sólo estadísticamente significativo con la dosis de 900 ng/kg ($17.9 \pm 3.2 \text{ ng/ml}$ $*p < 0.05$). La Figura 46B muestra que los niveles de leptina en plasma están aumentados tras los 15 minutos de administración de la leptina s.c. (1 mg/kg) y estos niveles se mantienen durante todo el experimento (60min.); $*p < 0.05$.

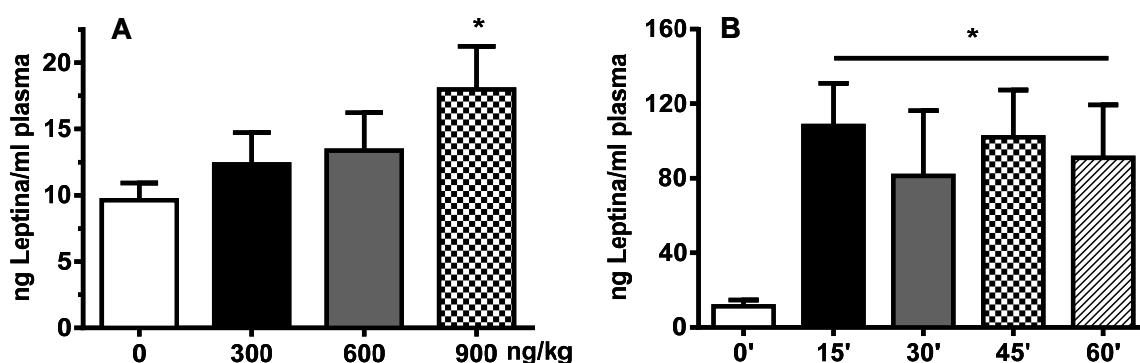


FIGURA 46: Niveles basales de leptina en plasma (columnas blancas) y tras la administración de leptina i.v. (A) y s.c. (B). Datos expresados como el valor de la media \pm ESM; $n=6$ ($*p < 0.05$ One way ANOVA).

Las Figuras 47 A y B muestran el efecto de la leptina sobre la glucemia en los animales experimentales. En ninguna de las dos situaciones, (administración i.v de leptina y administración s.c. de leptina) la leptina modificó los valores de la glucemia.

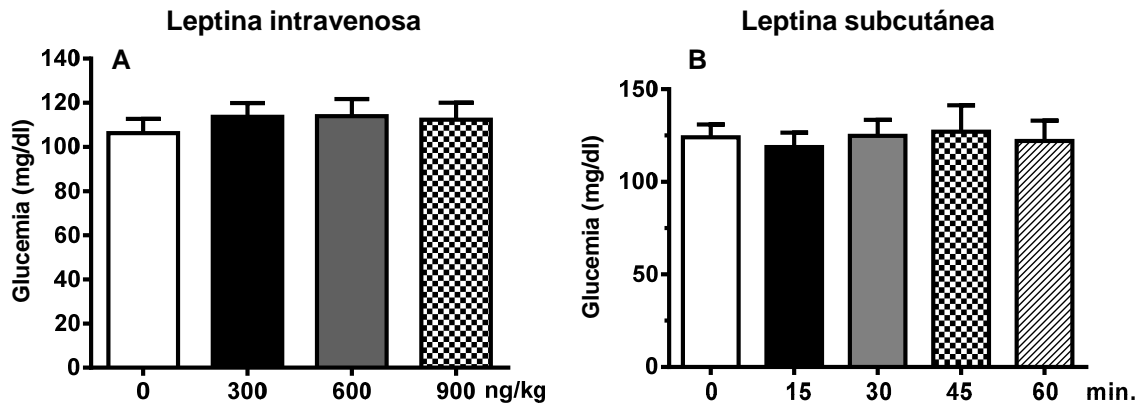


FIGURA 47: Efecto de la leptina en la glucemia. (A) Niveles basales de glucemia en plasma y tras la administración de leptina i.v. (300, 600 y 900ng/kg). En (B) se representan los niveles de glucemia basal y tras 15, 30, 45 y 60 min de la inyección s.c. de leptina (1mg/kg). Datos expresados como el valor de la media \pm ESM; n=8 (*p<0.05 One way ANOVA).

4.5.3 Efecto de la leptina sobre la liberación de ^3H -catecolaminas

En la Figura 48 se muestra el curso temporal de la liberación de ^3H -CA en CC controles y en CC experimentales, incubados con leptina desde el inicio del experimento (administración aguda) a diferentes dosis (10, 40 y 80ng/ml). Los datos muestran que tanto en los CC controles como en los experimentales hay un aumento de la liberación de ^3H -CA en respuesta al 7% de O_2 y al 35mM K^+ , pero no existen diferencias en el curso temporal cuando comparamos los CC control con los experimentales. Por lo tanto la liberación de CA en respuesta a la hipoxia de 7% O_2 y al estímulo de 35mM de K^+ no se modificó por la incubación de los CC con las diferentes dosis de leptina. Observamos lo mismo en la Figura 49, en la que se ha representado el efecto de las distintas dosis de leptina sobre la liberación evocada de ^3H -CA inducida por la hipoxia y el alto K^+ , es decir la liberación producida por los estímulos sobre la liberación basal.

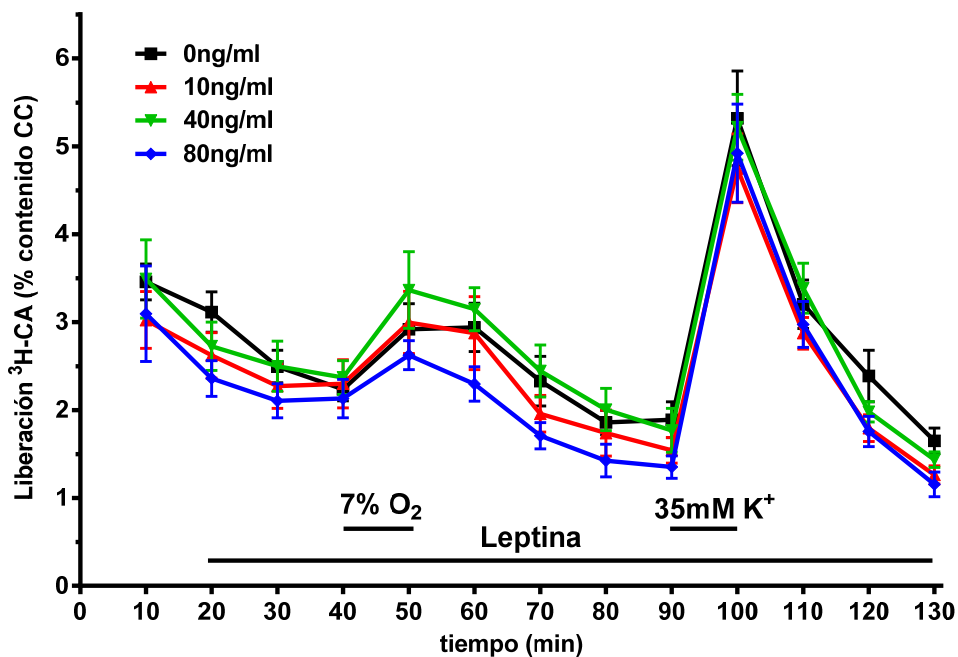


FIGURA 48: Efecto de la leptina en la liberación basal y evocada de catecolaminas ($^3\text{H-CA}$). Curso temporal de la liberación de $^3\text{H-CA}$ expresado como % del contenido del CC en situación basal y en respuesta a $7\% \text{O}_2$ y 35mM de K^+ en CC controles sin leptina (0ng/ml) y en CC con diferentes dosis de leptina (10ng/ml ; 40ng/ml ; 80ng/ml). Datos expresados como el valor de la media \pm ESM; $n=8$.

Por lo tanto, podemos decir que ninguna de las dosis de leptina administradas de forma aguda produjo cambios en la liberación de $^3\text{H-CA}$ ni en situación basal ni en respuesta a los estímulos estudiados ($7\% \text{O}_2$ y $35\text{mM} \text{K}^+$).

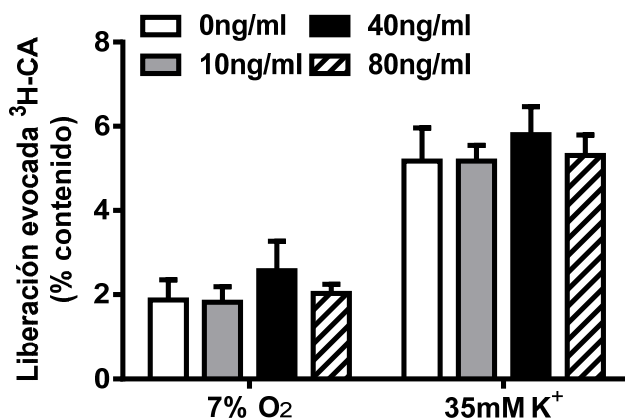


FIGURA 49: Liberación evocada de $^3\text{H-CA}$ expresado como % del contenido en respuesta a $7\% \text{O}_2$ y 35mM de K^+ en CC controles sin leptina (0ng/ml) y en CC con diferentes dosis de leptina (10ng/ml ; 40ng/ml ; 80ng/ml). Datos expresados como el valor de la media \pm ESM; $n=8$.

La Figura 50 muestra el curso temporal de la liberación de ^3H -CA en explantes de CC incubados durante 48h previas al experimento, controles (sin leptina en el medio) y experimentales incubados con 40ng/ml de leptina (administración crónica). De nuevo no observamos ninguna diferencia significativa en el curso temporal entre los controles y los incubados con leptina ni en situación basal ni en respuesta a los diferentes estímulos (7% O_2 y 35mM K^+). La liberación de ^3H -CA inducida por la hipoxia 7% O_2 y el alto K^+ en los explantes controles son comparables a los valores obtenidos en trabajos previos en nuestro laboratorio (Gallego-Martin et al. 2012).

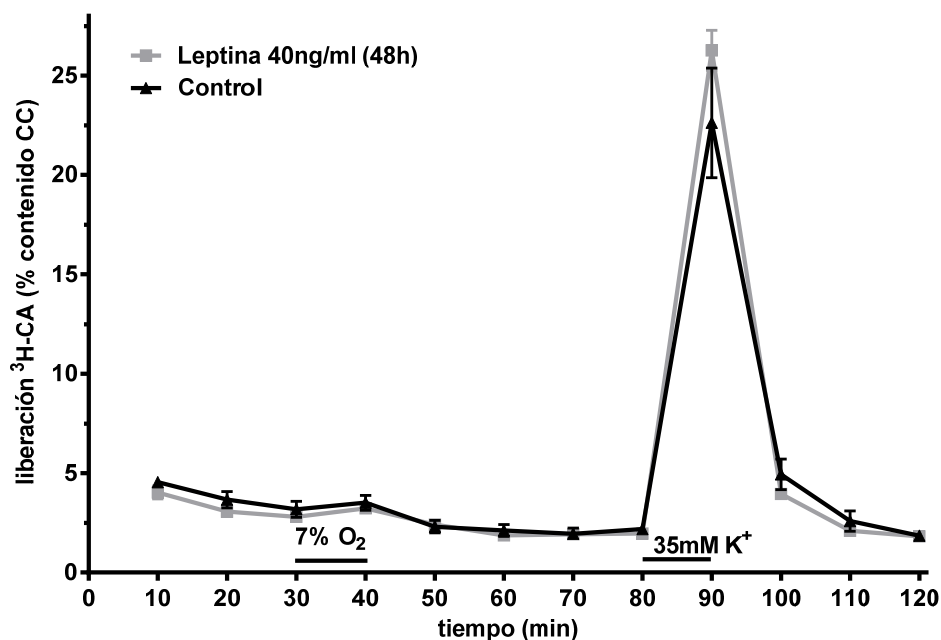


FIGURA 50: Curso temporal de la liberación de ^3H -CA expresado como % del contenido del CC en situación basal y en respuesta a 7% O_2 y 35mM de K^+ en CC cultivados durante 48h con leptina en el medio (40ng/ml) (línea gris) y sin leptina en el medio (controles) (línea negra). Datos expresados como el valor de la media \pm ESM; n=6.

En la Figura 51 se representa la liberación evocada de ^3H -CA inducida por la hipoxia y el alto K^+ en los CC incubados durante 48h con y sin leptina [40ng/ml]. De nuevo vemos que la incubación con leptina durante 48h no modifica la liberación de CA en los CC.

