

Javier Lázaro Sierra

MicroRNA exosomales circulantes
en obesidad mórbida con y sin
apnea obstructiva del sueño.
Efecto del tratamiento con presión
positiva y cirugía bariátrica

Director/es

Marín Trigo, José María
Sanz Rubio, David

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

MICRORNA EXOSOMALES CIRCULANTES EN
OBESIDAD MÓRBIDA CON Y SIN APNEA
OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO. EFECTO DEL
TRATAMIENTO CON PRESIÓN POSITIVA Y
CIRUGÍA BARIÁTRICA

Autor

Javier Lázaro Sierra

Director/es

Marín Trigo, José María
Sanz Rubio, David

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina

2020



Universidad
Zaragoza

microRNA EXOSOMALES
CIRCULANTES EN OBESIDAD MÓRBIDA
CON Y SIN APNEA OBSTRUCTIVA DEL
SUEÑO. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON
PRESIÓN POSITIVA Y CIRUGÍA BARIÁTRICA

Doctorando
Javier Lázaro Sierra

Director
Dr. José María Marín
Dr. David Sanz Rubio

JULIO DE 2020
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Este proyecto de investigación ha sido becado por FIS (15/01940), Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio (SEPAR-2017) y Sociedad Aragonesa del Aparato Respiratorio (SADAR 2016).

El **Dr. D. José María Marín Trigo**, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza y el **Dr. D. David Sanz Rubio** del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón.

CERTIFICAN QUE:

D. Javier Lázaro Sierra ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos correspondientes a su tesis doctoral titulada *microRNA exosomal circulantes en Obesidad Mórbida con/sin Apnea Obstructiva del Sueño. Efecto del tratamiento con Presión Positiva y Cirugía Bariátrica* que corresponde con el proyecto de tesis aprobado por la Comisión de Doctorado en el curso 2015/16 y cumple los requisitos mínimos exigidos para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizan su presentación para que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente.

Lo que suscribimos como directores del trabajo en Zaragoza, a 28 de Julio de 2020.

Fdo: Dr. José María Marín Trigo

Fdo: Dr. David Sanz Rubio

A mis padres, Antonio y M.^a Pilar.
A Carmen, mi mujer y principal apoyo.
A mis hijos, Carmen y Juan.

*«—¿Cuál considera usted el principio fundamental,
la idea básica que observa en el ejercicio de su profesión médica?
—Creo en mi fuero íntimo, que no debo tomar nada como absoluto.»*

AJ Cronin. La Ciudadela. 1962

Agradecimientos

Al Dr. José María Marín, por trasmitirme su pasión por la medicina y acompañarme en el mundo de la investigación; por tu tiempo, por tus consejos, por todo tu apoyo y sobre todo por creer en mí. Muchas gracias.

Al Dr. David Sanz Rubio, por mostrarme el mundo de los exosomas y los microRNA, por enseñarme el trabajo de laboratorio, por su apoyo metodológico y por estar ahí en los momentos de más estrés (incluso estando muy lejos). Muchas gracias.

A Paloma, enfermera y amiga, todo este trabajo no habría sido posible sin tu colaboración. Has hecho fácil lo difícil y siempre con una sonrisa en la boca. Muchas gracias.

A la Dra. Beatriz Boned, del laboratorio del hospital Royo Villanova por su colaboración en la recogida y almacenamiento de las muestras de sangre. Muchas gracias

A mis compañeros del Hospital Royo Villanova, jubilados y en activo. Sois los mejores, habéis estado ahí y he sentido vuestro cariño en todo momento. Muchas gracias.

Al Dr. Carlos Bejarano, neumólogo del Hospital Militar de Zaragoza, quién me acompañó en mis primeros años como adjunto de neumología. Muchas gracias.

A los adjuntos del servicio de neumología del hospital Clínico Lozano Blesa, donde hice la residencia, por formarme como médico y neumólogo. Muchas gracias.

A los Dres. Antonio Sebastián y Joaquín Costan, por mostrarme el mundo de la investigación y por los buenos momentos durante la residencia. Muchas gracias.

Al Dr. Alfonso Pérez Trullén, mi maestro en el campo de la neumología intervencionista, mi otra pasión en el mundo de la medicina. Muchas gracias por tus consejos.

Al Dr. José Angel Carretero, por traer una nueva luz a la neumología del hospital Royo Villanova y por ver que la investigación es una parte fundamental de nuestra profesión. Muchas gracias.

Al Dr. Antonio Castanera, compañero y sin embargo amigo, por todos los buenos momentos (que contigo son todos). Muchas gracias.

Al Dr. José Fernando Treballe, por sus explicaciones quirúrgica y su apoyo iconográfico, pero sobre todo por su amistad. Muchas gracias.

A los pacientes por su contribución desinteresada en este proyecto. La ciencia avanza gracias a ellos. Muchas gracias.

A Alejandro y Pilar, mis «titanes», por escucharme, por ser mi desahogo, darme los *break* semanales y ofrecerme una visión positiva en momentos duros. Muchas gracias.

A mis amigos, Luis y Julio, estuvisteis ahí en el principio, estáis y estaréis. Muchas gracias.

A mis amigos de la facultad, Asun, Elisa, Miguel, Pepe y Vanesa. Por los buenos momentos que pasamos y los que vendrán. Y por darme lo más preciado, vuestra amistad. Muchas gracias.

A todos mis amigos de la residencia. Por unos años geniales en los que descubrimos nuestra profesión. Muchas gracias.

A todos mis familiares, amigos y compañeros que por economizar espacio no he citado en estos agradecimientos pero que en algún momento me han ayudado en este proyecto. Muchas gracias.

A mis padres, sin vosotros no estaría donde estoy ni sería quién soy. «La mejor herencia que un padre puede dejar a su hijo es una buena formación». Muchas gracias.

A Carmen, mi mujer, «la suerte de mi vida». Gracias por tus palabras de ánimo, por sacar tiempo de donde no lo había, por tu apoyo, por creer en mí, por darme seguridad y confianza. Esta tesis es, en gran parte, gracias a ti. No veía el final, y tú me enseñaste a creer que lo conseguiría: «tú me enseñas que... se puede creer... en lo que no ves...». Muchas gracias. Te quiero.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	15
-------------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS	17
--------------------------	-----------

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	21
-------------------------------	-----------

1. INTRODUCCIÓN	23
------------------------	-----------

1.1.	APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO	25
1.1.1.	DEFINICIÓN	25
1.1.2.	EPIDEMIOLOGÍA	25
1.1.3.	COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO	25
1.1.4.	FISIOPATOLOGÍA DE LA APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO	27
1.1.5.	MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO	29
1.1.6.	DIAGNÓSTICO DE LA APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO	30
1.1.7.	TRATAMIENTO DE LA APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO	32
1.2.	OBESIDAD	34
1.2.1.	DEFINICIÓN	34
1.2.2.	EPIDEMIOLOGÍA	35
1.2.3.	COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA OBESIDAD	36
1.2.4.	FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD	38
1.2.5.	TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD	39
	1.2.5.1. TRATAMIENTO MÉDICO NO QUIRÚRGICO	39
	1.2.5.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA OBESIDAD	40
1.3.	COMUNICACIÓN INTERCELULAR	44
1.4.	VESÍCULAS EXTRACELULARES	46
1.4.1.	ECTOSOMAS	47
1.4.2.	CUERPOS APOPTÓTICOS	47
1.4.3.	EXOSOMAS	48
1.5.	DEFINICIÓN DE MICRO-RNA	51
1.5.1.	BIOGÉNESIS DEL MICRO-RNA	51
1.5.2.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL MICRO-RNA EXOSOMAL	53
1.6.	OBESIDAD MÓRBIDA Y MICRO-RNA	54
1.7.	SÍNDROME DE APNEA DEL SUEÑO Y MICRO-RNA	56

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO	59
--	-----------

3. OBJETIVO	63
--------------------	-----------

3.1.	OBJETIVO PRINCIPAL	65
3.2.	OBJETIVOS SECUNDARIOS	65

4. MÉTODOS	67
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	69
4.2. POBLACIÓN EN ESTUDIO	69
4.3. TAMAÑO MUESTRAL	69
4.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	70
4.5. PROCEDIMIENTOS	70
4.6. CRONOGRAMA	71
4.7. VARIABLES DE ESTUDIO	72
4.7.1. HISTORIA CLÍNICA	72
4.7.2. ANTROPOMETRÍA	73
4.7.3. PRUEBAS COMPLEMENTARIAS	73
4.8. DETERMINACIÓN DEL MICRO-RNA EXOSOMAL	74
4.8.1. AISLAMIENTO DE LOS EXOSOMAS PRESENTES EN EL PLASMA	75
4.8.2. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL	75
4.8.3. DETERMINACIÓN DEL MICRO-RNA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-PCR)	76
4.8.4. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD RELATIVA DE MICRO-RNA	76
4.8.5. SELECCIÓN DE MICRO-RNA PARA EL ESTUDIO	76
4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
5. RESULTADOS	81
5.1. VISITA BASAL	82
5.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	82
5.1.2. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EXOSOMALES CIRCULANTES	86
5.1.3. RELACIÓN DE LOS MICRO-RNA EXOSOMALES CON LOS PARÁMETROS DEL SUEÑO Y GASOMÉTRICOS	88
5.1.4. RELACIÓN DE LOS MICRO-RNA EXOSOMALES CON LOS PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS	91
5.2. VISITA A LOS 6 MESES PRECIRUGÍA: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PRESIÓN POSITIVA CONTINUA EN LA VÍA AÉREA	96
5.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA EN LA SEGUNDA VISITA	96
5.2.2. EVOLUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EXOSOMALES EN LA SEGUNDA VISITA	97
5.2.3. RELACIÓN DE LOS MICRO-RNA EXOSOMALES CON LOS PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS	102
5.3. VISITA A LOS 12 MESES POSTCIRUGÍA: EFECTO DE LA CIRUGÍA BARIÁTRICA	108
5.3.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA EN LA TERCERA VISITA	108
5.3.2. EVOLUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EN LA ÚLTIMA VISITA	111
5.3.3. RELACIÓN DE LOS MICRO-RNA EXOSOMALES CON LOS PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS	115
6. DISCUSIÓN	119
6.1. INTERPRETACIÓN GENERAL	121
6.2. INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO EN LA CARGA DE MICRO-RNA EXOSOMAL	122

6.3.	INFLUENCIA DE LA APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO SOBRE LA RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS CON LA EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EXOSOMAL CIRCULANTE	124
6.4.	EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PRESIÓN POSITIVA CONTINUA EN LA VÍA AÉREA SOBRE LA CARGA DE MICRO-RNA EXOSOMAL	127
6.5.	EFECTO DE LA CIRUGÍA BARIÁTRICA SOBRE LA CARGA DE MICRO-RNA EXOSOMAL	131
6.6.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	135
7. CONCLUSIONES		137
BIBLIOGRAFÍA		141
ANEXOS		165
ANEXO 1:	APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE ARAGÓN	167
ANEXO 2:	HOJA DE INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO EPIMOOSA	168
ANEXO 3:	CONSENTIMIENTO INFORMADO	171
ANEXO 4:	TEST DE EPWORTH	173
ANEXO 5:	PROTOCOLO DE MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL	174
ANEXO 6:	DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EN PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA CON Y SIN APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO	175
ANEXO 7:	RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y DEL SUEÑO	178
ANEXO 8:	EVOLUCIÓN DE LAS VARIABLES TRAS LA CIRUGÍA BARIÁTRICA RESPECTO A LA VISITA DE LOS 6 MESES PRECIRUGÍA	179
ANEXO 9:	DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EXOSOMALES EN PACIENTES HIPERTENSOS CON Y SIN DIABETES MELLITUS	180
ANEXO 10:	EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EXOSOMALES EN PACIENTES PROCEDENTES DE EPIMOOSA Y EPIOSA	181
ANEXO 11:	PUBLICACIONES	182

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sintomatología de la apnea obstructiva del sueño	29
Tabla 2. Criterios de clasificación de la obesidad en función del índice de masa corporal (IMC) según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y según la Sociedad Española para el estudio de la Obesidad (SEEDO).	35
Tabla 3. Criterios de selección de pacientes con obesidad mórbida para cirugía bariátrica	41
Tabla 4. Revisión bibliográfica de trabajos publicados sobre pacientes con obesidad mórbida y micro-RNA.	55
Tabla 5. Selección de micro-RNA para el estudio	77
Tabla 6. Variables de la visita basal del total de la muestra (n = 70) y de los que completaron el estudio (n = 24)	84
Tabla 7. Descripción de las muestras de EPIOSA y EPIMOOSA	85
Tabla 8. Descripción de la muestra en la segunda visita	96
Tabla 9. Impacto tras 6 meses de tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea sobre los parámetros antropométricos y bioquímicos.	97
Tabla 10. Descripción de la muestra en la última visita	109
Tabla 11. Impacto de la cirugía bariátrica en la última visita respecto a la primera visita	110
Tabla 12. Protocolo de medición de la presión arterial	174
Tabla 13. Impacto de la cirugía bariátrica en la última visita respecto a la visita de los 6 meses precirugía	179

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de eventos cardiovasculares mortales y no mortales en pacientes con y sin apnea obstructiva del sueño e impacto del tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea	26
Figura 2. Fisiopatología cardiovascular de la apnea obstructiva del sueño	28
Figura 3. Ejemplo de estudio polisomnográfico completo	31
Figura 4. Captura de pantalla de un estudio con dispositivo de poligrafía respiratoria domiciliar de Apnea Link®	32
Figura 5. Diagnóstico del síndrome de apnea-hipopnea del sueño (SAHS) según la Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio (SEPAR)	33
Figura 6. Tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea (CPAP)	34
Figura 7. Evolución de la obesidad y el sobrepeso entre 1987 y 2017. Obtenido de ENSE 2017 (57)	36
Figura 8. Esquema de la fisiopatología de la obesidad y sus comorbilidades	37
Figura 9. Tipos de técnicas quirúrgicas en cirugía bariátrica	41
Figura 10. Técnicas malabsortivas	42
Figura 11. Técnicas mixtas	43
Figura 12. Técnicas Restrictivas	43
Figura 13. Mecanismos básicos de comunicación intercelular	45
Figura 14. Esquema de la formación de vesículas extracelulares	47
Figura 15. Imagen obtenida por microscopía electrónica de dos exosomas	48
Figura 16. Biogénesis y contenido de los exosomas.	50
Figura 17. Biogénesis del micro-RNA.	52
Figura 18. Hipótesis de trabajo	62
Figura 19. Cronograma del estudio	71
Figura 20. Proceso de aislamiento de los exosomas	75
Figura 21. Extracción del RNA total de los exosomas purificados	76
Figura 22. Flujoograma de pacientes a lo largo del estudio	82
Figura 23. Diferencia en la expresión de micro-RNA exosomal en pacientes con obesidad mórbida con y sin apnea obstructiva del sueño	86
Figura 24. Diferencia en la expresión de micro-RNA exosomal circulante en pacientes con obesidad mórbida con y sin apnea obstructiva del sueño en función de los factores de riesgo cardiovascular	87
Figura 25. Relación del miR16 y el miR145 exosomales con los parámetros del sueño en la primera visita	88
Figura 26. Relación de los miRNA exosomales con los parámetros gasométricos en la primera visita	89
Figura 27. Relación de los micro-RNA exosomales con los parámetros gasométricos en pacientes con obesidad mórbida y apnea obstructiva del sueño en la primera visita	90
Figura 28. Relación del miR146 con los parámetros antropométricos en la primera visita.	91

Figura 29. Relación del miR146 con los parámetros antropométricos en pacientes con obesidad mórbida (OM) sin y con apnea obstructiva del sueño (AOS)	92
Figura 30. Relación del perfil glucémico con los micro-RNA exosomales en pacientes con obesidad mórbida (OM) con apnea obstructiva del sueño (AOS) y sin AOS	93
Figura 31. Relación de los parámetros lipídicos en el conjunto de la muestra de pacientes con obesidad mórbida (OM) y en los pacientes con OM y apnea obstructiva del sueño (AOS) durante la primera visita	95
Figura 32. Variación de la expresión de miRNA exosomal entre primera y segunda	99
Figura 33. Variación de la expresión de micro-RNA exosomal entre la primera y la segunda visita en los pacientes con obesidad mórbida (OM) sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS en tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea (CPAP)	101
Figura 34. Efecto del tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea en pacientes no obesos sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS, y pacientes con obesidad mórbida (OM) sin AOS y con AOS.	102
Figura 35. Relación de la concentración de glucosa con la expresión de micro-RNA exosomales en pacientes con obesidad mórbida en la segunda visita	103
Figura 36. Relación entre la expresión de micro-RNA exosomales y los parámetros del perfil glucémico en pacientes con obesidad mórbida (OM) sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS en la segunda visita	104
Figura 37. Relación de los parámetros del perfil lipídico con la expresión de micro-RNA exosomales en el conjunto de los pacientes con obesidad mórbida en la segunda visita	105
Figura 38. Relación de los parámetros del perfil lipídico con los micro-RNA exosomales en pacientes con obesidad mórbida (OM) sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS en la segunda visita	107
Figura 39. Evolución de la expresión de micro-RNA en las distintas visitas en los pacientes con obesidad mórbida sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS. Efecto del tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea y cirugía bariátrica	112
Figura 40. Relación entre la pérdida de peso relativo tras la cirugía bariátrica y los cambios en la expresión de micro-RNA	113
Figura 41. Relación de la variación relativa de los parámetros del sueño tras la cirugía bariátrica y los cambios en la expresión de micro-RNA en pacientes con obesidad mórbida (OM) sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS	114
Figura 42. Relación de la expresión del miR223 exosomal con los parámetros del sueño en la última visita	115
Figura 43. Relación de la expresión de micro-RNA exosomales con los parámetros antropométricos en la última visita	116
Figura 44. Relación de los parámetros del perfil glucémico con micro-RNA exosomales en la última visita	117
Figura 45. Relación de los parámetros del perfil lipídico con la expresión de micro-RNA exosomales en la última visita	118
Figura 46. Diferencias en la expresión de micro-RNA en pacientes con obesidad mórbida con apnea obstructiva del sueño (AOS) y sin AOS (I)	175

Figura 47. Diferencias en la expresión de micro-RNA en pacientes con obesidad mórbida con apnea obstructiva del sueño (AOS) y sin AOS (II)	176
Figura 48. Diferencias en la expresión de micro-RNA en pacientes con obesidad mórbida con apnea obstructiva del sueño (AOS) y sin AOS (III)	177
Figura 49. Relación entre los parámetros antropométricos y el índice de apneas e hipopneas (IAH)	178
Figura 50. Diferencias en la expresión de micro-RNA exosomal en pacientes con obesidad mórbida y sin ella	181

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AASM	American Academy of Sleep Medicine
AOS	apnea obstructiva del sueño
Apo A	Apolipoproteína A
CB	cirugía bariátrica
CIL	cuerpos intraluminales
CMV	cuerpo multivesicular
CPAP	presión positiva continua en la vía aérea (continuous positive airway pressure)
CT ₉₀	porcentaje de tiempo con saturación de oxígeno por debajo del 90 %
DLP	Dislipemia
DM	diabetes mellitus
DNA	ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
EDTA	ácido edético (ethylenediaminetetraacetic acid)
ENSE	Encuesta Nacional de Salud en España
EPIMOOSA	[estudio] Epigenetics Morbid Obesity Obstructive Sleep Apnea
EPIOSA	[estudio] Epigenetics Obstructive Sleep Apnoea
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
ESD	excesiva somnolencia diurna
ET	endosoma temprano
FC	tasa de cambio (fold change)
HCI	hipoxia crónica intermitente
HDL	lipoproteína de alta densidad (high density lipoprotein)
HIF-1 α	factor inducible por hipoxia tipo 1 α (hypoxia inducible factor type 1 α)
HTA	hipertensión arterial
IAH	índice de apneas e hipopneas
IAR	índice de alteración respiratoria
IFSO	International Federation for de Surgery of Obesity and Metabolic Disorders
IL	Interleucina
IMC	índice de masa corporal
LDL	lipoproteína de baja densidad (low density lipoprotein)
miRISC	microRNA induced silencing complex
miRNA	micro-RNA
MP	membrana plasmática
NF- κ B	factor nuclear κ B
OM	obesidad mórbida
P _a CO ₂	presión parcial arterial de dióxido de carbono
PCR	proteína C-reactiva
PSG	polisomnografía
REM	rapid eye movement
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
rtPCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time polymerase chain reaction)
SAHS	síndrome de apnea-hipopnea del sueño

SatO ₂	saturación de oxígeno
SECO	Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad
SEEDO	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
SEPAR	Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio
TAS	tensión arterial sistólica
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
VE	vesículas extracelulares

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO

1.1.1. Definición

La apnea obstructiva del sueño (AOS) se define como un cuadro de somnolencia excesiva y trastornos cognitivo-conductuales, respiratorios, cardíacos, metabólicos o inflamatorios, secundarios a episodios repetidos de obstrucción de la vía aérea superior durante el sueño (1). Desde un punto de vista clínico, la normativa de la Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio (SEPAR) de 2010 (2) define la AOS como la presencia de un índice de apneas e hipopneas (IAH) o un índice de alteración respiratoria (IAR) mayor de 5, acompañado de excesiva somnolencia diurna (ESD) y dos o más de las siguientes manifestaciones: episodios repetidos de asfixia nocturna, sensación de falta de sueño reparador, dificultad para concentrarse, despertares frecuentes durante el sueño o cansancio y fatiga durante el día.

1.1.2. Epidemiología

La prevalencia de la AOS varía según el estudio que se revise, pero se admite que afecta a entre el 3 % y el 4 % de los varones y el 2 % de las mujeres (3). La presencia de apneas en la población general, más allá de la existencia de una AOS, oscila entre el 9 % y el 25 %, afecta tanto a hombres como a mujeres y aumenta con la edad. La relación hombre/mujer es de 2-3/1 y tiende a igualarse a partir de la menopausia.

La prevalencia de obesidad en pacientes con AOS se estima entre el 50 % y el 70 % de dichos pacientes, pero la prevalencia de AOS en pacientes obesos se sitúa por encima del 40 %, y puede ser de hasta el 90 % en pacientes muy obesos (4). Cuando no es tratada, esta enfermedad implica un importante consumo de recursos sanitarios, que llega a duplicarse en comparación con el de los sujetos diagnosticados y tratados (5).

1.1.3. Comorbilidades asociadas a la apnea obstructiva del sueño

La AOS se asocia a complicaciones a corto plazo sobre la vida de los pacientes. Debido a la ESD, aumenta hasta 7 veces el riesgo de padecer un accidente de tráfico, tanto en conductores profesionales como en no profesionales, con una *odds ratio* de 5,9 en aquellos con un IAH > 15 y de hasta 7 en aquellos con un IAH > 20 respecto a los pacientes sin AOS (IAH < 5) (6).

Las complicaciones a medio y largo plazo se derivan del papel que juega como factor de riesgo cardiovascular independiente del sexo, la edad o la raza del paciente (7). En estudios observacionales, la AOS ha demostrado que se asocia de forma independiente con un mayor riesgo de desarrollar hipertensión arterial (HTA) (8), diabetes mellitus (DM) (9) y dislipemia (DLP) (10). Por otra parte, los pacientes con AOS no tratados muestran un mayor riesgo de eventos mortales y no mortales de ictus, infarto de miocardio y arritmias cardiacas (11). Finalmente, se ha demostrado un aumento de la mortalidad cardiovascular y total por cualquier causa en series observacionales estadounidenses (3), australianas (5) y españolas (12, 13). El exceso de mortalidad parece circunscribirse a pacientes con un IAH > 30, independientemente de otras variables de riesgo cardiovascular (Figura 1).

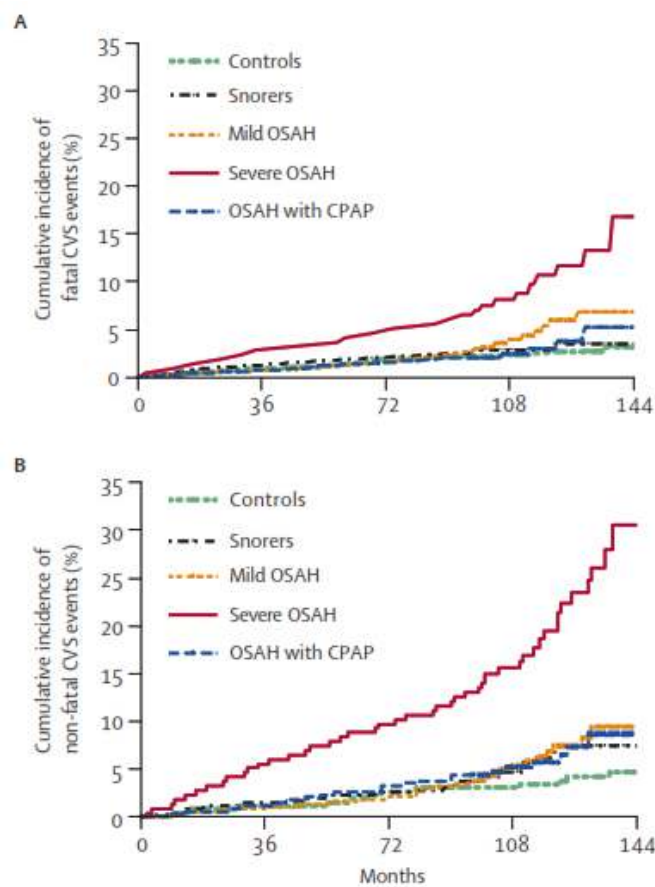


Figura 1. Incidencia de eventos cardiovasculares mortales y no mortales en pacientes con y sin apnea obstructiva del sueño e impacto del tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea
 CVS: cardiovascular; OSAH obstructive sleep apnea hypopnea; CPAP continuous positive airway pressure. Recuperado de Marin *et al.* (12).

Los efectos cardiovasculares no son los únicos temibles a largo plazo. Se ha demostrado que la gravedad de la AOS se relaciona de igual forma con el desarrollo de neoplasias con un peor pronóstico. Pero los estudios que demuestran esta relación son retrospectivos y presentan importantes limitaciones, ya que no controlan distintos factores confusores (14).

1.1.4. Fisiopatología de la apnea obstructiva del sueño

Los pacientes con AOS sufren múltiples episodios nocturnos de obstrucción parcial (hipopnea) o total (apnea) de la vía aérea superior. Dicha obstrucción ocurre en el tercio entre la orofaringe y la hipofaringe por la caída de la base de la lengua. Es un mecanismo multifactorial en el que se han descrito componentes anatómicos, musculares y neurológicos (15). Como consecuencia de esa obstrucción hay un cese o reducción en la ventilación pulmonar que da lugar a una hipoxemia/hipercapnia y produce un despertar.

Un fenómeno, sin duda fundamental, es la estimulación hipóxica de quimiorreceptores periféricos y el estímulo de mecanorreceptores torácicos. Estos estímulos aferentes activan la corteza cerebral y los centros cardiorrespiratorios y se induce una descarga simpática que aumenta la tensión de la musculatura de la vía aérea superior, la secreción de catecolaminas y el nivel de alerta cortical. Este fenómeno se denomina *arousal* o microdespertar. De esta forma, se modifica la fase del sueño hacia un mayor nivel de actividad eléctrica cerebral (sueño más superficial) y de tono simpático general. La consecuencia inmediata del *arousal* es un incremento en el tono muscular de la vía aérea superior que permite la restauración del flujo aéreo y la normalización de la ventilación pulmonar con la consiguiente reoxigenación (15). Los fenómenos de desoxigenación y reoxigenación repetitivos asociados a las apneas se conocen como hipoxia crónica intermitente (HCI).

Otra de las alteraciones asociadas a los fenómenos apneicos son la hipercapnia, la vasoconstricción arterial pulmonar y los cambios en la presión intratorácica. Estos cambios se traducen de forma inmediata en la elevación de la presión arterial pulmonar y sistémica, el aumento de la presión transmural ventricular, la secreción inapropiada de propeptido natriurético tipo B (pro-BNP) y un bajo gasto cardiaco (

Figura 2).

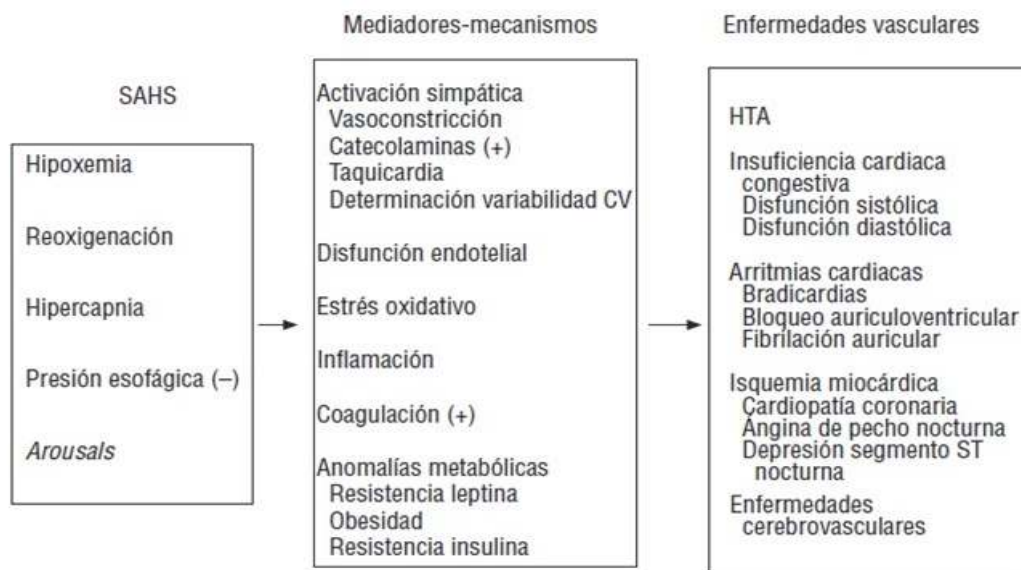


Figura 2. Fisiopatología cardiovascular de la apnea obstructiva del sueño
 SAHS Síndrome de apnea hipopnea del sueño. CV cardiovascular. Adaptado de Teran Santos *et al.* (16).

La HCI y la fragmentación y la pérdida de sueño disparan la producción de mediadores inflamatorios (17, 18). Se ha postulado que la liberación de esos mediadores es la responsable de los efectos cardiovasculares y metabólicos deletéreos a medio y largo plazo. Estos mediadores desencadenan una respuesta inmunitaria celular con activación de monocitos, neutrófilos y plaquetas (19, 20). Del mismo modo, se produce una diferenciación de linfocitos T hacia un fenotipo proinflamatorio con un aumento de la ratio entre linfocitos T colaboradores de tipo 1 (T_h1) y 2 (T_h2) (21). El exceso de actividad de T_h1 promueve la actividad de los monocitos y las moléculas de adhesión endotelial, lo que da lugar a la disfunción endotelial. Es el primer paso en el desarrollo de aterosclerosis y podría, en pacientes con AOS grave, desencadenar un fenómeno de aterosclerosis subclínica sin necesidad de otros cofactores de riesgo cardiovascular.

La evidencia disponible apunta a la AOS como factor de riesgo independiente para aterosclerosis. Recientes estudios lo señalan como mediador en el daño endotelial y la elevada producción de mediadores inflamatorios en pacientes obesos, además de indicar que estas alteraciones se revierten con un correcto tratamiento de la AOS (22-24). Por otro lado, en modelos animales de HCI, se ha demostrado que los episodios repetidos de desoxigenación y reoxigenación aumentan la actividad simpática, la liberación de catecolaminas, la presión arterial, la disfunción hepática, el déficit en los procesos de aprendizaje y el daño en las neuronas corticales y del hipocampo (25). La HCI activa la transcripción del factor nuclear κ B (NF- κ B) desde el citoplasma hasta el núcleo celular, donde es capaz de activar genes proinflamatorios (19) y aumentar la actividad del factor inducible por hipoxia tipo 1 α (HIF-

1 α) (26). La activación del HIF-1 α desencadena la liberación de multitud de hormonas (como la eritropoyetina), incrementa la liberación de catecolaminas y aumenta la presión arterial y la concentración de triglicéridos (26). La HCI también desencadena la liberación de radicales libres de oxígeno (27), como ocurre en los episodios de reperfusión de los eventos isquémicos (28). Una señal clara de estimulación del NF- κ B es la elevación en plasma de las citocinas proinflamatorias, como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intracelular tipo 1 (ICAM-1) (29, 30).

La fragmentación del sueño parece jugar un papel adicional que explica parcialmente la inflamación sistémica en el AOS. Diversos estudios han demostrado su relación con un incremento de la actividad simpática, la presión arterial, la liberación de cortisol y lípidos, la ganancia de peso y la resistencia a la insulina (31-34), así como el aumento de citocinas inflamatorias, como la IL-6, el TNF- α (18) y la proteína C-reactiva (PCR) (17). En resumen, el incremento de la actividad simpática y de la respuesta inflamatoria son consecuencias tanto de la HCI como de la fragmentación del sueño, mientras que el estrés oxidativo es consecuencia en exclusiva de la HCI.

1.1.5. Manifestaciones clínicas de la apnea obstructiva del sueño

Como en otras ramas de la medicina, el proceso diagnóstico nace de una sospecha clínica. En el caso de la AOS, la sospecha clínica suele aparecer por la presencia de tres síntomas que forman ya una tríada clásica: roncopatía, pausas de apnea nocturna e hipersomnias diurnas (2). Estos síntomas aparecen en la mayoría de los pacientes, pero no son los únicos, ya que se pueden presentar otros síntomas, tanto diurnos como nocturnos (Tabla 1).

Tabla 1. Sintomatología de la apnea obstructiva del sueño

SÍNTOMAS NOCTURNOS	SÍNTOMAS DIURNOS
Ronquidos	Excesiva somnolencia diurna
Apneas observadas	Sensación de sueño no reparador
Episodios asfícticos	Cansancio crónico
Movimientos anormales	Cefalea matutina
Diaforesis	Irritabilidad
Despertares frecuentes	Apatía
Nicturia	Depresión
Pesadillas	Dificultades de concentración
Sueño agitado	Pérdida de memoria
Insomnio	Disminución de la libido

La ESD plantea un problema diagnóstico, ya que, como todo síntoma, resulta subjetiva y, por tanto, es difícil de cuantificar. La American Academy of Sleep Medicine (AASM) define esta hipersomnolencia diurna como «una necesidad imperiosa de dormir o por la presencia de periodos de sueño durante el día» (35). Se han validado distintos cuestionarios (36, 37), aunque el más utilizado es la escala de somnolencia de Epworth (38). En la última guía de la AASM (39), se revisan los estudios sobre los distintos cuestionarios existentes hasta la fecha y se establece la recomendación sobre su uso. De las recomendaciones de esa guía se extrae que el uso de cualquier cuestionario debe ir acompañado siempre de una prueba que objetive las apneas; y que, pese a existir algunas diferencias entre los distintos cuestionarios, no hay ninguno que identifique inequívocamente a pacientes con y sin AOS (39).

1.1.6. Diagnóstico de la apnea obstructiva del sueño

Una vez establecida la sospecha clínica, se deben objetivar las apneas mediante un registro nocturno. Para ello se han desarrollado distintos tipos de polígrafos de mayor o menor complejidad en función de las variables que analizan. La AASM los clasifica en cuatro tipos atendiendo a los parámetros neurofisiológicos y cardiorrespiratorios, los movimientos musculares, la posición corporal, la necesidad de un técnico que supervise el desarrollo de la prueba durante la noche y la posibilidad de intervenir durante la noche (40). De esta forma, los tipos de estudios se clasifican de 1 a 4, con el grupo 1 como el de mayor complejidad.

El método diagnóstico establecido como *gold standard* es la polisomnografía (PSG) (2, 39, 41). En ella se registran la actividad eléctrica cerebral y parámetros cardiorrespiratorios y se identifica los eventos respiratorios, así como su repercusión cardiorrespiratoria y neurofisiológica, lo que permite evaluar la calidad del sueño (Figura 3). La PSG puede realizarse en el domicilio (PSG no vigilada) o en el ámbito hospitalario (PSG vigilada). El registro debe ser nocturno o en el horario habitual de sueño del paciente, durante un mínimo de 6 horas que incluyan al menos 180 minutos de sueño.