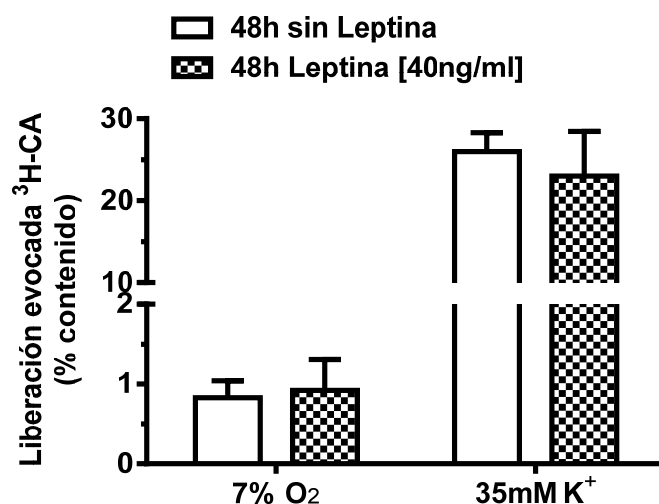


FIGURA 51: Liberación evocada de ³H-CA expresado como % del contenido en respuesta a 7%O₂ y 35mM de K⁺ en CC cultivados durante 48h en presencia y en ausencia de leptina (40ng/ml). Datos expresados como el valor de la media ± ESM; n=6

4.5.4 Efecto de la leptina sobre el calcio intracelular en células quimiorreceptoras

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los experimentos de liberación de CA se estudió el efecto crónico de la leptina sobre los niveles de Ca²⁺ intracelular en las células quimiorreceptoras cultivadas durante 48h. En la Figura 52 se muestra un registro representativo de este tipo de experimentos donde se ven las variaciones en la concentración del Ca²⁺ intracelular en situación basal y en respuesta a hipoxia y a 35mM K⁺, los datos están expresados como el ratio entre la fluorescencia emitida por el fluoróforo tras ser excitado a 340nm y la fluorescencia emitida tras ser excitado a 380nm (Ratio340/380nm). En la Figura 52B se presenta la integración de la respuesta obtenida en el registro, para ello se traza una línea basal (pintada en roja) ajustada manualmente en el registro (Figura 52A) y se calcula el área bajo la curva respecto a esa basal utilizando el programa Origin 7. El resultado de la integración se representa en la Figura 52B donde se estudia el cambio de las pendientes obtenidas marcando los incrementos correspondientes a cada estímulo y normalizándolo por el tiempo de aplicación del estímulo (2 minutos para el N₂ y 30s para el K⁺).

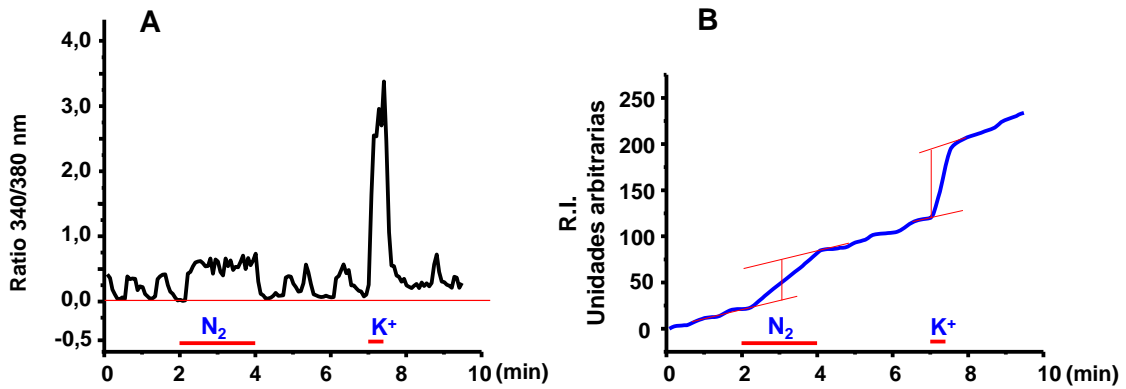


FIGURA 52: Efecto de la hipoxia y del K⁺ en el calcio intracelular. A) Registro de los niveles de Ca²⁺ intracelular en una célula quimiorreceptora de CC control, empleando el fluoróforo radiométrico Fura-2-AM, expresado como el Ratio 340/380nm. B) Integración de la respuesta obtenida en el registro. En este protocolo experimental se aplicaron 2 estímulos (N₂ y alto K⁺).

En la Figura 53 se representa la medida de calcio intracelular en las células quimiorreceptoras cultivadas durante 48h con leptina 40ng/ml y sin leptina (Controles) en condiciones basales y en respuesta a N₂ y 35mM de K⁺.

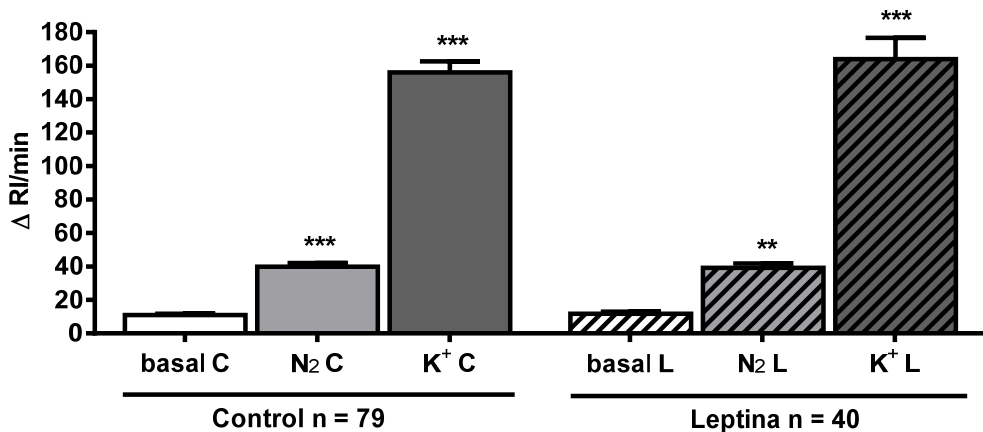


FIGURA 53: Efecto de la leptina en el calcio intracelular. Niveles de calcio intracelular, expresado como incremento de la respuesta integrada/min., en células quimiorreceptoras controles (columnas sin rayas) y en células quimiorreceptoras incubadas con leptina 40ng/ml (columnas rayadas) durante 48h en condiciones basales y en respuesta a N₂ y 35mM de K⁺. Datos expresados como el valor de la media ± ESM (**p<0.01; ***p<0.001 vs. basal; One way ANOVA; Control n =79 y Leptina n=40).

Observamos que la leptina durante 48h no parece tener ningún efecto sobre el Ca^{2+} en las células quimiorreceptoras cultivadas respecto a las células controles. Las respuestas de Ca^{2+} intracelular ante los distintos estímulos (N_2 y alto K^+) si aumentaron en los dos grupos experimentales, estos resultados son comparables a experimentos similares realizados en nuestro laboratorio (Gallego-Martin et al. 2012). Los datos están expresados como incremento de la respuesta integrada/minuto.

4.6 DISCUSIÓN

En este trabajo se demuestra que la leptina aumenta la ventilación basal y en respuesta a la hipoxia, sin embargo este proceso parece no estar mediado a nivel del cuerpo carotídeo por una vía en la que participe el Ca^{2+} intracelular o la liberación de CA.

Teniendo en cuenta los objetivos específicos planteados en este capítulo y en base a los resultados obtenidos podemos decir que la leptina administrada de forma aguda por vía intravenosa en ratas anestesiadas, aumenta la ventilación basal de manera dosis dependiente (Figura 43A) y potencia la ventilación en respuesta a la hipoxia producida por la oclusión de la arteria carótida común durante 5 y 15 segundos también de manera dosis dependiente (Figura 43B). Cuando administramos la leptina por vía subcutánea (única dosis de 1mg/kg de peso) en animales anestesiados, observamos un aumento de la ventilación en respuesta a las oclusiones de 5 y 15 segundos a partir de los 15min. de administración de leptina siendo sólo significativo en las oclusiones de 5 segundos a los 15 y 30min. tras la administración de leptina (Figura 44). En base a estos tiempos de 15 y 30min. en los que vemos el efecto de la leptina sobre la ventilación en animales anestesiados, diseñamos los experimentos de pletismografía para asegurarnos que la leptina produce un aumento de la ventilación en ratas controles sin anestesiarse. Los registros de la ventilación en estos animales a los que se inyectó leptina por vía subcutánea (1mg/kg de peso) también muestran un aumento del volumen minuto en respuesta a la hipoxia del 7% O_2 (Figura 45) principalmente debido al incremento del volumen corriente (Tabla 5), sin embargo no se vieron diferencias significativas en la ventilación en respuesta a la hipercapnia entre los animales control y los tratados con leptina. Pero sí que observamos un

aumento de la ventilación de ambos grupos en respuesta a la hipoxia del 7%O₂ y a la hipercapnia cuando lo comparamos con la situación de normoxia. En línea con estos resultados encontramos un estudio reciente (Chang et al. 2013) que muestra que la administración intravenosa de leptina provocó una estimulación de la ventilación (medida como actividad del nervio frénico) que fue independiente de la PCO₂. Este efecto de la leptina sobre la ventilación junto con el hecho de que la respuesta ventilatoria a la hipoxia tiene su origen principalmente en el CC y que las células quimiorreceptoras del CC expresan leptina y receptor de leptina ObRb (Porzionato et al. 2011; Messenger and Ciriello 2013), hizo que nos planteásemos los objetivos 2 y 3 de este trabajo con el fin de explorar el efecto agudo y crónico de la leptina en la actividad quimiorreceptora del CC.

Para llevar a cabo estos objetivos, primeramente se estudió *in vitro* el curso temporal de la liberación de ³H-CA utilizando CC intactos, donde se vió que ninguna de las concentraciones de leptina utilizadas (hasta 8 veces los niveles endógenos de leptina en plasma) modificó la liberación de CA en las condiciones estudiadas (basal, hipoxia y alto K⁺), por lo tanto parecía que la leptina de forma aguda (<2h) no modificaba la actividad quimiorreceptora del CC. A continuación se incubaron los CC durante 48h con y sin leptina (40ng/ml) para ver si existía un efecto crónico de la leptina sobre la liberación de CA, pero tampoco observamos ninguna modificación. Por último se midió Ca²⁺ intracelular en células disociadas de CC en presencia y ausencia de leptina 40ng/ml durante 48h sin observar cambios significativos del Ca²⁺ intracelular en las células incubadas con leptina respecto a las células controles. En base a estos resultados parece que la leptina no estimula las células quimiorreceptoras del CC en las condiciones estudiadas (normoxia, hipoxia aguda y alto K⁺) ya que tanto los experimentos de liberación de catecolaminas como la medida de calcio intracelular son buenos indicadores de la activación de las células quimiorreceptoras y cuando se produce un estímulo que activa al CC aumenta el calcio intracelular y la liberación de neurotransmisores (Gonzalez et al. 1994). En resumen nuestros datos muestran que la leptina aumenta tanto la ventilación basal como la inducida por la hipoxia, sin afectar a la liberación de catecolaminas ni al Ca²⁺ intracelular en las células quimiorreceptoras del CC.

En el CC se han descrito numerosos neurotransmisores, la gran mayoría dependientes de calcio para su liberación, sin embargo existe la posibilidad de que la liberación de algún neurotransmisor pueda ser modulada de manera independiente de los incrementos de la concentración del calcio intracelular (Glitsch 2008). Entre ellos en el CC se encuentra el ATP cuya liberación aumenta la actividad del NSC de manera dosis dependiente (McQueen and Ribeiro 1981) y su liberación espontánea basal no es dependiente de calcio (Conde et al. 2012); también está la adenosina que actúa a través de los receptores A_2 incrementando la actividad eléctrica en el NSC y la ventilación sin alterar el $[Ca^{2+}]_i$ en células expuestas a normoxia (Kobayashi et al. 2000b). También la hipoxia moderada aumenta la liberación de adenosina en el CC por lo tanto habría que tener en cuenta la posibilidad de que los efectos de la leptina pudieran estar mediados por otra cascada de transducción en la que el Ca^{2+} intracelular no esté involucrado.

También tenemos que destacar que la leptina regula múltiples vías de señalización, los receptores de leptina pertenecen a la superfamilia de receptores de citoquinas clase I que se expresan en el sistema nervioso central y periférico y cuando la leptina se liga al receptor se inician las cascadas de señalización intracelular que incluyen la fosforilación de proteínas: JAK2 / STAT3, erbB2, ERK, IRS y Rho / rac (Ghilardi et al. 1996; Myers 2004). También la unión de la leptina al receptor ObRb puede activar la vía de señalización MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) (Myers and White 2001) pudiendo estar estas vías involucradas en los efectos de la leptina.

Por otro lado tenemos que tener en cuenta que en el NTS, donde se integra la actividad del NSC, y donde se localiza el grupo respiratorio dorsal y los quimiorreceptores centrales respiratorios (Guyenet et al. 2010) también se han descrito receptores de leptina (Mercer et al. 1998). Experimentos en los que se realizaron microinyecciones de leptina en el NTS del cerebro de ratas, mostraron un aumento de la ventilación pulmonar y del volumen corriente respiratorio, al igual que aumentó la actividad de los músculos inspiratorios, sugiriendo que la leptina puede estar implicada en el control ventilatorio a través de efectos directos sobre el control de los centros respiratorios (Inyushkin et al. 2009). Ciriello y Moreau han demostrado la existencia de neuronas que expresan receptores de leptina en el NTS, que reciben señales

de los quimiorreceptores del CC y que proyectan a áreas vasopresoras de la médula rostroventrolateral (Ciriello and Moreau 2013). Por lo tanto, todo ello parece indicar que el NTS proporciona un enlace directo entre la actividad de los quimiorreceptores del CC y la activación simpática (Ciriello and Moreau 2012). Por otro lado, encontramos un estudio en el que la leptina es necesaria para que la función de los quimiorreceptores periféricos sea eficiente (Groeben et al. 2004) por lo que de acuerdo con esta idea Ciriello y Caverson, sugieren que la leptina podría modular la función de los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo a través de efectos directos sobre las neuronas del NTS y/o actuando directamente sobre las fibras aferentes del cuerpo carotídeo que inervan las neuronas del NTS (Ciriello J and Caverson 2014).

Con todos estos hallazgos y teniendo en cuenta nuestros resultados, podemos concluir que la leptina aumenta la ventilación basal y la ventilación en respuesta a la hipoxia, efecto que podría estar mediado a nivel postsináptico en el CC o a nivel central probablemente en el NTS. Por lo tanto la leptina no parece participar minuto a minuto en el proceso de la quimiorrecepción del CC, pero podría ser que su participación en la regulación de la función del CC fuera a largo plazo, probablemente contribuyendo a la sensibilización de estos quimiorreceptores como ocurre en la hipoxia crónica, sobre todo si tenemos en cuenta referencias bibliográficas que indican la presencia de leptina y de su receptor en las células quimiorreceptores del CC, la posible vinculación de la leptina en la función de los quimiorreceptores periféricos (Groeben et al. 2004) y su efecto sobre la ventilación a través del CC (Chang et al. 2013).

También debemos tener en cuenta que la leptina podría estar activando el CC a través de otros neurotransmisores no estudiados en este trabajo como la adenosina que no depende del calcio para su liberación y que podrían estar involucrados en el aumento de la ventilación producido por dicha hormona.

En un futuro trabajo y para poder clarificar mejor la posible contribución del CC en el efecto ventilatorio de la leptina se podría investigar a nivel postsináptico la actividad eléctrica del nervio del seno carotídeo (NSC) en respuesta a la leptina. Por otro lado, se podría verificar además si realmente existe una participación del CC estudiando si la leptina tiene el mismo efecto sobre la ventilación en ratas control y en ratas denervadas, es decir en ratas en las que se ha seccionado el NSC.

En otro sentido, la bibliografía nos muestra que la leptina puede jugar un papel importante sobre determinadas enfermedades respiratorias como el síndrome de hipoventilación y obesidad (SHO) (O'Donnell et al. 1999), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS) y el cáncer de pulmón (Malli et al. 2010). Por ello, sería de gran interés realizar estudios en condiciones en las que sabemos que existe una sensibilización del CC como en la hipoxia sostenida crónica y en la HIC (Conde et al. 2012 ; Iturriaga et al. 2014), imitando así dichas enfermedades respiratorias, que nos permitiría estudiar si en estas situaciones clínicas la leptina produce algún efecto sobre la función de los quimiorreceptores periféricos profundizando en el significado fisiopatológico de la leptina en la función respiratoria.

La leptina en este estudio no modificó la función de las células quimiorreceptoras del CC. La liberación de CA y el aumento del Ca^{2+} intracelular no parecen participar en los efectos observados sobre la ventilación y podría ser que el efecto de la leptina se genere a nivel postsináptico en el CC o a nivel central, probablemente en el NTS. Aunque tampoco podemos descartar que la leptina esté activando otros neurotransmisores a nivel del CC que no sean dependientes de Ca^{2+} para su liberación.

DISCUSIÓN GENERAL

5. DISCUSIÓN GENERAL

Este apartado de discusión general se centra en los datos más relevantes que hemos encontrado en esta tesis doctoral, explicando en primer lugar la justificación o el fundamento del estudio.

Este trabajo comenzó con el objetivo principal de una investigación básica centrada en buscar y aumentar el conocimiento sobre dos patologías importantes en nuestra sociedad actual que son la AOS y la obesidad. En el capítulo 1 de esta tesis, hemos querido profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de estas dos enfermedades y en el estudio de la interacción que se puede dar entre ellas, dada la alta prevalencia que tienen en la clínica. Por otro lado, quisimos indagar en el papel que juega la leptina en el CC estudiando si este órgano estaba implicado en los efectos que tiene esta hormona sobre la ventilación (capítulo 2).

En la Unidad del Sueño del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, el equipo del Dr. Santiago Juarros, con el que nuestro laboratorio ha comenzado un proyecto de investigación en colaboración, ha realizado varios estudios sobre pacientes adultos de esta unidad. En un estudio basado en el seguimiento de 346 pacientes diagnosticados de AOS, de los cuales el 78.3% de la muestra son varones y el 21.7% son mujeres, encuentran que el grupo de los varones presenta una media de IMC de 30.62 ± 0.297 , estando levemente aumentado en el grupo de las mujeres 32.83 ± 0.444 . Esto nos indica que la media de esta muestra de población presenta obesidad tanto en mujeres como en hombres. En otra muestra estudiada de 163 personas (pacientes), que acuden por primera vez a consulta para ser diagnosticados, el 73.6% son varones y un 26.4% son mujeres, han observado que la media del IMC en los varones era 29.3 ± 0.438 y en las mujeres de 31.6 ± 1.02 (datos no publicados, comunicación personal). Con estos datos podemos decir que la media de las mujeres que acuden a la unidad del sueño por primera vez presenta obesidad, y en el caso de los hombres la media presenta sobrepeso de grado II o preobesidad. Además, en ambas muestras estudiadas el porcentaje de hombres que presentan problemas del sueño es muy superior al de las mujeres. Todos estos datos nos hacen ver la importancia y lo íntimamente relacionadas que están ambas patologías, siendo de gran relevancia la investigación sobre los mecanismos fisiopatológicos de ambas enfermedades

con el fin de poder indagar sobre otros posibles tratamientos y prevenir complicaciones que empeoren la situación de estos pacientes. Siendo esta población una muestra muy pequeña de otros muchos estudios epidemiológicos que hay en todo el mundo.

En línea con este estudio, empezamos a interesarnos por la leptina, ya que la mayoría de las personas obesas tienen elevados los niveles en plasma de esta hormona pleiotrópica. Destaca además que dichos niveles de leptina en plasma en los pacientes obesos son más altos que los niveles que se encuentran en el líquido cefalorraquídeo (LCR), donde la relación de la leptina en el LCR respecto a la leptina en el plasma disminuye a medida que aumenta el IMC (Caro et al. 1996; Schwartz et al. 1996). Todo esto parece indicar que las personas obesas presentan un estado de resistencia a la leptina, es decir, la cantidad de leptina que llega a las áreas del sistema nervioso central que controlan la ingesta de alimentos es insuficiente en relación con el IMC. La resistencia a la leptina, también está implicada en las complicaciones asociadas a la obesidad entre las que se encuentran las alteraciones del metabolismo de los lípidos (Wang et al. 2001), que también han sido estudiadas en este trabajo.

En el Capítulo 1 de esta tesis doctoral, se ha realizado un estudio comparando los efectos de la HIC en animales controles y en animales obesos. Los principales resultados obtenidos muestran que la HIC y la obesidad producen alteraciones metabólicas en todos los grupos experimentales estudiados siendo los niveles de glucemia basal, insulina y el índice de HOMA-IR los que se alteran de manera estadísticamente más significativa al combinar la obesidad con la HIC. Estas alteraciones nos indicarían un estado de hiperinsulinemia y de resistencia a la insulina que podría estar mediado por el sistema nervioso simpático (Anderson and Mark 1993). Además, otros parámetros medidos en este estudio como son la presión arterial sistémica y la medida de contenido y síntesis de CA en las arterias renales, también nos indican un aumento de la activación del sistema nervioso simpático más acentuado en el grupo expuesto a HIC y a dieta rica en grasa simultáneamente (OHI) que en cada grupo individual. Las CA afectarían la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos y en el hígado llevando a un cuadro de resistencia a la insulina (Paton et al. 2013) como el que encontramos en

nuestros resultados. Por otro lado, el CC podría estar jugando un papel importante en estos hallazgos al ser estimulado por la HIC que aumenta la actividad del nervio del seno carotídeo (NSC) y produce un aumento de la actividad simpática en el núcleo del tracto solitario (NTS) (Gonzalez-Martín et al. 2011). Esta hiperactividad simpática secundaria a los eventos respiratorios producidos en el SAHS, podría influenciar en la homeostasis de la glucosa incrementándose la glucogenolisis y la gluconeogénesis (Punjabi and Polotsky 2005). Además, el aumento de insulina observado en estos animales experimentales también podría estimular el sistema nervioso simpático a través del CC (Ribeiro et al. 2013) creándose un círculo vicioso.

También debemos de tener en cuenta otros factores importantes presentes en pacientes con AOS y obesidad como es el estrés oxidativo, estudiado en esta tesis doctoral a través de la medida de distintos parámetros oxidantes y antioxidantes, entre los que encontramos un aumento de los niveles de peróxidos lipídicos (LPO) en hígado y de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina (8-OHdG) en plasma que muestran diferencias más significativas en el grupo OHI que en el grupo O. Por otro lado, encontramos que los niveles de leptina en plasma también estuvieron más aumentados en los animales expuestos a HIC y dieta rica en grasa (OHI), sugiriendo que tanto la leptina como los niveles elevados de ERO podrían activar el factor de transcripción NF-κB que también muestra valores más aumentados en dicho grupo experimental (OHI) pudiendo activar vías de señalización implicadas en desencadenar respuestas inflamatorias. En esta línea, el estudio de la proteína C Reactiva (PCR) como parámetro que nos informa sobre el estado de inflamación en nuestros animales, mostró una correlación con los resultados anteriores, ya que los niveles más aumentados de PCR se encuentran de nuevo en el grupo OHI. Todos estos datos muestran, que aunque no existe una interacción positiva estadísticamente significativa en el grupo OHI respecto a los grupo O y CHI, cuando se combinan la obesidad y la HIC se observa un aumento del estrés oxidativo y una mayor activación del sistema nervioso simpático, agravando las patologías metabólicas y cardiovasculares (Olea et al. 2014).

El síndrome de hipoventilación y obesidad (SHO) se define como la asociación de obesidad, hipoxia nocturna e hipercapnia sostenida, que conlleva

a una hipoventilación permanente. Hay pacientes obesos con AOS grave que presentan dicha hipoventilación mientras que otros pacientes no. Este hecho podría ser explicado por las diferencias individuales en el paso de la leptina desde el plasma al líquido cefalorraquídeo a través de la barrera hematoencefálica debido a una alteración en el transporte de la leptina (Caro et al. 1996). También podría darse el caso de que los pacientes con SHO presentaran una cantidad disminuida de leptina libre en plasma, estando la mayor parte de ella acomplejada con el receptor soluble Ob-Re (Wu et al. 2010; Brugniaux et al. 2011). Es por ello que los conceptos de un "déficit" de leptina y una "resistencia" a la leptina pueden tener relevancia en la relación existente entre la obesidad y el control respiratorio en los seres humanos obesos, donde los niveles insuficientes de esta hormona en el sistema nervioso central en presencia de obesidad pueden contribuir al desarrollo del SHO. Todo indica que existe una estrecha relación entre la obesidad, la leptina y el control respiratorio. Además, los efectos de la leptina sobre el control respiratorio son más potentes durante el sueño, lo que sugiere que estados de deficiencia o de resistencia a la leptina pueden también contribuir a la patogénesis de los trastornos respiratorios durante el sueño (O'Donnell et al. 2000). En esta línea, nuestros datos muestran en los modelos animales obesos un patrón respiratorio restrictivo, con aumento de la FR y una disminución del VC manteniéndose el VM. Respecto a los modelos de AOS vemos una disminución de la ventilación encontrada ya en estudios previos de nuestro laboratorio (Gonzalez-Martín et al. 2011) y en trabajos que encontramos en la literatura (Edge and O'Halloran 2015) aunque hay otros autores que ven aumento de la ventilación en animales expuestos a HIC (Iturriaga et al. 2006). En nuestros modelos animales, la interacción entre la HIC y la obesidad produjo un mantenimiento del patrón respiratorio restrictivo aunque también mostraron una disminución del VM en todas las situaciones de hipoxia y durante la hipercapnia (Olea et al. 2014).

Datos bibliográficos de varios autores muestran que la leptina estimula la ventilación cuando se aplica mediante microinyecciones en el NTS o bien inyectando leptina de forma sistémica (Inyushkin et al. 2009; Chang et al. 2013). A nivel del CC se ha descrito que hay leptina y receptor funcional de leptina (Porzionato et al. 2011) aunque no se había estudiado si esta hormona

podría intervenir en la respuesta ventilatoria mediada por el CC. Por ello quisimos averiguar si los quimiorreceptores del CC contribuían al aumento de la ventilación producido por la leptina. En este trabajo de tesis doctoral, mostramos que en experimentos *in vivo* la leptina ejerce una acción sobre la ventilación basal y en respuesta a distintas situaciones de hipoxia aguda. Así mismo, nuestros resultados de los experimentos realizados *in vitro* nos indican que no parece que la liberación de CA ni el aumento de calcio intracelular en las células quimiorreceptoras del CC tengan un papel importante en esta respuesta ventilatoria a la leptina (Olea et al. 2015). Por último presentamos el siguiente esquema en la Figura 54 como resumen que nos indica que la acción de la leptina sobre la ventilación en el CC podría estar mediada por otros neurotransmisores no dependientes de calcio y no estudiados en este trabajo como es la adenosina (Kobayashi et al. 2000b; Conde et al. 2012) o bien que la leptina estuviera ejerciendo su función a nivel postsináptico en las terminaciones nerviosas sensoriales del NSC o a nivel central probablemente en el NTS donde se han descrito receptores funcionales de leptina (ObRb), (ver (Ciriello and Moreau 2013)) y donde podría ejercer su función facilitando la neurotransmisión a nivel presináptico o postsináptico activando los centros respiratorios (dorsal y ventral).