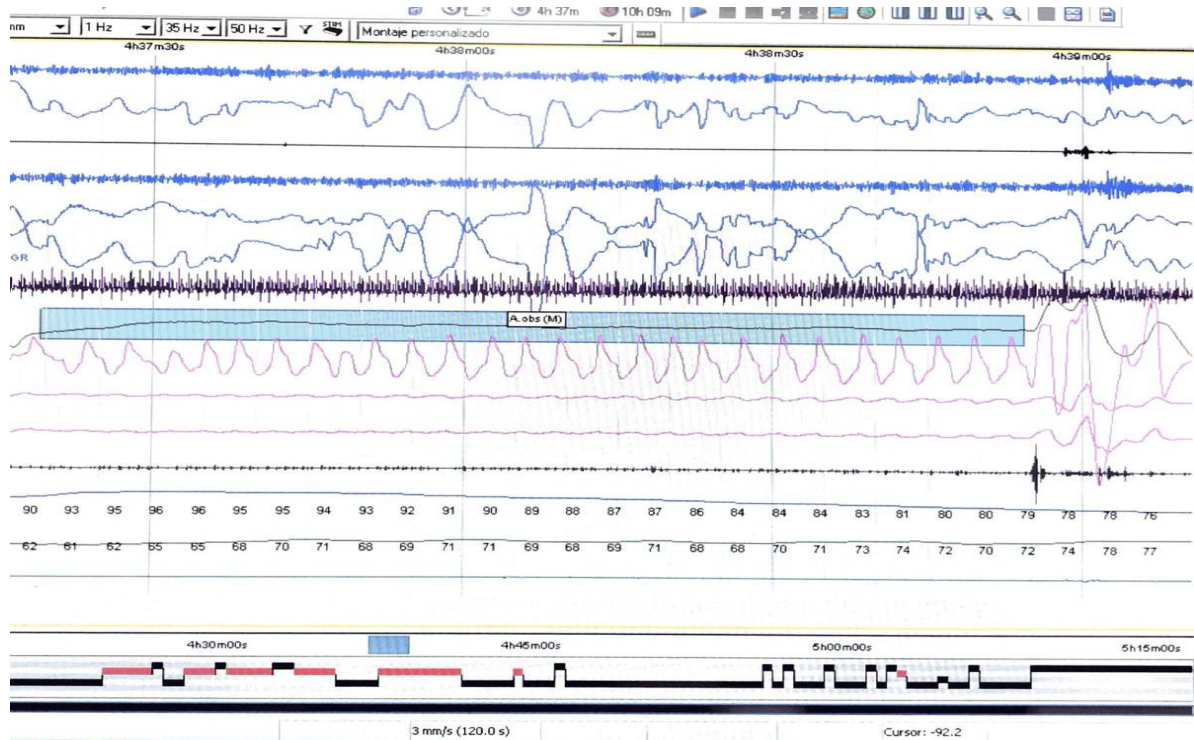


Figura 3. Ejemplo de estudio polisomnográfico completo

El registro de los parámetros cardiacos y respiratorios incluye la saturación de oxígeno (SatO₂) por pulsioximetría, el registro del esfuerzo respiratorio mediante bandas toracoabdominales y la medida del flujo nasobucal por neumotacógrafo o termistores. El termistor es un excelente detector de apneas, pero no es un buen sistema para la detección de hipopneas (36). Otro sistema de determinación semicuantitativo son las cánulas nasales conectadas a un transductor de presión y a un amplificador. La combinación de las cánulas nasales y el termistor son el mejor método para detectar las apneas. En 1997 se demostró que la supresión de las variables neurofisiológicas no cambiaba sensiblemente el diagnóstico (42), lo que abría las puertas a la simplificación del diagnóstico.

Para el diagnóstico de la mayor parte de los pacientes con sospecha de AOS se utilizan estudios simplificados clasificados en el nivel 3 de la AASM, en particular la poligrafía respiratoria (PR) (Figura 4). Estos estudios pueden realizarse en medio hospitalario o a domicilio. El uso de estos estudios domiciliarios ha sido aceptado y recomendado para individuos con una probabilidad pretest elevada de padecer AOS (2, 39). El uso de sistemas supersimplificados (monitores del tipo 4 en la clasificación de la AASM) no ha sido validado para el diagnóstico; sin embargo, existen estudios que sugieren que dichos monitores podrían tener un papel en el *screening* (43, 44). En aquellos casos en los que se sospechen otros trastornos del sueño asociados, se deberá realizar una PSG.

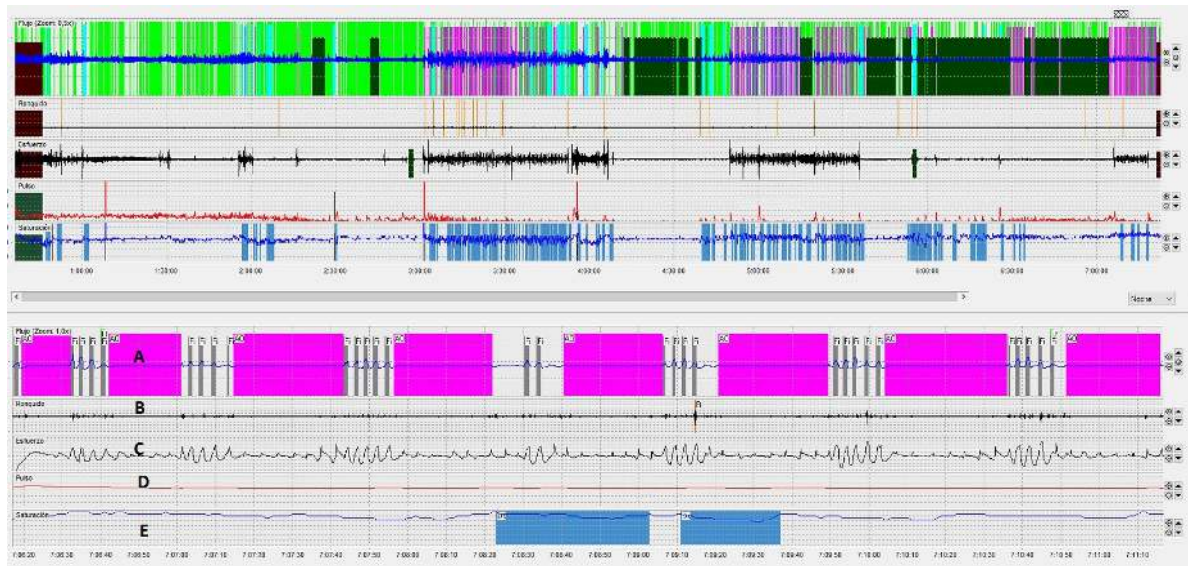


Figura 4. Captura de pantalla de un estudio con dispositivo de poligrafía respiratoria domiciliar de Apnea Link®
 A. Línea de flujo: en rosa se señalan los episodios de apnea de tipo obstructivo. B. Línea de ronquido. C. Línea de esfuerzo torácico. D. Línea de frecuencia cardiaca. E. Línea de saturación de oxígeno: en azul se marcan las caídas superiores al 3%.

Se considera que puede existir una AOS cuando el IAH es superior a 5. Este hallazgo debe ir acompañado de otra sintomatología, y en ese acaso hablamos de un síndrome de apnea-hipopnea del sueño (SAHS). El criterio del IAH puede ser sustituido por el IAR. Para ello, el dispositivo de análisis del sueño debe ser capaz de identificar los esfuerzos respiratorios asociados a microdespertares. Estos esfuerzos se identifican mediante PSG y la medición de la presión esofágica, y se definen como un incremento en esta última que finaliza con un microdespertar. Otro método, más rudimentario, accesible y cómodo para el paciente, consiste en identificar la atenuación transitoria de la señal del flujo oronasal o el esfuerzo toracoabdominal acompañado de un microdespertar (2). Según las recomendaciones de la SEPAR el diagnóstico requiere de la presencia de un IAH o IAR superior a 5 y una clínica acompañante (Figura 5).

1.1.7. Tratamiento de la apnea obstructiva del sueño

El componente multifactorial que desencadena la obstrucción hace que el tratamiento etiológico sea, en muchas ocasiones, difícil de alcanzar (15). El objetivo del tratamiento es liberar la vía aérea de las obstrucciones repetidas que ocurren durante la noche, manteniendo una correcta ventilación pulmonar durante el sueño.

Definición de SAHS SAHS = 1 + (A ó B)	1. IAR > 5 asociado a uno de los siguientes síntomas	
	A. Excesiva Somnolencia Diurna (ESD) no explicada por otras causas.	
	B. Dos o más de los siguientes.	
		B1. Asfixias repetidas durante el sueño.
		B2. Despertares recurrentes durante el sueño.
		B3. Percepción del sueño como no reparador.
		B4. Cansancio y/o fatiga durante el día.
		B5. Dificultades de concentración.

Figura 5. Diagnóstico del síndrome de apnea-hipopnea del sueño (SAHS) según la Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio (SEPAR)

IAR: índice de alteración respiratoria. Adaptado de Lloberes *et al.* (2).

Hasta la década de los ochenta del siglo pasado el tratamiento se reducía a la pérdida de peso junto con la administración de oxígeno a dosis bajas o, incluso, al uso de progestágenos con el objetivo de desencadenar una hiperventilación (45). En los casos más graves se realizaba una traqueotomía, lo que mejoraba significativamente la sintomatología y los parámetros hemodinámicos y gasométricos (46, 47). En los casos en los que se observaba que el origen era un trastorno anatómico (como una hipertrofia amigdalar) también se corregía con cirugía.

Los «padres» del tratamiento de la AOS con dispositivos de presión positiva continua en la vía aérea (CPAP, del inglés *continuous positive airway pressure*) fueron Christian Guilleminault y Collin Sullivan. En el año 1981, Sullivan da un gran empujón en el tratamiento de la AOS al tratarla por primera vez con esa terapia (48). Para su aplicación se basó en la descripción fisiopatológica que Guilleminault realizó de la apnea (49). De este modo, planteo la hipótesis de que al aplicar presión positiva a través de la nariz se desplazaría el paladar blando y la base de la lengua de la pared posterior de la orofaringe, evitando así su colapso (48). En ese estudio, Sullivan *et al.* aplican presión positiva a 5 pacientes con AOS grave. Los resultados fueron excelentes y se consiguió una mejora inmediata y sostenida de la saturación de oxígeno durante toda la noche. También se observó una normalización de la actividad eléctrica

cerebral, con un aumento considerable de las fases de sueño profundo no REM. El tratamiento con presión positiva corrige la apnea, pero no erradica la causa.

A finales de esa década se publica el primer ensayo clínico que demuestra la superioridad de la CPAP frente a placebo (50). A día de hoy, la CPAP se considera el tratamiento de primera línea y es el más utilizado, ya que consigue resultados inmediatos en la prevención de las apneas y de todos sus efectos asociados (Figura 6). Sin embargo, la CPAP también tiene sus sombras, ya que presenta una alta tasa de incumplimiento, que se ha cifrado en torno al 20-30 % (51).

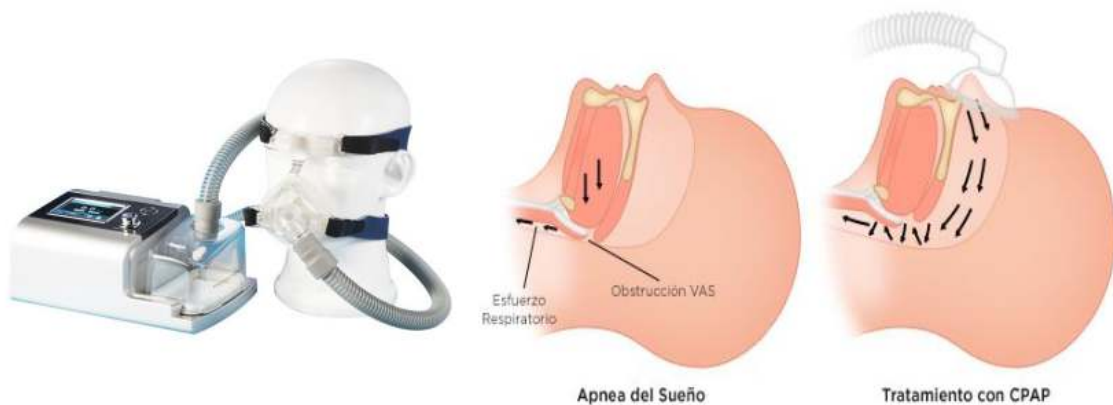


Figura 6. Tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea (CPAP)
VAS: vía aérea superior.

El efecto de la CPAP sobre la mortalidad en pacientes con AOS es controvertido. Por un lado, los estudios observacionales, incluido el de nuestro grupo, indican que la CPAP reduce la incidencia de eventos cardiovasculares mortales y no mortales (5, 11, 12). Por otro lado, el estudio SAVE, un ensayo internacional, multicéntrico y aleatorizado de CPAP frente a placebo, realizado con pacientes con antecedentes de enfermedad cardiovascular previa, fue negativo (52). Este estudio, sin embargo, incluyó preferentemente pacientes chinos, con AOS leve, escasa sintomatología diurna, escaso seguimiento (media de 3 años) y escaso cumplimiento (2,7 horas de CPAP/noche).

1.2. OBESIDAD

1.2.1. Definición

La obesidad es una patología crónica multifactorial que se produce por un exceso de grasa corporal y resulta de la interacción de causas ambientales con el genotipo individual. El método más aceptado para medir la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), que resulta

del cociente del peso en kilogramos y el cuadrado de la altura en metros. Dicho índice ha demostrado una correlación aceptable con el porcentaje de grasa corporal (53), si bien presenta ciertas limitaciones, como es la sobreestimación en el caso de deportistas o la infravaloración en las personas con bajo porcentaje de masa muscular, como es el caso de los ancianos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) (22, 54) ha establecido los conocidos puntos de corte para definir y graduar la obesidad (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios de clasificación de la obesidad en función del índice de masa corporal (IMC) según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y según la Sociedad Española para el estudio de la Obesidad (SEEDO)

Clasificación según OMS	IMC (kg/m ²)	Clasificación según SEEDO	IMC (kg/m ²)
-	-	Peso insuficiente	<18,5
Normopeso	18,5-24,9	Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso	25-29,9	Sobrepeso grado I	25-26,9
Obesidad grado 1	30-34,9	Sobrepeso grado II	27-29,9
Obesidad grado 2	35-39,9	Obesidad tipo 1	30-34,9
Obesidad grado 3	≥40	Obesidad tipo 2	35-39,9
-	-	Obesidad tipo 3 (mórbida)	40-44,9
-	-	Obesidad tipo 4 (extrema)	>45

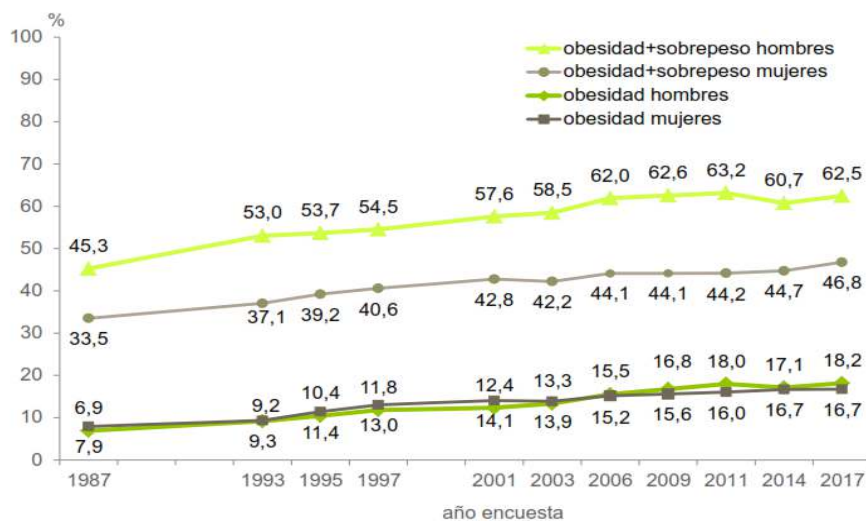
OMS: Organización Mundial de la Salud; SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad.

1.2.2. Epidemiología

La obesidad está considerada a día de hoy como una epidemia mundial por las dimensiones adquiridas y su impacto sobre la morbimortalidad, la calidad de vida y el gasto sanitario (55, 56). Según los datos de la última Encuesta Nacional de Salud en España (ENSE), del año 2017 (57), más de la mitad (54,5 %) de los adultos tiene exceso de peso (sobrepeso y obesidad). Según información de la ENSE 2017, «la obesidad es más frecuente en hombres (18,2 %) que en mujeres (16,7 %) [...] y su prevalencia en adultos se ha multiplicado por 2,4 pasando del 7,4 % en 1987 al 17,4 % en este ENSE». La diferencia por sexo en adultos es a expensas de los hombres menores de 65 años, ya que las mujeres superan a los hombres a partir de esa edad. El sobrepeso, al igual que la obesidad, es más frecuente en hombres, pero la diferencia es mucho mayor (44,3 % en los hombres frente a 30 % en las mujeres) y se mantiene en todos los grupos de edad (Figura 7).

Obesidad y sobrepeso adultos 1987-2017

Población de 18 y más años



Encuesta Nacional de Salud España 2017

Figura 7. Evolución de la obesidad y el sobrepeso entre 1987 y 2017. Obtenido de ENSE 2017 (57).

1.2.3. Comorbilidades asociadas a la obesidad

El sobrepeso y la obesidad se asocian con un aumento de la morbilidad y la mortalidad del individuo que la padece. Las complicaciones más importantes son la DM, la HTA, la DLP, la hiperuricemia y el síndrome metabólico o síndrome X (Figura 8) (58). El incremento del riesgo está determinado por un incremento del IMC y del perímetro del abdomen por encima de 102 cm en el caso de los hombres y de 88 cm en el caso de las mujeres.

Así pues, la pérdida de peso corporal es una indicación para todas aquellas personas con $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$, o bien en aquellas que presenten un $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ o un perímetro abdominal elevado ($>102 \text{ cm}$ en los hombres, $>88 \text{ cm}$ en las mujeres) y que además presenten más de dos factores de riesgo cardiovascular (53). El tratamiento básico para conseguir la pérdida de peso consiste en la reducción en la ingesta calórica, un aumento en el consumo energético y terapia conductual. Sin embargo, el problema de este tipo de tratamiento son sus resultados a largo plazo, ya que en muchas ocasiones no se logra mantener la pérdida de peso (59).

La obesidad debe ser considerada como una enfermedad crónica. Se han buscado soluciones alternativas o complementarias a la pérdida de peso convencional. La cirugía bariátrica (CB) es el método no convencional que mejores resultados ha presentado en el tratamiento a largo

plazo de la obesidad y en la corrección de las complicaciones metabólicas dependientes de ella. La CB se plantea, fundamentalmente, en todos aquellos pacientes con $\text{IMC} > 40 \text{ kg/m}^2$ o bien en aquellos con $\text{IMC} > 35 \text{ kg/m}^2$ con comorbilidades graves, siempre que se haya intentado la pérdida de peso por otros medios sin resultados satisfactorios.

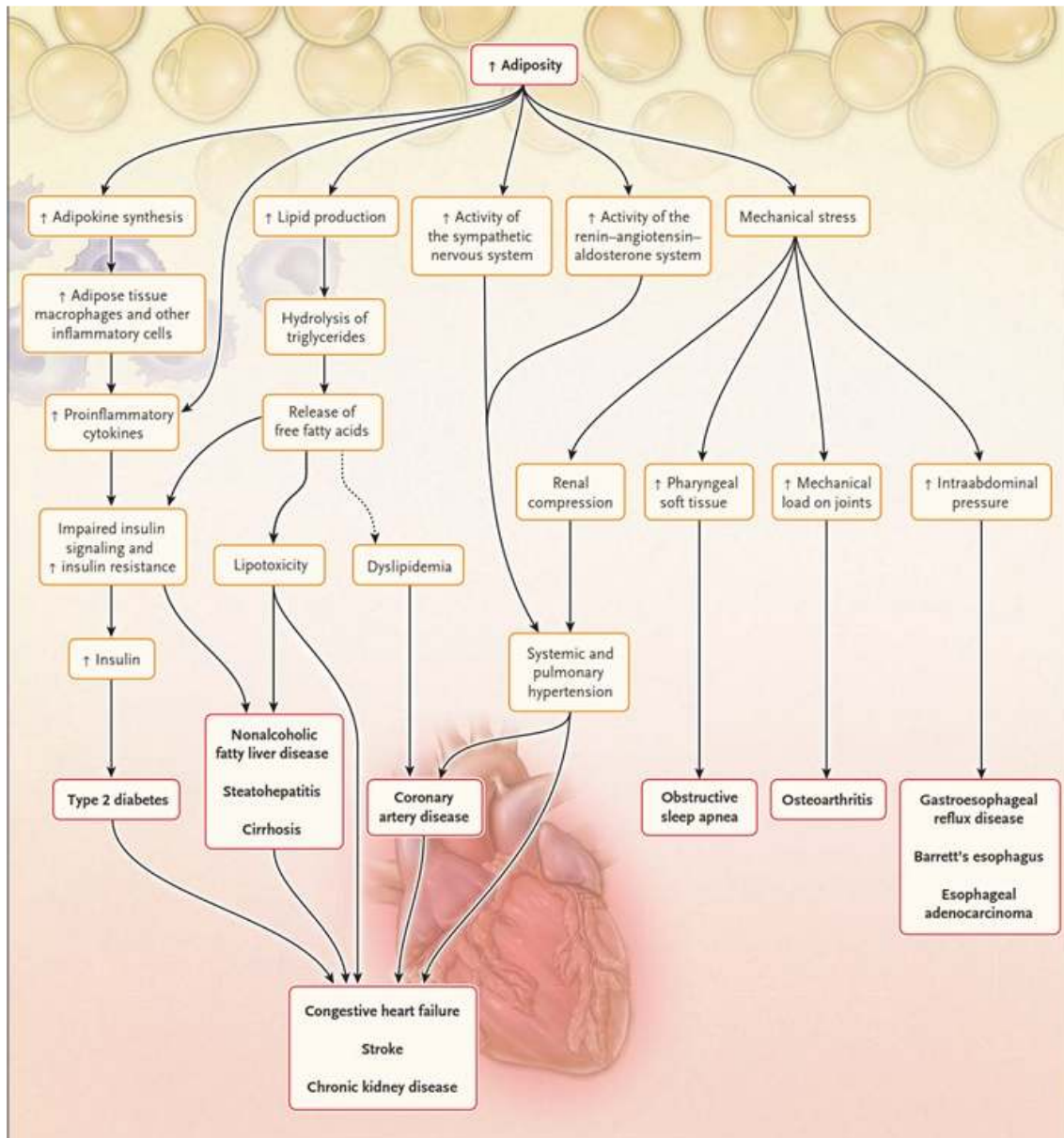


Figura 8. Esquema de la fisiopatología de la obesidad y sus comorbilidades
Recuperado de Heymsfield *et al.* (58).

1.2.4. Fisiopatología de la obesidad

La obesidad es un proceso multifactorial que se podría resumir en un desequilibrio entre la ingesta y el consumo de energía. En el primer mundo, factores como la sobrealimentación, la comida rápida y el sedentarismo motivan la epidemia de obesidad previamente descrita.

Los pacientes obesos sufren un estado crónico de inflamación de bajo nivel (*low level inflammation*) que condiciona el desarrollo de una resistencia aumentada a la insulina y mayor riesgo de DM tipo 2. Gregor y Hotamisligil (60) han denominado esta inflamación específica como *metainflamación*. Los mecanismos que originan esta inflamación no se conocen bien. El aumento en la resistencia a la acción de la insulina es algo común a múltiples entidades nosológicas de carácter inflamatorio, como son las infecciones, la artritis reumatoide, la hepatitis B o la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (61-63). Los mecanismos que desencadenan esta metainflamación son múltiples y se ha demostrado su origen a distintos niveles.

Como todo proceso inflamatorio, debe existir un agente causal que lo desencadene. En el caso de personas obesas, el origen se encuentra en la sobrecarga de nutrientes ingeridos y a la que su organismo debe hacer frente. Los adipocitos son las células que inician y perpetúan esta respuesta inflamatoria. La vía intracelular de las cinasas en los adipocitos parece ser la principal efectora de esta respuesta inflamatoria. Ante la sobrecarga de nutrientes se produce una activación de estas cinasas intracelulares en los adipocitos y los hepatocitos, que da lugar a la liberación de citocinas proinflamatorias. Esas cinasas son la *c-Jun N-terminal kinasa* (JNK), *κ kinasa inhibitor* (KKI) y, más recientemente, la proteína-cinasa R (PKR). La principal citocina proinflamatoria que participa en la metainflamación es el TNF- α , (64). Otras citocinas cuya participación se ha descrito son las interleucinas 1 β y 6, proteína quimiotáctica para los monocitos 1 (MPC 1)... (65, 66).

El sistema inmunitario también juega un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de la metainflamación. Las principales células involucradas son los macrófagos (60), los mastocitos y los linfocitos T *natural killer* (67, 68), aunque las células protagonistas de esta metainflamación son los macrófagos, ya que representan más del 40 % de las células del estroma del tejido adiposo (69). Estas células crean un ambiente proinflamatorio en el tejido adiposo de los individuos obesos, si bien el mecanismo no está bien explicado.

Como ocurre con muchas de las características de esta metainflamación, su cronicidad tampoco ha podido estudiarse de manera satisfactoria. Parece lógico pensar que el carácter

crónico venga de la sobrecarga calórica mantenida en el tiempo. Sin embargo, el papel de los macrófagos parece crucial en el desarrollo de este proceso inflamatorio y en su mantenimiento. Se ha apuntado que existe un incremento en la expresión de genes proinflamatorios de los macrófagos a medida que la masa grasa aumenta (70), un incremento que se relaciona con el aumento en la resistencia a la insulina (71). El estado inflamatorio es una de las hipótesis más plausibles que explican el exceso de riesgo cardiovascular, especialmente por aterosclerosis acelerada, que padecen los sujetos obesos.

Dado que un alto porcentaje de pacientes con AOS padecen simultáneamente obesidad, es difícil establecer el papel de ambos procesos (obesidad y AOS) de forma independiente en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, también es posible que ambas entidades se potencien y contribuyan a desarrollar un estado de «hiperinflamación sistémica» que sitúe al paciente que la padezca en un extremo riesgo cardiovascular. La investigación de base clínica debería aclarar cuáles son los mecanismos intermedios que explican las complicaciones cardiovasculares del AOS sin y con obesidad.

1.2.5. Tratamiento de la obesidad

El origen de la obesidad radica en un desequilibrio entre la ingesta calórica y el consumo energético. Por tanto, el tratamiento consistirá en corregir dicho desequilibrio, bien aumentando el gasto energético o bien reduciendo la ingesta.

Aumentar el gasto energético consiste básicamente en una modificación del estilo de vida incluyendo una mayor actividad física en el quehacer diario de cada paciente. Para ello, la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) recomienda un «mínimo de 30 minutos de ejercicio de intensidad moderada o alta, 5 o más días a la semana [...] y limitar la inactividad física» (72). Sin embargo, la reducción de la ingesta calórica puede lograrse por dos vías: el tratamiento médico no quirúrgico y el tratamiento quirúrgico.

1.2.5.1. Tratamiento médico no quirúrgico

El objetivo de esta terapia se centra en reducir la ingesta calórica mediante la dieta y la mejora de la calidad nutricional de esta. Además de los consejos administrados por el médico se debe realizar una terapia cognitivo-conductual y, en casos seleccionados, se pueden administrar fármacos anorexizantes. Según la guía europea sobre el manejo de la obesidad, el tratamiento farmacológico se recomienda para pacientes con $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ o bien $IMC > 27 \text{ kg/m}^2$ con al menos una enfermedad asociada a la obesidad (DM tipo 2, HTA, SAHS...) (73). Los fármacos aprobados para el uso en el tratamiento de la obesidad se utilizan como coadyuvantes.

En los últimos años se ha desarrollado un nuevo abordaje intervencionista no quirúrgico de la obesidad: las técnicas endoscópicas. Estas técnicas persiguen objetivos similares a los conseguidos con la cirugía, pero sin sus efectos negativos. Los procedimientos endoscópicos comparten objetivos comunes con las técnicas quirúrgicas: aumentar la saciedad mediante la reducción del tamaño del estómago o inducir una malabsorción de los nutrientes administrados o bien el uso de técnicas mixtas. Pese a que las opciones endoscópicas son bien conocidas y presentan excelentes resultados a corto plazo, no se consideran en ninguna de las guías y documentos de consenso consultados (72-74).

1.2.5.2. Tratamiento quirúrgico de la obesidad

La Real Academia de la Lengua Española define *bariátrico* como relativo al peso corporal. Etimológicamente, procede del griego βαρύς *barýs*, pesado, y *-iatría* e *-íco*, relativo al tratamiento médico (75).

La pérdida de peso secundaria a grandes resecciones del intestino delgado ya se conocía en el siglo XIX. Generalmente, esas intervenciones se llevaban a cabo por otros motivos y el efecto sobre la pérdida de peso era interpretado como un efecto secundario de la cirugía (76). La CB nace en la segunda mitad del siglo pasado tras los estudios en animales llevados a cabo por Kremen *et al.* (77). Estos cirujanos son los primeros que plantean la resección del intestino delgado como terapia para reducir la absorción de nutrientes y, de este modo, conseguir una pérdida de peso.

La CB es una técnica quirúrgica para el tratamiento de una enfermedad endocrino-metabólica que hace necesaria la redacción de documentos de consenso entre las sociedades de cirujanos (Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad, SECO) y endocrinólogos (SEEDO). En uno de estos documentos de consenso se define la técnica quirúrgica ideal como segura, útil (al menos en el 75 % de los intervenidos), duradera, reproducible, reversible fisiológicamente y con escasas secuelas (78).

Las indicaciones de la CB siguen vigentes desde el año 1991 y se plantea básicamente a los pacientes de entre 18 y 60 años con IMC > 40 kg/m² o bien aquellos con IMC > 35 kg/m² con comorbilidades graves (79, 80) (Tabla 3). Hoy en día se ha descrito una variante de esta cirugía de la obesidad, denominada cirugía metabólica, y que no deja de ser una nueva indicación quirúrgica para individuos con IMC de 30-35 kg/m² (81, 82).

Tabla 3. Criterios de selección de pacientes con obesidad mórbida para cirugía bariátrica

SELECCIÓN DE CANDIDATOS A CIRUGÍA BARIÁTRICA
Edad: 18-55 años
IMC ≥ 40 kg/m ² o IMC ≥ 35 kg/m ² con comorbilidades mayores asociadas, susceptibles de mejorar tras la pérdida ponderal
Tiempo evolución de la obesidad mórbida superior a 5 años
Fracasos continuados a tratamientos conservadores debidamente supervisados
Ausencia de trastornos endocrinos que sean causa de obesidad mórbida
Estabilidad psicológica <ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de abuso de alcohol o drogas • Ausencia de alteraciones psiquiátricas mayores, deterioro cognitivo y trastornos del comportamiento alimentario
Capacidad para comprender los mecanismos por los que se pierde peso con la cirugía y entender que no siempre se alcanzan buenos resultados
Comprender que el objetivo de la cirugía no es alcanzar el peso ideal
Compromiso de adhesión a las normas de seguimiento tras la cirugía
Consentimiento informado después de haber recibido toda la información necesaria (oral y escrita)
Las mujeres en edad fértil deberían evitar la gestación al menos durante el primer año postcirugía

IMC: índice de masa corporal. Adaptada de Rubio *et al.* (78)

Se han descrito diferentes opciones quirúrgicas para lograr el objetivo de la pérdida de peso. Esas técnicas pueden dividirse en tres grandes grupos atendiendo a su mecanismo de acción (Figura 9).

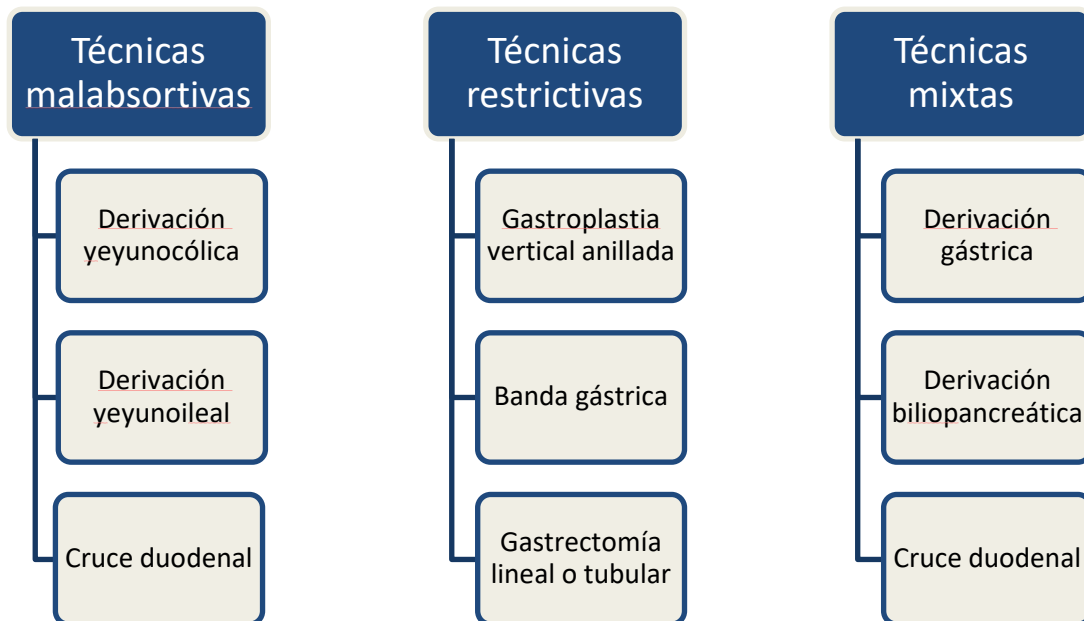


Figura 9. Tipos de técnicas quirúrgicas en cirugía bariátrica

TÉCNICAS MALABSORTIVAS

Como su propio nombre indica, con las técnicas malabsortivas se busca reducir la capacidad de absorción de los nutrientes por el intestino mediante un cruce de este, reduciendo de esta forma el tránsito del bolo alimenticio al evitar el paso por gran parte del intestino delgado. Estas técnicas se han abandonado en la actualidad. En la A.
B.

Figura 10 se muestran dos ejemplos esquemáticos de este tipo de técnicas.

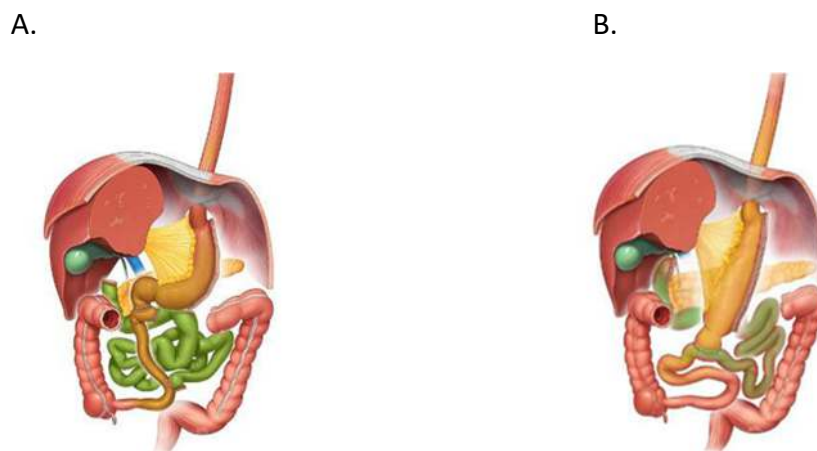


Figura 10. Técnicas malabsortivas

Recuperado del Atlas de la International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders (IFSO) (83), cortesía del Dr. Fernando Trebollé. A. Cruce duodenal: Técnica malabsortiva en la que se realiza un estómago vertical extirpando la curvadura mayor y una derivación intestinal con un asa ileal anastomosada al duodeno y una anastomosis a pie de asa. B. SDI: Técnica similar al cruce duodenal ideada como segundo tiempo quirúrgico de la gastrectomía vertical para asociar el componente malabsortivo, con un asa única en omega anastomosada al duodeno.

TÉCNICAS RESTRICTIVAS

Son las más sencillas de realizar y en ellas el estómago es el objeto de la intervención. Buscan reducir su capacidad, restringiendo de esta manera el tránsito de los alimentos. En la Figura 11 se muestran dos ejemplos de estas técnicas.

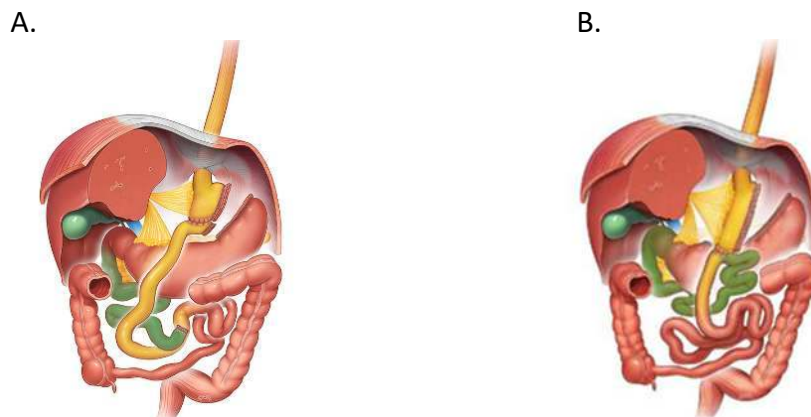


Figura 11. Técnicas mixtas

Recuperado de IFSO (83), cortesía del Dr. Fernando Trebollé. A. Derivación gástrica en Y de Roux: Técnica mixta con importante componente restrictivo en la que se realiza un reservorio gástrico de pequeño tamaño desconectado de la curvatura mayor gástrica (sin realización de gastrectomía), y una derivación intestinal con un asa biliopancreática y un asa alimentaria anastomosadas en Y de Roux. B. Miniderivación gástrica: Técnica mixta con el mismo fundamento que la derivación gástrica en Y de Roux, con un reservorio algo más largo, y una única anastomosis gastroyeyunal.