5.1 PERSPECTIVAS DE FUTURO

Dados los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, surgen nuevas ideas que sería de gran interés seguir investigando. En el estudio de la obesidad y de la AOS nos gustaría acercarnos más a los pacientes, mediante colaboraciones con profesionales clínicos en la investigación aplicada, estudiando la especificidad de los parámetros analizados en este trabajo, realizando determinaciones de los mismos a pacientes antes y después del tratamiento de las patologías. Otro punto importante sería intentar mejorar el diagnóstico de los pacientes con AOS en la población obesa ya que hemos visto que la gran mayoría de los pacientes que son diagnosticados de AOS tienen sobrepeso o son obesos.

También nos gustaría realizar más experimentos en relación con la función de la leptina en el CC estudiando si realmente este órgano tiene un papel en la respuesta ventilatoria producida por la leptina. Para ello lo primero

que tendríamos que hacer es ver si en animales con los CC denervados vemos el efecto de la leptina en la respuesta ventilatoria basal y en la estimulada por la hipoxia y tras esta comprobación ver a qué nivel podría estar actuando la leptina o que neurotransmisores estarían involucrados en su función.

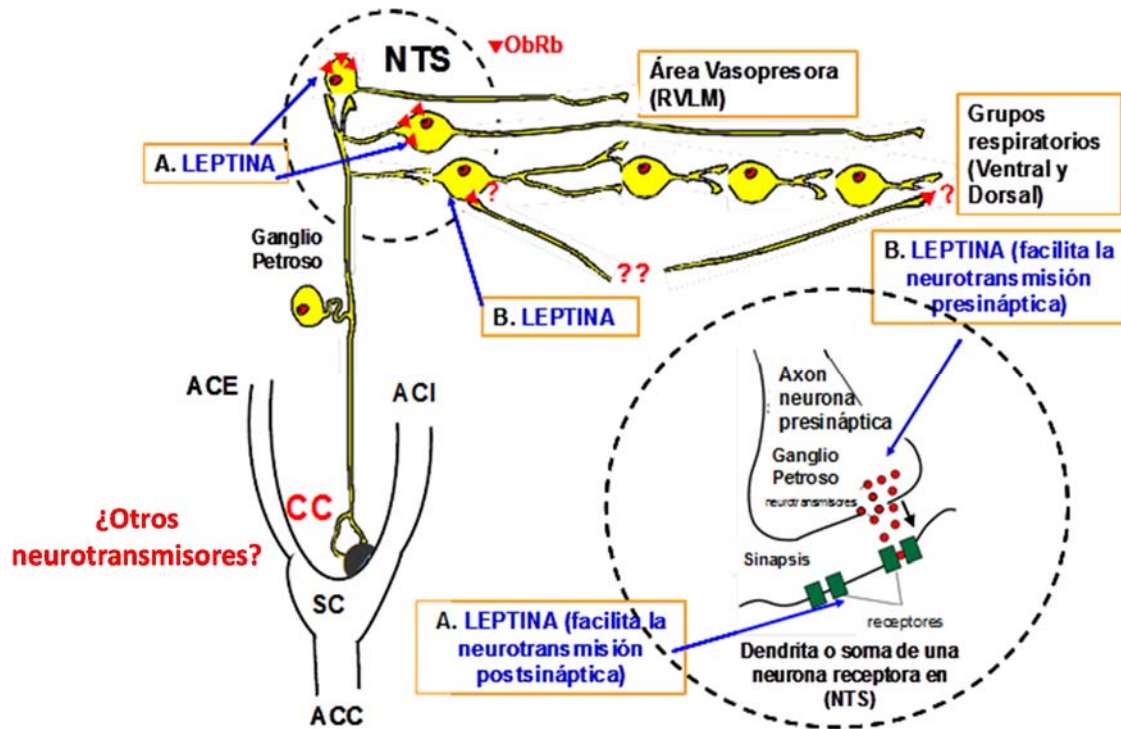


FIGURA 54: Esquema de los posible lugares donde la leptina puede ejercer su función. Cuerpo Carotídeo (CC); Arteria Carótida Común (ACC); Seno Carotídeo (SC); Arteria Carótida Externa (ACE); Arteria Carótida Interna (ACI); Núcleo del tracto solitario (NTS); Receptor funcional de leptina (ObRb).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Los modelos animales de apnea obstructiva del sueño y de obesidad empleados para el estudio de la fisiopatología de estas enfermedades y de la interacción entre ambas fueron adecuados para este trabajo.
2. La hipoxia intermitente crónica y la obesidad causan una hiperactividad simpática aumentando los niveles de catecolaminas en plasma, el contenido y la síntesis de catecolaminas en arteria renal y la presión arterial sistémica. La mayoría de estas alteraciones se acentúan en los modelos experimentales de obesidad e hipoxia intermitente crónica.
3. La hipoxia intermitente crónica y la obesidad producen estrés oxidativo incrementando los peróxidos lipídicos en el hígado y el 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina en plasma y disminuyendo la actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial y citoplasmática y la relación aconitasa/fumarasa en hígado.
4. La hipoxia intermitente crónica y la obesidad producen alteraciones en el metabolismo de los glúcidos y de los lípidos.
5. La hipoxia intermitente crónica y la obesidad generan un estado inflamatorio, aumentando la proteína C reactiva y la activación del Factor Nuclear kappa B, estos parámetros se incrementan aún más en el modelo experimental de obesidad e hipoxia intermitente crónica.
6. La hipoxia intermitente crónica y la obesidad producen un aumento de los niveles de leptina en plasma, siendo este aumento mayor cuando se combinan ambas situaciones.
7. La hipoxia intermitente crónica disminuye la respuesta ventilatoria a la hipoxia y a la hipercapnia, mientras los animales obesos muestran un patrón respiratorio restrictivo. La combinación de la obesidad y la hipoxia intermitente crónica mantiene el patrón respiratorio restrictivo y muestra hipoventilación.
8. La administración de leptina intravenosa en animales anestesiados aumenta la ventilación basal y potencia la respuesta ventilatoria a la hipoxia generada por oclusiones carotídeas de 5 y 15s, de manera dosis-dependiente.

9. La leptina subcutánea (1mg/kg) en animales anestesiados aumenta la respuesta ventilatoria a la hipoxia producida por oclusiones de 5s. siendo este aumento máximo a los 30min. de la administración de leptina.
10. En animales controles no anestesiados la leptina subcutánea (1mg/kg) aumenta la respuesta ventilatoria a la hipoxia aguda del 7%O₂.
11. En cuerpos carotídeos intactos, la leptina aplicada de forma aguda no modifica la liberación basal de catecolaminas ni la inducida por hipoxia o alto K⁺.
12. Los cuerpos carotídeos cultivados (48h) en presencia de leptina muestran respuestas neurosecretoras indistinguibles de los controles.
13. En células quimiorreceptoras cultivadas durante 48h en presencia y ausencia de leptina, los niveles basales de [Ca²⁺]_i y el aumento de [Ca²⁺]_i producidos por la hipoxia o el alto K⁺ no se modifican.
14. La administración de leptina, por vía subcutánea o intravenosa en animales controles anestesiados no modifica la glucemia basal.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, M, Arnáiz, P, Barja, S, Bambs, C, Berríos, X, Guzmán, B, Carvajal, J, Cassis, B and Navarrete, C (2007). "Relationship of C-reactive protein to adiposity, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis in healthy children." *Rev Esp Cardiol.* 60(10): 1051-8.
- Aguer, C and Harper, ME (2012). "Skeletal muscle mitochondrial energetics in obesity and type 2 diabetes mellitus: endocrine aspects." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26: 805–819.
- Aird, WC (2008). "Endothelium in health and disease." *Pharmacol Rep.* 60(1): 139-43.
- Al-Barrak, M, Shepertycky, MR and Kryger, MH (2003). "Morbidity and mortality in obstructive sleep apnea syndrome. 2. Effect of treatment on neuropsychiatric morbidity and quality of life. *Sleep Biol. Rhythms.*" 1(1): 65-74.
- Alam, I, Lewis, K, Stephens, JW and Baxter, JN (2007). "Obesity, metabolic syndrome and sleep apnoea: all pro-inflammatory states." *Obes Rev.* 8(2): 119-27.
- Alberti, KG and Zimmet, PZ (1998). "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." *Diabet Med.* 15(7): 539-53.
- Allahdadi, KJ, Cherng, TW, Pai, H, Silva, AQ, Walker, BR, Nelin, LD and Kanagy, NL (2008). "Endothelin type A receptor antagonist normalizes blood pressure in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(1) H: 434-40.
- Anderson, EA and Mark, AL (1993). "The vasodilator action of insulin. Implications for the insulin hypothesis of hypertension." *Hypertension* 21(2): 136-41.
- Anichkov, S and Belen'kii, M Eds. (1963). *Pharmacology of the carotid body chemoreceptors.* New York, Macmillan.
- Anstead, M and Philips, B (1999). "The spectrum of sleep-disordered breathing." *Respir Care Clin North Am* 5: 363–377.
- Aranceta, J, Serra, LI, Foz, M and Moreno, B (2005). "Prevalencia de Obesidad en España." *Med Clin (Barc).* 125(12): 460-6.
- Argente, J (2011). "Obesity in childhood and adolescence: a heterogeneous disease with new pathophysiological bases." *An Pediatr (Barc).* 75(1): 1—5.
- Arnardottir, ES, Maislin, G, Jackson, N, Schwab, RJ, Benediktsdottir, B, Teff, K, Juliusson, S, Pack, AI and Gislason, T (2013). "The role of obesity, different fat compartments and sleep apnea severity in circulating leptin levels: the Icelandic Sleep Apnea Cohort study." *Int J Obes (Lond).* 37(6): 835-42.
- Aserinsky, E and Kleitman, N (1955). "Two types of ocular motility occurring in sleep." *J Appl Physiol* 8(1): 1-10.
- Atwood, CW (2005). "Sleep-related hypoventilation: the evolving role of leptin." *Chest* 128(3): 1079-81.
- Bandín, C, Scheer, FA, Luque, AJ, Ávila-Gandía, V, Zamora, S, Madrid, JA, Gómez-Abellán, P and Garaulet, M (2015). "Meal timing affects glucose

- tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: A randomized, crossover trial." *Int J Obes (Lond)*. 39(5): 828-33.
- Bartosz, G (2009). "Reactive oxygen species: destroyers or messengers?" *Biochem Pharmacol*. 77(8): 1303-15.
- Bassi, M, Furuya, WI, Zoccal, DB, Menani, JV, Colombari, E, Hall, JE, da Silva, AA, do Carmo, JM and Colombari, DS (2015). "Control of respiratory and cardiovascular functions by leptin." *Life Sci*. 125: 25-31.
- Bickelmann, AG, Burwell, CS, Robin, ED and Whaley, RD (1956). "Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation; a Pickwickian syndrome." *Am J Med*. 21(5): 811-8.
- Block, AJ, Boysen, PG, Wynne, JW and Hunt, LA (1979). "Sleep apnea, hypopnea and oxygen desaturation in normal subjects. A strong male predominance." *N Engl J Med*. 300(10): 513-7.
- Boethel, CD (2002). "Sleep and the endocrine system: new associations to old diseases." *Curr Opin Pulm Med*. 8(6): 502-5.
- Bowes, G, Townsend, ER, Bromley, SM, Kozar, LF and Phillipson, EA (1981). "Role of the carotid body and of afferent vagal stimuli in the arousal response to airway occlusion in sleeping dogs." *Am Rev Respir Dis* 123(6): 644-7.
- Bowie, A and O'Neill, LA (2000). "Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries." *Biochem Pharmacol*. 59(1): 13-23.
- Bradford, MM. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem*. 72: 248-54.
- Bradley, TD and Floras, JS (2009). "Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences." *Lancet* 373(9657): 82-93.
- Brugniaux, JV, Pialoux, V, Foster, GE, Duggan, CT, Eliasziw, M, Hanly, PJ and Poulin, MJ (2011). "Effects of intermittent hypoxia on erythropoietin, soluble erythropoietin receptor and ventilation in humans." *Eur Respir J*.
- Bucolo, G and David, H. (1973). "Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes." *Clin Chem*. (5) 476-82.
- Bulteau, AL, Ikeda-Saito, M and Szweda, LI (2003). "Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria." *Biochemistry* 42(50): 14846-55.
- Butt, M, Dwivedi, G, Khair, O and Lip, GY (2010). "Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease." *Int J Cardiol*. 139(1): 7-16.
- Cadenas, E and Sies, H (1998). "The lag phase." *Free Radic. Res*. 28: 601-609.
- Campillo, JE, Ed. (2007). *El mono obeso: La evolución humana y las enfermedades de la opulencia: diabetes, hipertensión, arteroesclerosis*. Barcelona, CRÍTICA S.L.
- Campos-Rodriguez, F, Grilo-Reina, A, Perez-Ronchel, J, Merino-Sanchez, M, Gonzalez-Benitez, MA, Beltran-Robles, M and Almeida-Gonzalez, C (2006). "Effect of continuous positive airway pressure on ambulatory BP in patients with sleep apnea and hypertension: a placebo-controlled trial." *Chest* 129(6): 1459-67.
- Cao, H (2014). "Adipocytokines in obesity and metabolic disease." *J Endocrinol*. 220(2): T47-59.
- Caro, JF, Sinha, MK, Kolaczynski, JW, Zhang, PL and Considine, RV (1996). "Leptin: the tale of an obesity gene." *Diabetes*. 45(11): 1455-62.

- Caro, JF, Kolaczynski, JW, Nyce, MR, Ohannesian, JP, Opentanova, I, Goldman, WH, Lynn, RB, Zhang, PL, Sinha, MK and Considine, RV (1996). "Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance." *Lancet* 348 (9021): 159-61.
- Carreras, A, Kayali, F, Zhang, J, Hirotsu, C, Wang, Y and Gozal, D (2012). "Metabolic effects of intermittent hypoxia in mice: steady versus high-frequency applied hypoxia daily during the rest period." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 303(7): R700-9.
- Ciriello, J and Moreau, JM (2012). "Leptin signaling in the nucleus of the solitary tract alters the cardiovascular responses to activation of the chemoreceptor reflex." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 303(7): R727-36.
- Ciriello, J and Moreau, JM (2013). "Systemic administration of leptin potentiates the response of neurons in the nucleus of the solitary tract to chemoreceptor activation in the rat." *Neuroscience*. 229: 88-99. .
- Ciriello J and Caverson, MM (2014). "Carotid chemoreceptor afferent projections to leptin receptor containing neurons in nucleus of the solitary tract." *Peptides*. 58: 30-5.
- Coleman, DL (1973). "Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice." *Diabetologia* 9(4): 294-8.
- Conde, SV, Monteiro, EC, Rigual, R, Obeso, A and Gonzalez, C (2012). "Hypoxic intensity: a determinant for the contribution of ATP and adenosine to the genesis of carotid body chemosensory activity." *J Appl Physiol* (1985) 112(12): 2002-10.
- Conde, SV, Ribeiro, MJ, Obeso, A, Rigual, R, Monteiro, EC and Gonzalez, C (2012). "Chronic caffeine intake in adult rat inhibits carotid body sensitization produced by chronic sustained hypoxia but maintains intact chemoreflex output." *Mol Pharmacol*. 82(6): 1056-65.
- Consenso del Grupo de Trabajo: Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes (2002). "La resistencia a la insulina y su implicación en múltiples factores de riesgo asociados a diabetes mellitus tipo 2." *Med Clin (Barc)*. 119:458-63.
- Considine, RV, Sinha, MK, Heiman, ML, Kriauciunas, A, Stephens, TW, Nyce, MR, Ohannesian, JP, Marco, CC, McKee, LJ, Bauer, TL and Caro, JF (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." *N Engl J Med*. 334(5): 292-5.
- Corella, D (2011). *Dieta, Genética y Obesidad*. Revista Española de Obesidad (Septiembre-Octubre 2011). Vol. 9.
- Cortijo, C and Blanco, MA (2014). *Epidemiología. Trastornos de la conducta alimentaria y obesidad. Un enfoque integral*. G Morandé, M Graell and A Blanco. Madrid, Editorial Médica Panamericana. 44: 491-498.
- Couplan, E, del Mar Gonzalez-Barroso, M, Alves-Guerra, MC, Ricquier, D, Goubern, M and Bouillaud, F (2002). "No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria." *J Biol Chem*. 277(29): 26268-75.
- Crouse, JA, Elliott, GE, Burgess, TL, Chiu, L, Bennett, L, Moore, J, Nicolson, M and Pacifici, RE (1998). "Altered cell surface expression and signaling of leptin receptors containing the fatty mutation." *J Biol Chem*. 273(29): 18365-73.

- Cui, F, Gao, L, Yuan, F, Dong, ZF, Zhou, ZN, Kline, DD, Zhang, Y and DP, Li (2012). "Hypobaric intermittent hypoxia attenuates hypoxia-induced depressor response." *PLoS One* 7(7).
- Chandel, NS, Trzyna, WC, McClintock, DS and Schumacker, PT (2000). "Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin." *J Immunol.* 165(2): 1013-21.
- Chandra, A, Neeland, IJ, Berry, JD, Ayers, CR, Rohatgi, A, Das, SR, Khera, A, McGuire, DK, de Lemos, JA and Turer, AT (2014). "The relationship of body mass and fat distribution with incident hypertension: observations from the Dallas Heart Study." *J Am Coll Cardiol.* 64 (10): 997-1002.
- Chang, Z, Ballou, E, Jiao, W, McKenna, KE, Morrison, SF and McCrimmon, DR (2013). "Systemic leptin produces a long-lasting increase in respiratory motor output in rats." *Front Physiol.* 4:16.
- Chaudhary, B, Dasti, S, Park, Y, Brown, T, Davis, H and Akhtar, B. (1998). "Hour-to-hour variability of oxygen saturation in sleep apnea." *Chest.* 113(3): 719-22.
- Chen, H, Charlat, O, Tartaglia, LA, Woolf, EA, Weng, X, Ellis, SJ, Lakey, ND, Culpepper, J, Moore, KJ, Breitbart, RE, Duyk, GM, Tepper, RI and Morgenstern, JP (1996). "Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice." *Cell.* 84(3): 491-5.
- Cheng, Z and Ristow, M (2013). "Mitochondria and metabolic homeostasis." *Antioxid Redox Signal* 19(3): 240-2.
- Chenuel, BJ, Smith, CA, Henderson, KS and Dempsey, JA (2005). "Increased propensity for apnea via dopamine-induced carotid body inhibition in sleeping dogs." *J Appl Physiol* (1985) 98(5): 1732-9.
- Cherniack, NS (2004). "Inflammatory ideas about sleep apnoea." *Respiration* 71: 20-21.
- Chirinos, JA, Gurubhagavatula, I, Teff, K, Rader, DJ, Wadden, TA, Townsend, R, Foster, GD, Maislin, G, Saif, H, Broderick, P, Chittams, J, Hanlon, AL and Pack, AI (2014). "CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea." *N Engl J Med.* 370(24): 2265-75.
- Chua, SC Jr, Chung, WK, Wu-Peng, XS, Zhang, Y, Liu, SM, Tartaglia, L and Leibel, RL (1996). "Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor." *Science* 271(5251): 994-6.
- Da Costa, LA, Badawi, A and El-Sohemy, A (2012). "Nutrigenetics and modulation of oxidative stress." *Ann Nutr Metab.* 3:27-36.
- De Castro, F (1928). "Sur la structure et l'innervation du sinus carotidien de l'homme et des mammifères: nouveaux faits sur l'innervation et la fonction du glomus caroticum." *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* 25: 330-380.
- Dempsey, JA, Veasey, SC, Morgan, BJ and CP, O'Donnell (2010). "Pathophysiology of sleep apnea." *Physiol Rev.* 90(1): 47-112.
- Dempsey, JA, Harms, CA, Morgan, BJ, Badr, MS and Skatrud, JB, Eds. (1997). *The Lung: Scientific Foundations. Sleep effects on breathing and breathing stability.* Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Dina, C, Meyre, D, Gallina, S, Durand, E, Körner, A, Jacobson, P, Carlsson, LM, Kiess, W, Vatin, V, Lecoeur, C, Delplanque, J, Vaillant, E, Pattou, F, Ruiz, J, Weill, J, Levy-Marchal, C, Horber, F, Potoczna, N, Hercberg, S, Le Stunff, C, Bougnères, P, Kovacs, P, Marre, M, Balkau, B, Cauchi, S,

- Chèvre, JC and Froguel, P (2007). "Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity." *Nat Genet.* 39(6): 724-6.
- Douglas, NJ, White, DP, Weil, JV, Pickett, CK and Zwillich, CW (1982). "Hypercapnic ventilatory response in sleeping adults." *Am Rev Respir Dis.* 126: 758-62
- Drager, LF, Li, J, Reinke, C, Bevans-Fonti, S, Jun, JC and Polotsky, VY (2011). "Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity." *Obesity (Silver Spring).* 19(11): 2167-74.
- Drager, LF, Li, J, Shin, MK, Reinke, C, Aggarwal, NR, Jun, JC, Bevans-Fonti, S, Sztalryd, C, O'Byrne, SM, Kroupa, O, Olivecrona, G, Blaner, WS and Polotsky, VY (2012). "Intermittent hypoxia inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins and inactivates adipose lipoprotein lipase in a mouse model of sleep apnoea." *Eur Heart J.* 33(6): 783-90.
- Durán-Cantolla, J, Puertas-Cuesta, FJ, Pin-Arboledas, G and Santa María-Cano, J (2005). "Documento de consenso nacional sobre el síndrome de apneas-hipopneas del sueño." *Arch Bronconeumol.* 41 Extraordinario 4: 1-110.
- Duvnjak, L and Duvnjak, M (2009). "The metabolic syndrome - an ongoing story." *J Physiol Pharmacol.* 60 Suppl 7: 19-24.
- Dwivedi, G, Khair, O and Lip, GY (2008). "Obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome: two sides of the same coin?" *J Hum Hypertens.* 22(6): 377-9.
- Edge, D and O'Halloran, KD (2015). *Chronic Intermittent Hypoxia Blunts the Expression of Ventilatory Long Term Facilitation in Sleeping Rats. Arterial Chemoreceptors in Physiology and Pathophysiology*, Springer International Publishing. 860: 335-342.
- Eikelis, N, Lambert, G, Wiesner, G, Kaye, D, Schlaich, M, Morris, M, Hastings, J, Socratous, F and Esler, M (2004). "Extra-adipocyte leptin release in human obesity and its relation to sympathoadrenal function." *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(5): E744-52.
- Eisele, DW, Schwartz, AR and Smith, PL (2003). "Tongue neuromuscular and direct hypoglossal nerve stimulation for obstructive sleep apnea." *Otolaryngol Clin North Am.* 36(3): 501-10.
- Elejalde Guerra, JI (2001). "Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes." *An Med Interna (Madrid)* 18: 326-335.
- Eltzschig, HK and Eckle, T (2011). "Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation." *Nat Med.* 17(11): 1391-401.
- Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001). "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* 285(19): 2486-97.
- Farooqi, IS and O'Rahilly, S (2014). "20 years of leptin: human disorders of leptin action." *J Endocrinol.* 223(1): T63-70.
- Farr, OM, Gavrieli, A and Mantzoros, CS (2015). "Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity?" *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 22(5): 353-9.
- Fidone, S and Gonzalez, C. (1982). "Catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro." *J Physiol* 333: 69-79.

- Figlewicz, DP and Benoit, SC (2009). "Insulin, leptin, and food reward: update 2008." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 296(1): R9-R19.
- Fitzgerald, RS (2000). "Oxygen and carotid body chemotransduction: the cholinergic hypothesis - a brief history and new evaluation." *Respir Physiol*. 120(2): 89-104.
- Fletcher, EC, Orolinova, N and Bader, M (2002). "Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: the renin-angiotensin system." *J Appl Physiol* (1985) 92(2): 627-33.
- Fletcher, EC, Lesske, J, Qian, W, Miller, CC and Unger, T (1992). "Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats." *Hypertension*. 19 (6 Pt 1): 555-61.
- Folch J, Lees M and GH., Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *J Biol Chem* 226(1): 497-509.
- Foley, RA, Ed. (2001). *The evolutionary consequences of increased carnivory in hominids*. In *Meat-Eating and Human Evolution*. New York, Oxford University Press.
- Ford, ES (2003). "The metabolic syndrome and C-reactive protein, fibrinogen, and leukocyte count: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey." *Atherosclerosis* 168(2): 351-8.
- Frayling, TM, Timpson, NJ, Weedon, MN, Zeggini, E, Freathy, RM, Lindgren, CM, Perry, JR, Elliott, KS, Lango, H, Rayner, NW, Shields, B, Harries, LW, Barrett, JC, Ellard, S, Groves, CJ, Knight, BP, Patch, AM, Ness, AR, Ebrahim, S, Lawlor, DA, Ring, SM, Ben-Shlomo, Y, Jarvelin, MR, Sovio, U, Bennett, AJ, Melzer, D, Ferrucci, L, Loos, RJ, Barroso, I, Wareham, NJ, Karpe, F, Owen, KR, Cardon, LR, Walker, M, Hitman, GA, Palmer, CN, Doney, AS, Morris, AD, Smith, GD, Hattersley, AT and McCarthy, MI (2007). "A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity." *Science* 316(5826): 889-94.
- Furukawa, S, Fujita, T, Shimabukuro, M, Iwaki, M, Yamada, Y, Nakajima, Y, Nakayama, O, Makishima, M, Matsuda, M and I., Shimomura (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." *J Clin Invest* 114(12): 1752-61.
- Gallagher, D, Heymsfield, SB, Heo, M, Jebb, SA, Murgatroyd, PR and Sakamoto, Y (2000). "Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index." *Am J Clin Nutr*. 72(3): 694-701.
- Gallego-Martin, T, Fernandez-Martinez, S, Rigual, R, Obeso, A and Gonzalez, C (2012). "Effects of low glucose on carotid body chemoreceptor cell activity studied in cultures of intact organs and in dissociated cells." *Am J Physiol Cell Physiol*. 302(8): C1128-40.
- Ghilardi, N, Ziegler, S, Wiestner, A, Stoffel, R, Heim, MH and Skoda, RC (1996). "Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(13): 6231-5.
- Gibson, GJ (2000). "Obesity, respiratory function and breathlessness." *Thorax*. 55 Suppl 1: S41-4.
- Ginsberg, HN, Zhang, YL and Hernandez-Ono, A (2005). "Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes." *Arch Med Res* 36(3): 232-40.