TÉCNICAS MIXTAS

Son técnicas básicamente malabsortivas que asocian una reducción del tamaño del estómago. Son las mejor toleradas y utilizadas, ya que presentan menor tasa de complicaciones. En la Figura 12 se muestran dos ejemplos de estas técnicas.

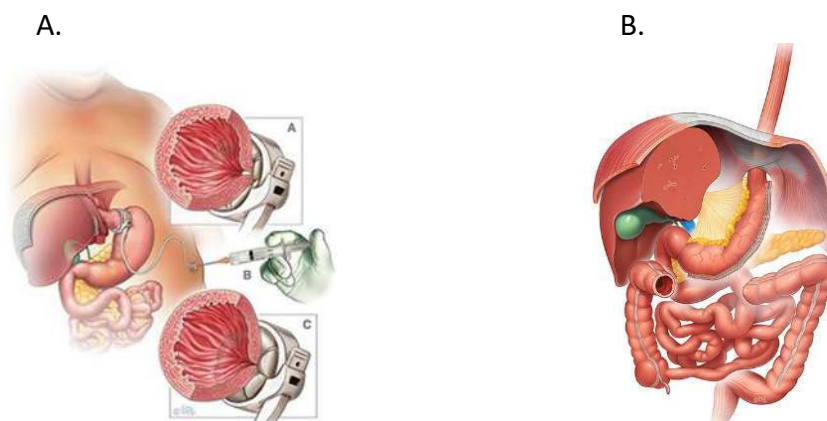


Figura 12. Técnicas restrictivas

Recuperado de IFSO (83), cortesía del Dr. Fernando Trebollé. A. Banda gástrica ajustable: Técnica restrictiva consistente en la colocación de una anilla al nivel del cardias conectada a un reservorio subcutáneo que regula el nivel de restricción. B. Gastrectomía vertical: Técnica restrictiva en la que se secciona la curvatura mayor gástrica y se grapa el estómago de forma vertical sobre una sonda de Fouchet.

Hoy en día, según el último consenso de la SEEDO y la SECO, el abordaje de estas técnicas debería hacerse siempre por laparoscopia (84). Las características de las distintas técnicas

hacen que para su elección se deban tener en cuenta distintos factores, como el IMC, la edad, el patrón alimentario, la clasificación de la American Society of Anesthesiologists (ASA) de riesgo quirúrgico y la presencia y el tipo de comorbilidades (85). Las técnicas más indicadas son las restrictivas y las mixtas, mientras que las malabsortivas puras se han restringido únicamente para pacientes muy obesos con $IMC > 60 \text{ kg/m}^2$.

La pérdida de peso varía en función de la técnica utilizada y oscila entre el 43,5 % de la banda gástrica hasta el 70 % de las técnicas mixtas (86). Los resultados de la CB a muy largo plazo, en comparación con las opciones no quirúrgicas, son los más satisfactorios. Recientemente se ha revisado el estado de salud de un grupo de pacientes intervenido en Estados Unidos en el año 2000 y se ha demostrado que la derivación gástrica en Y de Roux consigue una mayor pérdida de peso, mantenida en el tiempo y con una clara mejora en la incidencia de complicaciones en comparación con aquellos pacientes no sometidos a técnicas quirúrgicas (87).

La CB es un procedimiento seguro, con una mortalidad en torno al 0,3 % (85, 88). Según el Registro Informatizado de Cirugía Bariátrica (RICIBA) de nuestro país, la tasa de complicaciones, mayores y menores, se sitúa en el 10,6 %; dentro de las complicaciones mayores, la más frecuente fue la fuga de la anastomosis (2,3 %) y el sangrado gastrointestinal (1,8 %); la complicación menor más frecuente fue la infección de la herida quirúrgica (2,3 %) (85).

Los efectos de la pérdida de peso producto de la CB suponen una mejora en las distintas comorbilidades asociadas a la obesidad. Lo mismo ocurre con el AOS, y en un metaanálisis en el que se comparaban la influencia de la pérdida de peso mediante CB y la terapia médica, se demostró que en el caso de la obesidad mórbida (OM) la pérdida de peso secundaria a la CB ofrecía resultados más satisfactorios (89).

1.3. COMUNICACIÓN INTERCELULAR

La comunicación intercelular en los organismos pluricelulares se lleva a cabo de manera directa o mediante la liberación de distintos elementos de señalización. Dichas moléculas permiten transmitir información a otras células tanto cercanas como más lejanas. Su acción sobre las distintas células diana dependerá del receptor de membrana al que se unan y el estado de la célula, alterando diferentes parámetros, como su metabolismo, su forma, su movimiento o la expresión génica. De esta forma, se conocen cuatro tipos de señalización celular para la comunicación intercelular (Figura 13) (90):

1. **Contacto directo.** Una proteína de membrana de la célula efectora interactúa directamente con un receptor en la célula diana.
2. **Sinapsis.** Este tipo de conexión se da únicamente entre las células del sistema nervioso. En ellas se produce la transmisión de un impulso eléctrico a lo largo de toda su membrana, lo que produce la liberación de un determinado neurotransmisor al espacio sináptico. Este sistema de señalización permite poner en contacto células muy distantes entre sí gracias a la longitud del terminal axonal de la neurona.
3. **Comunicación paracrina.** Se liberan sustancias al espacio extracelular con una acción local sobre las células cercanas.
4. **Comunicación endocrina.** Se envían las señales a larga distancia y no es necesario que la célula emisora y la diana se encuentren próximas entre sí. Utiliza sustancias que se liberan al torrente circulatorio. Las más conocidas son las hormonas, pero hay una amplia variedad de moléculas que participan de esta comunicación a distancia.

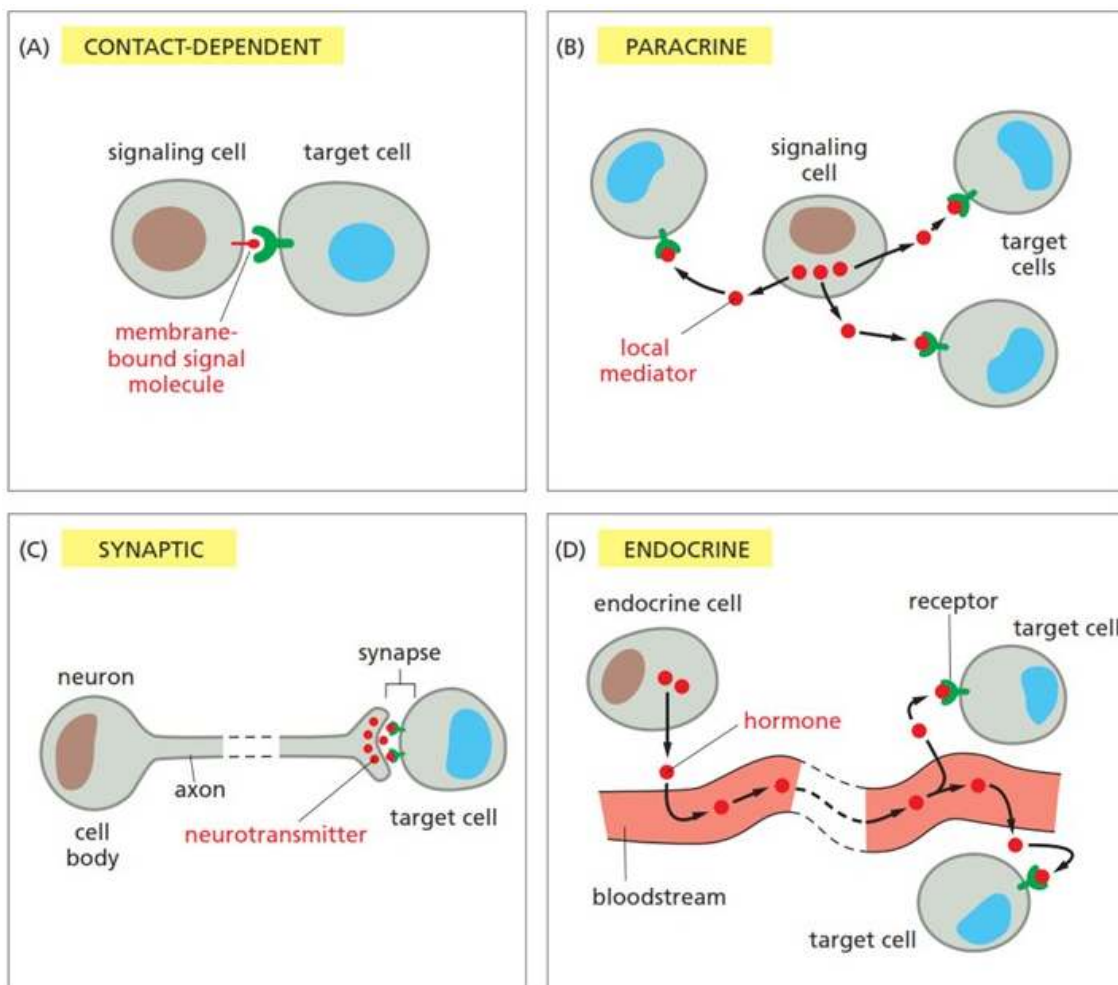


Figura 13. Mecanismos básicos de comunicación intercelularRecuperado de Alberts *et al.* (90)

Los cambios epigenéticos más conocidos son la metilación del DNA, la acetilación de las histonas, el remodelado de la cromatina y la producción de micro-RNA (miRNA) (91). La presencia de estos cambios en determinados genes conlleva una expresión modificada de sus proteínas. La producción de miRNA supone una novedosa forma de comunicación intercelular.

1.4. VESÍCULAS EXTRACELULARES

En los últimos años se ha puesto el foco en un nuevo mecanismo de comunicación intercelular: las vesículas extracelulares (VE). En su contenido distintos tipos de moléculas biológicas (DNA, RNA, proteínas, lípidos...). La producción de las VE ocurre tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas y se han aislado en la práctica totalidad de los fluidos biológicos (plasma, líquido ascítico, leche materna, orina, lavado broncoalveolar...) (92).

La identificación de pequeñas vesículas que se liberan de la superficie de muchos tipos celulares se conoce desde hace décadas. De esta manera, se trató de diferenciar las diferentes VE del organismo por su tamaño, su densidad, su fuente y su proceso de formación (93). Actualmente se conocen distintos tipos de pequeñas vesículas con diferentes biogénesis, tamaño y función: exosomas, microvesículas, ectosomas o cuerpos apoptóticos (Figura 14) (94). La nomenclatura para definir los distintos tipos de VE continúa siendo actualmente materia de debate en la comunidad científica.

Originalmente se pensó que la función principal de los exosomas era la eliminación de sustancias de deshecho; sin embargo, trabajos posteriores han demostrado su importancia en la comunicación célula-célula. Estudios en animales han demostrado que las VE liberadas por las células se encuentran moduladas por el tipo de enfermedad (95). De ahí que exista un manifiesto interés en el estudio de los exosomas y de su función en el cuerpo para desarrollar aplicaciones clínicas en el diagnóstico y el tratamiento.

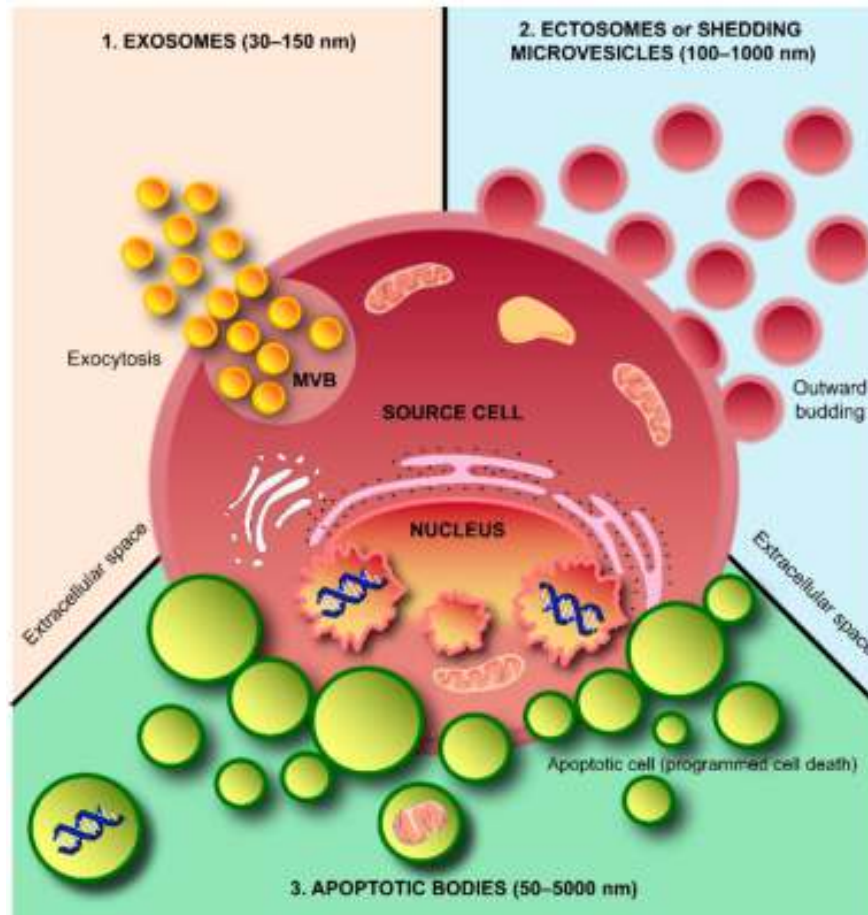


Figura 14. Esquema de la formación de vesículas extracelulares
Recuperado de Kalra et al. (92).

1.4.1. Ectosomas

Son estructuras (100-1000 nm) formadas por la evaginación de una porción de la membrana plasmática (MP). Se observaron por primera vez desprendiéndose de la membrana de neutrófilos activados (96). La producción y el contenido de estas vesículas varía en función del estado de actividad de la célula, así como de su estirpe. Los ectosomas suelen transportar distintas proteínas; básicamente, metaloproteasas, integrinas y glicoproteínas (92).

1.4.2. Cuerpos apoptóticos

Fueron las primeras VE descritas (97) y conforman un grupo heterogéneo de vesículas que se forman durante el proceso de apoptosis celular. Dicho proceso ocurre en células de gran tamaño que no pueden ser fagocitadas (98). En esos casos, la célula sufre un proceso de desmantelamiento progresivo que culmina con la formación de estos cuerpos apoptóticos. La formación está mediada por una familia de enzimas proteolíticas denominadas *caspasas*.

1.4.3. Exosomas

Los exosomas son pequeñas vesículas de 50 a 100 nm (Figura 15) que contienen material genómico y diferentes proteínas y lípidos, y que son liberadas por las células ante diferentes estímulos mediante un complejo mecanismo. En los últimos años se las ha puesto en la diana de biomarcadores para distintas enfermedades, ya que tienen un papel muy relevante en la comunicación intercelular (99). Todas las células del organismo presentan un ciclo de endocitosis-exocitosis, de tal forma que la MP se encuentra en continuo movimiento, manteniendo su tamaño y el volumen celular en todo momento.

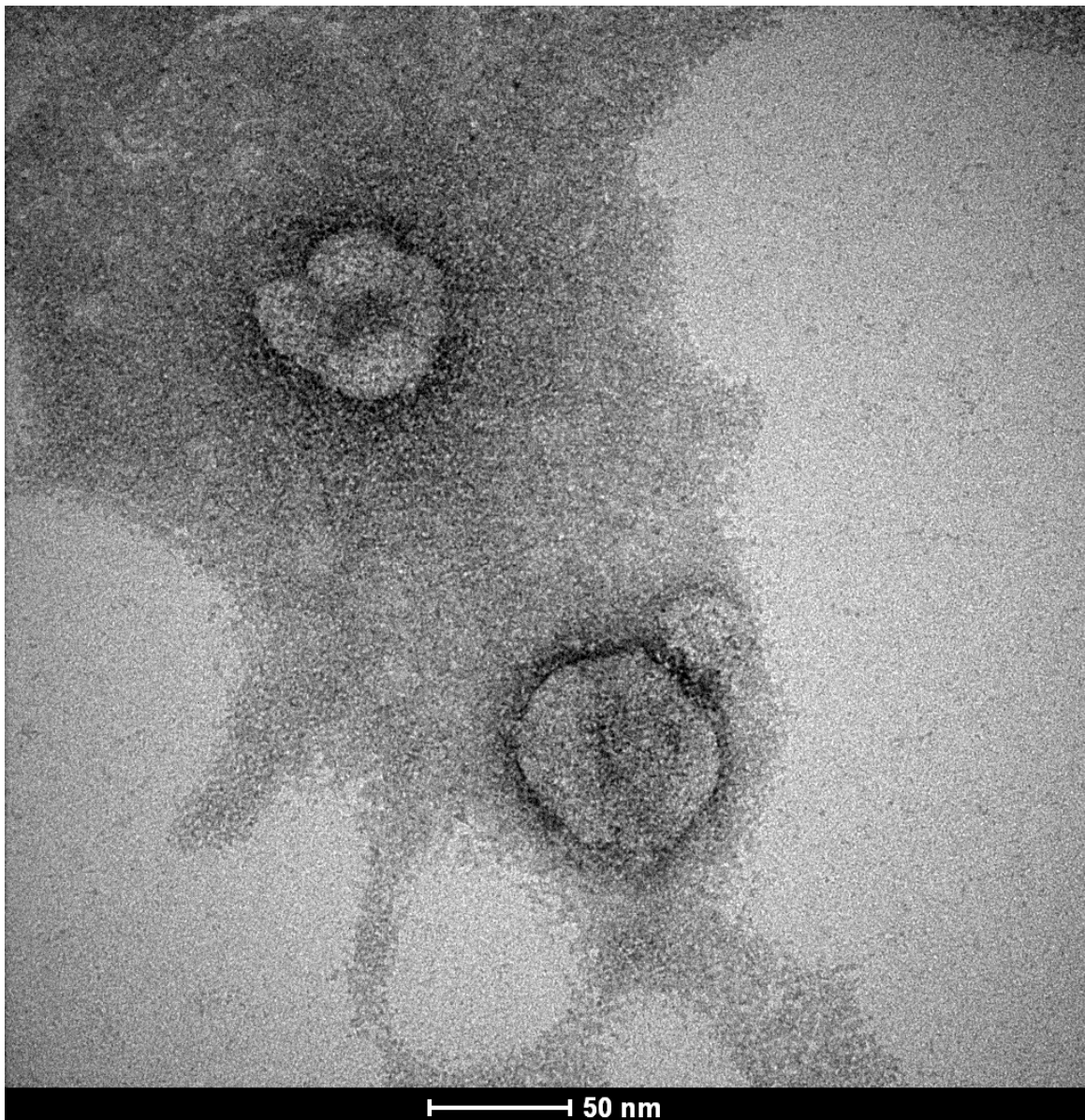


Figura 15. Imagen obtenida por microscopía electrónica de dos exosomas
Cortesía del Dr. Sanz Rubio.

La formación de los exosomas comienza con un proceso conocido como *pinocitosis*, en el que se producen pequeñas invaginaciones de la MP. Esas zonas de la MP se encuentran tapizadas por distintos tipos de proteínas, aunque las invaginaciones más frecuentes son las formadas por clatrina. En su interior se almacenan sustancias extracelulares, receptores y proteínas de membrana. En las proximidades de la superficie citosólica de la MP se produce la formación del endosoma temprano (ET) mediante la fusión de esas vesículas pinocíticas.

El ET adquiere una morfología pleomórfica en el que se pueden identificar zonas vacuolares y otras tubulares. Este ET, además de recibir nuevas vesículas procedentes de la MP, también recibe vesículas procedentes del aparato de Golgi; pero también devuelve vesículas a la MP. El ET permanece bajo la superficie de la MP durante 5-10 minutos. Una vez formado, se desplaza en un movimiento errático a través de microtúbulos hacia la periferia nuclear, donde tendrá lugar la maduración del endosoma.

Durante la maduración del ET este pierde sus zonas vacuolares y tubulares, y adquiere una morfología más esférica. Se modifican las proteínas de la membrana del endosoma (ubiquitinización) y comienza la formación de vacuolas o cuerpos intraluminales (CIL) (100). La biogénesis de los CIL no se conoce bien. Parece haber una doble vía que participa en su desarrollo: la vía de la ceramida y la vía de la *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT), aunque esta última es la más conocida.

Durante su trayecto hasta la periferia del núcleo, los receptores y proteínas de membrana del ET sufren un proceso de ubiquitinización. El complejo ESCRT lo constituyen cuatro unidades: 0, I, II y III. La proteína ESCRT-0 clasifica y agrupa a las proteínas ubiquitinizadas y deja libres zonas ricas en una proteína transmembrana: la tetrapasnina. Esas zonas se denominan *tetrapasnins enriched microdomains* (101) que serán las zonas donde la membrana del endosoma se invaginará para dar lugar al CIL. De igual modo que la formación del CIL no ocurre de manera aleatoria, su contenido tampoco es azaroso. El contenido (proteínas, DNA, miRNA...) que llevarán los CIL procedente del citosol celular es seleccionado por ESCRT-I y ESCRT-II. Tras la formación de los CIL, el ET ha evolucionado al endosoma tardío o cuerpo multivesicular (CMV). Una vez que se finaliza la formación del CMV, este se dirige nuevamente a la periferia celular. Allí se activará la maquinaria molecular necesaria para su fusión con la MP y la liberación de los CIL, que en ese momento pasan a denominarse *exosomas*. En la Figura 16 se muestra, esquemáticamente, este proceso.

Los CMV pueden seguir un camino distinto, que, al igual que ocurre con la biogénesis del exosoma, no se conoce bien. La presencia de determinadas proteínas en la membrana del CMV durante su proceso de maduración produce la fusión con lisosomas procedentes del

aparato del Golgi y el retículo endoplásmico, lo que da lugar al endolisosoma. Al igual que ocurre con el CMV, el endolisosoma también se fusiona con la MP y los restos moleculares se envían al espacio intercelular.

El contenido de los exosomas es muy variado, y se ha descrito la presencia de proteínas, lípidos, moléculas de DNA, RNA, etc. En el año 2012 se desarrolló una herramienta de trabajo colaborativo dentro de la comunidad científica conocida como *Vesiclepedia* (102), que tiene como objetivo catalogar toda la información sobre los hallazgos moleculares en exosomas, cuerpos apoptóticos y ectosomas (última actualización, 15 de agosto de 2018) (103). De las moléculas encontradas en su interior, las que mayor trascendencia están alcanzando son las moléculas de RNA que, a su vez, se pueden clasificar en dos tipos: codificantes (RNA mensajero [mRNA]) y no codificantes (miRNA, *long coding* RNA [lcRNA], *circular* RNA [cirRNA], *small nucleolar* RNA [snoRNA], etc.) (104).

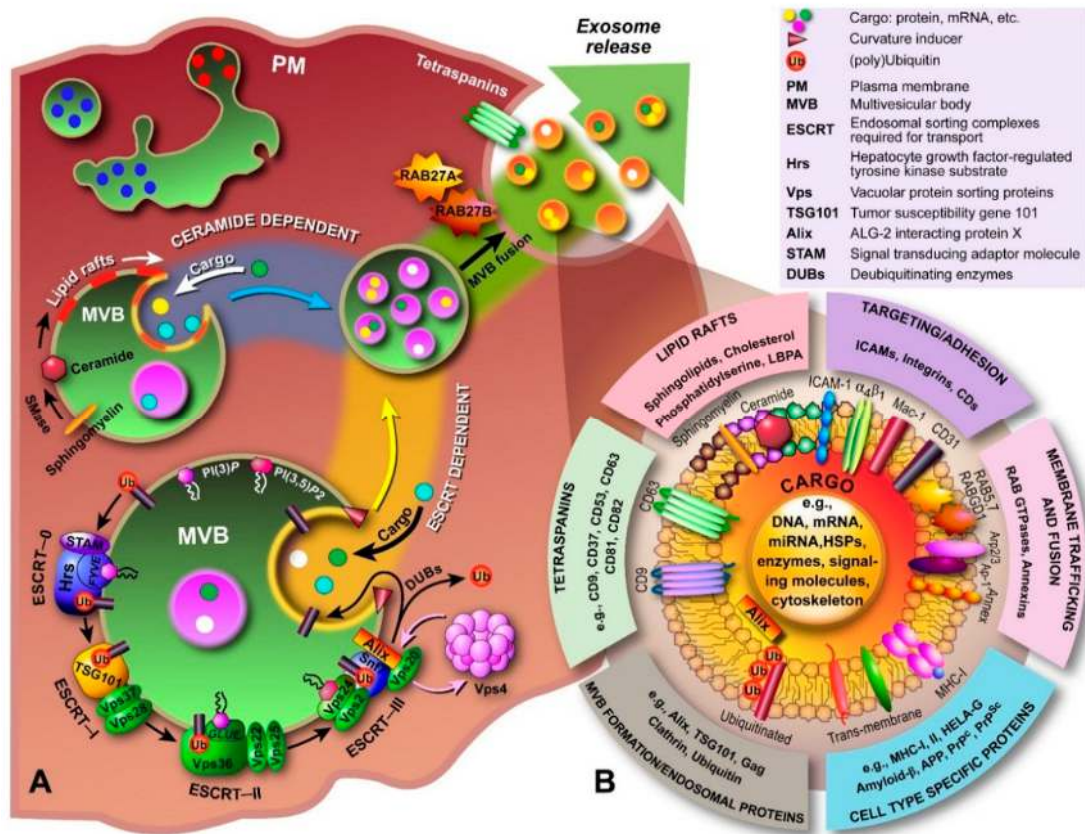


Figura 16. Biogénesis y contenido de los exosomas
 Recuperado de Kalra et al. (92).

La internalización de los exosomas liberados puede ocurrir por tres vías (105): fusión con la membrana celular y liberación del contenido del exosoma al citoplasma celular, endocitosis

del exosoma, o fusión con la membrana celular según la unión de proteínas de membrana exosoma-célula diana.

Las células diana de los exosomas vienen determinadas por la célula procedente y por la situación fisiológica o fisiopatológica en la que se encontraba, si bien la expresión de proteínas de membrana en el exosoma no es específica de una única célula diana (106).

1.5. DEFINICIÓN DE MICRO-RNA

Los miRNA son pequeñas cadenas de RNA no codificantes de entre 21 y 25 pares de bases similares estructuralmente a otros RNA no codificantes y que tienen la función de silenciar la expresión génica a un nivel postranscripcional (107).

La historia de los miRNA se remonta a finales del siglo XX, cuando se describe por primera vez un miRNA, *lin-4*, en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Inicialmente se sospechaba que el gen *lin-4* codificaba una proteína que actuaba sobre el gen *lin-14*, responsable del desarrollo larvario del nematodo. Sin embargo, Lee *et al.* describen que realmente el producto del gen *lin-4* no da lugar a una proteína, sino a una pequeña molécula de RNA no codificante (108). Dicha molécula resulta ser complementaria con la secuencia de nucleótidos del gen *lin-14*, lo que produce su inhibición y, por tanto, reduce la producción de la proteína *lin-14*.

1.5.1. Biogénesis del micro-RNA

Los miRNA son transcritos en el núcleo por la RNA-polimerasa II, que origina un miRNA primario (pri-miRNA) (109). Los pri-miRNA forman estructuras secundarias de horquilla que son cortadas por la enzima DROSHA ayudada por su cofactor PASHA, y originan el precursor del miRNA (pre-miRNA). Los pre-miRNA son transportados desde el núcleo al citoplasma por la proteína exportina 5 y en el citoplasma son procesados a miRNA cortos (22 nucleótidos) de doble cadena por la ribonucleasa de tipo III Dicer. Los miRNA maduros se incorporan en los complejos efectores *microRNA induced silencing complex* (miRISC) y es entonces cuando se forman los miRNA maduros de cadena sencilla (107). Mientras una cadena se mantiene incorporada en el complejo miRISC (donde ejercerá su función de silenciamiento), la otra cadena se degradará. El mecanismo por el cual un miRNA ejerce su función depende del grado de complementariedad entre el miRNA y la región 3'-UTR de su RNA mensajero (mRNA) diana. Si la complementariedad entre ambas secuencias es completa, el mRNA diana será degradado por el miRISC. Sin embargo, si el emparejamiento entre las bases no es perfecto, como ocurre con la mayoría de los miRNA en los mamíferos,

se producirá la inhibición de la traducción. En la Figura 17 se muestra, esquemáticamente, el proceso de formación de los miRNA.

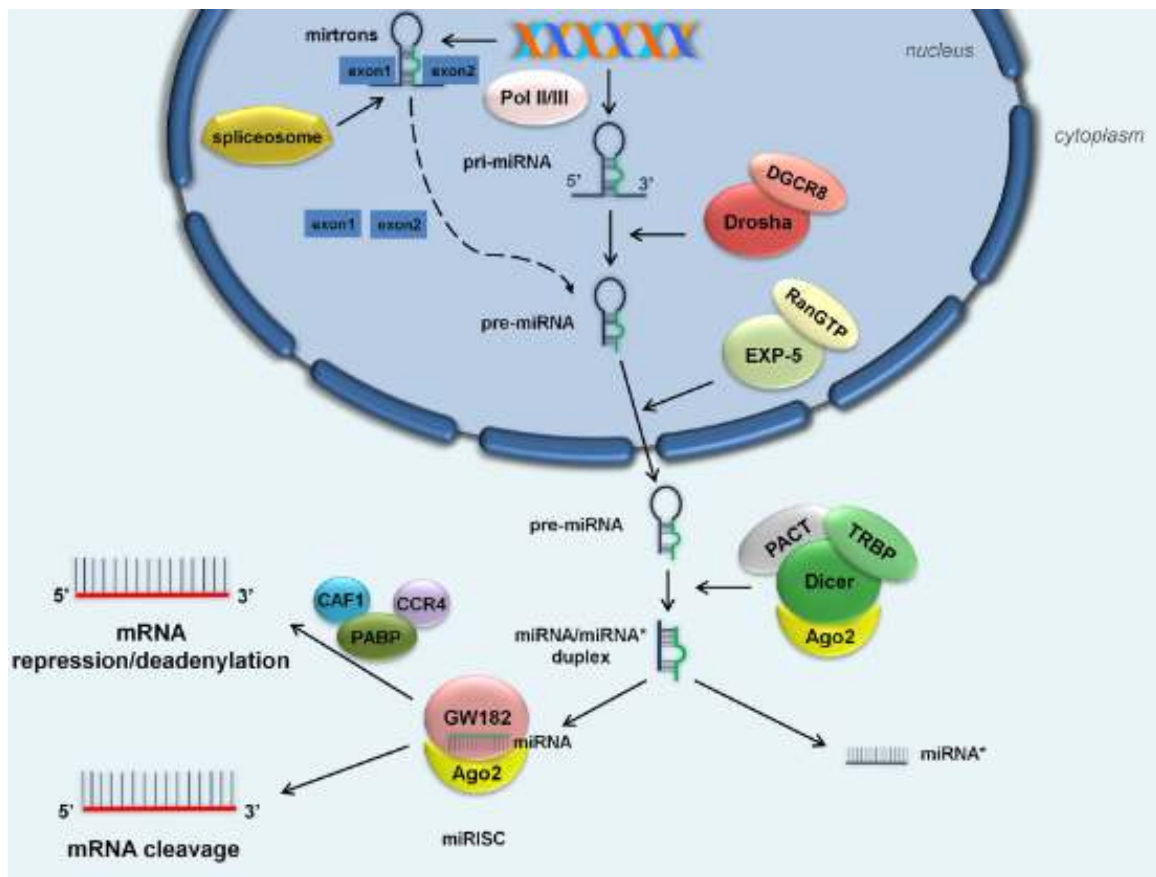


Figura 17. Biogénesis del micro-RNA
 Recuperado de Gargalionis *et al.* (110)

Un miRNA puede tener muchos mRNA diana y cada mRNA puede estar regulado por varios miRNA. En estudios bioinformáticos se ha estimado que los miRNA pueden regular hasta el 30 % de todos los genes humanos. Estas moléculas de miRNA juegan un papel fundamental en distintos procesos celulares, como son la diferenciación (111), la proliferación (112) y la apoptosis (113).

Aunque la importancia clínica de los miRNA se encuentra en su papel como biomarcadores y como diana terapéutica, también realizan un papel fundamental en el desarrollo fisiológico del individuo (114-116). La expresión de los miRNA se ve alterada por numerosos factores tanto ambientales como genéticos (117).

1.5.2. Actividad biológica del micro-RNA exosomal

Los miRNA pueden ser transportados por los exosomas y los ectosomas, pero también se han encontrado libres en el plasma o bien unidos a proteínas o lipoproteínas de alta densidad (HDL) (118, 119). Sin embargo, existe discrepancia en el porcentaje de miRNA transportado por cada uno de los medios. Unos autores afirman que la mayor parte van libres en el plasma formando complejos proteicos a partir del complejo miRISC: argonauta 2 (Ago-2), cuya función es evitar su degradación por las enzimas ribonucleasas extracelulares (120-122). Otros autores han demostrado que la mayoría del miRNA viaja protegido por la bicapa lipídica de las VE (123). Como señalan O'brien *et al.* (124), esas discordancias pueden deberse a las diferencias existentes entre las muestras y los tipos de miRNA analizados, y que el medio de transporte dependa del miRNA estudiado, la célula que lo emite y otros factores que afecten a su producción.

En cualquier caso, los exosomas confieren estabilidad a los miRNA en distintas condiciones de almacenamiento y a lo largo del tiempo (125). En un estudio llevado a cabo en los descendientes de la cohorte de Framingham se analizaron y compararon los miRNA presentes tanto en plasma como sangre total, y se obtuvo una discordancia entre ambas muestras probablemente debidas al contenido de miRNA de las células presentes en la sangre total (126). En el estudio publicado por Sanz-Rubio *et al.*, se demostró en 7 adultos sanos que las concentraciones de miRNA exosomal se mantenían estables en cuatro determinaciones semanales, lo que sentaba las bases de su uso como biomarcador para distintas enfermedades (127).

El almacenamiento y el transporte en los exosomas los protege frente a agresiones externas y hace que tengan dianas celulares selectivas según las proteínas de membrana de la bicapa (128), a diferencia de lo que ocurre con los miRNA que viajan por el plasma, que pueden actuar sobre cualquier célula. Los mecanismos por los que unos exosomas son cargados con unos miRNA y no con otros siguen sin conocerse, pero no se produce de manera aleatoria. Distintos estudios han demostrado que la incorporación de los miRNA a los exosomas varía en función de la enfermedad que afecta a la célula. El papel de los miRNA exosomales tiene su máximo exponente en las metástasis de las neoplasias malignas (129).

1.6. OBESIDAD MÓRBIDA Y MICRO-RNA

Los miRNA juegan un papel fundamental en el metabolismo lipídico. Como ya se ha comentado anteriormente, el tejido adiposo es el principal órgano para el almacenaje de energía y lípidos; sin embargo, un exceso de calorías modificará, a través de la infiltración por macrófagos, la actividad endocrina de los adipocitos, y la producción de miRNA es una más de sus consecuencias (130). El tejido adiposo ha demostrado ser un gran productor de miRNA exosomal con efectos en otros órganos, entre los que destaca la sensibilidad a la insulina (131). De igual modo, los exosomas circulantes en la sangre periférica de pacientes obesos son mucho más abundantes que los observados en individuos con normopeso, y la pérdida de peso reduce su número (132, 133). Como se puede ver en la Tabla 4, casi todos los estudios realizados hasta la fecha en pacientes con OM analizan el papel de los miRNA circulantes sin tener en cuenta los contenidos en los exosomas y no estratifican por una comorbilidad fundamental en este tipo de pacientes: la AOS.