- Glitsch, MD (2008). "Spontaneous neurotransmitter release and Ca²⁺--how spontaneous is spontaneous neurotransmitter release?" *Cell Calcium*. 43(1): 9-15.
- Goldstein, DS, Eisenhofer, G and Kopin, IJ (2003). "Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans." *J Pharmacol Exp Ther*. 305(3): 800-11.
- Gonzalez-Martín, MC, Vega-Agapito, MV, Conde, SV, Castañeda, J, Bustamante, R, Olea, E, Perez-Vizcaino, F, Gonzalez, C and Obeso, A (2011). "Carotid body function and ventilatory responses in intermittent hypoxia. Evidence for anomalous brainstem integration of arterial chemoreceptor input." *J Cell Physiol*. 226: 1961-9.
- González-Martín, MC , Vega-Agapito, V, Prieto-Lloret, J, Agapito, MT, Castañeda, J and Gonzalez, C, Eds. (2009). Effects of intermittent hypoxia on blood gases plasma catecholamine and blood pressure. Arterial chemoreceptors, *Adv Exp Med Biol*.
- Gonzalez, C, Almaraz, L, Obeso, A and Rigual, R (1994). "Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges." *Physiol Rev*. 74: 829–898.
- Gonzalez, C, Yubero, S, Gomez-Niño, MA, Agapito, T, Rocher, A, Rigual, R, A, Obeso and Montserrat, JM (2012). "Some reflections on intermittent hypoxia. Does it constitute the translational niche for carotid body chemoreceptor researchers?" *Adv Exp Med Biol*. 758: 333-42.
- Gonzalez, C, Conde, SV, Gallego-Martín, T, Olea, E, Gonzalez-Obeso, E, Ramirez, M, Yubero, S, Agapito, MT, Gomez-Niño, A, Obeso, A, Rigual, R and Rocher, A (2014). "Fernando de Castro and the discovery of the arterial chemoreceptors." *Front Neuroanat*. 8:25: 16.
- González, C, Almaraz, L, Obeso, A and Rigual, R (1992). "Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors." *Trends Neurosci* 15(4): 146-53.
- Gonzalez, Jose Antonio Morales (2010). *Obesidad. Un enfoque multidisciplinario. Modelos animales y experimentales de la obesidad*. M en C Agustín Carmona Castro. Hidalgo, Méjico, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Gordon, Christopher J *Thermal Biology of the laboratory rat*. Neurotoxicology Divison, Health Effects Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency and North Carolina 27711 Research Triangle Park: 115.
- Gottlieb, DJ, Punjabi, NM, Mehra, R, Patel, SR, Quan, SF, Babineau, DC, Tracy, RP, Rueschman, M, Blumenthal, RS, Lewis, EF, Bhatt, DL and S, Redline (2014). "CPAP versus oxygen in obstructive sleep apnea." *N Engl J Med*. 370(24): 2276-85.
- Groeben, H , Meier, S, Brown, RH, O'Donnell, CP, Mitzner, W and Tankersley, CG (2004). "The effect of leptin on the ventilatory responseto hyperoxia." *Exp Lung Res*. 30(7): 559-70.
- Gu, H, Lin, M, Liu, J, Gozal, D, Scrogin, KE, Wurster, R, Chappelle, MW, Ma, X and Cheng, ZJ (2007). "Selective impairment of central mediation of baroreflex in anesthetized young adult Fischer 344 rats after chronic intermittent hypoxia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293(5): H2809-18.
- Guilleminault, C, Tilkian, A and Dement, WC (1976). "The sleep apnea syndromes." *Annu Rev Med*. 27: 465-84.

- Gutiérrez-Fisac, JL, Guallar-Castillón, P, León-Muñoz, LM, Graciani, A, Banegas, JR and Rodríguez-Artalejo, F (2012). "Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: the ENRICA study." *Obes Rev.* 13(4): 388-92.
- Guyenet, PG, Stornetta, RL and Bayliss, DA (2010). "Central respiratory chemoreception." *J Comp Neurol.* 518(19): 3883-906.
- Halaas, JL, Gajiwala, KS, Maffei, M, Cohen, SL, Chait, BT, Rabinowitz, D, Lallone, RL, Burley, SK and Friedman, JM (1995). "Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene." *Science.* 269(5223): 543-6.
- Hargens, TA, Guill, SG, Kaleth, AS, Nickols-Richardson, SM, Miller, LE, Zedalis, D, Gregg, JM, Gwazdauskas, F and Herbert, WG (2013). "Insulin resistance and adipose-derived hormones in young men with untreated obstructive sleep apnea." *Sleep Breath.* 17(1): 403-9.
- Harlan, SM, Morgan, DA, Agassandian, K, Guo, DF, Cassell, MD, Sigmund, CD, Mark, AL and Rahmouni, K (2011). "Ablation of the leptin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus abrogates leptin-induced sympathetic activation." *Circ Res.* 108(7): 808-12.
- Harsch, IA, Konturek, PC, Koebnick, C, Kuehnlein, PP, Fuchs, FS, Pour Schahin, S, Wiest, GH, Hahn, EG, Lohmann, T and Ficker, JH (2003). "Leptin and ghrelin levels in patients with obstructive sleep apnoea: effect of CPAP treatment." *Eur Respir J.* 22(2): 251-7.
- Hausladen, A and Fridovich, I (1996). "Measuring nitric oxide and superoxide: rate constants for aconitase reactivity." *Methods Enzymol.* 269:3: 7-41.
- Hayden, MS and Ghosh, S (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." *Cell* 132(3): 344-62.
- Hirshman, CA, McCullough, RE, Cohen, PJ and Weil, JV (1975). "Hypoxic ventilatory drive in dogs during thiopental, ketamine, or pentobarbital anesthesia." *Anesthesiology* 43(6): 628-34.
- Hirshman, CA, McCullough, RE, Cohen, PJ and Weil, JV (1977). "Depression of hypoxic ventilatory response by halothane, enflurane and isoflurane in dogs." *Br J Anaesth.* 49(10): 957-63.
- Hoffstein, V and Mateika, S (1992). "Differences in abdominal and neck circumferences in patients with and without sleep apnoea." *Eur Respir J.* 5: 377-381.
- Huang, J, Tamisier, R, Ji, E, Tong, J and Weiss, WJ (2007). "Chronic intermittent hypoxia modulates nNOS mRNA and protein expression in the rat hypothalamus." *Respir Physiol Neurobiol.* 158(1): 30-8
- Huang, RC, Garratt, ES, Pan, H, Wu, Y3, Davis, EA, Barton, SJ, Burdge, GC, Godfrey, KM, Holbrook, JD and Lillycrop, KA (2015). "Genome-wide methylation analysis identifies differentially methylated CpG loci associated with severe obesity in childhood." *Epigenetics* 10(11): 995-1005.
- Iber, C, Ancoli-Israel, S, Chesson, A and Quan, SF (2007). "The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications." American Academy of Sleep Medicine.
- Inyushkin, AN, Inyushkina, EM and Merkulova, NA (2009). "Respiratory responses to microinjections of leptin into the solitary tract nucleus." *Neurosci Behav Physiol.* 39(3): 231-40.

- Ira Fox, Stuart, Ed. (2008). *Fisiología Humana. Fisiología respiratoria*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U.
- Itani, SI, Ruderman, NB, Schmieder, F and Boden, G (2002). "Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B α ." *Diabetes* 51(7): 2005-11.
- Iturriaga, R, Moya, EA and Del Rio, R (2010). Cardiorespiratory Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in a Rat Model of Sleep Apnea. *New Frontiers in Respiratory Control, Advances in Experimental Medicine and Biology*. 669: 271-274.
- Iturriaga, R, Andrade, DC and Del Rio, R (2014). "Enhanced carotid body chemosensory activity and the cardiovascular alterations induced by intermittent hypoxia." *Front Physiol*. 5:468.
- Iturriaga, R, Rey, S, Alcayaga, J and Del Rio, R (2006). "Chronic intermittent hypoxia enhances carotid body chemosensory responses to acute hypoxia." *Adv Exp Med Biol*. 580: 227-32.
- Jun, J, Savransky, V, Nanayakkara, A, Bevans, S, Li, J, Smith, PL and Polotsky, VY (2008). "Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 295(4).
- Kaur, J (2014). "A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome." *Cardiology Research and Practice: Article ID 943162*.
- Kawser Hossain, M, Abdal Dayem, A, Han, J, Yin, Y, Kim, K, Kumar Saha, S, Yang, GM, Choi, HY and Cho, SG (2016). "Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids." *Int J Mol Sci* 17(4): pii: E569.
- Kennedy, AJ, Ellacott, KL, King, VL and Hasty, AH (2010). "Mouse models of the metabolic syndrome." *Dis Model Mech*. 3(3-4): 156-66.
- Keys, A, Fidanza, F, Karvonen, MJ, Kimura, N and Taylor, HL (1972). "Indices of relative weight and obesity." *J Chronic Dis*. 25(6): 329-43.
- Keys, A, Menotti, A, Karvonen, MJ, Aravanis, C, Blackburn, H, Buzina, R, Djordjevic, BS, Dontas, AS, Fidanza, F, Keys, MH, Kromhout, D, Nedeljovic, S, Punsar, S, Seccarecia, F and Toshima, H (1986). "The diet and 15-year death rate in the seven countries study." *Am J Epidemiol*. 124(6): 903-15.
- Kim, NH (2012). "Obstructive sleep apnea and abnormal glucose metabolism." *Diabetes Metab J*. 36(4): 268-72.
- Kjelsberg, FN, Ruud, EA and Stavem, K (2005). "Predictors of symptoms of anxiety and depression in obstructive sleep apnea." *Sleep Med*. 6(4): 341-6.
- Kleemann, R, van Erk, M, Verschuren, L, van den Hoek, AM, Koek, M, Wielinga, PY, Jie, A, Pellis, L, Bobeldijk-Pastorova, I, Kelder, T, Toet, K, Wopereis, S, Cnubben, N, Evelo, C, van Ommen, B and Kooistra, T (2010). "Time-resolved and tissue-specific systems analysis of the pathogenesis of insulin resistance." *PLoS One* 5(1).
- Kline, DD (2010). "Chronic intermittent hypoxia affects integration of sensory input by neurons in the nucleus tractus solitarius." *Respir Physiol Neurobiol*. 174(1-2): 29-36.
- Kobayashi, S, Zimmermann, H and Millhorn, D (2000b). "Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport." *J Neurochem* 74: 621-632.

- Kohler, M and Stradling, JR (2012). "Cross Talk proposal: most of the cardiovascular consequences of OSA are due to increased sympathetic activity." *J. Physiol* 590: 2813–2815.
- Kohler, M and Stradling, JR (2012). "CrossTalk proposal: Most of the cardiovascular consequences of OSA are due to increased sympathetic activity." *J Physiol*. 590(Pt 12): 2813-5.
- Korkmaz, A, Rosales-Corral, S and Reiter, RJ (2012). "Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena." *Gene*. 503(1): 1-11.
- Krude, H, Biebermann, H, Luck, W, Horn, R, Brabant, G and Grüters, A (1998). "Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans." *Nat Genet*. 19(2): 155-7.
- Kubin, L, Davies, RO and Pack, AI (1998). "Control of Upper Airway Motoneurons During REM Sleep." *News Physiol Sci*. 13: 91-97.
- Kumar, GK, Peng, YJ, Nanduri, J and Prabhakar, NR (2015). "Carotid Body Chemoreflex Mediates Intermittent Hypoxia-Induced Oxidative Stress in the Adrenal Medulla." *Adv Exp Med Biol*. 860: 195-9.
- Kurtz, D and Krieger, J (1978). "Respiratory arrest during sleep. Facts and hypotheses." *Rev Neurol (Paris)* 134(1): 11-22.
- Laclaustra-Gimeno, M, Bergua Martínez, C, Pascual Calleja, I and Casasnovas Lenguas, JA (2005). "Síndrome metabólico. Concepto y fisiopatología." *Rev Esp Cardiol Supl*. 5: 3D-10D.
- Lanaspa, MA, Sanchez-Lozada, LG, Choi, YJ, Cicerchi, C, Kanbay, M, Roncal-Jimenez, CA, Ishimoto, T, Li, N, Marek, G, Duranay, M, Schreiner, G, Rodriguez-Iturbe, B, Nakagawa, T, Kang, DH, Sautin, YY and Johnson, RJ (2012). "Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and -independent fatty liver." *J Biol Chem*. 287(48): 40732-44.
- Lattimore, JD, Celermajer, DS and Wilcox, I (2003). "Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease." *J Am Coll Cardiol*. 41(9): 1429-37.
- Lau, DC, Dhillon, B, Yan, H, Szmitko, PE and Verma, S (2005). "Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288(5): H2031-41.
- Laurent, A, Nicco, C, Tran Van Nhieu, J, Borderie, D, Chéreau, C, Conti, F, Jaffray, P, Soubrane, O, Calmus, Y, Weill, B and Batteux, F (2004). "Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis." *Hepatology* 39(5): 1277-85.
- Lavie, L (2003). "Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder." *Sleep Med Rev*. 7(1): 35-51.
- Lavie, L (2015). "Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia--revisited--the bad ugly and good: implications to the heart and brain." *Sleep Med Rev*. 20: 27-45.
- Lavie, L and Lavie, P (2012). "CrossTalk opposing view: most cardiovascular diseases in sleep apnoea are not caused by sympathetic activation." *J Physiol*. 590: 2817–2819.
- Lewis, GF and Steiner, G (1996). "Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state." *Diabetes Care*. 19(4): 390-3.
- Li, J, Thorne, LN, Punjabi, NM, Sun, CK, Schwartz, AR, Smith, PL, Marino, RL, Rodriguez, A, Hubbard, WC, O'Donnell, CP and Polotsky, VY (2005).

- "Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice." *Circ Res.* 97(7): 698-706.
- Lieberman, D, Ed. (2013). *La historia del cuerpo humano*. Barcelona, Ediciones de Pasado y Presente, S.L.
- Liyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, Polotsky VY, O'Donnell CP (2007). "Intermittent Hypoxia Causes Insulin Resistance in Lean Mice Independent of Autonomic Activity." *Am J Respir Crit Care Med* 175: 851-857.
- Lönnqvist, F, Arner, P, Nordfors, L and Schalling, M (1995). "Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects." *Nat Med.* 1(9): 950-3.
- Louis, M and Punjabi, NM (2009). "Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers." *J Appl Physiol* (1985). 106(5): 1538-44.
- Lutz, TA and Woods, SC (2012). "Overview of animal models of obesity." *Curr Protoc Pharmacol*. Chapter 5:Unit5.61.
- Malhotra, A, Kang, BP, Cheung, S, Opawumi, D and Meggs, LG (2001). "Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I." *Diabetes.* 50(8): 1918-26.
- Malli, F, Papaioannou, AI, Gourgoulisanis, KI and Daniil, Z (2010). "The role of leptin in the respiratory system: an overview." *Respir Res.* 11: 152.
- Mardones, F (2014). *Intervenciones en la obesidad del niño y el adolescente. Trastornos de la conducta alimentaria y obesidad. Un enfoque integral*. G Morandé, M Graell and A Blanco. Madrid, Editorial Médica Panamericana, S.A. 50: 531-538.
- Marín Trigo, JM, Arán Corbella, X, Barbé Illa, F, Biurru Unzué, O, Fiz Fernández, J, Jimenez Gomez, A, Monserrat Canal, JM, Terán Santos, J and Cosío, MG (1993). *Diagnóstico y tratamiento del síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS). Recomendaciones SEPAR*: 1-18.
- Mark, AL (2013). "Selective leptin resistance revisited." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 305(6): R566-81.
- Marnett, LJ (2000). "Oxyradicals and DNA damage." *Carcinogenesis* 21(3): 361-70.
- Marsh, AJ, Fontes, MA, Killinger, S, Pawlak, DB, Polson, JW and Dampney, RA (2003). "Cardiovascular responses evoked by leptin acting on neurons in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus." *Hypertension* 42(4): 488-93.
- Marshall, JM (1994). "Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation." *Physiol Rev.* 74(3): 543-94.
- Martínez-García, MA, Durán-Cantolla, J and Montserrat, JM (2010). "Sleep apnea-hypopnea syndrome in the elderly." *Arch Bronconeumol.* 46(9): 479-88.
- Martos-Moreno, GÁ, Barrios, V and Argente, J (2009). "Fundamentos clínicos y diagnóstico-terapéuticos de la obesidad en la infancia." *Rev Esp Ped.* 65: 408—22.
- Martos-Moreno, GÁ, Pozo-Román, J and Argente Oliver, J (2014). *Etiopatogenia en el niño y el adolescente. Trastornos de la conducta alimentaria y obesidad. Un enfoque integral*. G Morandé, M Graell and A Blanco, Editorial Panamericana Médica: 499-505.

- Marwarha, G and Ghribi, O (2012). "Leptin signaling and Alzheimer's disease." *Am J Neurodegener Dis.* 1(3): 245-65.
- Mataix Verdú, J, Ed. (2009). *Nutrición y Alimentación humana II. Situaciones fisiológicas y patológicas.* Madrid, Ergon.
- Matthews, DR, Hosker, JP, Rudenski, AS, Naylor, BA, Treacher, DF and Turner, RC (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." *Diabetologia* (7):412-9.
- McCord, J. M and Fridovich, I (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
- McNab, BK and Brown, JH, Eds. (2002). *The physiological ecology of vertebrates: A view from Energetics.* Ithaca, Cornell University Press.
- McQueen, DS and Ribeiro, JA (1981). "Effect of adenosine on carotid chemoreceptor activity in the cat." *Br J Pharmacol.* 74(1): 129-36.
- Meiattini, F, Prencipe, L, Bardelli, F, Giannini, G and Tarli, P. (1978). "The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol." *Clin Chem.* (12): 2161-5.
- Mercer, JG, Moar, KM, Findlay, PA, Hoggard, N and Adam, CL (1998). "Association of leptin receptor (OB-Rb), NPY and GLP-1 gene expression in the ovine and murine brainstem." *Regul Pept.* 75-76: 271-8.
- Messenger, SA and Ciriello, J (2013). "Effects of intermittent hypoxia on leptin signalling in the carotid body." *Neuroscience* 232: 216-25.
- Messenger, SA, Moreau, JM and Ciriello, J (2012). "Intermittent hypoxia and systemic leptin administration induces pSTAT3 and Fos/Fra-1 in the carotid body." *Brain Res.* 1446: 56-70.
- Milagro, FI, Campión, J, García-Díaz, DF, Goyenechea, E, Paternain, L and Martínez, JA (2009). "High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats." *J Physiol Biochem.* 65(1): 1-9.
- Milton, K, Ed. (1988). *Foraging behavior and the evolution of primate cognition.* In *Machiavellian Intelligence: Social Expertise and the Evolution of Intellect in Monkeys, Apes, and Humans.*
- Monteiro, TC, Batuca, JR, Obeso, A, González, C and Monteiro, EC (2011). "Carotid body function in aged rats: responses to hypoxia, ischemia, dopamine, and adenosine." *Age (Dordr).* 33(3): 337-50.
- Montserrat, JM and Puertas-Cuesta, FJ, Eds. (2015). *Patología básica del sueño. Fisiología del aparato respiratorio durante el sueño.* Barcelona, Elsevier.
- Morrison, DL, Launois, SH, Isono, S, Feroah, TR, Whitelaw, WA and Remmers, JE (1993). "Pharyngeal narrowing and closing pressures in patients with obstructive sleep apnea." *Am Rev Respir Dis.* 148(3): 606-11.
- Myers, MG Jr (2004). "Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology." *Recent Prog Horm Res.* 59: 287-304.
- Myers, MG Jr and White, MF Eds. (2001). *The molecular basis of insulin action.* In: DeGroot, LJ, Jameson JL (eds.) Philadelphia:Saunders p. 712-727., *Endocrinology.* 4th ed
- Nair, D, Ramesh, V and Gozal, D (2012). "Adverse cognitive effects of high-fat diet in a murine model of sleep apnea are mediated by NADPH oxidase activity." *Neuroscience.* 227: 361-9.
- Nanduri, J, Wang, N, Yuan, G, Khan, SA, Souvannakitti, D, Peng, YJ, Kumar, GK, Garcia, JA and Prabhakar, NR (2009). "Intermittent hypoxia degrades

- HIF-2alpha via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(4): 1199-204.
- Narkiewicz, K, Kato, M, Phillips, BG, Pesek, CA, Davison, DE and Somers, VK (1999b). "Nocturnal continuous positive airway pressure decreases daytime sympathetic traffic in obstructive sleep apnea." *Circulation* 100: 1332-2335.
- Nelson, DL and Cox, MM, Eds. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York, Macmillan Higher Education.
- O'Donnell, CP, Tankersley, CG, Polotsky, VP, Schwartz, AR and Smith, PL (2000). "Leptin, obesity, and respiratory function." *Respir Physiol*. 119(2-3): 163-70.
- O'Donnell, CP, Schaub, CD, Haines, AS, Berkowitz, DE, Tankersley, CG, Schwartz, AR and Smith, PL (1999). "Leptin prevents respiratory depression in obesity." *Am J Respir Crit Care Med*. 159(5 Pt 1): 1477-84.
- Obeso, A, Gonzalez, C and Rocher, A (2006). Mecanismos de quimiorrecepción en el cuerpo carotídeo. En: *Estudio de la Función Respiratoria: Control de la Respiración*. Ed. Francisco García Rio.Sanitaria 2000. Barcelona-Madrid: pp.26-61.
- Obeso, A, Rocher, A, Herreros, B and Gonzalez, C, Eds. (1997b). Oxygen consumption and energy metabolism in the carotid body. In "The Carotid Body Chemoreceptors". Heidelberg, Germany, Springer-Verlag.
- Olea, E, Agapito, MT, Gallego-Martin, T, Rocher, A, Gomez-Niño, A, Obeso, A, Gonzalez, C and Yubero, S (2014). "Intermittent hypoxia and diet-induced obesity: effects on oxidative status, sympathetic tone, plasma glucose and insulin levels, and arterial pressure." *J Appl Physiol* (1985) 117(7): 706-19.
- Olea, E, Ribeiro, MJ, Gallego-Martin, T, Yubero, S, Rigual, R, Masa, JF, Obeso, A, Conde, SV and Gonzalez, C (2015). "The Carotid Body Does Not Mediate the Acute Ventilatory Effects of Leptin." *Adv Exp Med Biol*. 860: 379-85.
- Oztürk, L, Mansour, B, Yüksel, M, Yalçın, AS, Celikoğlu, F and Gökhan, N (2003). "Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients." *Clin Chim Acta*. 332(1-2): 83-8.
- Panchal, SK, Poudyal, H and Brown, L (2012). "Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats." *J Nutr*. 142(6): 1026-32.
- Pardal, R, Ortega-Sáenz, P, Durán, R and López-Barneo, J (2007). "Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body." *Cell*. 131(2): 364-77.
- Paredes Salido, F and Roca Fernández, JJ (2002). "Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular." *Offarm* 21(7).
- Paton, JF, Sobotka, PA, Fudim, M, Engelman, ZJ, Hart, EC, McBryde, FD, Abdala, AP, Marina, N, Gourine, AV, Lobo, M, Patel, N, Burchell, A, Ratcliffe, L and Nightingale, A (2013). "The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases." *Hypertension*. 61(1): 5-13.
- Pearse, AG, Polak, JM, Rost, FW, Fontaine, J, Le Lièvre, C and Le Douarin, N (1973). "Demonstration of the neural crest origin of type I (APUD) cells in the avian carotid body, using a cytochemical marker system." *Histochemie*. 34(3): 191-203.