Tabla 4. Revisión bibliográfica de trabajos publicados sobre pacientes con obesidad mórbida y micro-RNA

Población	AOS	miRNA	Procedencia del miRNA	CB	Objetivo	Ref	
Obesos asiáticos	21	No	125	TCS Epiplón	No	Diferencias de género en la expresión de miRNA	(134)
Obesos asiáticos	12	No	29, 122, 124, 320	Circulante	Sí	Impacto en la DM tipo 1 un año después de la CB	(135)
Mujeres obesas	9	No	221, 222, 155	TCS Cultivo celular	Sí	Variación del miRNA y la inflamación tras 2 años CB	(136)
Obesos asiáticos	124	No	448	Circulante	Sí	Factor pronóstico de miR448 respecto al éxito de la CB	(137)
Mujeres obesas frente a no obesas	48	No	143, 652	TCS	Sí	Resistencia a la insulina y aumento de la acción lipogénica	(138)
Mujeres Obesas	3	No	212, 299, 370, 487, 519, 671	TCS	Sí	Variación del miRNA a los 3 años tras la CB	(27)
Obesos	22	No	7, 15, 106, 135	Circulante	Sí	Beneficio metabólico del ejercicio físico tras la cirugía	(139)
Mujeres obesas frente a no obesas	51	No	155, 130, 221, 339, 345, 483, 501, 575, 1973, 1295, 4286	TCS Cultivo celular	Sí	El mRNA y el miRNA inflamatorio mejora a los 2 años de la CB	(140)
Obesos	54	No	10	Circulante	Sí	Variación tras la CB	(141)
Obesos	9	No	125, 378, 192, 629, 22, 15	Circulante	Sí	Variación un año después de la CB	(142)
Obesos	21	No	122 / 451	Circulante	Sí	Variación a los 3 meses de la CB y riesgo endotelial y oncológico	(143)
Obesos frente a no obesos	15	No	103, 107, 146, 24, 26, 320, let-7	Circulante	Sí	Impacto de la CB en la DM tipo 2 y el miRNA circulante	(144)

AOS: apnea obstructiva del sueño; CB: cirugía bariátrica; DM: diabetes mellitus; miRNA: micro-RNA; Ref: referencia; TCS: tejido celular subcutáneo

1.7. SÍNDROME DE APNEA DEL SUEÑO Y MICRO-RNA

La característica fundamental de la AOS son los episodios de apnea repetidos durante la noche, que se traducen en HIC. La relación entre hipoxia crónica y miRNA circulante está muy estudiada, con el miR210 como su principal exponente (145, 146). Existen dos tipos de episodios de hipoxia durante el sueño: los episodios de hipoxemia intermitentes que característicamente están asociados con AOS, y la hipoxemia mantenida durante un periodo más o menos largo (por ejemplo, en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC). Estas diferencias pueden tener consecuencias sobre la presencia de miRNA. En el estudio de Lacedonia *et al.* (147), se demuestra que el miR21 está sobreexpresado únicamente en pacientes con hipoxia intermitente, lo que lo posiciona como un protagonista de dicho tipo de hipoxia y, por tanto, como un biomarcador útil para pacientes con AOS.

Los determinantes de patogenicidad de la AOS no están bien delimitados. Se han vinculado con comorbilidades como la obesidad y parece haber una contribución genética y ambiental en ellos (148). La disfunción endotelial (70) también se encuentra determinada por los exosomas y su contenido de miRNA. A esta conclusión llegan Khalyfa *et al.* (149) en un estudio llevado a cabo en 128 niños en los que estudian el tipo de exosomas y su comportamiento *in vitro* e *in vivo* en función de la existencia de disfunción endotelial. El grupo de pacientes con disfunción endotelial mostró un tipo de exosomas que, al aplicarlos tanto a modelos *in vitro* (cultivo de células endoteliales) como a modelos *in vivo* (inyección intravascular de exosomas en ratones), desencadenaban la disfunción endotelial. Esa alteración también se producía, aunque en menor medida, en pacientes sin disfunción endotelial, pero con obesidad o AOS. El contenido de esos exosomas presentó diferencias significativas entre los pacientes con disfunción endotelial y sin ella, con un descenso en la expresión de miR16 y miR630 en los pacientes que la presentaban, independiente de si padecían obesidad o AOS. Además, observaron que la solución quirúrgica de la AOS devolvía a la normalidad los valores de ambos miRNA pasados entre 4 y 8 meses. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto la necesidad de estudiar la acción de ambas condiciones, la obesidad y la AOS, conjuntamente.

La HIC en ratones no obesos ha demostrado que altera el metabolismo de la glucosa y aumenta la resistencia a la insulina, siendo este deterioro aún mayor en los casos de los ratones obesos sometidos a HIC (150, 151). Estos hallazgos sugieren que el tejido adiposo es un mecanismo efector en la fisiopatología de la AOS y que sufre de manera especial los episodios de desaturación nocturna (152). Pero el tejido adiposo no es el único órgano diana,

ya que la HCI ha demostrado, en modelo murino, alterar tanto el endotelio vascular como la expresión de sus miRNA (153).

Además de la HCI, la otra consecuencia de la AOS, la fragmentación del sueño, también ha demostrado que tiene consecuencias negativas sobre el medio interno. En una serie de estudios llevados a cabo en modelo murino por el grupo de Gozal y Khalyfa, se ha demostrado que la fragmentación del sueño altera la maquinaria transcripcional del tejido adiposo, modifica hasta 19 miRNA y altera la regulación metabólica de los ratones (154).

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

La traslación a la clínica de los estudios *in vitro* o en animales sobre la relación entre hipoxia intermitente (o fragmentación del sueño) y disfunción metabólica o cardiovascular siempre va a ser cuestionable. En nuestra opinión, para dilucidar el papel por separado de la obesidad y de la AOS sobre los miRNA exosomales como agentes moduladores de morbilidad cardiovascular es necesario determinar el comportamiento de estos miRNA en los siguientes grupos: 1) cohortes de pacientes con AOS (sin y con obesidad), seguidas por un tiempo suficiente; 2) sujetos que reciben tratamiento del AOS (por ejemplo, mediante CPAP) sin y con obesidad asociada; y 3) personas obesas con o sin AOS tratados mediante CB.

Con esta tesis se pretende aportar alguna luz a esta importante cuestión, ya que tenemos la oportunidad de poder estudiar a un amplio grupo de pacientes con OM antes de CB y tras ella. Planteamos un estudio prospectivo para evaluar cambios epigenéticos a nivel de los miRNA exosomales que sufren los pacientes obesos mórbidos con AOS y sin AOS antes y después de CB. Los resultados, además, se compararán con los obtenidos en pacientes no obesos sin comorbilidad con y sin AOS procedentes del estudio EPIOSA (155).

Con todo lo expuesto, planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: «Existe un perfil epigenético específico en pacientes con solapamiento OM y AOS que viene dado por la suma del efecto de la hipoxia crónica tisular sobre los adipocitos y por la hipoxia crónica intermitente debida a la AOS. Hipotetizamos que existen anomalías en los miRNA exosomales circulantes propias del estado de OM, que se modificarán tras la CB, y cambios en la carga exosomal de miRNA secundarios a la acción de la AOS, que se modificarán con el tratamiento de CPAP» (Figura 18).

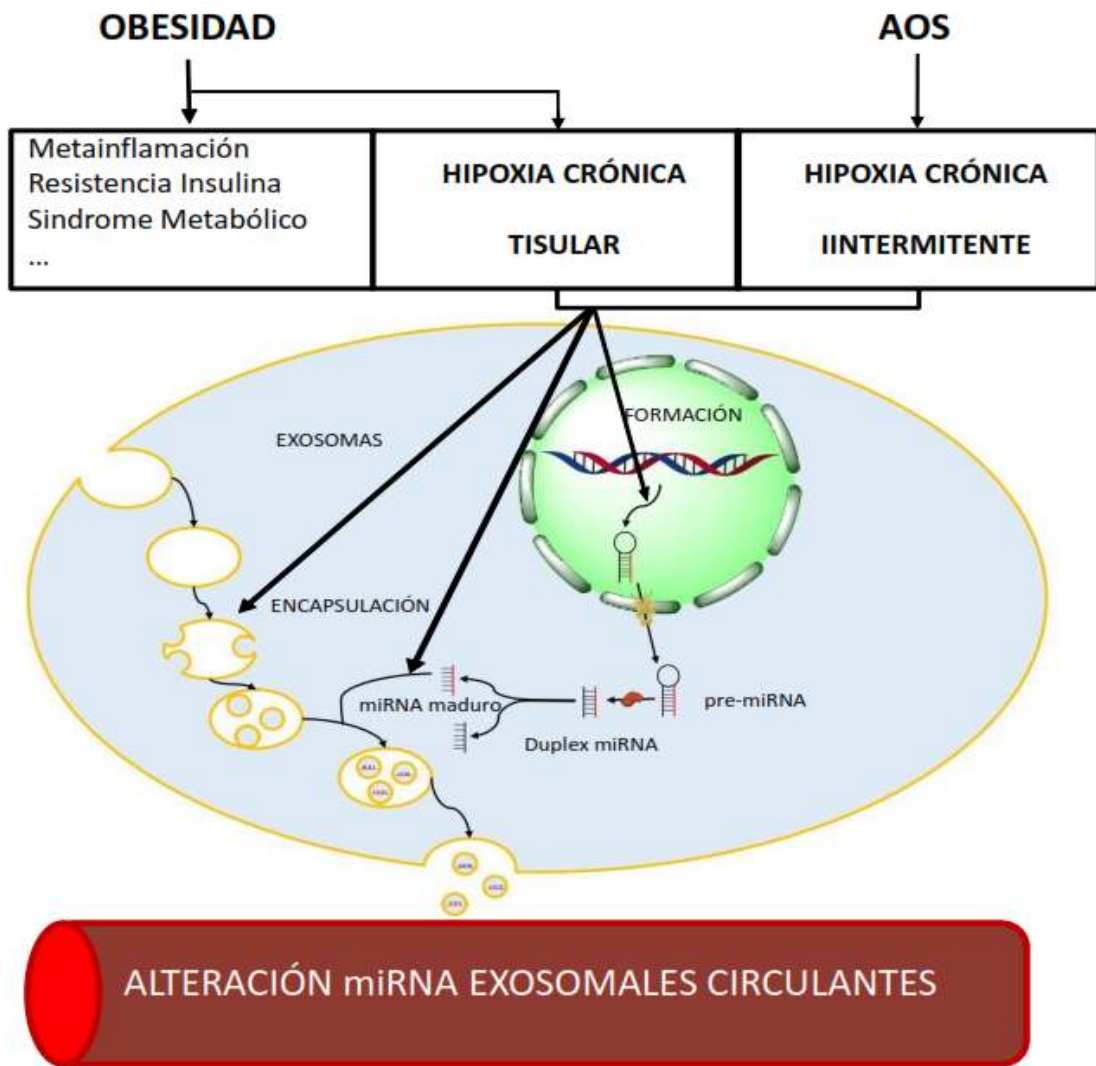


Figura 18. Hipótesis de trabajo

3. OBJETIVO

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

En pacientes con OM candidatos a CB, determinar las diferencias en una batería de miRNA exosomales circulantes asociados a inflamación o riesgo cardiovascular, entre sujetos con y sin AOS asociado, y sus cambios tras tratamiento mediante CPAP y CB.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar la prevalencia de AOS y el comportamiento de los factores predictores clásicos de AOS en pacientes con OM.
2. En pacientes con OM, establecer diferencias en la carga de miRNA exosomales circulantes en función de la presencia de AOS.
3. En pacientes con OM, valorar el impacto del tratamiento con CPAP en la expresión de los miRNA exosomales y sus diferencias con pacientes no obesos.
4. En pacientes con OM, valorar el impacto de la pérdida de peso inducida por la CB en la expresión de los miRNA exosomales.
5. En pacientes con OM, evaluar la relación de los parámetros antropométricos en función del diagnóstico de AOS y su relación con los miRNA exosomales.
6. En pacientes con OM, determinar la evolución de los parámetros bioquímicos (perfil glucémico y lipídico) y su relación con los miRNA exosomales.
7. En pacientes con OM, evaluar la influencia de la AOS en los parámetros gasométricos diurnos y poligráficos nocturnos y su relación con los miRNA exosomales.

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Para comprobar la hipótesis de trabajo se ha planteado un estudio sobre una cohorte de pacientes con OM con y sin AOS, con carácter prospectivo y controlado. El estudio se considera de no intervención, ya que la decisión de recibir tratamiento con CPAP y la decisión quirúrgica no se aleatorizó, sino que se realizó de acuerdo con una decisión clínica no programada en el diseño del estudio. El protocolo del presente estudio se presentó ante el Comité de Ética e Investigación Clínica de Aragón y fue aceptado por él (anexo 1). Dicho protocolo ha sido registrado en ClinicalTrials.gov, de la US National Library of Medicine (Estados Unidos), bajo el título «Epigenetics dysfunction in morbid obesity with or without obstructive sleep apnea: The EPIMOOSA study» (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03995836) (156).

4.2. POBLACIÓN EN ESTUDIO

Todos los pacientes incluidos en el estudio tenían una edad superior a 18 años, estaban diagnosticados de OM y en espera de CB en el Hospital Royo Villanova (Zaragoza). El reclutamiento de los pacientes se extendió desde el 1 de julio de 2014 hasta el 1 de julio de 2016.

4.3. TAMAÑO MUESTRAL

El cálculo muestral se determinó en la hipótesis de que en un grupo de 30 pacientes con AOS grave el tratamiento con CPAP redujo de forma significativa el espesor de la capa íntima-media de las arterias carótidas tras 3 meses de terapia efectiva (157). Se conformaron dos grupos de pacientes: a) sujetos con OM y sin AOS; y b) pacientes con OM y AOS que requieren tratamiento con CPAP. La composición mínima de cada subgrupo fue de al menos 12 sujetos con un seguimiento de 2 años tras su inclusión en la visita basal.

Este tamaño se calculó para demostrar diferencias significativas en las modificaciones epigenéticas entre subgrupos con AOS y el grupo control (objetivo principal). En un estudio previo, Kim *et al.* (158) demostraron diferencias significativas en la metilación del DNA de genes proinflamatorios entre dos subgrupos de 8 niños con AOS con PCR alta o baja. En nuestra propia cohorte, se evidenciaron diferencias significativas en los niveles de exosomas circulantes en grupos de 12 pacientes con AOS frente a los controles. Así pues, considerando una pérdida potencial del 10 % de casos durante el seguimiento, planteamos incluir 15 sujetos

por subgrupo analizables tras un seguimiento mínimo de 2 años. Ello conformará la inclusión de un total de 30 casos.

4.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión:

- Firma del consentimiento informado (anexos 2 y 3).
- Obesidad mórbida pendiente de CB.
- Intervención quirúrgica prevista más de un año después de la primera visita.

Criterios de exclusión:

- Denegación del consentimiento informado.
- Realización de un estudio del sueño previo a su inclusión en el estudio.
- Tratamiento previo con CPAP.
- Enfermedades crónicas de tipo inflamatorio o autoinmune.
- Diagnóstico de neoplasia en los últimos 5 años.
- Evento cardiovascular en los últimos 6 meses.
- No completar cada una de las visitas programadas.

4.5. PROCEDIMIENTOS

Antropometría. Las medidas antropométricas se realizaron mediante cinta metrada (3 m) y báscula para pacientes obesos homologada, disponible en el laboratorio de pruebas funcionales del Servicio de Neumología del Hospital Royo Villanova.

Estudios de sueño. La poligrafía de sueño se llevó a cabo mediante el polígrafo Apnea Link Air Resmed® y la titulación de la CPAP se realizó con un sistema AutoCPAP Resmed®.

Muestras biológicas. El análisis de las muestras de sangre se llevó a cabo de manera ordinaria por el laboratorio de nuestro centro en el contexto del manejo habitual del paciente. Dicho laboratorio dispone de un ultracongelador capaz de alcanzar -80°C , donde se

almacenaron las alícuotas de plasma y suero. La extracción de sangre periférica se realizó en condiciones estériles en un tubo de 10 ml con EDTA tras la información y la firma del consentimiento informado.

Espirometría. Se realizó de manera ordinaria en el laboratorio de pruebas funcionales del Servicio de Neumología del Hospital Royo Villanova, siguiendo los procedimientos de la SEPAR (159).

4.6. CRONOGRAMA

La inclusión de los pacientes comenzó en julio de 2014, solapándose con la estrategia asistencial de la Unidad de Cirugía Bariátrica del centro. Los pacientes fueron captados dentro del grupo de pacientes en lista de espera de CB. El periodo de reclutamiento dura 2 años, y el de seguimiento son 6 meses después de la poligrafía y un año después de la cirugía. Como se ve en la Figura 19, se realizaron un total de tres visitas a lo largo de dos años, excluyendo la visita a los 3 meses, en la que se realiza el auto-CPAP, y la de la cirugía, donde no se recogió ninguna variable.

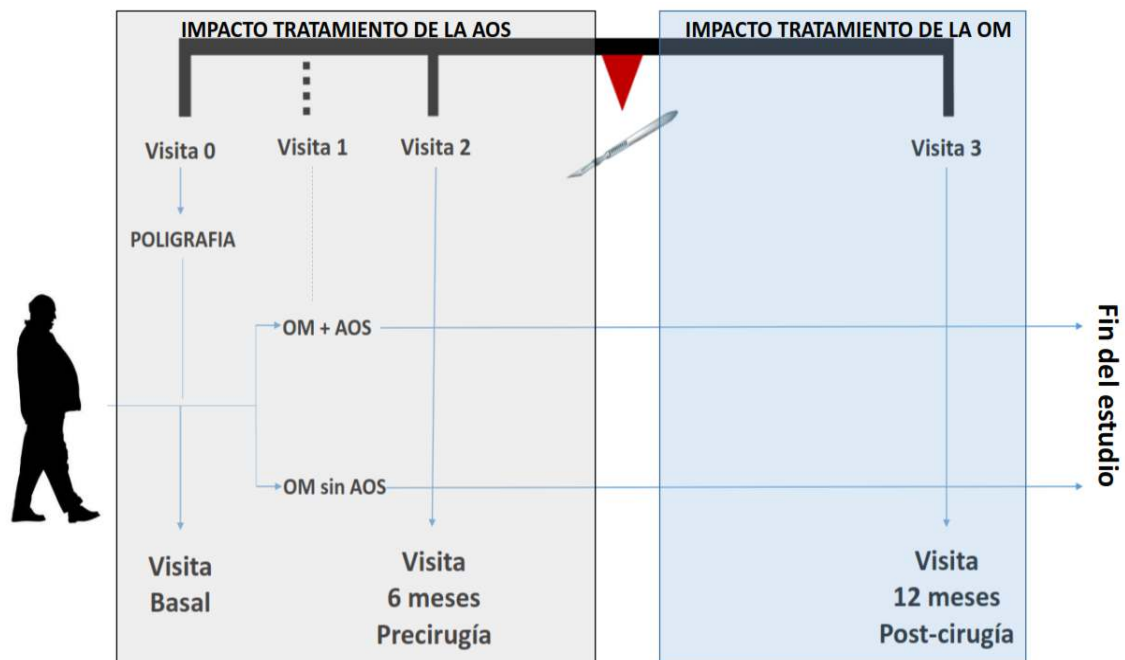


Figura 19. Cronograma del estudio

AOS: apnea obstructiva del sueño; OM: obesidad mórbida.

4.7. VARIABLES DE ESTUDIO

Las variables de estudio se incluyeron en hojas de recogida de datos específicamente diseñadas y agrupadas a partir de las fuentes de información que se describen a continuación.

4.7.1. Historia clínica

Factores de riesgo cardiovascular. Se consideraron factores de riesgo los siguientes:

- *Tabaquismo.* Se definió como el consumo de al menos un cigarrillo en los últimos 6 meses.
- *Hipertensión arterial.* Se definió como cualquier presión mayor de 140 mmHg de tensión arterial sistólica (TAS) o mayor de 90 mmHg de tensión arterial diastólica (160), o bien que se encontraran en tratamiento antihipertensivo.
- *Hipercolesterolemia.* Se definió como la elevación de los valores de colesterol total y de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad), o bien pacientes que ya se encontraran en tratamiento farmacológico por esta causa (161).
- *Diabetes mellitus.* Se definió como la existencia de alguna de estas situaciones:
 - a) Glucosa en ayunas > 126 mg/dl en dos ocasiones (162).
 - b) Hemoglobina glicosilada > 6,5 % en dos ocasiones (162).
 - c) Paciente en tratamiento con antidiabéticos o insulina.

Antecedentes de eventos cardiovasculares. Se consideró como evento cardiovascular cualquiera de estas situaciones:

- Infarto agudo de miocardio.
- Taquiarritmia (fibrilación auricular u otras).
- Accidente cerebrovascular de tipo isquémico.
- Cualquier otro evento isquémico sistémico.

Cuestionario de sueño:

- Apneas presenciadas (dicotómica).
- Sensación de sueño no reparador (dicotómica).
- Roncopatía (dicotómica).
- Test de Epworth (anexo 4).

4.7.2. Antropometría

Las medidas antropométricas se tomaron la mañana siguiente de la realización de la poligrafía en la visita basal y en la visita a los 12 meses tras la cirugía o el mismo día de la visita en la segunda visita. El paciente acudió a la cita en ayunas.

- Peso y talla. Tanto el pesado como el tallado se realizarán con la báscula del servicio. Cálculo del IMC: peso en kilogramos/talla en metros cuadrados.
- Perímetro del cuello, abdominal y de cadera. Todas las medidas se tomaron con el paciente en bipedestación y respirando normalmente. Se utilizó la misma cinta métrica, colocándose sobre la piel y sin comprimirla.
 - Medición del perímetro del cuello.
 - Medición del perímetro abdominal: se definió como la circunferencia abdominal mínima entre la parte inferior de la parrilla costal y la línea que une la parte superior de ambas crestas ilíacas.
 - Medición del perímetro de cadera: se definió como la circunferencia que une ambas cabezas femorales.
 - Índice cintura-cadera: se definió como el cociente entre el perímetro abdominal y el perímetro la cadera, ambos en centímetros.

4.7.3. Pruebas complementarias

Medición de la tensión arterial. La medición de la presión arterial se llevó a cabo con un esfigmomanómetro manual, realizando dos medidas consecutivas y calculando la media entre ambas. La medición de la presión arterial se hizo siguiendo las recomendaciones de la guía clínica de hipertensión de la Sociedad Europea de Cardiología (anexo 5).

Poligrafía cardiorrespiratoria domiciliaria. Se llevó a cabo con dos polígrafos Apnea Link Resmed®. Se explicó cómo colocar los sensores para la medición (flujo oronasal, bandas torácicas y abdominales, pulsioximetría, sensor de posición, micrófono de ronquido). Definimos una apnea como la ausencia de flujo durante más de 10 segundos; una hipopnea, como la reducción del flujo de aire en más del 50 % durante más de 10 segundos, acompañada de un descenso en los niveles de oxígeno mayor del 4 %. El índice de apneas e hipopneas (IAH) se expresa como la suma de apneas e hipopneas por hora del periodo de tiempo grabado. Las variables obtenidas para su análisis fueron las siguientes: IAH por hora de registro (IAH), saturación de oxígeno (SatO₂) media, SatO₂ mínima, y porcentaje de tiempo con una SatO₂ por debajo del 90 % (CT₉₀).

Gasometría arterial basal. Se obtuvo al día siguiente de la realización de la poligrafía respiratoria mediante punción de la arteria radial de la mano no dominante sin administración de anestesia local.

Analítica general. Lo mismo que la gasometría, se llevó a cabo al día siguiente de la realización de la poligrafía, entre las 8:00 y las 8:30 de la mañana, en ayunas; y la visita restante, el mismo día.

Se extrajeron 10 cm³ de sangre y, tras su procesamiento específico, se guardaron muestras de suero y plasma para *biobanking* y determinaciones ulteriores. En tubos de Paxgene se guardaron muestras congeladas para determinar marcadores epigenéticos.

La bioquímica general se realizó inmediatamente en el laboratorio del hospital para obtener los siguientes parámetros:

- Perfil glucémico: glucosa en ayunas, hemoglobina glicosilada.
- Perfil lipídico: colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos y apolipoproteína A y B.
- Proteína C-reactiva (PCR).

4.8. DETERMINACIÓN DEL MICRO-RNA EXOSOMAL

El estudio de los exosomas circulantes y del miRNA contenido se llevó a cabo en el laboratorio de la Unidad Traslacional del Hospital Miguel Servet de Zaragoza. La determinación de los miRNA que se iban a estudiar siguió el siguiente esquema:

1. Aislamiento de los exosomas presentes en el plasma.

2. Extracción del RNA total de los exosomas previamente aislados.
3. Determinación de miRNA mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rtPCR).

4.8.1. Aislamiento de los exosomas presentes en el plasma

Las muestras de sangre obtenidas en cada una de las visitas se congelaron en el congelador del Hospital Royo Villanova a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez que finalizó la inclusión de pacientes, en contenedores con hielo seco se trasladaron a la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital Miguel Servet.

Siguiendo los resultados publicados por nuestro grupo de investigación, se analizaron los exosomas procedentes de plasma congelado (127). Una vez descongelado el plasma, se utilizó el miRCURY Exosome Isolation Kit (Exiqon), como se explica esquemáticamente en la Figura 20.

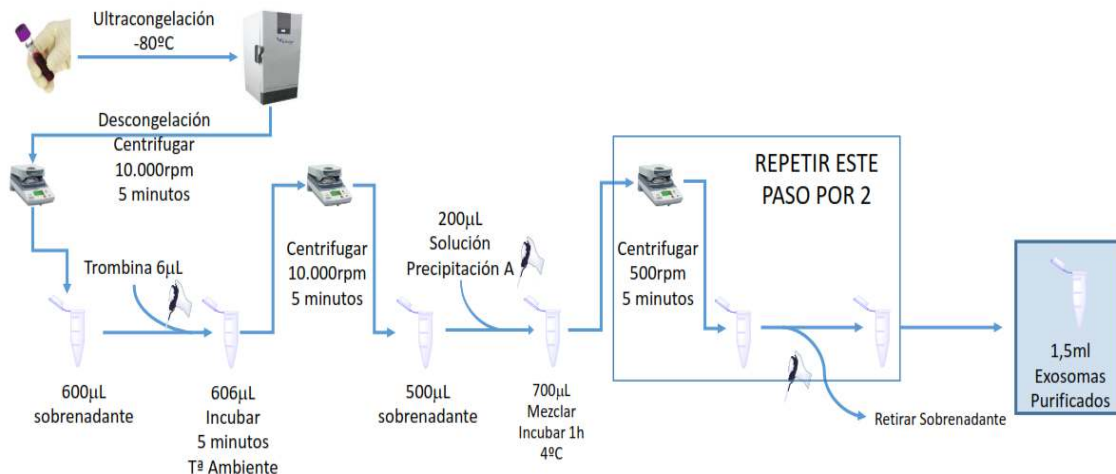


Figura 20. Proceso de aislamiento de los exosomas

4.8.2. Extracción del RNA total

Una vez aislados los exosomas, se procedió a liberar el contenido de RNA de su interior, para lo que utilizamos el miRCURY RNA Exosome Isolation Kit (Exiqon). El proceso se expone esquemáticamente en la Figura 21.

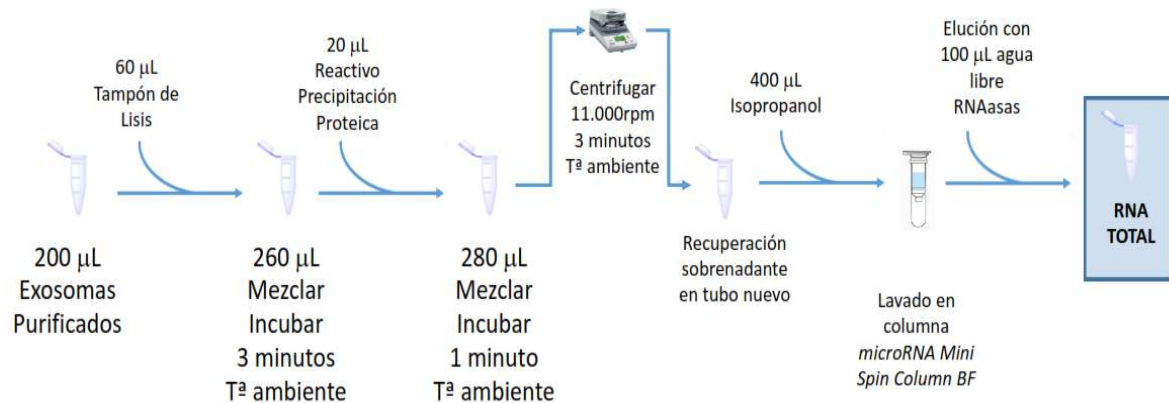


Figura 21. Extracción del RNA total de los exosomas purificados

4.8.3. Determinación del micro-RNA mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rtPCR)

El análisis del RNA se llevó a cabo mediante rtPCR. Dado que las moléculas para estudiar son RNA, el proceso se inicia con la retrotranscripción, para lo que se utilizó el kit comercial miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Kit (Exiqon).

La técnica utilizada para la cuantificación de las muestras de miRNA fue la rtPCR, siguiendo las especificaciones del fabricante del kit citado anteriormente. Los miRNA analizados en el presente estudio fueron los relacionados con episodios de hipoxia que mayor estabilidad presentaron en el análisis por nuestro grupo tras la congelación del plasma (127).

4.8.4. Determinación de la cantidad relativa de micro-RNA

El análisis se llevó a cabo sobre los valores del ciclo umbral o *cycle threshold* (C_t), es decir, el número mínimo de ciclos de PCR necesarios para que se produzca una señal cuantificable, según el método $\Delta\Delta C_t$, descrito por Livak *et al.* en 2001 (163). El cálculo de este valor requiere la determinación de dos diferenciales (Δ). En primer lugar, el diferencial entre los C_t del miRNA que se estudia y el miRNA considerado como normalizador. El segundo diferencial se obtuvo de la diferencia entre el ΔC_t medio de cada grupo de análisis y el del grupo de referencia de los demás grupos, obteniendo de esta forma el $\Delta\Delta C_t$. Finalmente, según el desarrollo matemático propuesto por Livak, el valor definitivo se obtuvo tras la transformación exponencial de $\Delta\Delta C_t$, es decir $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

4.8.5. Selección de micro-RNA para el estudio

Se realizó una búsqueda bibliográfica para la selección de miRNA relacionados con obesidad, hipoxia, inflamación y aterosclerosis. En la Tabla 5 se muestran los miRNA que se estudiaron

y el indicio de su relación con cada uno de los ítems seleccionados. La búsqueda se realizó en PubMed utilizando la combinación de los descriptores: «miRXXX» OR «circulating miRXXX» AND «Obesity», «hipoxia», «inflammation», «cardiovascular disease» y «atherosclerosis». Se han incluido, indistintamente, tanto los hallazgos relativos a miRNA circulantes como los hallados en otros tejidos (como el adiposo, las células endoteliales, las células de músculo liso vascular, los estudios *in vitro*...).

Tabla 5. Selección de micro-RNA para el estudio

	miR 16	miR 21	miR 34	miR 126	miR 133	miR 145	miR 146	miR 155	miR 223	miR 320
Aterosclerosis	↓ (164)	↑ (165, 166)	↑ (165)	↓ (165, 167)	↓ (168, 169)	↓ (170)	↑ (101, 171)	↑ * (172)	↓ (173)	↑ * (168, 174)
Inflamación		↑ (175)	↑ (176)			↑ * (177)	↓↑ (178, 179)	↑ (180)	↑ (181)	↑* (168)
Hipoxia	↑ (182, 183)	↑ ** (147)	↓ (184, 185)	↑ (186)	↓ (187)	↑ ** (147)	↑ (188)	↑ (189)	↓ (190)	↑ (191- 193)
Obesidad		↑ (194- 197)	↑ (198, 199)	↑(199) ↓ (200)			↑* (199, 201)	↓ * (202)	↑ (199)	↑ *** (203)

↓ Expresión disminuida ↑ Expresión aumentada

* Estudios llevados a cabo sobre micro-RNA circulante.

+ Estudios llevados a cabo sobre micro-RNA exosomal.

** En hipoxia intermitente.

*** En adipocitos con resistencia a la insulina.

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se han realizado los siguientes procedimientos estadísticos:

- Descripción de poblaciones. Se expresaron en valores medios \pm desviaciones estándar cuando las variables eran continuas. Para las variables cualitativas se obtuvieron su distribución de frecuencias.
- Diferencias entre grupos: contrastes paramétricos t-Student o ANOVA si siguen una distribución normal, o mediante los contrastes U de Mann-Whitney o H de Kruskal Wallis si no se trabaja con dicha hipótesis. Para las variables cualitativas se utilizó el contraste habitual χ^2 , con el estudio de residuos estandarizados.

- Relación entre variables clínicas e inflamación sistémica: correlación de Pearson o de Spearman según sea el comportamiento de normalidad de las variables estudiadas.
- Efecto del tratamiento: test de *t* para datos pareados si se trabaja con el supuesto de normalidad, o test no paramétrico de Wilcoxon cuando la variable no sigue distribución normal.
- El proceso de análisis de los marcadores epigenéticos se realizó mediante el paquete GOstats) (204).
- Las diferencias entre los miRNA interindividuos se estableció por el coeficiente de variación. Los paquetes estadísticos utilizados fueron el GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) y el SPSS version 20.0 (IBM).

El IAH, como variable cuantitativa continua, se utilizó para crear los grupos con AOS y sin AOS, utilizando el valor 10 como punto de corte.

La expresión numérica de los miRNA es el *threshold cycle* (C_t), que se podría traducir como señal o ciclo umbral, es decir, el ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa en la que aparece por primera vez el miRNA que se estudia. Dado que este valor viene determinado por el momento en el que aparece la primera señal de un determinado miRNA, su interpretación es inversamente proporcional, es decir, a menor valor, mayor expresión del miRNA. Este valor por sí mismo no permite hacernos una idea de la expresión del miRNA, por lo que se debe normalizar. Como normalizador se seleccionaron el *let-7a* y el miR16, y tras aplicar la calculadora RefFinder (205) se decidió que el más estable era el *let-7a*, que fue el que finalmente se utilizó. De esta forma se calculó el ΔC_t :

$$\Delta C_t = (C_t \text{ miRNA en estudio})_i - (C_t \text{ let-7a})$$

La interpretación de este valor resulta compleja y poco intuitiva, ya que, cuanto más positivo es el resultado, menor es la expresión. Por ese motivo se opta por transformar los resultados utilizando la *fold change* o tasa de cambio (FC) o expresión relativa. Esta herramienta matemática nos permite relacionar el ΔC_t de un miRNA frente a la media de otro que utilizamos como control:

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t \text{ en estudio} - \overline{\Delta C_t \text{ grupo de control}}$$

Una vez calculado el $\Delta \Delta C_t$, ya podemos calcular la expresión relativa:

$$FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

En nuestro estudio hemos utilizado como grupo control los pacientes con OM sin AOS para los análisis independientes, y la visita basal para las comparaciones dependientes, en las que vemos la evolución en los pacientes con y sin AOS a lo largo de las distintas visitas. Con esta fórmula se obtiene un guarismo positivo a partir de 0, donde 1 es el punto de corte:

- $FC > 1$ implica una expresión positiva. Su interpretación será «el miRXXX experimentó un incremento de XX (>1) veces en su expresión».
- $FC < 1$ implica una expresión negativa. El valor se expresará manteniendo su formato («el miRXXX experimentó un descenso de XX (<1) veces en su expresión») o bien como porcentaje de reducción de la expresión («el miRXXX redujo su expresión en XX % [(1 - FC) × 100]»).

Los valores extremos o *outliers* de la expresión de los miRNA han sido eliminados del análisis utilizando el método *robust regression and outlier removal* (ROUT) con un Q = 1 % del paquete estadístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software).

Tras la pérdida de peso experimentada en la última visita, se analizó el impacto que la variación de este peso, así como el cambio en los parámetros del sueño, había tenido en la variación de los miRNA. Para ello se calculó, por un lado, la diferencia de los miRNA entre la visita basal y la última (ΔmiRNA); por otro lado, se calculó la diferencia relativa de IMC, IAH y CT_{90} (ΔIMC , ΔIAH , ΔCT_{90}):

$$\left(\frac{x \text{ inicial} - x \text{ final}}{x \text{ inicial}} \right) \times 100$$

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. VISITA BASAL

5.1.1. Descripción de la muestra

Entre el 1 de julio de 2014 y el 1 de julio de 2016 se realizaron cinco cortes de la lista de espera quirúrgica, cada 6 meses, para la inclusión de pacientes. Una vez aplicados los criterios de inclusión y exclusión, la muestra para su análisis se redujo a un total de 70 pacientes en la visita inicial y 24 tras completar todas las visitas (Figura 22).

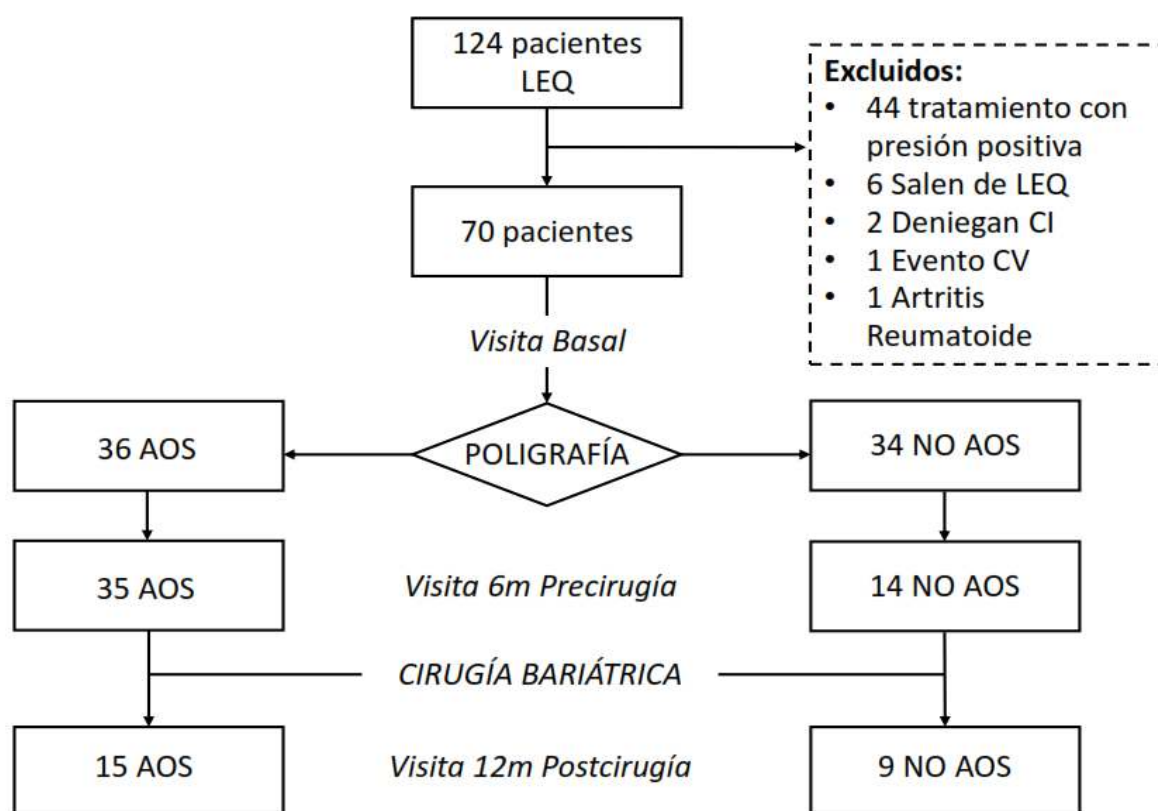


Figura 22. Flujograma de pacientes a lo largo del estudio

AOS: apnea obstructiva del sueño; LEQ: lista de espera quirúrgica; CI: consentimiento informado; CV: cardiovascular.

La prevalencia de AOS en aquellos pacientes que acudieron a la primera visita fue de 51,4 %. Dado que no todos los pacientes completaron todas las visitas, se han descrito ambas muestras estableciéndose las diferencias entre quienes presentaban AOS y quienes no la presentaban (Tabla 6). El análisis de los parámetros antropométricos, los parámetros del sueño, el perfil glucémico y el perfil lipídico se llevó a cabo en ambos grupos para asegurar su igualdad. Nuestro análisis, además, se comparó con los resultados presentados en la tesis

doctoral de David Sanz Rubio, *Micro-RNAs de exosomas circulantes en apnea obstructiva del sueño* (206), donde analiza la base de datos de EPIOSA (155). Para el análisis de miRNA se utilizaron las muestras de sangre de aquellos pacientes que completaron las tres visitas, y los resultados se compararon con los datos de la citada tesis. De esta forma, se pudo determinar el impacto de la obesidad, el tratamiento con CPAP y la CB en cada uno de los grupos.

En ambos grupos, los pacientes con y sin AOS, morfológicamente, muestran el mismo IMC, pero los primeros tienen un mayor perímetro de cuello (media y desviación estándar: $44 \pm 3,7$ frente a 40 ± 3 , $p < 0,001$) e incluyen a un mayor porcentaje de hombres (53 % frente a 15 %, $p < 0,001$). Los pacientes con AOS son mayores (48 ± 8 años frente a $40,5 \pm 8$ años, $p < 0,001$) y muestran una mayor prevalencia de comorbilidades. En el grupo de pacientes que completan el estudio, el grupo de AOS fueron mayores (49 ± 9 años frente a $42,5 \pm 8$ años), pero las diferencias no alcanzaron la significación estadística. Lo mismo ocurrió con el perímetro abdominal y la TAS, con una media superior en ambas variables para el grupo con AOS (perímetro abdominal: 128 ± 13 cm frente a 118 ± 15 cm; TAS: 135 ± 13 mmHg frente a 129 ± 10 mmHg), pero sin alcanzar la significación estadística.

Tabla 6. Variables de la visita basal del total de la muestra (n = 70) y de los que completaron el estudio (n = 24)

VARIABLES	TOTAL EN LA PRIMERA VISITA		COMPLETAN EL ESTUDIO	
	Sin AOS	Con AOS	Sin AOS	Con AOS
n	34	36	9	15
Sexo [femenino; n (%)]	29 (85,3)	17 (47,2) ***	8 (88,9)	6 (40) *
Edad (años)	40,5 ± 7,9	47,9 ± 8,2 ***	42,4 ± 7,9	49,6 ± 9
Peso (kg)	113,4 ± 13,8	121,1 ± 16,4 *	116,3 ± 13,2	117 ± 13,1 *
IMC (kg/m ²)	41,6 ± 3,8	43 ± 4,8	42 ± 1,5	42 ± 3,1
Perímetro del cuello (cm)	40,2 ± 3,1	43,9 ± 3,7 ***	40,4 ± 4,2	44,6 ± 4,1 **
Perímetro abdominal (cm)	119,1 ± 10,6	129,3 ± 13,3 ***	118,4 ± 14,7	127,8 ± 12,8 *
Perímetro de la cadera (cm)	134,1 ± 9,1	134,4 ± 14,1	136,1 ± 10,9	129,9 ± 10
Índice cintura-cadera	0,89 ± 0,09	0,96 ± 0,11 **	0,87 ± 0,14	0,99 ± 0,12 *
Epworth	7,2 ± 3,5	7,9 ± 4,4	8,8 ± 4	9,2 ± 4,8
IAH (eventos/hora)	3,8 ± 2,3	32,9 ± 23,6 ***	4,5 ± 3	35,5 ± 21,7 ***
CT ₉₀ (%)	4 ± 7,5	33,2 ± 27,9 ***	1,7 ± 1,7	30,4 ± 23,9 ***
SatO ₂ (%)	93,8 ± 1,2	91 ± 2,6 ***	94,3 ± 1,1	91,2 ± 2,1 ***
Fumador activo	5 (14,7)	10 (27,8)	4 (16)	7 (33,3)
Exfumador	11(32,4)	19 (52,8)	8 (32)	9 (42,9)
Nunca fumador	18 (52,9)	7 (19,4) *	13 (52)	5 (23,8)
Hipertensión arterial	14 (41,2)	23 (63,9) *	6 (66,7)	10 (66,7)
Dislipemia	6 (17,6)	20(55,6) ***	1 (11,1)	10 (66,7) **
Diabetes mellitus	9 (26,5)	20 (55,6) **	1 (11,1)	9 (60) **
Evento cardiovascular	3 (8,8)	4 (11,1)	1 (11,1)	2 (13,3)
Asma	2 (5,8)	3 (8,3)	0	1 (6,7)
Consumo de fármacos sedantes	8 (23,5)	7 (19,4)	1 (11,1)	2 (13,3)
FEV ₁ (l)	3,19 ± 0,84	2,99 ± 0,9	3,36 ± 0,98	2,86 ± 0,75
FEV ₁ (%)	100,9 ± 13,8	93,8 ± 17,4 *	103,2 ± 5,4	88,5 ± 15,3 **
TAS (mmHg)	129,5 ± 13,7	140,6 ± 16,2 **	129,4 ± 10	135,5 ± 13,6
TAD (mmHg)	85,4 ± 8,4	87,9 ± 11,4	84,4 ± 8,7	90 ± 12,2

CT₉₀: porcentaje de tiempo con saturación de oxígeno por debajo del 90 %; FEV₁: volumen espiratorio máximo en el primer segundo; IAH: índice de apneas e hipopneas; IMC: índice de masa corporal; SatO₂: saturación de oxígeno; TAD: tensión arterial diastólica; TAS: tensión arterial sistólica. Variables Cualitativas: Frecuencia (%). Variables Cuantitativas: media (Desviación Estándar). Con AOS frente sin AOS, U de Mann Whitney; variables cualitativas, χ^2 ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se ha descrito previamente, se utilizaron los datos de pacientes del estudio EPIOSA, que incluye pacientes sin OM (IMC < 35 kg/m²) y sin comorbilidades. Las diferencias se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Descripción de las muestras de EPIOSA y EPIMOOSA

VARIABLES	EPIOSA		EPIMOOSA	
	Sin AOS (n = 16)	Con AOS (n = 65)	OM sin AOS (n = 9)	OM con AOS (n = 15)
Edad (años)	47,8 ± 6,3	45,1 ± 9,3	42,4 ± 7,9	49,6 ± 9
Sexo [femenino; n (%)]	3 (18,7)	6 (18,1)	8 (88,9)	6 (40)
IMC (kg/m ²)	28,9 ± 3,6	30,3 ± 3,7	42 ± 1,5	42 ± 3,1
TAS (mmHg)	119,7 ± 11,3	127,2 ± 13,6	129,5 ± 15	144,2 ± 17,2 *
TAD (mmHg)	72,7 ± 7,8	82,1 ± 12,2 *	84,4 ± 8,7	90 ± 12,2 *
Epworth	10,6 ± 3,8	11,2 ± 5	6,67 ± 3,3	7 ± 3,9
IAH (eventos/hora)	2 ± 2	38,2 ± 20,5 *	4,5 ± 3	35,5 ± 21,7 *
SatO ₂ media (%)	94,5 ± 1,2	92,8 ± 2,2 *	94,3 ± 1,1	91,2 ± 2,1 *
CT ₉₀ (%)	2,9 ± 6,5	17,6 ± 17 *	1,7 ± 1,7	30,4 ± 23,9 *
Glucosa (mg/dl)	91,5 ± 11,2	92,8 ± 11,9	100,1 ± 8,4	113 ± 14,6 *
Hemoglobina glicosilada (%)	-	-	5,7 ± 0,4	5,9 ± 0,4
Colesterol total (mg/dl)	205,6 ± 37,5	207,4 ± 38,9	180,8 ± 26,2	186 ± 29,3
HDL (mg/dl)	53,8 ± 15,4	49 ± 11,9	53 ± 8,6	45,2 ± 14,8
LDL (mg/dl)	129 ± 27,7	126,3 ± 33,2	106,2 ± 27,8	111 ± 31,7
Ácido úrico (mg/dl)	5,39 ± 0,9	6,3 ± 1,3 *	5,9 ± 2	6,8 ± 1,6 *
Triglicéridos (mg/dl)	114,2 ± 41,3	150,1 ± 74,9	107,5 ± 38,9	138,8 ± 59,4
Creatinina (mg/dl)	0,84 ± 0,15	0,86 ± 0,16	0,74 ± 0,15	0,88 ± 0,18
Urea (mg/dl)	32,7 ± 7,3	32,6 ± 7,5	36,8 ± 13,1	34,1 ± 8,1
Apolipoproteína A (mg/dl)	149,8 ± 24,8	147,5 ± 27,7	143,4 ± 18	137,2 ± 26,2
Apolipoproteína B (mg/dl)	103,7 ± 23,4	108,6 ± 30,3	92,7 ± 20,5	104,2 ± 25,4
PCR (mg/dl)	0,24 ± 0,19	0,43 ± 0,41	0,86 ± 0,61	0,71 ± 0,45

CT₉₀: porcentaje de tiempo con saturación de oxígeno por debajo del 90 %; HDL: lipoproteína de alta densidad; IAH: índice de apneas e hipopneas; IMC: índice de masa corporal; LDL: lipoproteína de baja densidad; PCR: proteína C-reactiva; SatO₂: saturación de oxígeno; TAD: tensión arterial diastólica; TAS: tensión arterial sistólica. Variables cualitativas: frecuencia (%). Variables Cuantitativas: media y desviación estándar. Con AOS frente sin AOS, U de Mann Whitney; variables cualitativas, χ^2 ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

De los 70 pacientes inicialmente estudiados, 24 completaron todas las visitas. El análisis final de resultados se realizó en 15 pacientes con AOS y 9 pacientes sin AOS. Pese a la significativa reducción del número de casos, las diferencias entre pacientes con y sin AOS se mantiene en relación con el perfil antropométrico y las variables clínicas evaluadas. Por tanto, estos subgrupos representan la globalidad de la población de pacientes con CB inicialmente atendidos en la Unidad de Cirugía Bariátrica. Los 15 pacientes diagnosticados de AOS recibieron tratamiento con CPAP de acuerdo con el criterio clínico extraído de la guía clínica de la SEPAR.

5.1.2. Diferencias en la expresión de micro-RNA exosomales circulantes

Los pacientes con OM y AOS tuvieron una expresión significativamente superior de micro-RNA exosomal circulante que los pacientes sin AOS para el miR16, el miR126 y el miR320 ($FC_{miR16} = 2,06$; $FC_{miR126} = 1,8$; $FC_{miR320} = 2,1$), mientras que el miR223 presentó una menor expresión que en los pacientes sin AOS ($FC_{miR223} = 0,60$) (Figura 23). No se establecieron diferencias significativas en la expresión del resto de miRNA (datos mostrados en el anexo 6).

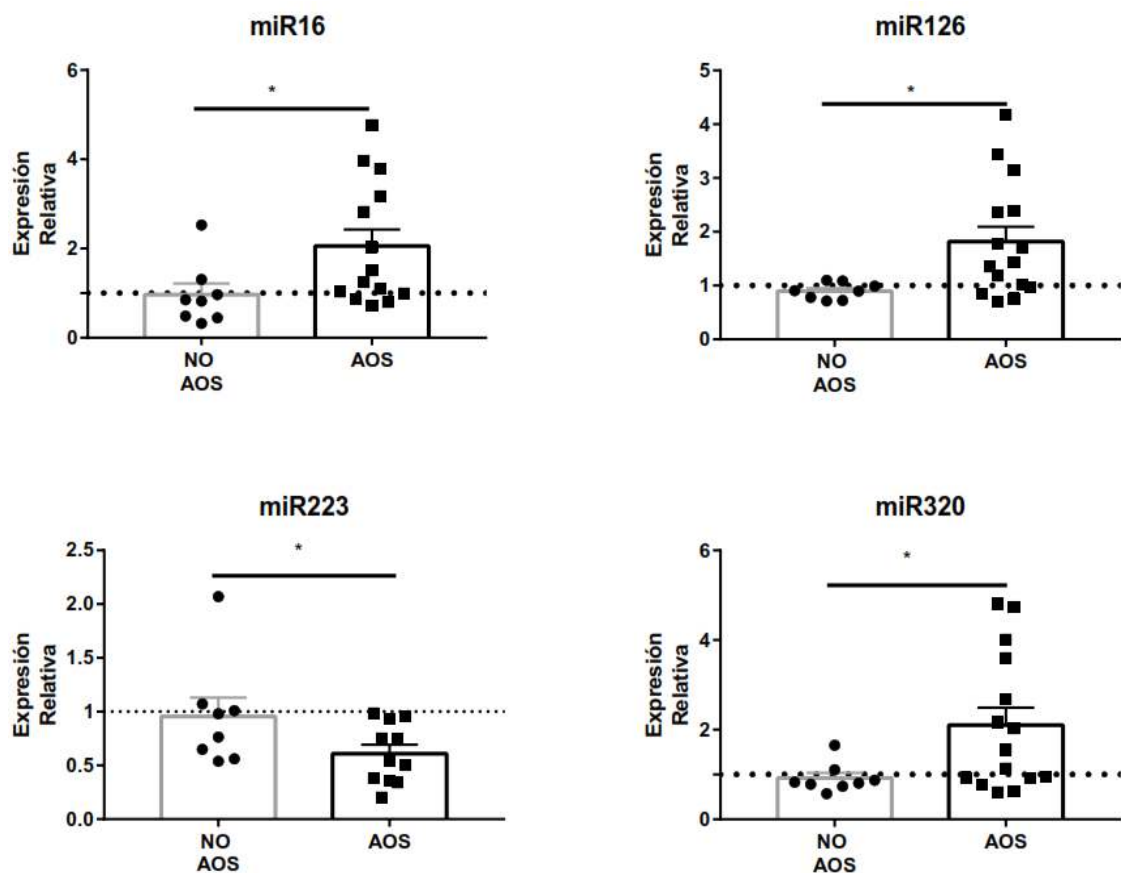


Figura 23. Diferencia en la expresión de micro-RNA exosomal en pacientes con obesidad mórbida con y sin apnea obstructiva del sueño

AOS: apnea obstructiva del sueño. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los miRNA analizados se seleccionaron por su vinculación con la arterosclerosis, y segmentamos los resultados en función de la HTA, la DLP y la DM. En pacientes con DLP y DM no pudimos analizar las diferencias entre padecer o no AOS dado que tan solo un paciente con esas comorbilidades no padecía AOS. Pero con la HTA sí que se pudo llevar a cabo el análisis. La expresión de los miRNA entre individuos sin HTA con y sin AOS no fue significativa. En segundo lugar, en los pacientes hipertensos pudimos comprobar cómo quienes padecían AOS tenían una mayor expresión frente a quienes no la padecía en el miR126 (FC = 2,06; $p = 0,031$) y miR320 (FC = 2,42; $p = 0,013$) (Figura 24). El miR223 demostró una menor expresión en los pacientes con AOS sin DM y en los que no padecían DLP que los que no tenían AOS (FC = 0,53, $p = 0,042$, y FC = 0,25, $p = 0,030$, respectivamente) (Figura 24).

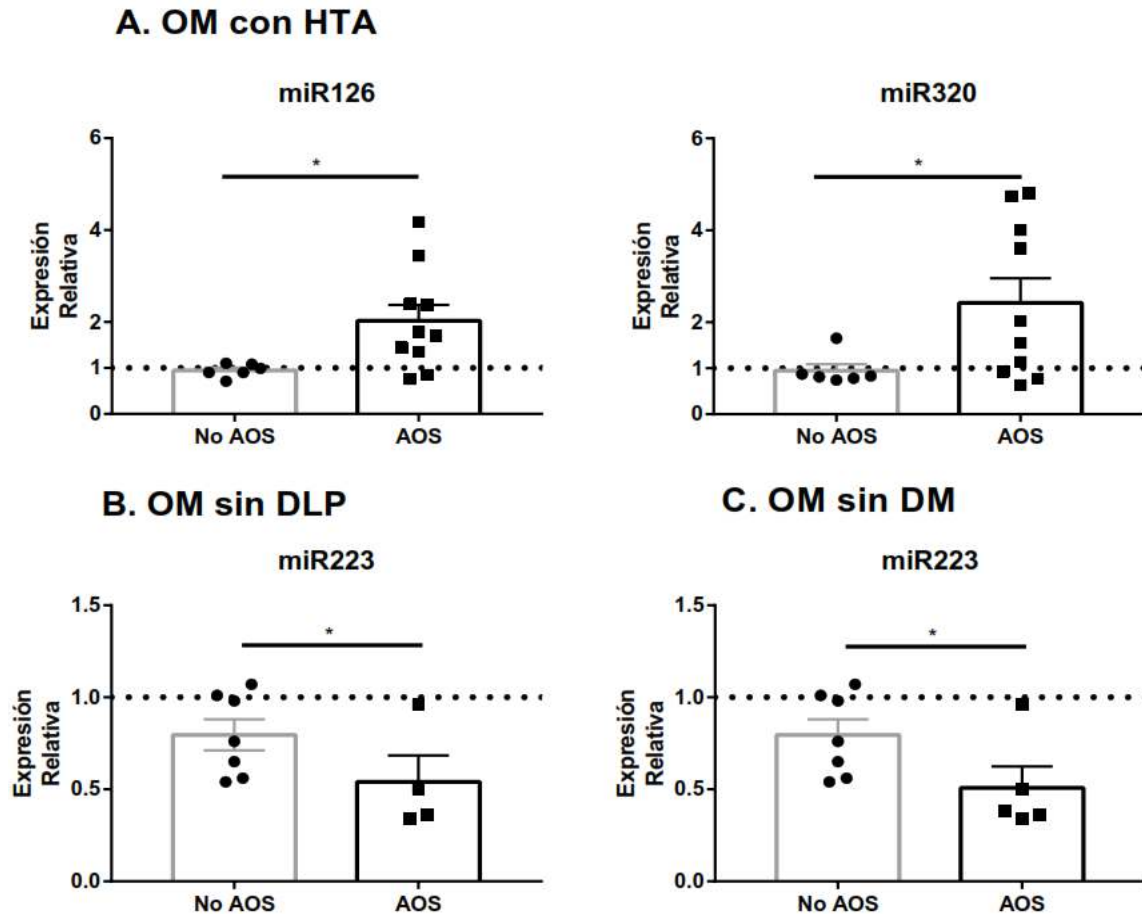


Figura 24. Diferencia en la expresión de micro-RNA exosomal circulante en pacientes con obesidad mórbida con y sin apnea obstructiva del sueño en función de los factores de riesgo cardiovascular

AOS: apnea obstructiva del sueño; DM: diabetes mellitus; DLP: dislipemia; HTA: hipertensión arterial; OM: obesidad mórbida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.1.3. Relación de los micro-RNA exosomales con los parámetros del sueño y gasométricos

El único miRNA que mostró una relación con el IAH fue el miR16, con un incremento en su expresión a medida que aumentaba el IAH. Este miR16 también demostró una relación significativa con la SatO₂ media, pero la dirección de esta relación fue inversa a la observada con el IAH. El miR145 también mostró una relación positiva significativa con la SatO₂ media; del mismo modo, el incremento del CT₉₀ disminuyó, significativamente, su expresión (Figura 25). El resto de los miRNA analizados no demostraron relaciones significativas con los parámetros de la poligrafía.

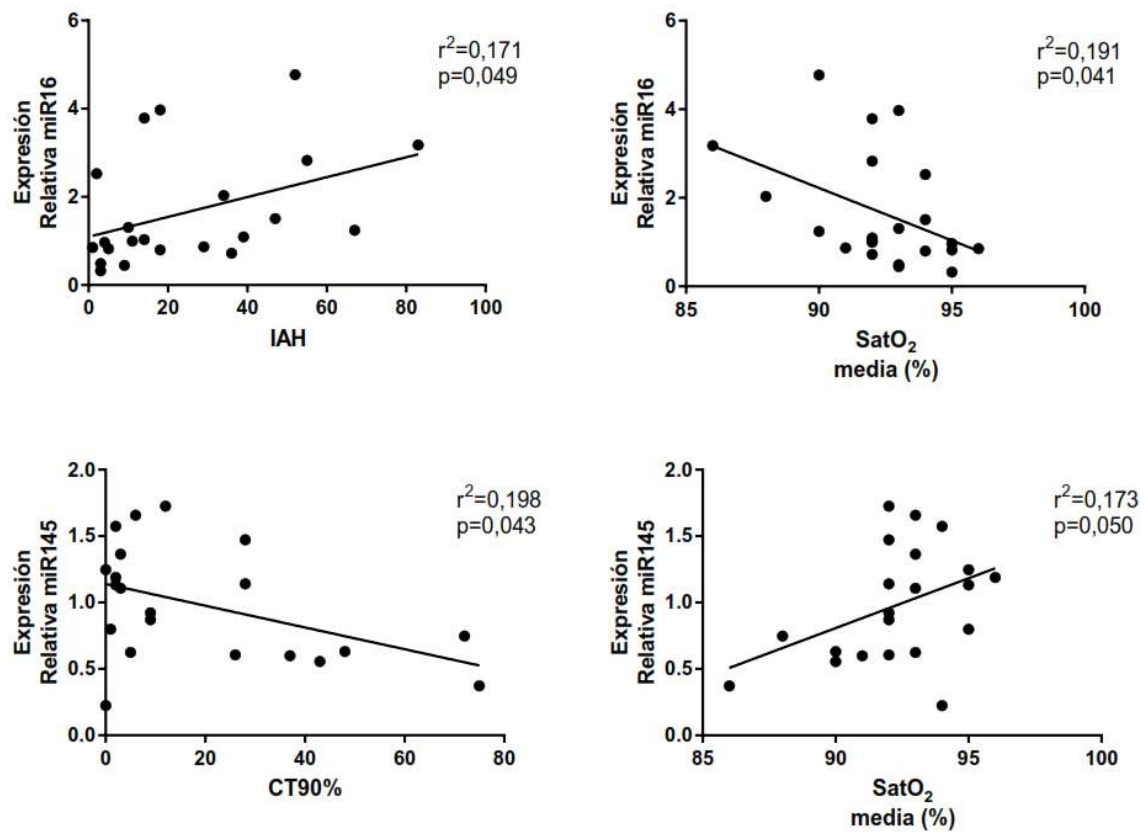


Figura 25. Relación del miR16 y el miR145 exosomales con los parámetros del sueño en la primera visita
 CT90: porcentaje de tiempo con saturación de oxígeno por debajo del 90 %; IAH: índice de apneas e hipopneas; SatO₂: saturación de oxígeno.

Los parámetros relacionados con la hipoventilación, la presión parcial arterial de dióxido de carbono (P_aCO₂) y el bicarbonato fueron los únicos que demostraron relación con el miR16, el miR21 y, sin alcanzar la significación estadística, el miR320 (Figura 26). Cuanto mayor fue

la P_aCO_2 , mayor fue la expresión de miR16 y miR21. El resto de los miRNA exosomales no mostraron relación con ninguno de los parámetros gasométricos.

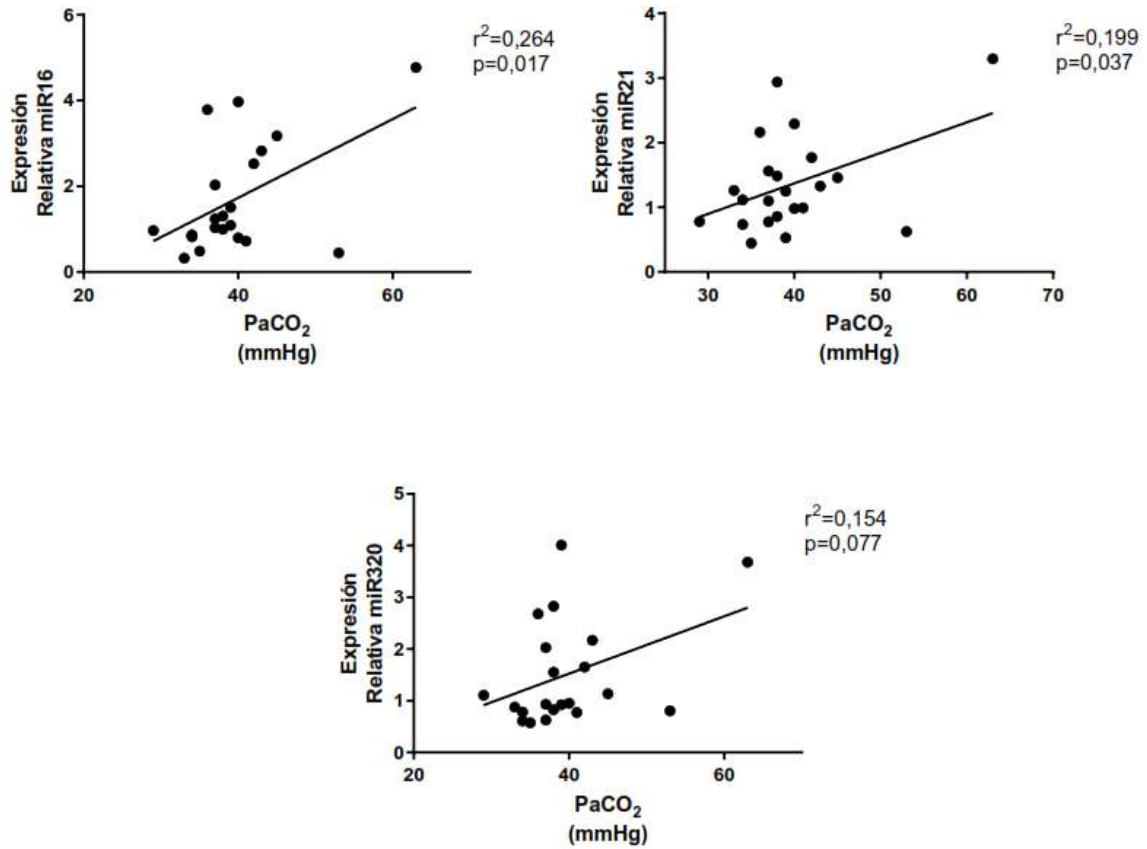


Figura 26. Relación de los miRNA exosomales con los parámetros gasométricos en la primera visita
 P_aCO_2 : presión parcial arterial de dióxido de carbono.

Los parámetros gasométricos en pacientes sin AOS no mostraron relación con ninguno de los miRNA exosomales. Sin embargo, las relaciones observadas en el conjunto del grupo de pacientes con OM se mantuvieron en el grupo de pacientes con AOS. Además de mantener la relación con la P_aCO_2 , se encontró una relación con el bicarbonato (Figura 27).

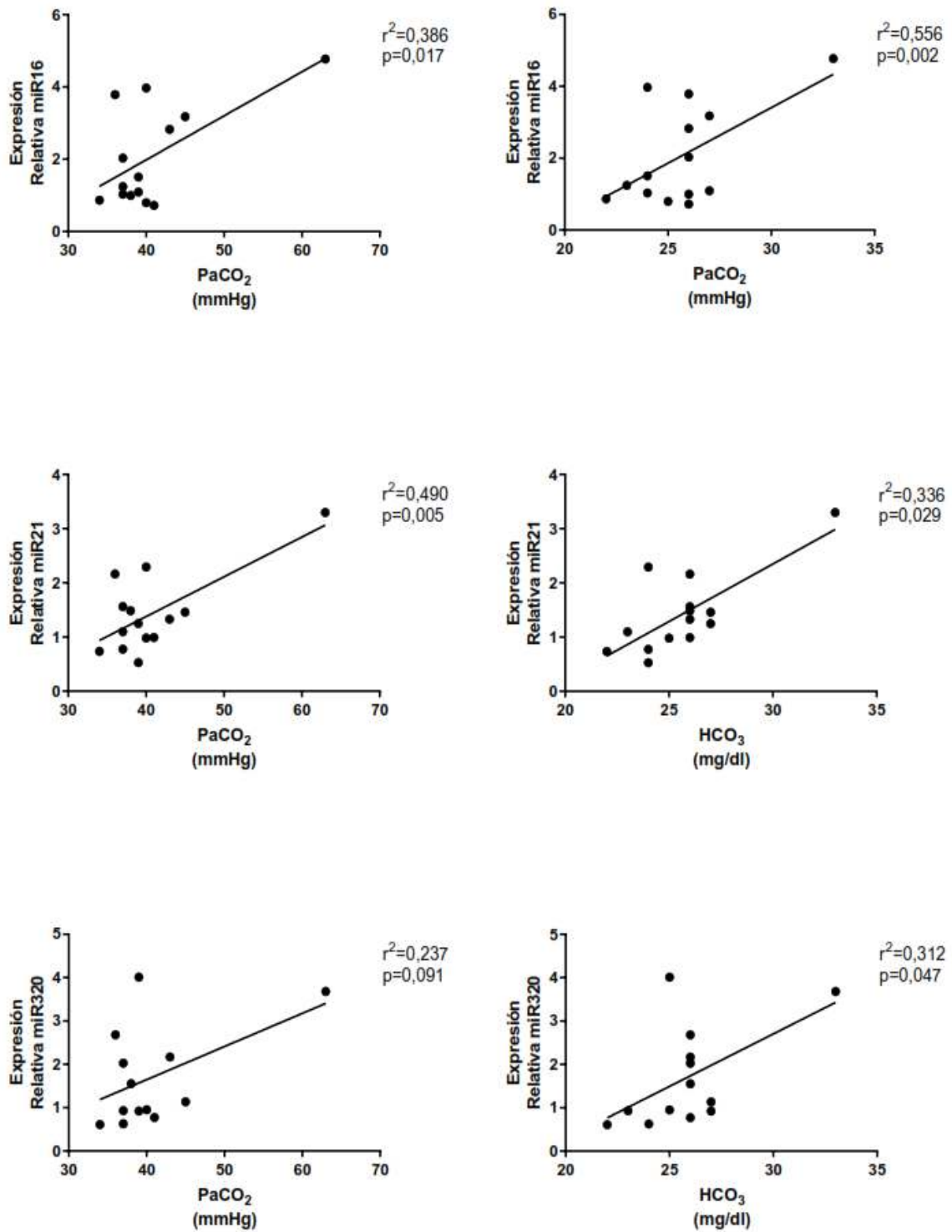


Figura 27. Relación de los micro-RNA exosomales con los parámetros gasométricos en pacientes con obesidad mórbida y apnea obstructiva del sueño en la primera visita

HCO₃⁻: bicarbonato; PaCO₂: presión parcial arterial de dióxido de carbono.

5.1.4. Relación de los micro-RNA exosomales con los parámetros antropométricos y bioquímicos

Para dar respuesta al objetivo número 2 sobre la relación de los parámetros antropométricos, planteamos la realización de un análisis de regresión lineal tomando como variable independiente los parámetros antropométricos (IMC, los perímetros cervical y abdominal y el índice cintura-cadera) y como dependiente la expresión relativa de cada uno de los miRNA analizados. El miR146 fue el que mostró las relaciones más llamativas, en especial con el perímetro abdominal, como se puede ver en la Figura 28. El resto de los miRNA no mostraron una relación significativa con los parámetros antropométricos.

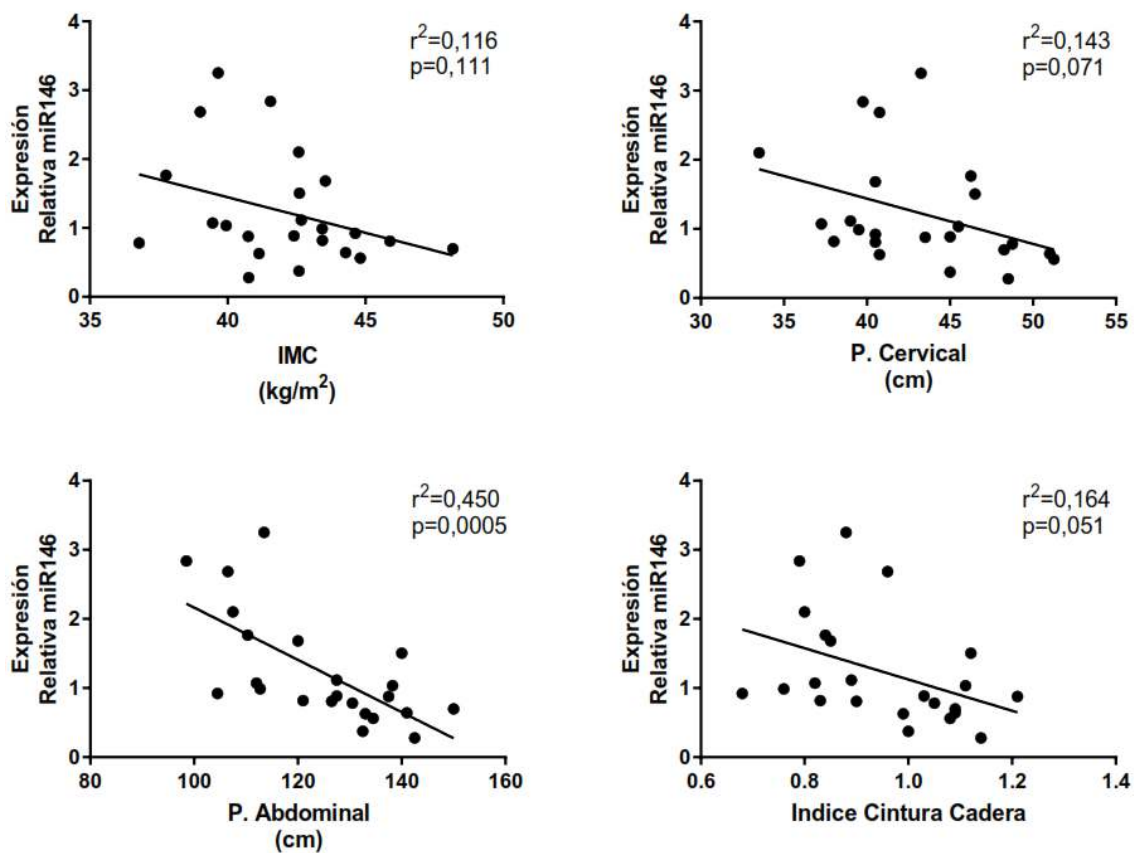


Figura 28. Relación del miR146 con los parámetros antropométricos en la primera visita
IMC: índice de masa corporal.

A continuación, se estudiaron las relaciones en los grupos con y sin AOS. Al igual que ocurrió en el conjunto de la muestra, la expresión del miR146 se vio afectada en ambos grupos de pacientes (Figura 29). Este miRNA no mostró ninguna relación con el IMC en los pacientes sin AOS ni en los pacientes con AOS. El parámetro antropométrico que mejor predijo la expresión de este miRNA fue el perímetro abdominal.