- Peaston, RT and Weinkove, C. (2004). "Measurement of catecholamines and their metabolite." *Ann Clin Biochem.* 41(Pt 1): 17-38.
- Pecqueur, C, Alves-Guerra, MC, Gelly, C, Levi-Meyrueis, C, Couplan, E, Collins, S, Ricquier, D, Bouillaud, F and Miroux, B (2001). "Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation." *J Biol Chem.* 276(12): 8705-12.
- Peng, YJ and Prabhakar, NR (2004). "Effect of two paradigms of chronic intermittent hypoxia on carotid body sensory activity." *J Appl Physiol* (1985) 96(3): 1236-42.
- Pereira, MA, Erickson, E, McKee, P, Schrankler, K, Raatz, SK, Lytle, LA and Pellegrini, AD (2011). "Breakfast frequency and quality may affect glycemia and appetite in adults and children." *J Nutr.* 141(1): 163-8.
- Petersen, KF and Shulman, GI (2006). "Etiology of insulin resistance." *Am J Med.* 119(5 Suppl 1): S10-6.
- Phipps, PR, Starritt, E, Caterson, I and Grunstein, RR (2002). "Association of serum leptin with hypoventilation in human obesity." *Thorax.* 57(1): 75-6.
- Porzionato, A, Rucinski, M, Macchi, V, Stecco, C, Castagliuolo, I, Malendowicz, LK and De Caro, R (2011). "Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the rat and human carotid body." *Brain Res.* 1385: 56-67.
- Prabhakar, NR (2001). "Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms." *J Appl Physiol* (1985). 90(5): 1986-94.
- Prabhakar, NR and Semenza, GL (2012). "Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2." *Physiol Rev.* 92(3): 967-1003.
- Punjabi, NM and Polotsky, VY (2005). "Disorders of glucose metabolism in sleep apnea." *J Appl Physiol* (1985) 99(5): 1998-2007.
- Quintero, M, Gonzalez-Martin, MC, Vega-Agapito, V, Gonzalez, C, Obeso, A, Farré, R, Agapito, T and Yubero, S (2013). "The effects of intermittent hypoxia on redox status, NF B activation, and plasma lipid levels are dependent on the lowest oxygen saturation. ." *Free Radic Biol Med.* 65: 1143–1154.
- Rabec, C, Ramos, P and Vealec, D (2011). "Complicaciones respiratorias de la obesidad." *Arch Bronconeumol.* 47(5): 252-261.
- Racker, E (1950). "Spectrophotometric measurements of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids." *Biochim Biophys Acta* 4(1-3): 211-4.
- Raffaella, C, Francesca, B, Italia, F, Marina, P, Giovanna, L and Susanna, I (2008). "Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance." *Obesity (Silver Spring)* 16(5): 958-64.
- Raggi, MA, Sabbioni, C, Casamenti, G, Gerra, G, Calonghi, N and Masotti, L (1999). "Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection." *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 730(2): 201-11.
- Rahmouni, K (2010). "Leptin-Induced Sympathetic Nerve Activation: Signaling Mechanisms and Cardiovascular Consequences in Obesity." *Curr Hypertens Rev.* 6(2): 104-209.
- Ramírez Alvarado, MM and Sánchez Roitz, C (2012). "Relation of serum levels of C-reactive protein to anthropometric measurements; a systematic review of studies in South America." *Nutr Hosp.* 27(4): 971-7.

- Reaven, GM (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." *Diabetes* 37(12): 1595-607.
- Renard, P, Zachary, MD, Bougelet, C, Mirault, ME, Haegeman, G, Remacle, J and Raes, M (1997). "Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation." *Biochem Pharmacol.* 53(2): 149-60.
- Reuter, S, Gupta, SC, Chaturvedi, MM and Aggarwal, BB (2010). "Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?" *Free Radic Biol Med.* 49: 1603e16.
- Ribeiro, MJ, Sacramento, JF, Gonzalez, C, Guarino, MP, Monteiro, EC and Conde, SV (2013). "Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets." *Diabetes* 62(8): 2905-16.
- Rodríguez-Rodríguez, E, Perea, JM, López-Sobaler, AM and Ortega, RM (2009). "Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico." *Nutr Hosp.* 24(4): 415-421.
- Ryan, CM and Bradley, TD (2005). "Pathogenesis of obstructive sleep apnea." *J Appl Physiol* (1985) 99(6): 2440-50.
- Ryan, S, Taylor, CT and McNicholas, WT (2005). "Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome." *Circulation* 112(17): 2660-7.
- Sanner, BM, Kollhosser, P, Buechner, N, Zidek, W and Tepel, M (2004). "Influence of treatment on leptin levels in patients with obstructive sleep apnoea." *Eur Respir J.* 23(4): 601-4.
- Sateia, MJ. (2003). "Neuropsychological impairment and quality of life in obstructive sleep apnea." *Clin Chest Med.* 24(2): 249-59.
- Schwartz, M.W, Peskind, E, Raskind, M, Boyko, E.J and Porte, D. Jr (1996). "Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans." *Nat.Med.* 2: 589–593.
- Semenza, GL (2001). "Hypoxia inducible factor 1: oxygen haemostasis and disease pathophysiology." *Trends Mol Med* 2001 7: 345–350.
- Serrano-Ríos, M, Ordovás, JM and Gutierrez-Fuentes, JA, Eds. (2011). *Obesity. Obesity: A Modern Pandemic.* Barcelona, Elsevier España S.L.
- Shipman, P and Walker, A (1989). "The costs of becoming a predator." *Am. Anthropol.* 88: 26-43.
- Sinton, CM and McCarley, RW (2004). "Neurophysiological mechanisms of sleep and wakefulness: a question of balance." *Semin Neurol.* 24(3): 211-23.
- Smemo, S, Tena, JJ, Kim, KH, Gamazon, ER, Sakabe, NJ, Gómez-Marín, C, Aneas, I, Credidio, FL, Sobreira, DR, Wasserman, NF, Lee, JH, Puvindran, V, Tam, D, Shen, M, Son, JE, Vakili, NA, Sung, HK, Naranjo, S, Acemel, RD, Manzanares, M, Nagy, A, Cox, NJ, Hui, CC, Gomez-Skarmeta, JL and Nóbrega, MA (2014). "Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3." *Nature* 507(7492): 371-5.
- Snyder, EM, Carr, RD, Deacon, CF and Johnson, BD (2008). "Overnight hypoxic exposure and glucagon-like peptide-1 and leptin levels in humans." *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 33(5): 929-35.
- Stetka, B (2015). *Obesity: The Shocking Numbers and New Treatments.* Medscape Nurses.

- Sutherland, K, Lee, RW and Cistulli, PA (2012). "Obesity and craniofacial structure as risk factors for obstructive sleep apnoea: impact of ethnicity." *Respirology* 17: 213–222.
- Svatikova, A, Wolk, R, Gami, AS, Pohanka, M and Somer, VK (2005). "Interaction between obstructive sleep apnoea and the metabolic syndrome." *Curr Diab Rep* 5: 53–58.
- Svatikova, A, Wolk, R, Lerman, LO, Juncos, LA, Greene, EL, McConnell, JP and Somers, VK (2005). "Oxidative stress in obstructive sleep apnoea." *Eur Heart J* 26(22): 2435-9.
- Svensson, V, Jacobsson, JA, Fredriksson, R, Danielsson, P, Sobko, T, Schiöth, HB and Marcus, C (2011). "Associations between severity of obesity in childhood and adolescence, obesity onset and parental BMI: a longitudinal cohort study." *Int J Obes (Lond)*. 35(1): 46-52.
- Taheri, S, Lin, L, Austin, D, Young, T and Mignot, E (2004). "Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index." *PLoS Med*. 1(3).
- Tak, PP and Firestein, GS (2001). "J Clin Invest" NF- κ B: A key role in inflammatory diseases 107(1): 7-11.
- Tankersley, C, Kleeberger, S, Russ, B, Schwartz, A and Smith, P (1996). "Modified control of breathing in genetically obese (ob/ob) mice." *J Appl Physiol* (1985) 81(2): 716-23.
- Tankersley, CG, O'Donnell, C, Daood, MJ, Watchko, JF, Mitzner, W, Schwartz, A and Smith, P (1998). "Leptin attenuates respiratory complications associated with the obese phenotype." *J Appl Physiol* (1985) 85(6): 2261-9.
- Tatsumi, K, Kasahara, Y, Kurosu, K, Tanabe, N, Takiguchi, Y and Kuriyama, T (2005). "Sleep oxygen desaturation and circulating leptin in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome." *Chest*. 127(3): 716-21.
- Terán-Santos, J, Jiménez-Gómez, A and Cordero-Guevara, J (1999). "The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. Cooperative Group Burgos-Santander." *N Engl J Med*. 340(11): 847-51.
- Testelmans, D, Tamisier, R, Barone-Rochette, G, Baguet, JP, Roux-Lombard, P, Pépin, JL and Lévy, P (2013). "Profile of circulating cytokines: impact of OSA, obesity and acute cardiovascular events." *Cytokine*. 62(2): 210-6.
- Thomas, JJ and Ren, J (2012). "Obstructive sleep apnea and cardiovascular complications: perception versus knowledge." *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 39: 995–1003.
- Trayhurn, P (2013). "Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity." *Physiol Rev*. 93(1): 1-21.
- Trayhurn, P and Wood, IS (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." *Br J Nutr*. 92(3): 347-55.
- Troncoso Brindeiro, CM, da Silva, AQ, Allahdadi, KJ, Youngblood, V and Kanagy, NL (2007). "Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293(5): H2971-6.
- Ulukavak Ciftci, T, Kokturk, O, Bukan, N and Bilgihan, A (2005). "Leptin and ghrelin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome." *Respiration* 72(4): 395-401.
- van Dijk, SJ, Molloy, PL, Varinli, H, Morrison, JL and Muhlhausler, BS (2015). "Epigenetics and human obesity." *Int J Obes (Lond)*. 39(1): 85-97.

- Verna, A, Ed. (1997). The mammalian carotid body: Morphological data. The Carotid Body Chemoreceptors, Springer.
- Vgontzas, AN, Bixler, EO and Chrousos, GP (2005). "Sleep apnea is a manifestation of the metabolic syndrome." *Sleep Med Rev.* 9(3): 211-24.
- Vicario, I, Rigual, R, Obeso, A and Gonzalez, C (2000). "Characterization of the synthesis and release of catecholamine in the rat carotid body in vitro." *Am J Physiol Cell Physiol* 278(3): C490-9.
- Wang, T, Zhang, X and Li, J.J (2002). "The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses." *Int.Immunopharmacol.* 2: 1509–1520.
- Wang, ZW, Pan, WT, Lee, Y, Kakuma, T, Zhou, YT and Unger, RH (2001). "The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging." *FASEB J.* 15(1): 108-114.
- Weaver, TE and Sawyer, AM (2010). "Adherence to continuous positive airway pressure treatment for obstructive sleep apnoea: implications for future interventions." *Indian J Med Res.* 131: 245-58.
- West, SD, Nicoll, DJ, Wallace, TM, Matthews, DR and Stradling, JR (2007). "Effect of CPAP on insulin resistance and HbA1c in men with obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes." *Thorax.* 62: 969-974.
- Wiegand, DA, Latz, B, Zwillich, CW and Wiegand, L (1990). "Geniohyoid muscle activity in normal men during wakefulness and sleep." *J Appl Physiol* (1985) 69(4): 1262-9.
- Winder, CV (1937). "On the mechanism of stimulation of carotid gland chemoreceptors." *Am. J. Physiol.* 118: 389-398.
- Wolf, J, Hering, D and Narkiewicz, K (2010). "Non-dipping pattern of hypertension and obstructive sleep apnea syndrome." *Hypertens Res.* 33(9): 867-71.
- Wolff, SP, Garner, A and Dean, RT (1986). "Free radical, lipids and protein degradation." *Trends Biochem Sci.* 11: 27-31.
- Woods, SC, D'Alessio, DA, Tso, P, Rushing, PA, Clegg, DJ, Benoit, SC, Gotoh, K, Liu, M and Seeley, RJ (2004). "Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance." *Physiol Behav.* 83(4): 573-8.
- Wu-Peng, XS, Chua, SC Jr, Okada, N, Liu, SM, Nicolson, M and Leibel, RL (1997). "Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (Lepr): evidence for deficient plasma-to-CSF transport of leptin in both the Zucker and Koletsky obese rat." *Diabetes* 46(3): 513-8.
- Wu, FT, Stefanini, MO, Mac Gabhann, F, Kontos, CD, Annex, BH and Popel, AS (2010). "A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use." *J Cell Mol Med.* 14(3): 528-52.
- Yaggi, HK, Concato, J, Kernan, WN, Lichtman, JH, Brass, LM and Mohsenin, V (2005). "Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death." *N Engl J Med.* 353(19): 2034-41.
- Yarian, CS, Toroser, D and Sohal, RS (2006). "Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice." *Mech Ageing Dev.* 127(1): 79-84.
- Yazdi, FT, Clee, SM and Meyre, D (2015). "Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again." *PeerJ.* 3:e856.
- Young, T, Palta, M, Dempsey, J, Peppard, PE, Nieto, FJ and Hla, KM (2009). "Burden of Sleep Apnea: Rationale, Design, and Major Findings of the

- Wisconsin Sleep Cohort Study." *WMJ: official publication of the State Medical Society of Wisconsin*. 108(5): 246-249.
- Yuan, G, Khan, SA, Luo, W, Nanduri, J, Semenza, GL and Prabhakar, NR (2011). "Hypoxia-inducible factor 1 mediates increased expression of NADPH oxidase-2 in response to intermittent hypoxia." *J Cell Physiol*. 226(11): 2925-33.
- Zammit, C, Liddicoat, H, Moonsie, I and Makker, H (2010). "Obesity and respiratory diseases." *Int J Gen Med* 3: 335–343.
- Zhang, Y, Proenca, R, Maffei, M, Barone, M, Leopold, L and Friedman, JM (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372: 425-432.
- Zhang, Z, Yang, Y, Hill, MA and Wu, J (2012). "Does C-reactive protein contribute to atherothrombosis via oxidant-mediated release of pro-thrombotic factors and activation of platelets?" *Front Physiol*. 3:433.
- Zoccal, DB, Simms, AE, Bonagamba, LG, Braga, VA, Pickering, AE, Paton, JF and Machado, BH (2008). "Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity." *J Physiol* 586(13): 3253-65.