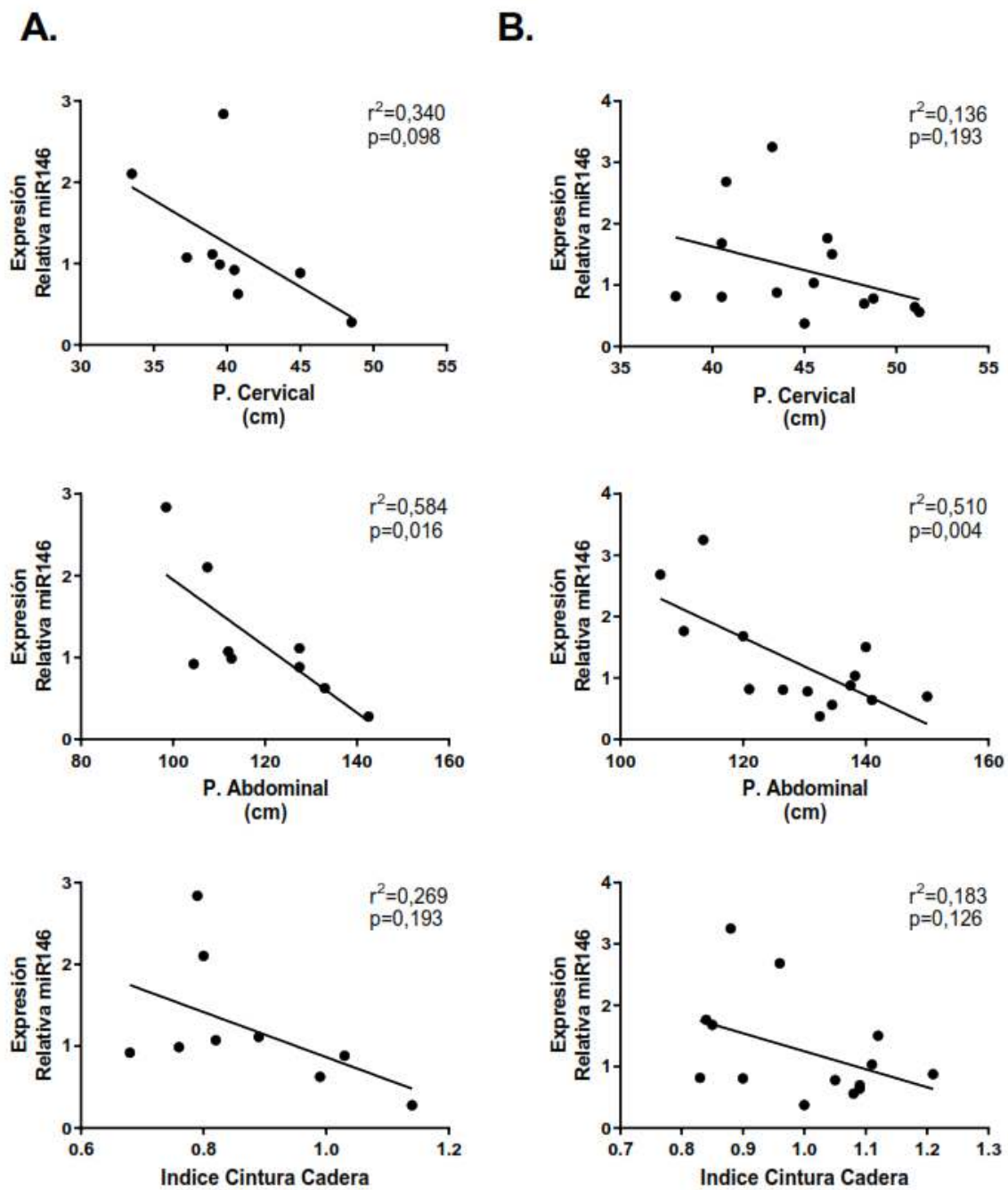


Figura 29. Relación del miR146 con los parámetros antropométricos en pacientes con obesidad mórbida (OM) sin y con apnea obstructiva del sueño (AOS)

A: OM sin AOS. B: OM con AOS.

El análisis de regresión, utilizando como variables independientes la glucosa y la hemoglobina glicosilada, no demostró ningún tipo de relación en el conjunto de los pacientes con OM. Al dividir la muestra, encontramos que en los pacientes con OM y AOS la expresión de miR34 disminuía a medida que aumentaba la concentración tanto de glucosa ($r^2 = 0,850$; $p = 0,0001$) como de hemoglobina glicosilada ($r^2 = 0,427$; $p = 0,041$). En los pacientes con OM sin AOS

no se encontraron relaciones significativas entre los parámetros glucémicos y los miRNA en estudio. Sin embargo, es interesante mencionar la relación demostrada por el miR320, aunque no alcance la significación estadística. Todos estos resultados se muestran en la Figura 30.

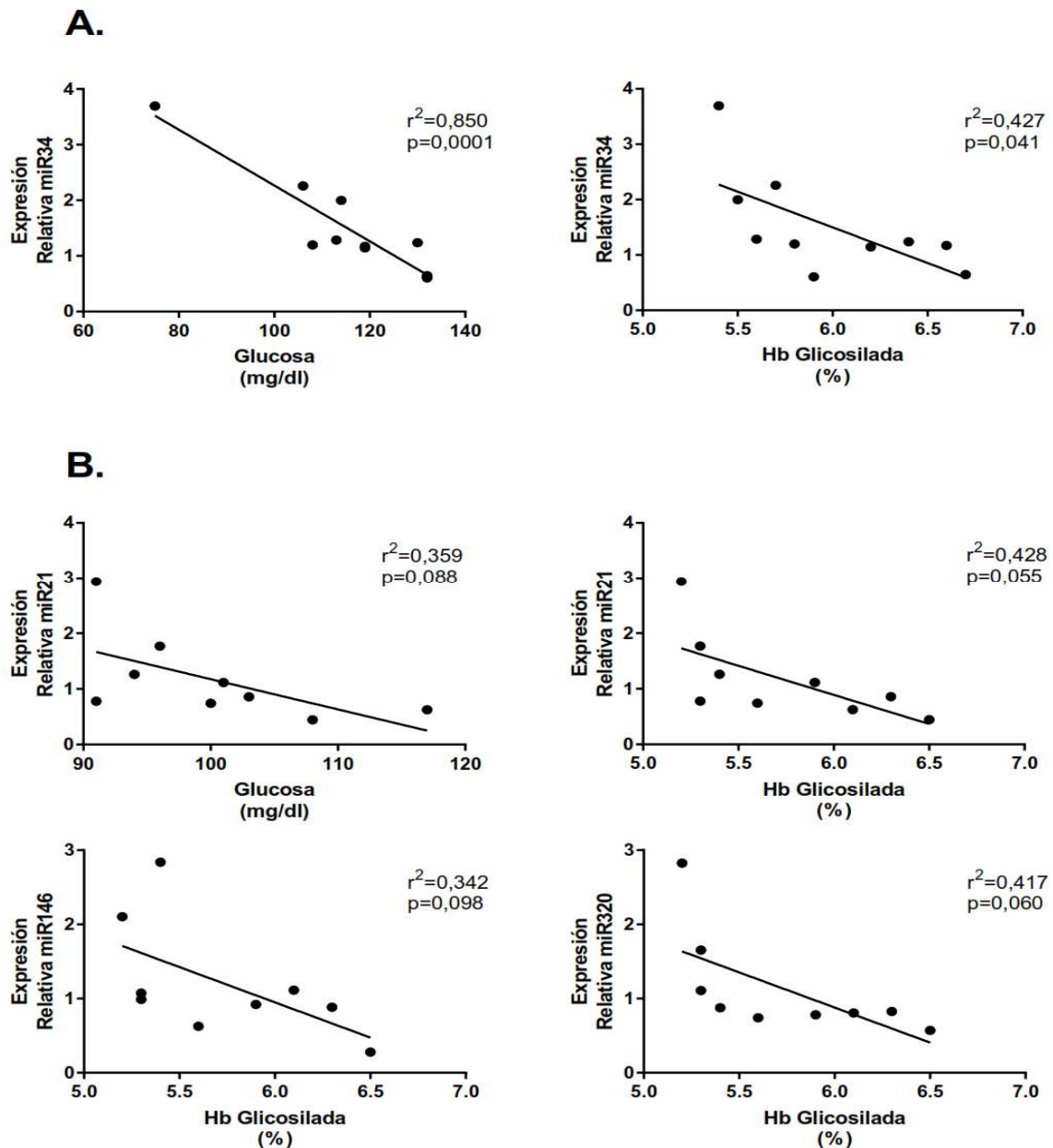


Figura 30. Relación del perfil glucémico con los micro-RNA exosomales en pacientes con obesidad mórbida (OM) con apnea obstructiva del sueño (AOS) y sin AOS

A: OM con AOS. B: OM sin AOS.

A continuación, se buscaron las relaciones existentes entre los parámetros del perfil lipídico y los miRNA en cada una de las visitas. En la primera visita, tanto en el conjunto de la

muestra como en la comparación entre pacientes con OM y AOS, se establecieron relaciones significativas. Gran parte de esas relaciones fueron producto de la presencia de valores extremos y desaparecieron al excluirlas. Las relaciones significativas encontradas se muestran en la Figura 31.

Los niveles de HDL y apolipoproteína B no mostraron ninguna relación con la expresión de los miRNA en el conjunto de la muestra. El miR145 experimentó un descenso en su expresión, tanto con el colesterol total ($r^2 = 0,265$; $p = 0,016$) como con las LDL ($r^2 = 0,217$; $p = 0,033$). De igual modo, la expresión de miR146 se vio influida por los niveles de apolipoproteína A (ApoA) ($r^2 = 0,189$; $p = 0,037$). Los niveles de triglicéridos también influyeron de manera proporcional sobre la expresión de miR34 ($r^2 = 0,271$; $p = 0,038$).

En el análisis comparado de la muestra en la primera visita pudimos comprobar cómo los pacientes con OM y AOS manifestaron estrechas relaciones de los parámetros estudiados con la expresión de dos de los miRNA (Figura 31). Una de ellas fue la relación, directamente proporcional, entre la concentración de ApoA y la expresión de miR126 ($r^2 = 0,394$; $p = 0,021$). La otra relación se estableció entre el colesterol total y la expresión de miR145. En este caso, el sentido de esta correlación fue inversamente proporcional, es decir, a medida que aumentaba la concentración de colesterol total disminuía la expresión de miR145 ($r^2 = 0,423$; $p = 0,016$). El grupo de pacientes con OM y sin AOS no mostró diferencias en relación con ninguno de los parámetros, y la más próxima fue la hallada entre las HDL y el miR146 ($r^2 = 0,395$; $p = 0,07$).

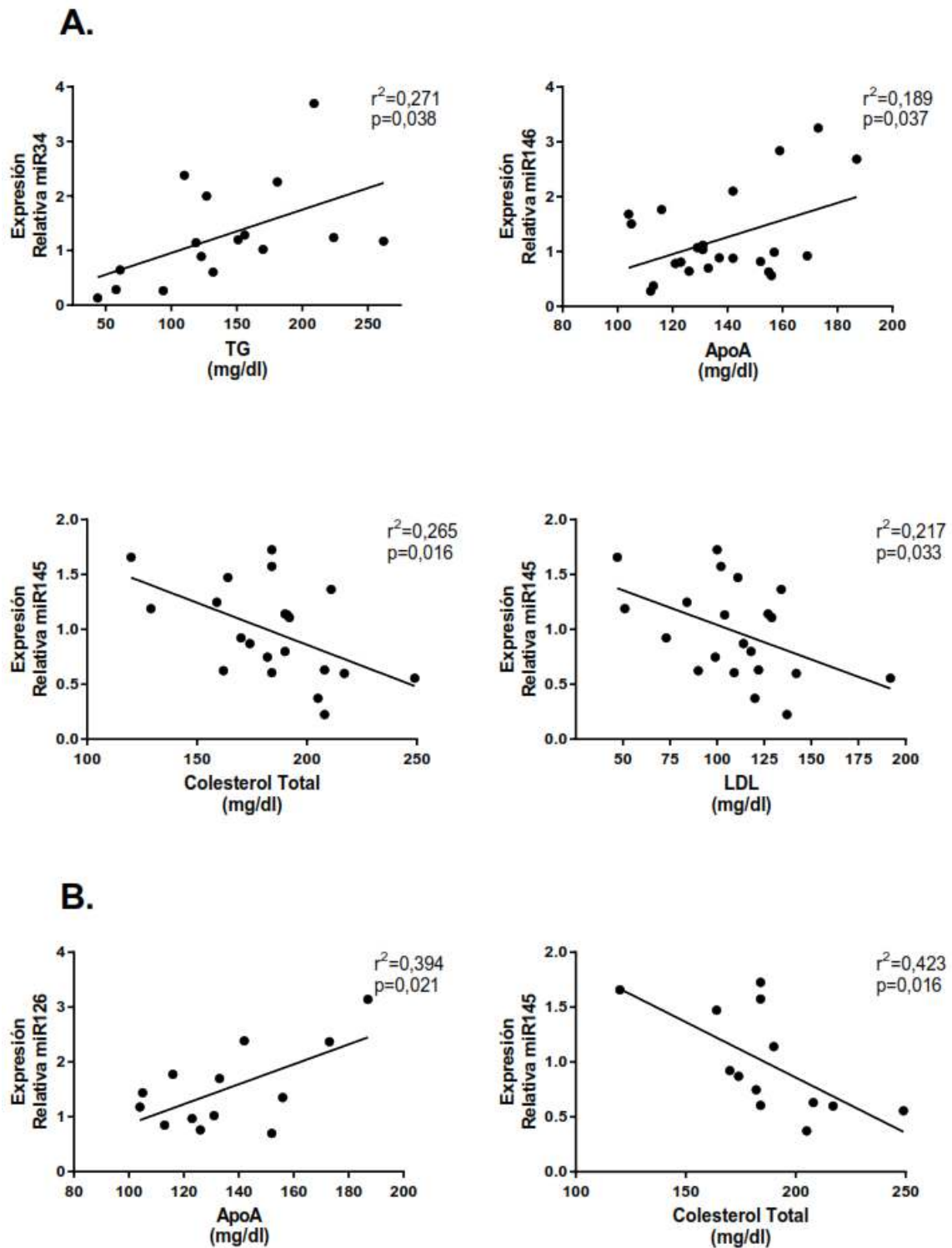


Figura 31. Relación de los parámetros lipídicos en el conjunto de la muestra de pacientes con obesidad mórbida (OM) y en los pacientes con OM y apnea obstructiva del sueño (AOS) durante la primera visita

A: Conjunto de pacientes con OM. B: OM con AOS.

5.2. VISITA A LOS 6 MESES PRECIRUGÍA: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PRESIÓN POSITIVA CONTINUA EN LA VÍA AÉREA

5.2.1. Descripción de la muestra en la segunda visita

Al igual que ocurrió en la primera visita, se establecieron diferencias significativas en los pacientes con y sin AOS en los parámetros antropométricos y la glucosa (Tabla 8). A diferencia de la primera visita, aparecieron diferencias a favor de los pacientes con OM y sin AOS en los valores de HDL y ApoA.

Tabla 8. Descripción de la muestra en la segunda visita

	Sin AOS	Con AOS
<i>n</i>	9	15
IMC (kg/m ²)	43 ± 1,8	42,5 ± 3
Perímetro cervical (cm)	41,6 ± 3,4	45,2 ± 4,1*
Perímetro abdominal (cm)	127,4 ± 10,5	131,1 ± 9,1*
Índice cintura-cadera	0,93 ± 0,11	0,99 ± 0,10*
Glucosa (mg/dl)	103,1 ± 21,9	122,1 ± 34,1*
Hemoglobina glicosilada (%)	5,7 ± 0,4	6,2 ± 0,7
Colesterol total (mg/dl)	185,1 ± 25,7	184,4 ± 32,7
HDL (mg/dl)	55,8 ± 8,6	44,3 ± 9,2 **
LDL (mg/dl)	104,3 ± 27	113,1 ± 35,4
Triglicéridos (mg/dl)	124 ± 28,8	135 ± 39,3
ApoA (mg/dl)	167,8 ± 24,4	132,4 ± 22,6 **
ApoB (mg/dl)	99,6 ± 20,1	110,2
PCR (mg/dl)	0,62 ± 0,32	0,80 ± 0,78

ApoA: apolipoproteína A; ApoB: apolipoproteína B; HDL: lipoproteína de alta densidad; IMC: índice de masa corporal; LDL: lipoproteína de baja densidad; PCR: proteína C-reactiva. Valores expresados como media y desviación estándar. U de Mann Whitney; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como podemos ver en la Tabla 9, el tratamiento con CPAP no produjo ningún cambio en los parámetros antropométricos ni bioquímicos. Por el contrario, en el grupo de pacientes

con OM y sin AOS se produjo un incremento significativo de los parámetros antropométricos, a excepción del IMC. También aumentaron los niveles de ApoA.

Tabla 9. Impacto tras 6 meses de tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea sobre los parámetros antropométricos y bioquímicos

	Con AOS (n = 9)		Sin AOS (n = 15)	
	VISITA BASAL	VISITA A LOS 6 MESES PRECIRUGÍA	VISITA BASAL	VISITA A LOS 6 MESES PRECIRUGÍA
IMC (kg/m ²)	42 ± 1,5	43,1 ± 1,8	42 ± 3,1	42,5 ± 3
Perímetro cervical (cm)	40,4 ± 4,2	41,6 ± 3,4 *	44,6 ± 4,1	45,2 ± 4,1
Perímetro abdominal (cm)	118,4 ± 14,7	127,4 ± 10,5 *	127,8 ± 12,8	131,1 ± 9,1
Índice cintura-cadera	0,87 ± 0,14	0,93 ± 0,11 *	0,99 ± 0,12	0,99 ± 0,10
Glucosa (mg/dl)	100,1 ± 8,4	103,1 ± 21,9	113 ± 14,6	122,1 ± 34,1
Hemoglobina glicosilada (%)	5,7 ± 0,4	5,7 ± 0,4	5,9 ± 0,4	6,2 ± 0,7
Colesterol total (mg/dl)	180,8 ± 26,2	185,1 ± 25,7	186 ± 29,3	184,4 ± 32,7
HDL (mg/dl)	53 ± 8,6	55,8 ± 8,6	46,9 ± 11,6	44,3 ± 9,2
LDL (mg/dl)	106,2 ± 27,8	104,3 ± 27	111 ± 31,7	113,1 ± 35,4
Triglicéridos (mg/dl)	107,5 ± 38,9	124 ± 28,8	138,8 ± 59,4	135 ± 39,3
ApoA (mg/dl)	143,4 ± 18	167,8 ± 24,4 *	137,2 ± 26,2	132,4 ± 22,6
ApoB (mg/dl)	92,7 ± 20,5	99,6 ± 20,1	104,2 ± 25,4	110,2 ± 28,3
PCR (mg/dl)	0,86 ± 0,61	0,62 ± 0,32	0,71 ± 0,45	0,80 ± 0,78

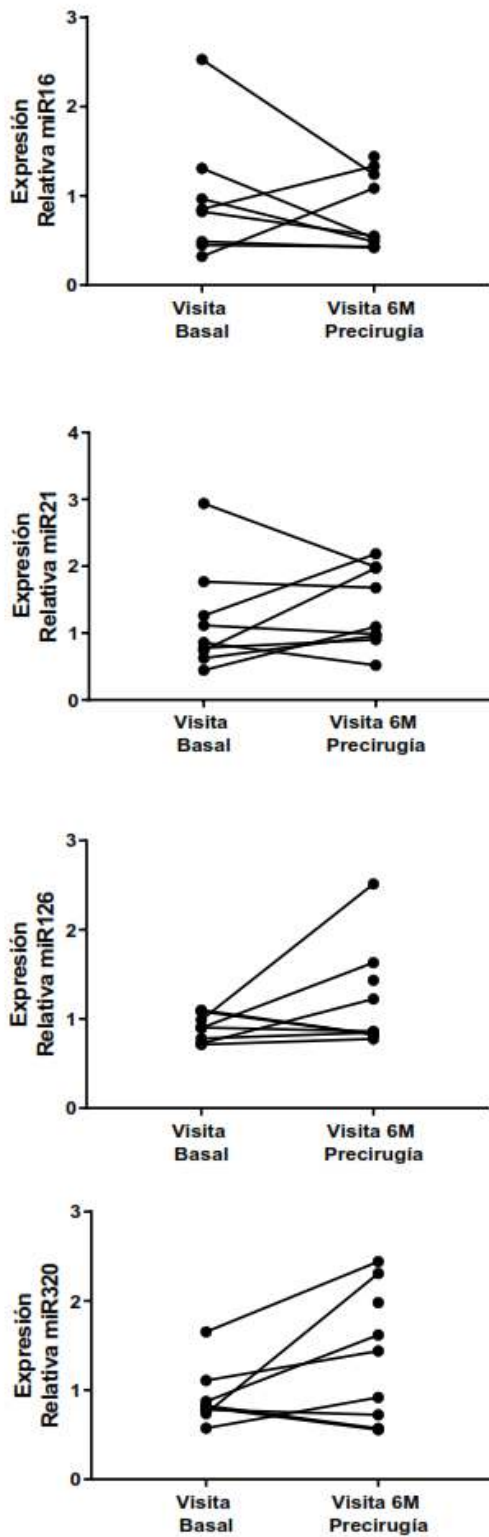
HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; PCR: proteína C-reactiva; IMC índice de masa corporal. Valores expresados como media y desviación estándar. Wilcoxon; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2.2. Evolución en la expresión de micro-RNA exosomales en la segunda visita

A la hora de comparar los resultados entre los pacientes procedentes de EPIOSA y EPIMOOSA, hay una limitación fundamental que se debe tener en cuenta, que es el desigual periodo de seguimiento del tratamiento con CPAP (un año en el grupo EPIOSA y 6 meses en el grupo EPIMOOSA). Por ese motivo no se realiza la comparación entre pacientes con OM y pacientes sin OM.

Tras el tratamiento con CPAP observamos cómo el miR16, el miR21, el miR126 y el miR320 vieron disminuida su expresión de manera significativa en los pacientes con AOS (Figura 32). El miR223, que en la primera visita demostró tener una menor expresión en los pacientes con OM y AOS, no vio modificada su expresión en la segunda visita por efecto de la CPAP. Del mismo modo, los pacientes con OM y sin AOS no mostraron diferencias significativas en la segunda visita.

A.



B.

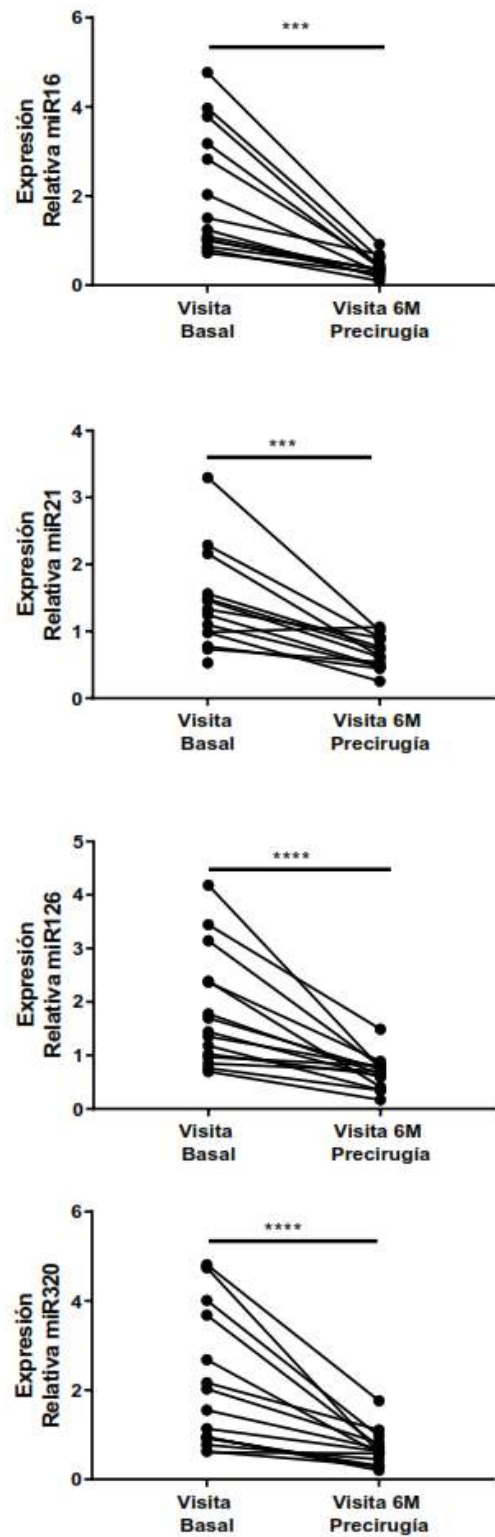


Figura 32. Variación de la expresión de miRNA exosomal entre primera y segunda

En la segunda visita desaparecen las diferencias en la expresión del miR16, el miR21 y el miR320 entre los pacientes con AOS y los pacientes sin AOS; se incrementa la diferencia en la expresión de miR223 y aparece una diferencia en miR146. Como observamos en la Figura 33 la expresión de miR146 en los pacientes con AOS se reduce significativamente en la mayoría de los pacientes. Este miRNA, en esa segunda visita, disminuye su expresión ($FC = 0,52$; $p = 0,004$) en los pacientes con OM y AOS frente a los que no lo padecían. En el caso del miR223, persiste la menor expresión en los pacientes con OM y AOS, pero no se aprecian variaciones significativas entre la segunda y la primera visita, tanto en los pacientes con AOS como en los pacientes sin ella.

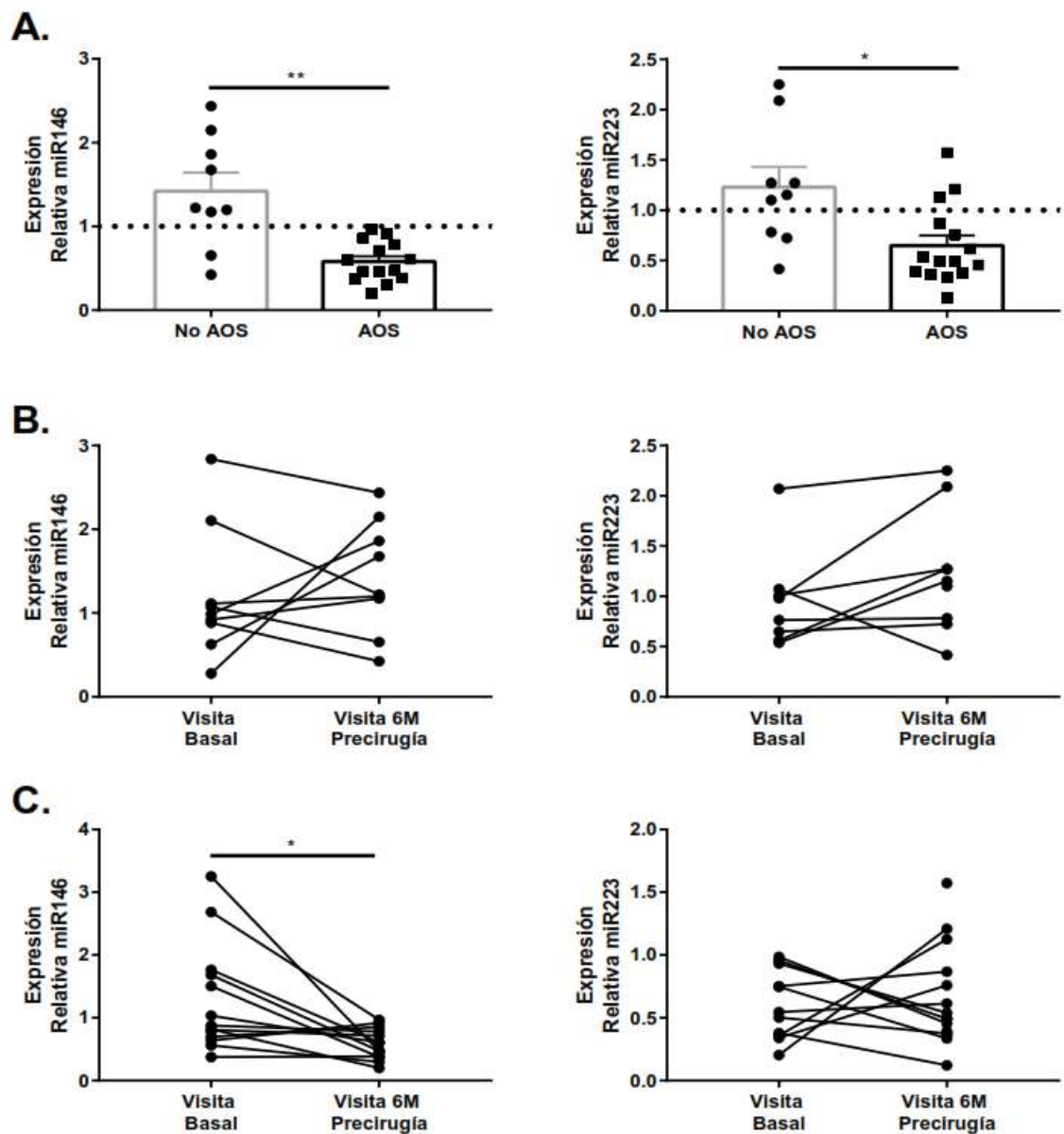


Figura 34. Variación de la expresión de micro-RNA exosomal entre la primera y la segunda visita en los pacientes con obesidad mórbida (OM) sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS en tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea (CPAP)

A: Diferencia de la expresión de miRNA en pacientes con AOS y sin AOS. B. Evolución de la expresión de miRNA en pacientes con OM sin AOS. C. Evolución de la expresión de miRNA en pacientes con OM y AOS. U de Mann Whitney (A) y Wilcoxon (B y C); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En este punto pudimos comparar el efecto que el tratamiento con CPAP tuvo en los pacientes con OM frente a los pacientes no obesos del estudio EPIOSA. No se pudieron comparar todos los miRNA (sólo miR21, miR126, miR145, miR223 y miR320). Las diferencias observadas en el grupo de pacientes con AOS no se alcanzaron en el grupo de pacientes con AOS no obesos. Sin embargo, este grupo presentó un descenso significativo en el miR145 (Figura 35).

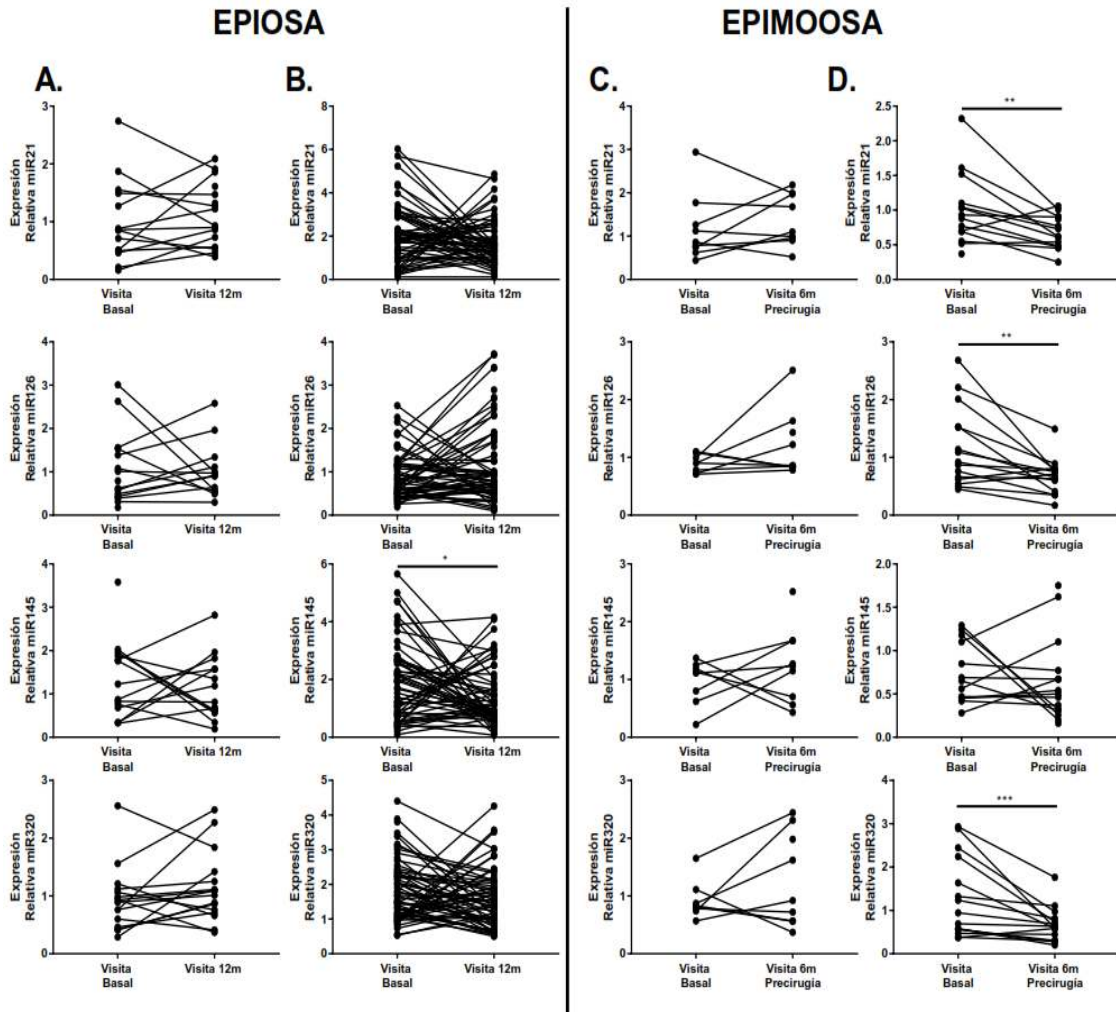


Figura 35. Efecto del tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea en pacientes no obesos sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS, y pacientes con obesidad mórbida (OM) sin AOS y con AOS
 A: Pacientes no obesos sin AOS. B: Pacientes no obesos con AOS. C: Pacientes con OM sin AOS. D: Pacientes con OM y AOS. En el grupo EPIOSA, la segunda visita ocurrió 12 meses después. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2.3. Relación de los micro-RNA exosomales con los parámetros antropométricos y bioquímicos

En la visita de los 6 meses, con el efecto de la CPAP en el grupo de pacientes con OM y AOS desaparecieron las relaciones observadas en la primera visita, incluida la relativa al miR146. Tampoco se observaron al segmentar la muestra en pacientes con y sin AOS.

En la visita de los 6 meses, durante los cuales los pacientes con OM y AOS habían estado en tratamiento con CPAP, aparecieron nuevas relaciones en el conjunto de la muestra que no se habían observado en la primera visita. Así, se observó cómo el incremento en la concentración de glucosa disminuyó, proporcionalmente, la expresión de miR16 ($r^2 = 0,165$;

$p = 0,048$), miR21 ($r^2 = 0,173$; $p = 0,047$) y miR320 ($r^2 = 0,167$; $p = 0,046$) (Figura 36). Estas relaciones no se observaron en la primera visita.

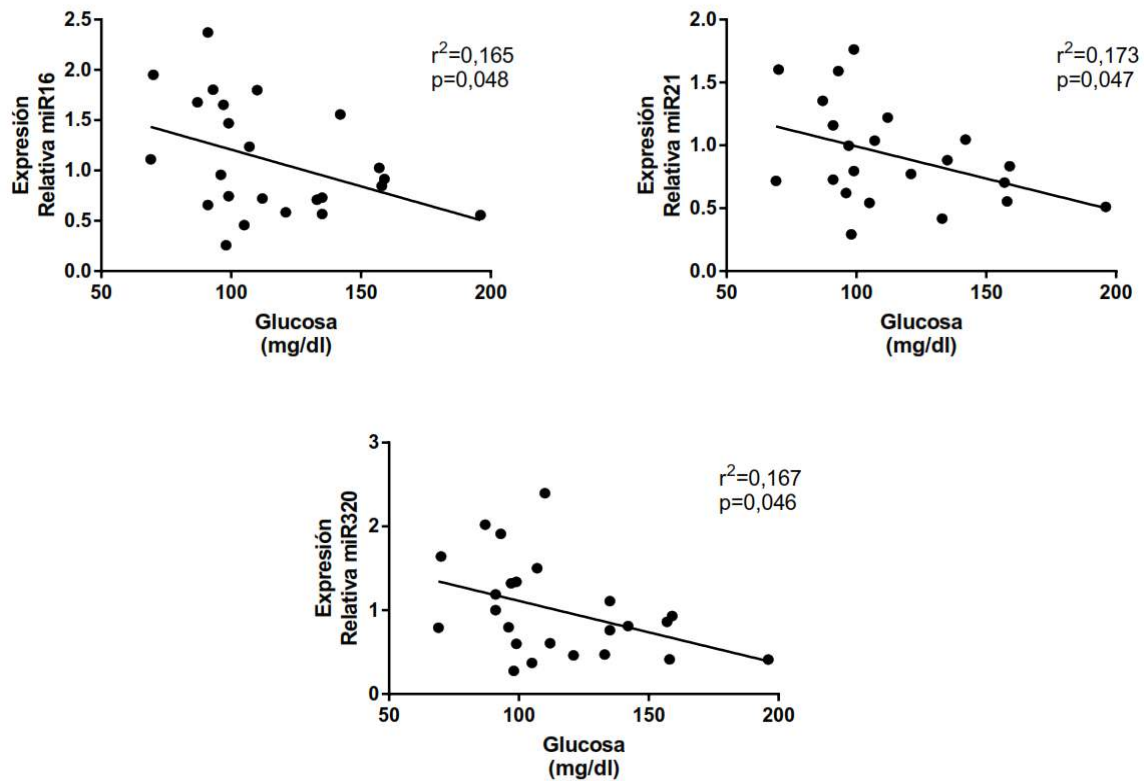


Figura 36. Relación de la concentración de glucosa con la expresión de micro-RNA exosomales en pacientes con obesidad mórbida en la segunda visita

Pudimos comprobar que estas nuevas relaciones se sustentaron en los pacientes con OM y sin AOS. Estos pacientes mantuvieron los resultados observados en el conjunto de la muestra, tanto en el miR16 ($r^2 = 0,568$; $p = 0,018$) como en el miR320 ($r^2 = 0,578$; $p = 0,017$), mientras que el miR21 se aproximó a la significación estadística, sin alcanzarla ($r^2 = 0,435$; $p = 0,053$) (Figura 37). Los pacientes sin AOS también experimentaron nuevas conexiones de la hemoglobina glicosilada con el miR16 ($r^2 = 0,516$; $p = 0,043$) y el miR320 ($r^2 = 0,545$; $p = 0,036$).

Los pacientes con OM y AOS, tras el tratamiento con CPAP, tan solo demostraron una única correlación positiva de la hemoglobina glicosilada, concretamente, con el miR145 ($r^2 = 0,477$; $p = 0,044$) (Figura 37).

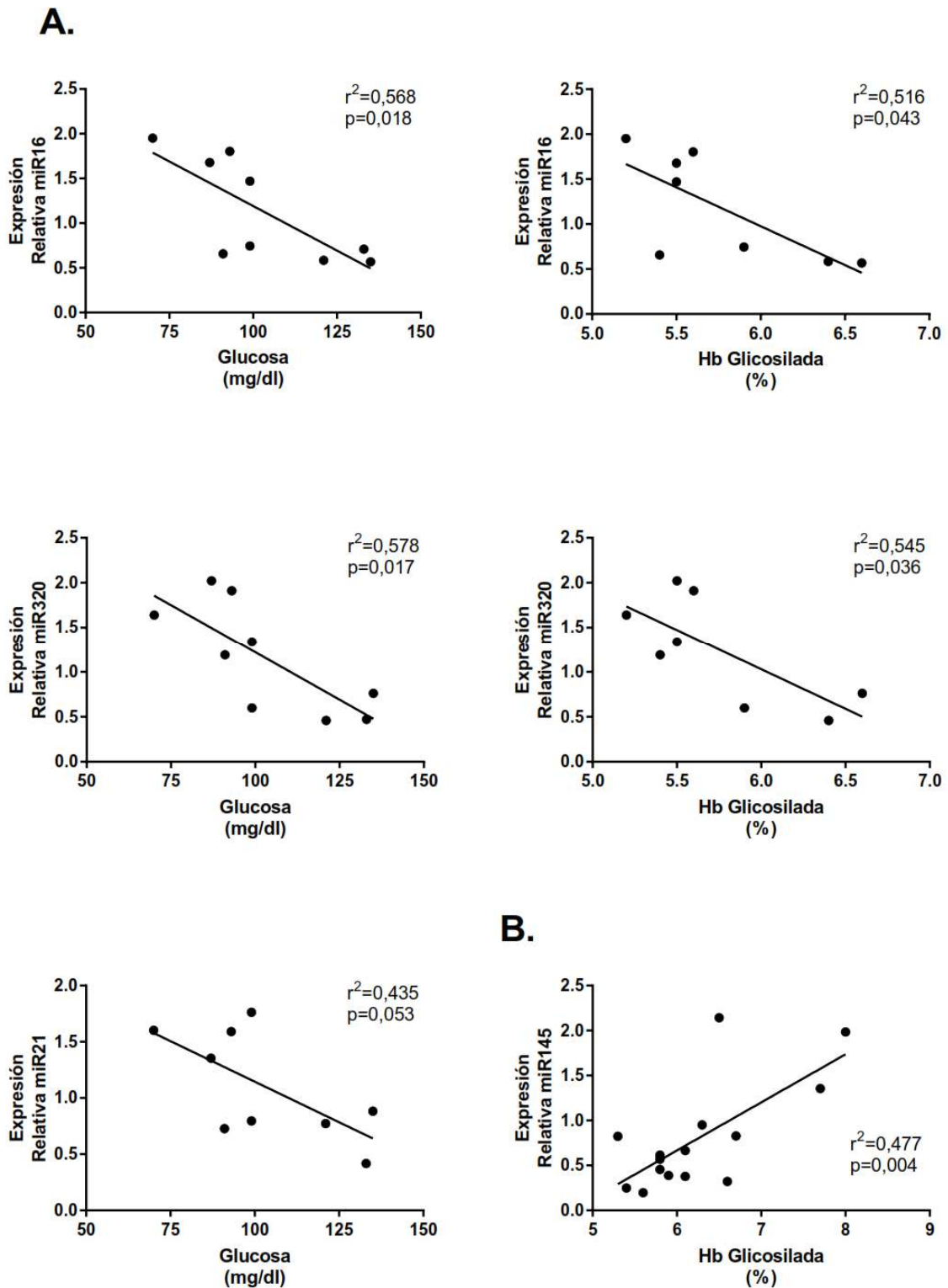


Figura 37. Relación entre la expresión de micro-RNA exosomales y los parámetros del perfil glucémico en pacientes con obesidad mórbida (OM) sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS en la segunda visita

A: OM sin AOS. B: OM con AOS.

En la segunda visita, el conjunto de la muestra mantuvo las relaciones establecidas en la primera visita entre la concentración de triglicéridos y ApoA con la concentración de miR34 y miR146, respectivamente. Respecto a esta visita, desaparecieron las relaciones observadas del colesterol total y las LDL con el miR145. Pero surgieron dos nuevas correlaciones que vinculaban la concentración de ApoA con la expresión de miR133 ($r^2 = 0,379$; $p = 0,033$) y miR223 ($r^2 = 0,383$; $p = 0,001$) (Figura 38).

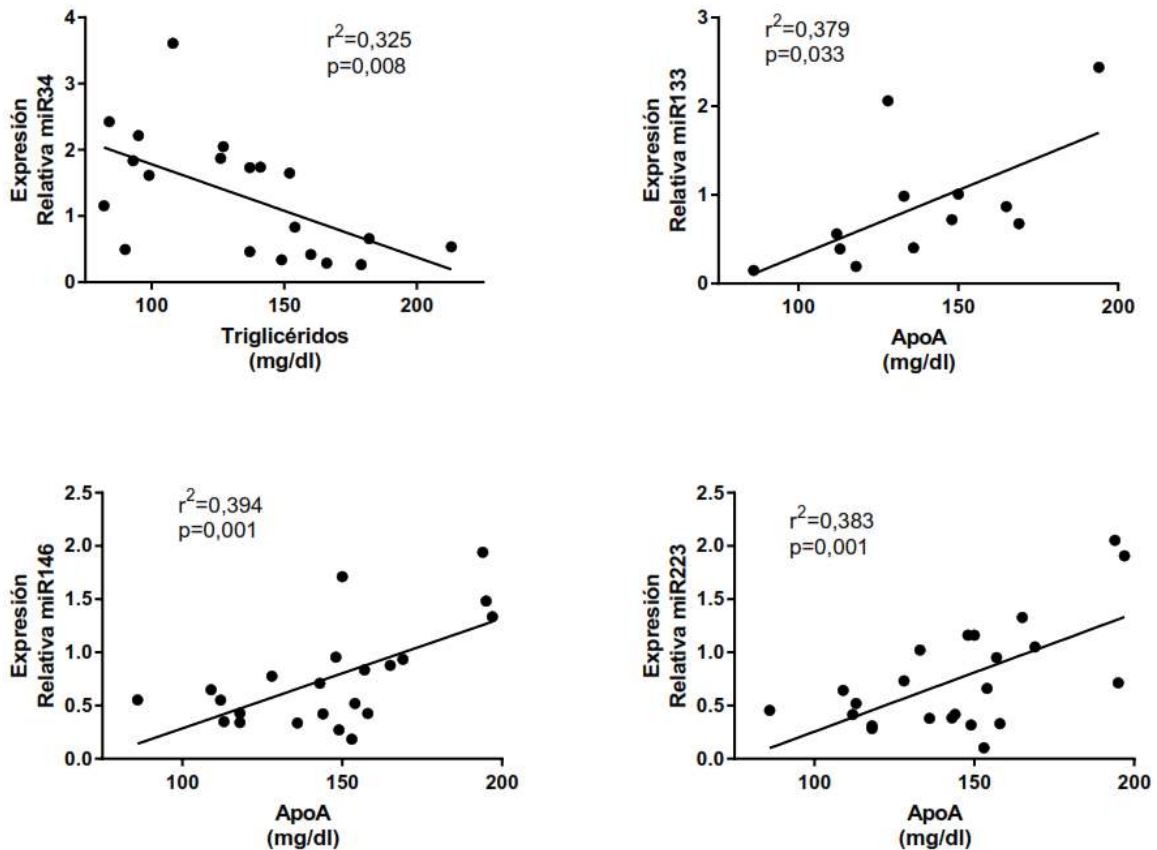


Figura 38. Relación de los parámetros del perfil lipídico con la expresión de micro-RNA exosomales en el conjunto de los pacientes con obesidad mórbida en la segunda visita

ApoA: apolipoproteína A.

Al analizar por grupos separados, vimos cómo las relaciones establecidas en la primera visita en el grupo de pacientes con OM y AOS desaparecieron en esta segunda visita tras el tratamiento con CPAP. Este grupo de pacientes no mostró ninguna relación.

Por el contrario, el grupo de pacientes con OM y sin AOS presentaron los valores más llamativos en el análisis de regresión. El miR126 demostró estar influido negativamente por la concentración de colesterol total ($r^2 = 0,545$; $p = 0,023$) y LDL ($r^2 = 0,589$; $p = 0,015$); y, positivamente, por la ApoA ($r^2 = 0,600$; $p = 0,023$). Hallamos que la concentración de los

triglicéridos redujo la expresión de miR133 ($r^2 = 0,815$; $p = 0,013$) y miR145 ($r^2 = 0,549$; $p = 0,022$) (Figura 39).

El otro miRNA que más sufrió la variación de los parámetros lipídicos en esta segunda visita fue el miR34. El aumento de la concentración de ApoA aumentó la expresión de este miRNA ($r^2 = 0,926$; $p = 0,0008$). También observamos una relación, de sentido contrario, con el incremento de la concentración de triglicéridos, es decir, el aumento de este parámetro redujo la expresión de miR34. En los pacientes con OM y AOS, el miR34 señala en esta dirección, aunque no alcanza la significación estadística (Figura 39).

A.

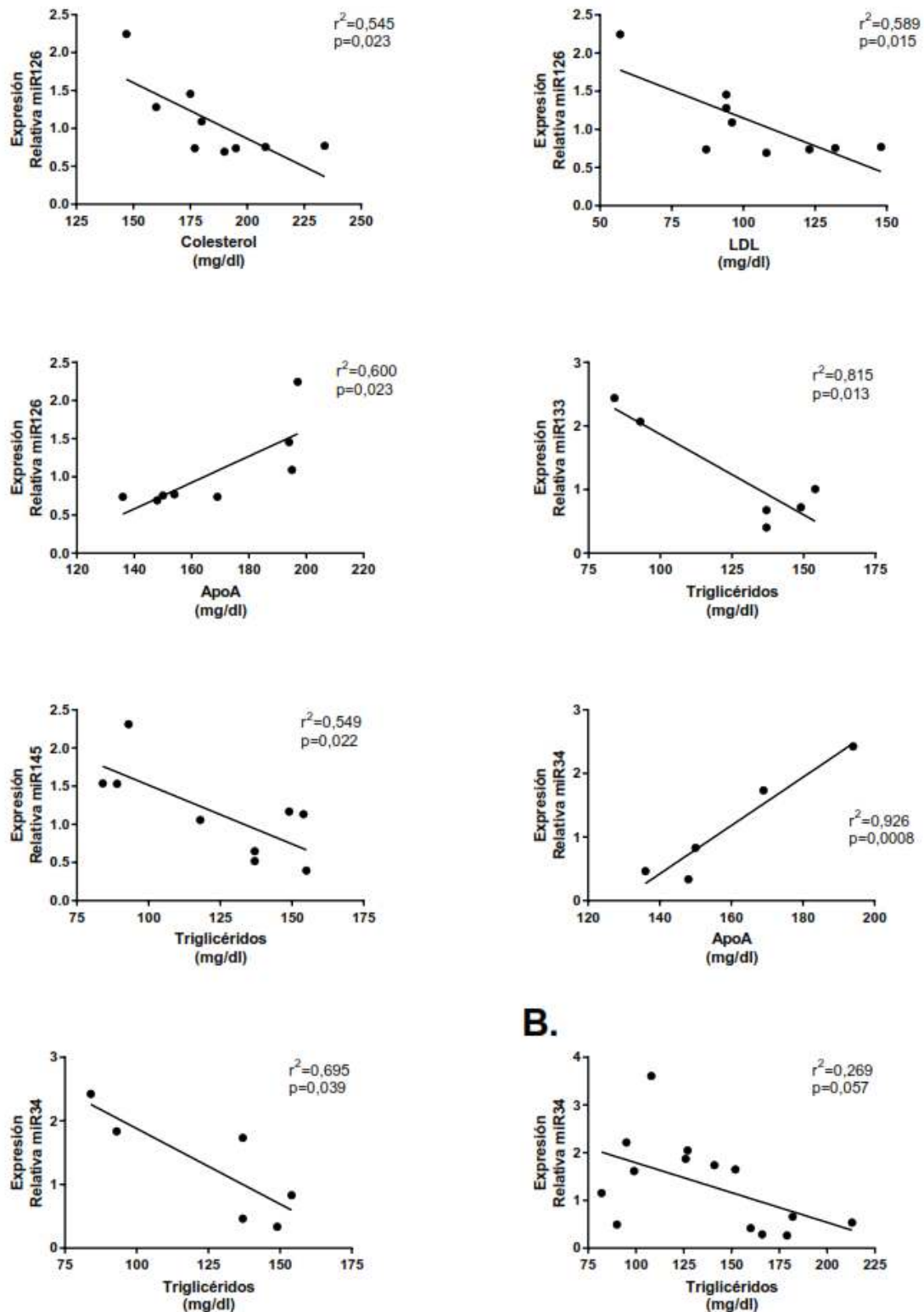


Figura 39. Relación de los parámetros del perfil lipídico con los micro-RNA exosomales en pacientes con obesidad mórbida (OM) sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS en la segunda visita

ApoA: apolipoproteína A.

5.3. VISITA A LOS 12 MESES POSTCIRUGÍA: EFECTO DE LA CIRUGÍA BARIÁTRICA

5.3.1. Descripción de la muestra en la tercera visita

El principal cambio en esta última visita respecto a la primera fue la pérdida de peso, que fue de $30,5 \text{ kg} \pm 10,2$ o $10,9 \text{ kg/m}^2 \pm 3,8$ y que representa un $25,7 \% \pm 8,4$ del exceso de peso. Los pacientes con AOS experimentaron una mayor pérdida de peso, con una diferencia de $11,4 \text{ kg/m}^2 \pm 4,5$, lo que corresponde a una pérdida del $27,4 \% \pm 9,4$ del exceso de peso. Los pacientes sin AOS perdieron $9,9 \text{ kg/m}^2 \pm 2,01$, lo que supone un $23,8 \% \pm 4,8$ del exceso de peso. Las diferencias entre ambos grupos no alcanzaron la significación estadística.

En la última visita se repitieron el estudio del sueño y la gasometría arterial, así como el estudio del resto de las variables que se habían analizado en las distintas visitas. Los resultados del estudio del sueño demostraron el efecto que la pérdida de peso tuvo sobre el diagnóstico de AOS. La prevalencia de AOS en la muestra se redujo a tan solo 3 individuos (12,5 %). Como podemos ver en la Tabla 10, no aparecieron diferencias entre ambos grupos, aunque en el grupo de pacientes con AOS tan solo quedaban 3 pacientes con este diagnóstico

Tabla 10. Descripción de la muestra en la última visita

	Con AOS	Sin AOS
<i>n</i>	9	15
IMC (kg/m ²)	32,1 ± 2,5	30,5 ± 3,9
Perímetro cervical (cm)	37,1 ± 3,4	38,9 ± 4,6
Perímetro abdominal (cm)	103,4 ± 7,9	102,9 ± 11,2
Índice cintura-cadera	0,88 ± 0,09	0,94 ± 0,08
IAH (eventos/h)	2,2 ± 1,7	9,5 ± 14,5
CT ₉₀ (%)	1,3 ± 3,6	15,7 ± 23,3
SatO ₂ media (%)	94,7 ± 1	93 ± 2,2
pH	7,40 ± 0,02	7,40 ± 0,03
P _a O ₂ (mmHg)	74,2 ± 27,7	72,3 ± 26,9
P _a CO ₂ (mmHg)	43 ± 2,8	43,2 ± 4,7
HCO ₃ (mEq/l)	27,2 ± 2,8	26,9 ± 1,6
Glucosa (mg/dl)	83,5 ± 6,6	87,3 ± 8,8
Hemoglobina glicosilada (%)	5,4 ± 0,1	5,2 ± 0,3
Colesterol Total(mg/dl)	188,2 ± 31,3	174 ± 46,4
HDL (mg/dl)	62,6 ± 13,4	53,9 ± 14,5
LDL (mg/dl)	106 ± 29,1	103 ± 39,2
Triglicéridos (mg/dl)	97,6 ± 30,7	84,4 ± 30,1
ApoA (mg/dl)	171,6 ± 29,3	155,4 ± 38,3
ApoB (mg/dl)	90,2 ± 28,1	89,6 ± 29,8
PCR (mg/dl)	0,20 ± 0,15	0,45 ± 0,78

ApoA: apolipoproteína A; ApoB: apolipoproteína B; CT₉₀: porcentaje de tiempo de tiempo con saturación de oxígeno por debajo del 90 %; HCO₃: bicarbonato; IAH: índice de apneas e hipopneas; IMC: índice de masa corporal; P_aCO₂: presión parcial arterial de dióxido de carbono; P_aO₂: presión parcial arterial de oxígeno; PCR: proteína C-reactiva; SatO₂: saturación de oxígeno. Valores expresados como media y desviación estándar. U de Mann Whitney; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La pérdida de peso modificó tanto los parámetros antropométricos como los gasométricos y bioquímicos en ambos grupos respecto a la primera visita. Aunque en ambos grupos las diferencias fueron estadísticamente significativas, fueron mucho mayores en el grupo de pacientes con AOS (Tabla 11). En el anexo 8 se muestran las diferencias evolutivas con respecto a la visita a los 6 meses precirugía.

Tabla 11. Impacto de la cirugía bariátrica en la última visita respecto a la primera visita

	Sin AOS (n = 9)		Con AOS (n = 15)	
	VISITA BASAL	VISITA A LOS 12 MESES POSTCIRUGÍA	VISITA BASAL	VISITA A LOS 12 MESES POSTCIRUGÍA
IMC (kg/m ²)	42 ± 1,5	32, 1 ± 2,5 ***	42 ± 3,1	30,5 ± 3,9 ***
Perímetro cervical (cm)	40,4 ± 3,4	37,1 ± 3,4 ***	44,6 ± 4,1	38,9 ± 4,6 ***
Perímetro abdominal (cm)	118,4 ± 14,7	103,4 ± 7,9 ***	127,8 ± 12,8	102,9 ± 11,2 ***
Índice cintura-cadera	0,87 ± 0,14	0,88 ± 0,09	0,99 ± 0,12	0,94 ± 0,08 *
IAH (eventos/h)	4,5 ± 3	2,2 ± 1,7	35,5 ± 21,7	9,5 ± 14,5 ***
CT ₉₀ (%)	1,7 ± 1,7	1,3 ± 3,6	30,4 ± 23,9	15,7 ± 23,3 *
SatO ₂ media (%)	94,3 ± 1,1	94,7 ± 1	91,2 ± 2,1	93 ± 2,2 *
Glucosa (mg/dl)	100,1 ± 8,4	83,5 ± 6,6 **	113 ± 14,6	87,3 ± 8,8 ***
Hemoglobina glicosilada (%)	5,7 ± 0,4	5,4 ± 0,1 *	5,9 ± 0,4	5,2 ± 0,3 ***
Colesterol Total(mg/dl)	180,8 ± 26,2	188,2 ± 31,3	186 ± 29,3	174 ± 46,4
HDL (mg/dl)	53 ± 8,6	62,6 ± 13,4 *	46,9 ± 11,6	53,9 ± 14,5 *
LDL (mg/dl)	106,2 ± 27,8	106 ± 29,1	111 ± 31,7	103 ± 39,2
Triglicéridos (mg/dl)	107,5 ± 38,9	97,6 ± 30,7 *	138,8 ± 59,4	84,4 ± 30,1 ***
ApoA (mg/dl)	143,4 ± 18	171,6 ± 29,3*	137,2 ± 26,2	155,4 ± 38,3 *
ApoB (mg/dl)	92,7 ± 20,5	90,2 ± 28,1	104,2 ± 25,4	89,6 ± 29,8 *
PCR (mg/dl)	0,86 ± 0,61	0,20 ± 0,15 **	0,71 ± 0,45	0,45 ± 0,78 *

ApoA: apolipoproteína A; ApoB: apolipoproteína B; CT₉₀: porcentaje de tiempo de tiempo con saturación de oxígeno por debajo del 90 %; HCO₃: bicarbonato; HDL: lipoproteína de alta densidad; IAH: índice de apneas e hipopneas; IMC: índice de masa corporal; LDL: lipoproteína de baja densidad; P_aCO₂: presión parcial arterial de dióxido de carbono; P_aO₂: presión parcial arterial de oxígeno; PCR: proteína C-reactiva; SatO₂: saturación de oxígeno. Valores expresados como media y desviación estándar. Wilcoxon; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

5.3.2. Evolución de la expresión de micro-RNA en la última visita

En la última visita desaparecen las diferencias entre el grupo de pacientes con AOS y el grupo de pacientes sin AOS. A diferencia de lo ocurrido entre la primera y la segunda visita, entre la segunda y la última visita tan solo aparece el incremento significativo en la expresión de miR146 (Figura 40). Este miRNA recupera su expresión de la primera visita. Las diferencias tan solo acontecen en el grupo de pacientes con AOS.

La variación de la SatO₂ media, dentro los parámetros del sueño, fue el único que demostró una relación significativa con la diferencia en la expresión de miR145 y miR16 (FC de la primera visita y FC de la última visita). En el caso del miR145, el incremento relativo de SatO₂ media se tradujo en un mayor descenso de este miRNA. El miR16 experimentó una relación similar, aunque de sentido contrario, es decir, el incremento de SatO₂ media aumentó el miRNA. La variación de los parámetros antropométricos, en concreto del perímetro abdominal, fue lo que más influyó en la variación tanto del miR21 como del miR223 y el miR320 (Figura 41). La expresión de miR223 también se ve influida por la pérdida de peso (IMC).

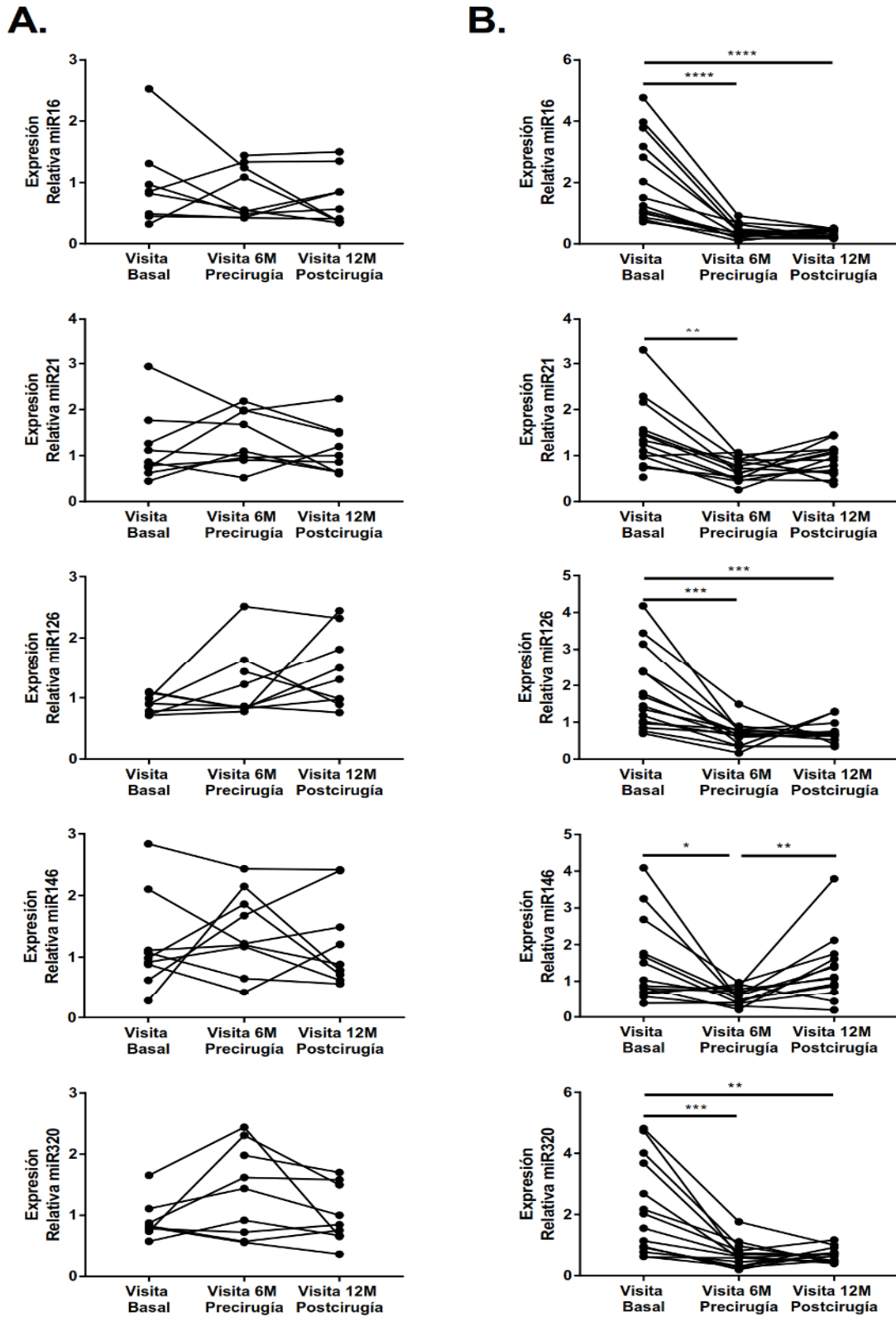


Figura 40. Evolución de la expresión de micro-RNA en las distintas visitas en los pacientes con obesidad mórbida sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS. Efecto del tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea y cirugía bariátrica

A: OM sin AOS. B: OM con AOS. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

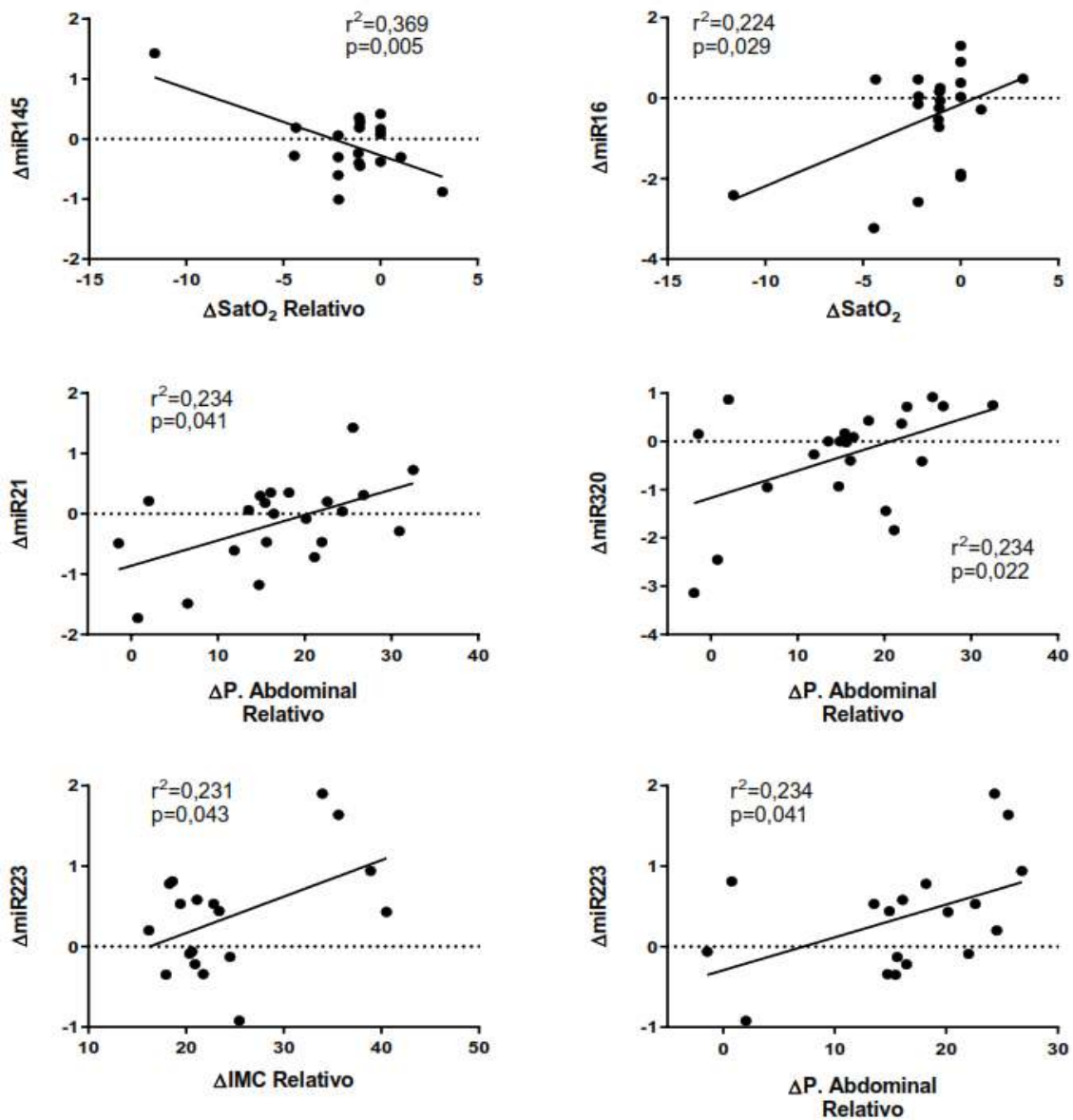
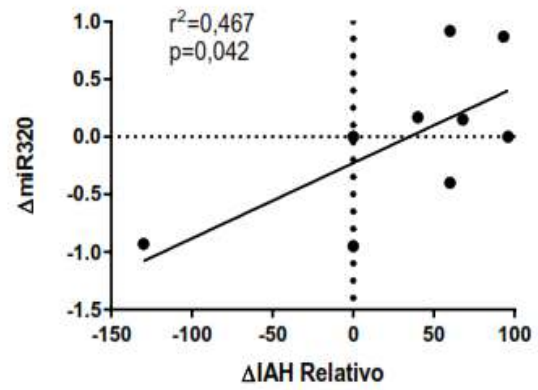
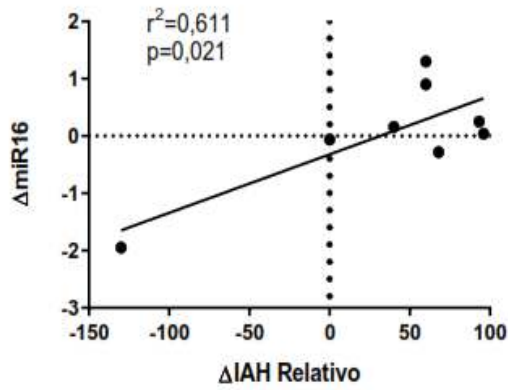


Figura 41. Relación entre la pérdida de peso relativo tras la cirugía bariátrica y los cambios en la expresión de micro-RNA
 SatO₂: saturación de oxígeno.

En el grupo de pacientes sin AOS, la reducción en el IAH implicó un aumento tanto del miR16 como del miR320. Dentro del grupo de pacientes con AOS, el aumento de la SatO₂ media fue la variable que mejor predijo el incremento de miR145 y miR223. En este grupo de pacientes, cuanto mayor fue la pérdida de perímetro abdominal mayor fue el incremento de miR21 y miR320 (Figura 42).

A.



B.

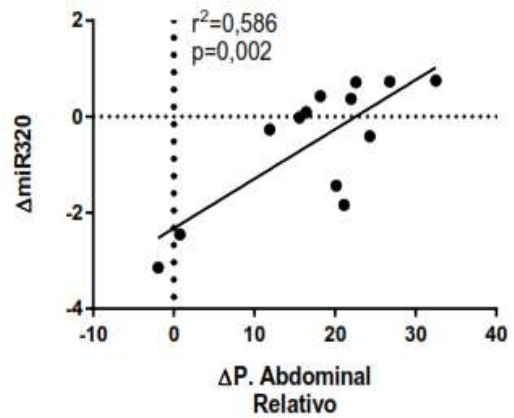
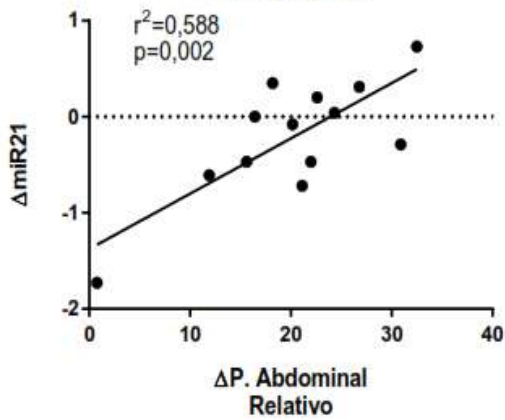
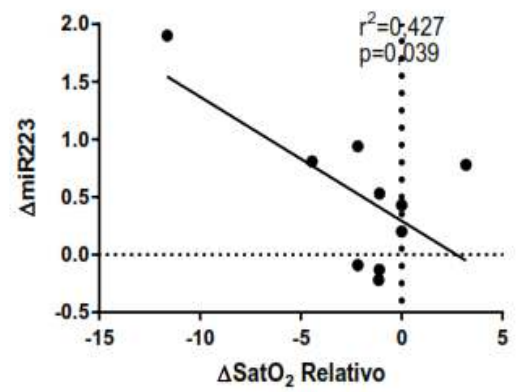
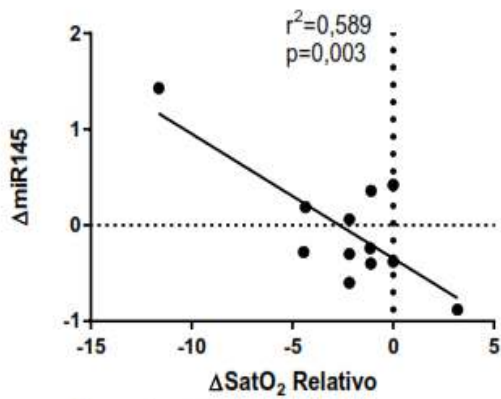


Figura 42. Relación de la variación relativa de los parámetros del sueño tras la cirugía bariátrica y los cambios en la expresión de micro-RNA en pacientes con obesidad mórbida (OM) sin apnea obstructiva del sueño (AOS) y con AOS

IAH: índice de apneas e hipopneas; SatO_2 : saturación de oxígeno. A: OM sin AOS. B: OM con AOS.

5.3.3. Relación de los micro-RNA exosomales con los parámetros antropométricos y bioquímicos

En la última visita, un año después de la CB y con la pérdida de peso conseguida, observamos algunas relaciones no expresadas en la primera visita. Esas relaciones aparecen únicamente con el miR223 (Figura 43). Vemos cómo el aumento en el IAH se traduce en una menor expresión de miR223, mientras que el aumento de la SatO₂ aumenta la expresión de este miRNA. El resto de los miRNA no mostraron relación en esta última visita con ninguno de los parámetros de la poligrafía nocturna.

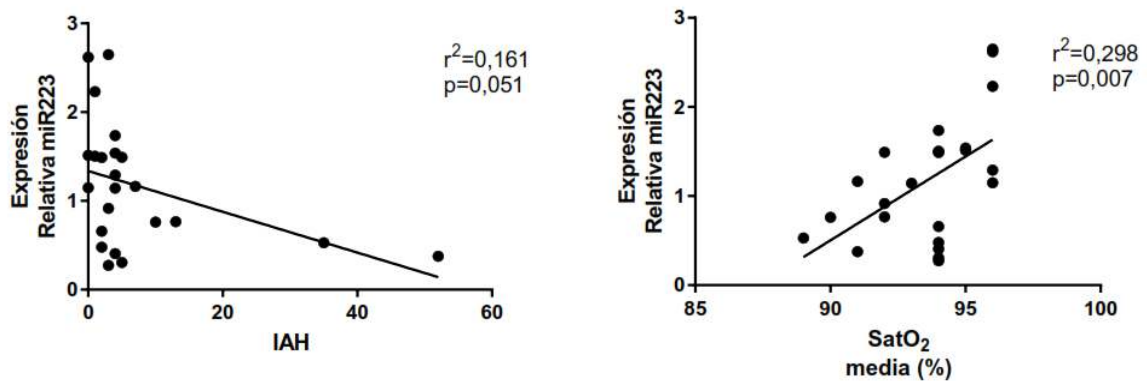


Figura 43. Relación de la expresión del miR223 exosomal con los parámetros del sueño en la última visita
IAH: índice de apneas e hipopneas; SatO₂: saturación de oxígeno.

Tras la pérdida de peso inducida por la CB, a diferencia de lo ocurrido en las visitas previas, el IMC mostró relaciones significativas con el miR16, el miR21 y el miR223 (Figura 44). En la última visita, la pérdida de peso redujo el IAH y tan solo 3 pacientes mantuvieron un IAH por encima de 10, motivo por el cual se decidió no realizar un análisis de regresión con los grupos con AOS y sin AOS. En esta última visita no se establecen conexiones entre los parámetros de la gasometría arterial y los miRNA analizados.

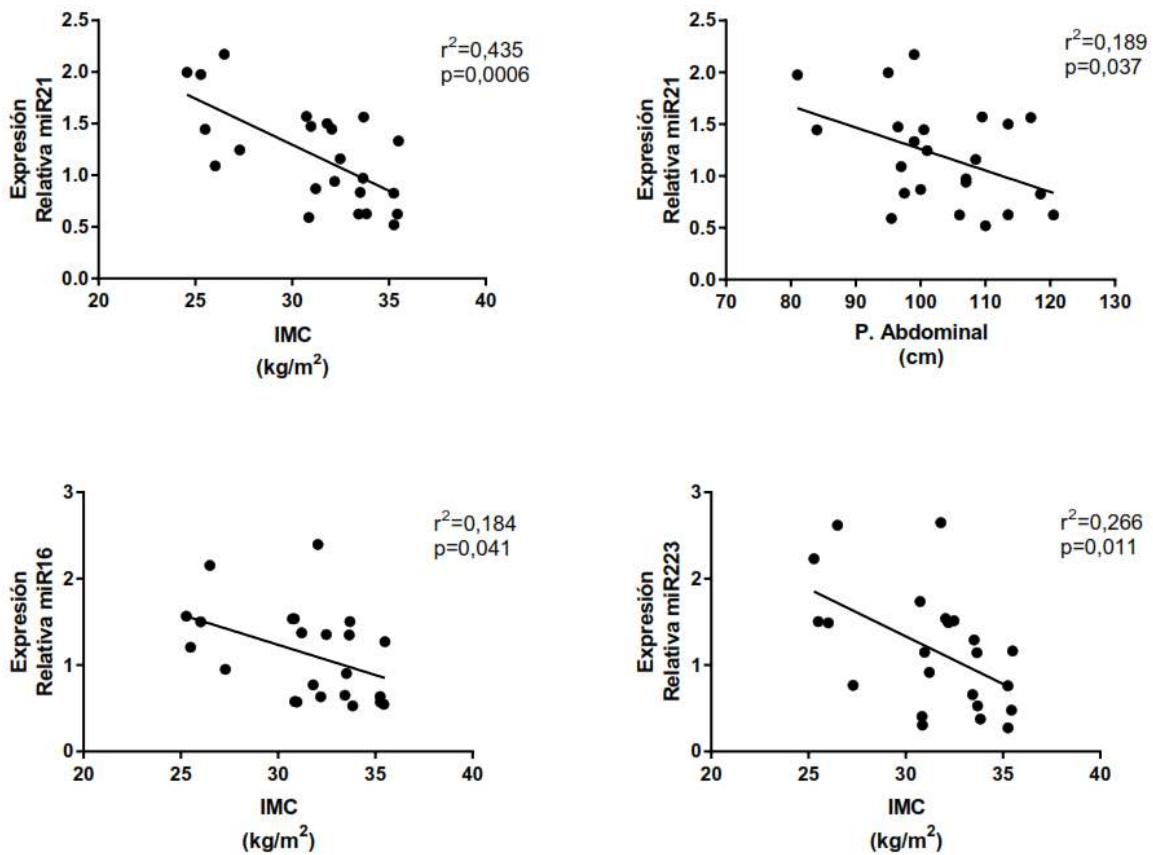


Figura 44. Relación de la expresión de micro-RNA exosomales con los parámetros antropométricos en la última visita
 IMC: índice de masa corporal.

Tras la pérdida de peso 12 meses después de la CB, se establecieron llamativas relaciones en el conjunto de la muestra. En esta visita la glucosa no mostró relaciones con ninguno de los miRNA en estudio. El incremento de la hemoglobina glicosilada tras la pérdida de peso se relacionó con un descenso de distintos miRNA: miR133 ($r^2 = 0,352$; $p = 0,025$), miR145 ($r^2 = 0,199$; $p = 0,042$) y miR146 ($r^2 = 0,208$; $p = 0,028$) (Figura 45). En esta tercera visita, cabe mencionar la relación de la hemoglobina glicosilada con el miR223, que no alcanzó la significación estadística al retirar los *outliers* ($r^2 = 0,127$; $p = 0,069$). Dado que al finalizar la prueba solo hubo 3 pacientes con AOS, no se buscaron las relaciones en este grupo.

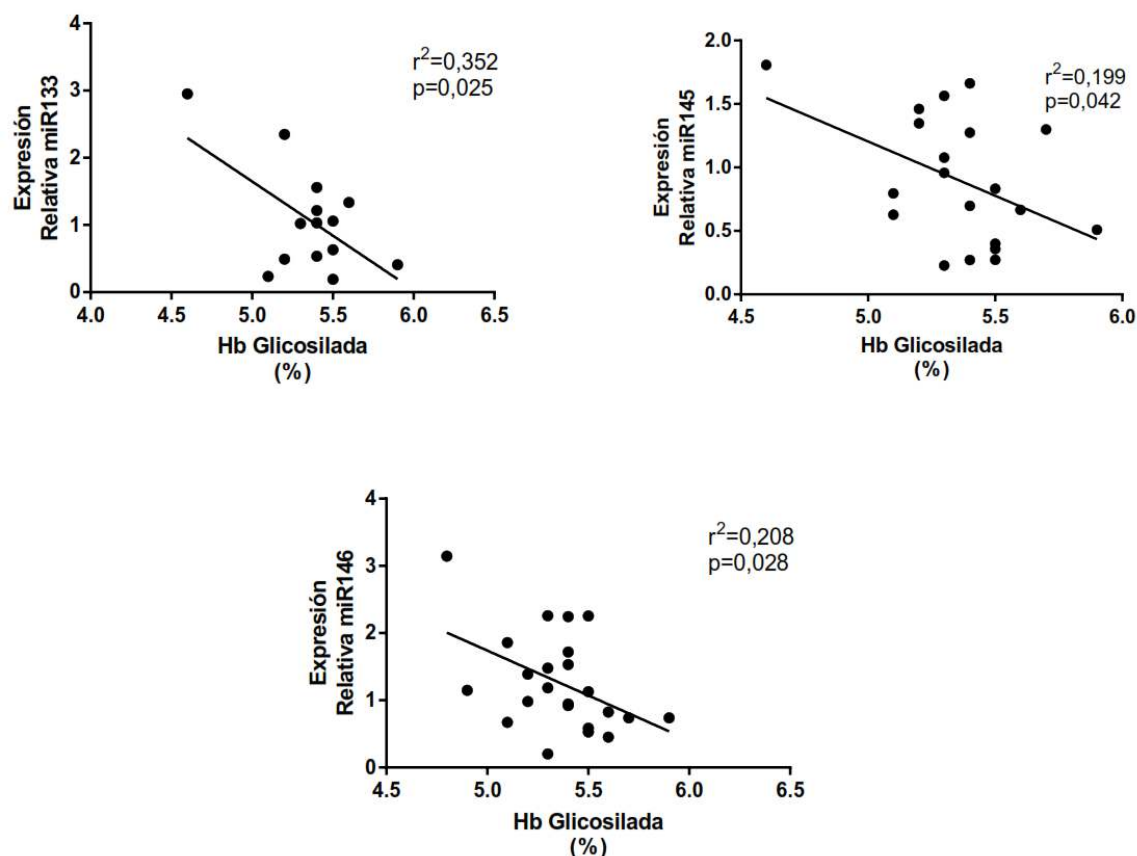


Figura 45. Relación de los parámetros del perfil glucémico con micro-RNA exosomales en la última visita

En la última visita pudimos observar cómo los niveles de colesterol se relacionaron significativamente con la expresión de miR145 ($r^2 = 0,228$; $p = 0,028$), con un sentido inversamente proporcional, es decir, a medida que aumentaba la concentración de colesterol total, disminuía la expresión de miR145. Con este miRNA observamos una relación similar, en el límite de la significación estadística, con la concentración de ApoA ($r^2 = 0,179$; $p = 0,050$). El incremento de los triglicéridos disminuyó la expresión de miR320 ($r^2 = 0,242$; $p = 0,017$). Todas las relaciones se muestran en la Figura 46.

La ApoA, que en otras visitas demostró correlaciones con algunos miRNA, en esta ocasión no lo hizo; aunque destacamos las observadas con el miR21 ($r^2 = 0,158$; $p = 0,055$) y el miR146 ($r^2 = 0,151$; $p = 0,06$) (resultados no representados en las gráficas). Al igual que ha ocurrido con el resto de los parámetros, no se pudo realizar el análisis comparativo entre los pacientes con AOS y sin AOS.

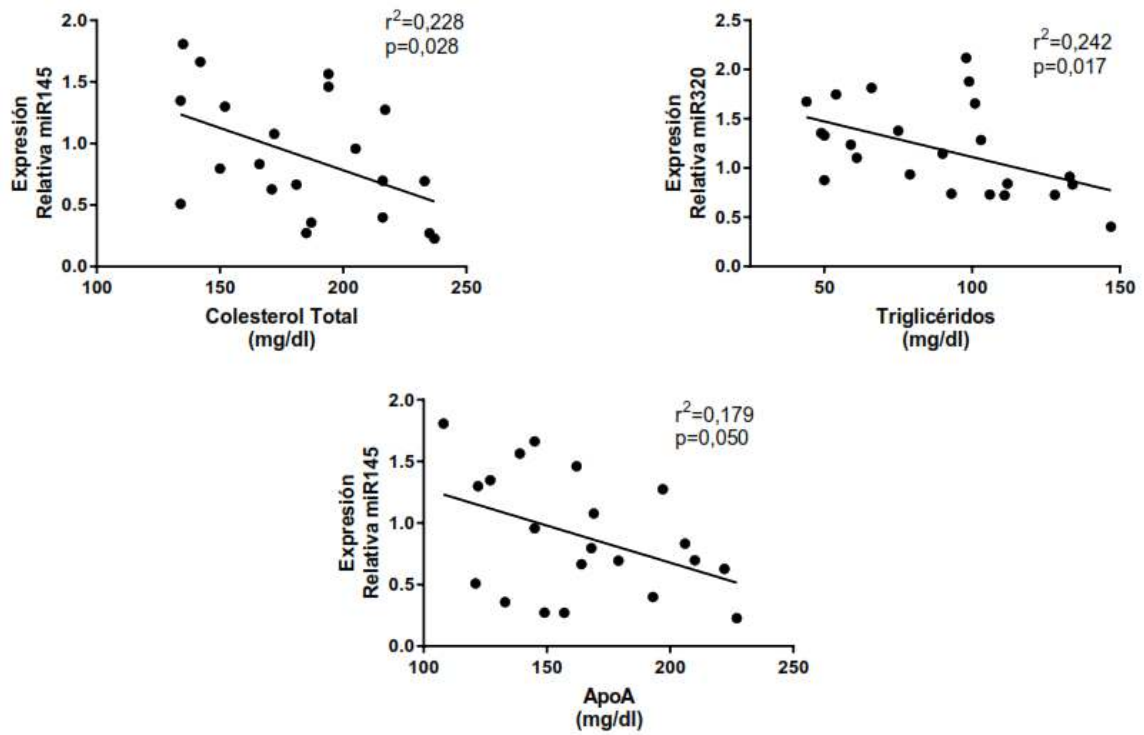


Figura 46. Relación de los parámetros del perfil lipídico con la expresión de micro-RNA exosomales en la última visita
ApoA: apolipoproteína A.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. INTERPRETACIÓN GENERAL

Con este trabajo hemos demostrado, por primera vez, que en pacientes con OM la expresión de miRNA exosomal circulante varía en función de la coexistencia de AOS. También hemos evidenciado que el tratamiento con CPAP y CB modifica dicha expresión. El objetivo de esta tesis era conocer la influencia que la AOS tiene en los pacientes con OM sobre determinados miRNA exosomales relacionados con la aterosclerosis. Dado que los pacientes incluidos procedían de una lista de espera quirúrgica de CB, se hizo un seguimiento hasta un año después esa intervención. De esta forma, se pudo analizar el impacto que sobre esos miRNA tenían el tratamiento con CPAP y la pérdida de peso inducida por la CB.

Hasta la fecha, este es el primer estudio que analiza las diferencias existentes a nivel epigenético entre pacientes con OM con y sin AOS y el impacto que los distintos tratamientos de esas entidades tienen sobre la expresión de una batería de miRNA exosomales relacionados con la aterosclerosis.

La prevalencia de AOS en nuestra muestra está próxima al 60 % y, aunque se encuentra dentro del rango descrito en la literatura, se sitúa por debajo de lo habitualmente publicado (207-212). Tanto en nuestro estudio como en las publicaciones de pacientes con OM pendientes de CB la mayoría son mujeres (85). En pacientes no obesos, el sexo femenino se ha relacionado con un menor riesgo de AOS (3, 7, 209). Pero en las pacientes con OM se presentan prevalencias de hasta el 86 % (211), aunque no se traduce en una equiparación del riesgo entre ambos sexos (213). La elevada prevalencia de AOS y sus potenciales efectos adversos sumatorios sobre la morbimortalidad de la OM obligan a realizar un cribado de AOS (214).

La edad, tanto de nuestra muestra como en los estudios analizados, resulta superior en los pacientes con AOS. Entendemos que la menor prevalencia de AOS en nuestra muestra no se debe al número de mujeres incluidas ni a la edad. Achacamos esas diferencias a los criterios de inclusión y exclusión, que implicaban la selección de pacientes que nunca se hubieran sometido a un estudio del sueño o que no estuvieran en tratamiento con CPAP.

6.2. INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO EN LA CARGA DE MICRO-RNA EXOSOMAL

En la primera visita, los parámetros de la poligrafía están conectados con el miR16 y con el miR145. El primero ve aumentado su expresión a medida que aumenta el IAH, mientras que el aumento de la SatO₂ se traduce en una menor expresión. Una situación similar ocurre con el miR145, aunque en esta ocasión lo hace con el CT₉₀ en lugar del IAH y con un sentido contrario. De la misma forma, cuanto mayor fue la SatO₂ media, mayor fue la expresión de miR145. En el caso del miR16, parece estar influido por la HCI propia de los pacientes con AOS, mientras que el miR145 parece estar ligado a la hipoxemia sostenida propia de la obesidad y la AOS. En un modelo canino de AOS, el descenso en la expresión de miR145 en las células endoteliales indujo fibrosis en la pared aórtica (215).

Los pacientes con OM y AOS presentaron unas diferencias significativas en el miR16, el miR126, el miR223 y el miR320. El miR223 presentó una menor expresión en los pacientes con OM y AOS respecto a los pacientes con OM y sin AOS, mientras que los otros tres miRNA experimentaron una expresión de entre 1,8 y 2,1 veces superior a la de los pacientes con OM y sin AOS. El incremento del miR320e en pacientes con AOS grave (IAH > 30) ha sido descrita en un estudio de casos-controles sobre pacientes varones con obesidad tipo 1 (216). Por otro lado, el miR320b, junto con el miR126-3p, presenta una menor expresión en sujetos con AOS con y sin HTA frente a individuos sanos (217).

Al miR16 se le atribuye un papel antiapoptótico en procesos tumorales (218). Se ha estudiado su comportamiento *in vitro* en situaciones de hipoxia y reoxigenación sobre cultivos celulares de miocardiocitos. Dichos episodios desencadenan una sobreexpresión de miR16 que aumenta la apoptosis celular al inhibir la *cytokine-induced apoptosis inhibitor 1* (CIAPIN1) y aumentar la vía del NF-κB (182). En nuestros pacientes con OM y AOS se encuentra sobreexpresado, hecho que podría contribuir a los efectos deletéreos que la HCI tiene en estos pacientes.

La menor expresión de miR223 en pacientes con OM y AOS no se ha descrito en otros estudios clínicos. No obstante, en estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se analiza el efecto de la hipoxia crónica en cultivos celulares de músculo liso de arteria pulmonar y en ratones se ha observado que el estímulo hipóxico desencadena un descenso en la expresión de miR223, lo que favorece el remodelado y el engrosamiento de la musculatura lisa vascular pulmonar (190).

Una vez establecidas las diferencias entre pacientes con OM con y sin AOS, el siguiente paso consistió en analizar el impacto de las distintas comorbilidades cardiovasculares: HTA, DLP y DM. La escasa prevalencia de las dos últimas entre pacientes sin AOS hace imposible el análisis; por el contrario, encontramos diferencias en la expresión del miR126 y el miR320 en pacientes hipertensos con y sin AOS.

En un estudio sobre 30 pacientes (15 normotensos y 15 hipertensos) sin otras comorbilidades, se observa cómo la expresión de miR126 es menor en el grupo de hipertensos y disminuye a medida que aumenta la tensión arterial sistólica (219). La expresión de miR126 en células mononucleares en sangre periférica de pacientes hipertensos está disminuida frente a controles no hipertensos (220), es decir, el incremento de la tensión arterial disminuye la expresión de miR126. En el trabajo de Yang *et al.* se investigó si la expresión de miR126 era diferente en pacientes con AOS con y sin HTA (217). En dicho estudio se analizan tres grupos de pacientes no obesos (el IMC más alto es inferior a 26 kg/m²): controles sanos y pacientes con AOS con y sin HTA. Los autores de ese estudio concluyen que hay un descenso en la expresión de miR126 circulante en ambos grupos de pacientes y, por tanto, sería independiente de la presencia de HTA. Planteamos además una limitación importante de este estudio, y es que tan solo informan de las diferencias respecto al grupo control, pero no entre pacientes con AOS y HTA y pacientes con AOS pero sin HTA.

En nuestra revisión no hemos encontrado ningún artículo que vincule la HTA con el miR320. No obstante, en el artículo de Karolina *et al.* (221) se analiza el comportamiento de una batería de miRNA, entre los que se encuentra el miR320, en individuos sanos y pacientes con síndrome metabólico, DLP, DM o HTA. En este estudio encuentran que el miR320 forma parte del *cluster* de miRNA relacionados con la DM, pero no con la HTA. En el trabajo de Yang *et al.* (217), con las limitaciones ya descritas, también se encontró que la expresión de miR320 circulante estaba disminuida en pacientes con AOS sin HTA respecto a los controles sanos, pero no en los pacientes con AOS hipertensos. De este modo, planteamos que el resultado en nuestro trabajo pueda deberse al efecto que la DM tiene sobre la expresión de miR320, más allá del resultado de la presión arterial elevada. En nuestra muestra, los pacientes con HTA y DM presentan una mayor expresión de miR320 exosomal circulante que aquellos sin DM, estos hallazgos se observan también en los miR16 y miR126 (anexo 9).

Por último, pudimos comparar la expresión de los miRNA exosomales en pacientes con OM frente a pacientes sin OM del estudio EPIOSA (206). El miR21, el miR145 y el miR223 presentan diferencias significativas en su expresión en pacientes con y sin OM. Pero son el

miR320 y el miR126 los que arrojan las mayores diferencias (anexo 10). Aunque los miRNA que se han estudiado son los mismos en ambos grupos, los experimentos para su análisis, aunque han seguido la misma metodología, son distintos. Este hecho podría justificar las diferencias tan elevadas observadas en las tasas de cambio. Para dilucidar definitivamente si la obesidad tiene un papel fundamental en la expresión de estos y otros miRNA exosomales, se hace necesario analizarlos con la misma metodología.

6.3. INFLUENCIA DE LA APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO SOBRE LA RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS CON LA EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EXOSOMAL CIRCULANTE

El análisis de los parámetros antropométricos demostró que los que más relación guardan con la obesidad (perímetro abdominal e índice cintura-cadera) establecieron las mejores relaciones con la expresión del miR146, independiente de la coexistencia de AOS. Los parámetros antropométricos influyeron de manera determinante en la expresión de un miRNA en concreto, el miR146. En el estudio de regresión lineal vimos cómo a mayor perímetro cervical, índice cintura-cadera y, en especial, perímetro abdominal, la expresión de miR146 disminuía. Este efecto se mantuvo tanto en el grupo de pacientes con AOS como en el de los pacientes sin AOS, por lo que su presencia no afecta a la expresión de dicho miRNA.

El miR146 se ha relacionado con la obesidad, así como con procesos antiinflamatorios y aterogénicos (222, 223). Pero esta relación ha arrojado resultados contradictorios. El trabajo llevado a cabo por Hijmans *et al.* (224) sobre 45 pacientes sanos (15 no obesos, 15 con sobrepeso y 15 obesos) demostró que los pacientes con obesidad y sobrepeso presentaban una menor expresión de RNA total en suero. Establecen además una relación negativa con el IMC, pero no encuentran relación ni diferencias en su expresión en función del perímetro abdominal. Otro estudio (225), sobre niños y adultos asiáticos obesos, para buscar miRNA de riesgo de padecer DM en al edad adulta, demostró una relación positiva entre el IMC y la expresión de miR146a y miR146b, con una sobreexpresión de estos en los niños obesos en comparación con los controles no obesos, así como en los adultos no obesos con DM. Los resultados de nuestro estudio siguen la línea del trabajo de Hijmans, si bien en nuestro caso no se logra alcanzar la significación estadística entre el IMC y la expresión de miR146, pero sí con el resto de parámetros antropométricos.

En síntesis, en pacientes con OM existe una relación significativa entre el perímetro abdominal y la expresión de miR146. Esta relación es independiente de la existencia de AOS.

En nuestro estudio no hemos encontrado ninguna relación entre el perímetro cervical y la expresión de miRNA exosomal.

Proseguimos el análisis con los parámetros gasométricos. Vimos cómo los valores relacionados con la hipoventilación ($P_a\text{CO}_2$ y bicarbonato) estaban vinculados con el miR16 y el miR21 en el conjunto de la muestra. Tan solo los pacientes con OM y AOS mantuvieron esas relaciones y, además, añadieron la influencia de la concentración de bicarbonato sobre el miR320 (con la $P_a\text{CO}_2$ no se alcanzó la significación estadística). Esos miRNA ven aumentada su expresión a medida que se incrementa la $P_a\text{CO}_2$ y el bicarbonato.

El siguiente punto del análisis lo constituyen las relaciones observadas de la expresión de miRNA con los parámetros del perfil glucémico. El 60 % de los pacientes con AOS presentaban DM, mientras que tan solo un paciente (11,1 %) del grupo sin AOS era diabético. Los parámetros utilizados para analizar la DM fueron la glucosa y la hemoglobina glicosilada.

De nuestro análisis se desprende que, en aquellos individuos en los que coexisten OM y AOS, el incremento en la concentración de glucosa y hemoglobina glicosilada aumenta la expresión de miR34. Los pacientes con OM pero sin AOS no mostraron esta relación, y el conjunto de pacientes con OM tampoco. Otros investigadores han analizado el papel de los miRNA circulantes o extracelulares en la obesidad, los estados prediabéticos y la DM insulino dependiente y no insulino dependiente. Dentro de la batería de miRNA, la sobreexpresión de miR34 se ha observado en pacientes obesos o en situaciones de DM (226).

En la primera visita pudimos comprobar cómo los niveles de glucosa y hemoglobina glicosilada se relacionaron con el miR21, el miR146 y el miR320. El incremento tanto de la glucosa en ayunas como de la hemoglobina glicosilada dio lugar a un descenso en la expresión de miR21 en el grupo de pacientes sin AOS, si bien las diferencias no alcanzaron la significación estadística. El miR21 se ha relacionado con los estados prediabéticos y con la DM tipo 2; sin embargo, su relación con los parámetros del perfil glucémico no se ha podido determinar en un sentido u otro (226).

De igual forma, tanto el miR146 como el miR320 vieron reducida su expresión a medida que aumentaban los valores de hemoglobina glicosilada sin alcanzar la significación estadística. Al igual que el miR21, la relación de ambos con la DM (prediabetes y DM tipo 2) también se ha documentado, aunque tampoco se ha aclarado la dirección de esta relación (226).

Para terminar el análisis del perfil glucémico, queremos incidir en las limitaciones que presenta nuestro estudio debido al escaso número de pacientes incluidos, en especial en el

grupo de pacientes con OM y AOS y sin DM. No obstante, podemos concluir que la coexistencia de OM y AOS influye en los parámetros del perfil glucémico y su relación con el miR34.

Dentro del marco del análisis de las relaciones entre el miRNA exosomal y los parámetros bioquímicos, continuamos con el análisis del perfil lipídico. Los pacientes con AOS no presentaron diferencias significativas en los parámetros analizados del perfil lipídico ni en el grupo de quienes acudieron a la primera visita ni entre quienes completaron todo el estudio. No obstante, las diferencias no fueron homogéneas en todos los parámetros. En el caso de la ApoA, vimos que los pacientes con AOS que completan el estudio tenían menor cantidad de esta proteína que los pacientes sin AOS; por el contrario, en el grupo de pacientes que no completan el estudio esta relación se invierte. Esta diferencia resulta difícilmente explicable, ya que lo esperable (tanto por los datos encontrados en la bibliografía como por la relación entre la AOS y la aterosclerosis) es que los niveles de ApoA sean superiores en los pacientes sin AOS (227, 228).

Nuestro análisis demuestra que el incremento en la concentración de colesterol total y LDL se traduce en un descenso en la expresión de miR145. Un experimento analizó el efecto de las fuerzas de cizallamiento, factor proaterogénico, sobre la expresión de miR143/145 en cultivos de células endoteliales humanas y de músculo liso. En él se observó que dicho estímulo induce, por un lado, una mayor expresión del complejo miR143/145 y, por otro, mayor empaquetamiento exosomal de ese complejo de miR143/145, cuyo destino son las células de la musculatura lisa vascular de proximidad. Una vez en su interior, inducen cambios fenotípicos en la célula de músculo liso y la protegen de la formación de placas de ateroma (229). Nuestros resultados señalarían la dirección marcada en este último trabajo, ya que el aumento de colesterol total y LDL, ambos factores proaterogénicos, se traduce en una menor expresión de miR145 exosomal circulante. En ese sentido, vimos cómo esta relación, esta vez tan solo entre el colesterol total y el miR145, tan solo se observó en el grupo de pacientes con AOS.

Para terminar el análisis del perfil lipídico en la primera visita, estudiamos el papel de la ApoA. Esta lipoproteína es el principal componente de la HDL, lo que hace que el aumento en su concentración se considere un efecto positivo y ateroprotector. En nuestras observaciones comprobamos cómo el aumento en la concentración de ApoA se tradujo en una ampliación en la expresión del miR146 en el conjunto de la muestra; y, en el grupo de pacientes con AOS, del miR126.

El miR146 tiene una actividad antiinflamatoria (171, 179). Los estudios de Cheng *et al.* (101, 171) señalan la acción inhibitoria sobre el NF- κ B, entre otras, como responsable de este efecto antiinflamatorio. Esos estudios afirman que la sobreexpresión de miR146 aparece como respuesta al incremento de citocinas proinflamatorias, actúa, como dicen Cheng *et al.* (101), como un «freno». La expresión de miR146 está aumentada en las células endoteliales del fenómeno aterogénico (230). Dicho incremento se entiende como un mecanismo de respuesta para controlar la inflamación que lleva a la formación de la placa de ateroma.

El otro miRNA que mostró una relación significativa con la ApoA fue el miR126, que aumenta con el incremento de los niveles de ApoA en el grupo de pacientes con OM y AOS. La expresión de miR126 desempeña un papel antiinflamatorio y ateroprotector (231). La relación de este miRNA con las lipoproteínas se ha estudiado en el contexto del papel que esas moléculas, en concreto las HDL, adquieren como transportadores de miRNA (118, 232, 233).

De las evidencias mostradas por los miRNA exosomales y los parámetros del perfil lipídico, podemos concluir que la coexistencia de OM y AOS induce un vínculo entre ambos, que no se da en pacientes sin AOS.

6.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PRESIÓN POSITIVA CONTINUA EN LA VÍA AÉREA SOBRE LA CARGA DE MICRO-RNA EXOSOMAL

En nuestro estudio, como vimos en la Figura 32, los pacientes con AOS que han estado en tratamiento con CPAP experimentaron un descenso significativo de los miRNA exosomales: el miR16, el miR21, el miR126 y el miR320. Este hecho no se puso de manifiesto en el grupo de pacientes sin AOS. Dicha variación en la expresión de los miRNA, inducida por el tratamiento con la CPAP, hizo que, en esta segunda visita, desapareciesen las diferencias observadas en la primera visita entre los pacientes con AOS y sin AOS. El efecto que el tratamiento con CPAP tiene sobre los exosomas y la expresión de miRNA circulante ya se ha estudiado (187, 234-237). Los trabajos procedentes del estudio HIPARCO (187, 236) demostraron que con 3 y 6 meses de tratamiento con CPAP ya se producían variaciones significativas en ellos. Aunque los resultados señalan en la misma dirección hay que tener en cuenta que el estudio HIPARCO analiza miRNA libre circulante mientras que el nuestro lo hace con miRNA contenido en los exosomas.

Como se acaba de comentar, el efecto positivo del CPAP sobre la expresión de miRNA circulante ya se ha descrito. No obstante, tan solo en dos de esos trabajos se analiza el efecto que la CPAP tiene en pacientes con OM (235, 237). Ambos estudios tienen como objetivo

principal analizar el comportamiento de los exosomas circulantes en sujetos con síndrome de hipoventilación y obesidad y, aunque evidencian diferencias en ellos, tan solo el trabajo de Bhattacharjee *et al.* (237) aporta información sobre el contenido que transportan. Este trabajo, llevado a cabo sobre 12 pacientes, en su mayoría afroamericanos, indica que el tratamiento con un dispositivo de CPAP o de bipresión positiva en las vías respiratorias (*bilevel positive airway pressure*, BiPAP) modificó la expresión de los miRNA exosomales, entre los que se encontraba el miR16. Estos hallazgos, junto con los trabajos citados en el párrafo anterior, validan nuestros resultados.

Pudimos comparar el efecto de la CPAP en pacientes con y sin OM gracias a los pacientes del estudio EPIOSA. Vemos cómo el tratamiento con CPAP en pacientes con OM modifica un mayor número de miRNA exosomales (miR21, miR126 y miR320), mientras que en el grupo de pacientes de EPIOSA el tratamiento con la CPAP tan solo modifica la expresión del miR145. Este punto merece un comentario aparte, ya que, en el estudio original, los pacientes del grupo con AOS se subdividen en cuatro grupos: AOS con aterosclerosis subclínica y sin ella y con tratamiento con CPAP y sin él. En los pacientes con AOS sin aterosclerosis tratados con CPAP se modifica la expresión de miR320 (206). Estas diferencias vienen determinadas por las características basales de ambos grupos y el efecto de la obesidad sobre la expresión de miRNA exosomales.

También fue objeto de análisis la modificación en los parámetros antropométricos y bioquímicos a los 6 meses, tanto en pacientes con AOS como en pacientes sin AOS. En la visita de los 6 meses observamos cómo el grupo de pacientes que estaba en tratamiento con CPAP mantuvieron sus parámetros antropométricos. Este hecho no ocurrió con los pacientes que no padecían AOS, quienes experimentaron un incremento significativo en todas las medidas, a excepción del IMC. El IMC en este grupo de pacientes aumento $1,1 \text{ kg/m}^2$ sin alcanzar la significación estadística. El efecto que el tratamiento de la AOS con CPAP tiene sobre el IMC ya se ha estudiado. En este sentido, el trabajo de Myllylä *et al.* (238) demuestra que la adherencia al tratamiento con CPAP no evita la ganancia ponderal en pacientes con OM, pero sí que consigue atenuarla. Otros estudios han demostrado que el uso de CPAP no es capaz de reducir el IMC y que incluso lo puede aumentar con respecto al placebo (*sham CPAP*) (239, 240). El objetivo principal de nuestro estudio no fue analizar el efecto concreto de la CPAP sobre los parámetros antropométricos, pero en los que la utilizaron no se produjo esa ganancia ponderal.

Al igual que en la primera visita, comenzamos el análisis de los parámetros bioquímicos con el perfil glucémico. La glucosa se mantuvo constante en ambos grupos en la segunda visita. Por el contrario, la hemoglobina glicosilada aumentó en los pacientes con AOS sometidos a

tratamiento con CPAP. Pese a la evidente relación existente entre AOS y DM, el tratamiento del primero no parece alterar ni el nivel de glucemia en ayunas ni la hemoglobina glicosilada, aunque sí que parece reducir la resistencia a la insulina (241, 242).

Tres de los miRNA (miR16, miR21 y miR320) que experimentaron un descenso significativo por la acción de la CPAP mostraron novedosas relaciones con los niveles de glucosa en el conjunto de la muestra. El incremento en la concentración de glucosa disminuyó la expresión de estos miRNA. El grupo de pacientes con OM sin AOS, a diferencia de lo observado en la primera visita, dio cuenta de novedosas relaciones. En este grupo el miR16 y el miR320 disminuyeron su expresión a medida que aumentaba la concentración tanto de glucosa como de hemoglobina glicosilada.

En el grupo de pacientes con OM y AOS desaparece la relación observada en la primera visita entre el miR34 y los parámetros del perfil glucémico. Además, este grupo de pacientes experimentó un incremento de la expresión de miR145 a medida que aumentaron los niveles de hemoglobina glicosilada. Este miRNA ha sido relacionado con el diagnóstico de disfunción de células β pancreáticas en pacientes no diabéticos que acabaron desarrollando una situación de pre-DM tipo 2 a los 3 años (243). De esta forma, el miR145, junto con otros miRNA (como el miR21 o el miR223, entre otros), actuarían como predictores, muy precoces, del riesgo de padecer DM.

En resumen, vemos cómo el tratamiento con CPAP actúa de manera determinante sobre la relación de los miRNA exosomales y su relación con los parámetros del perfil glucémico estudiados.

Los parámetros del perfil lipídico también mostraron diferencias llamativas que pasamos a discutir a continuación. Los individuos con OM y sin AOS experimentaron un aumento significativo en la concentración de ApoA respecto a la primera visita. Achacamos este hecho al tratamiento con hipolipemiantes, ya que en la primera visita tan solo un paciente del grupo sin AOS usaba estos fármacos y, en esta segunda visita lo hacen 4 pacientes más. Uno de los efectos del tratamiento con estatinas es el aumento en la concentración de ApoA (244-246).

En esta segunda visita se actualizan las relaciones entre los parámetros del perfil lipídico. El miR223 presenta una relación significativa con los niveles de ApoA en la segunda visita, tan solo en el conjunto de la muestra. Gracias a los trabajos de Vickers *et al.*, conocemos el papel que este miRNA juega en la homeostasis del colesterol, así como su unión con las moléculas HDL para su transporte (119, 247). En sus experimentos sobre cultivos de hepatocitos humanos, describe cómo la sobreexpresión de miR223 inhibe la biosíntesis de colesterol, así

como su captación, y favorece la salida a través del *ATP binding cassette transport A1* (ABCTA1). Esta vía de salida hace que el colesterol se una a la ApoA1, favoreciendo, por tanto, la formación de HDL, tanto en los hepatocitos como en los macrófagos cargados de lípidos del tejido periférico (248).

También vimos cómo el miR146 aumentaba su expresión con el incremento de ApoA en los pacientes con OM y sin AOS. En los experimentos con ratones que no expresaban miR146, más allá de las diferencias en la formación de placa frente a aquellos que sí lo expresaron, encontraron que aumentaban los niveles de citocinas proinflamatorias circulantes, como TNF- α o IL-6; se alteraba la producción, en la médula ósea, de células aterogénicas (descenso de monocitos Ly6^{hi}, neutrófilos y células T con efecto proaterogénico; incremento de monocitos Ly6^{lo} con efecto protector); y disminuían los niveles de todo el perfil lipídico, en especial de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y LDL (101).

La relación del miR34 con los triglicéridos se invirtió respecto a la primera visita. Antes de iniciar el tratamiento con CPAP, la relación positiva se dio en el conjunto de la muestra. Sin embargo, en esta segunda visita, el aumento en la concentración de triglicéridos disminuyó la expresión de miR34. En esta ocasión, esta relación se vio tanto en el conjunto de la muestra como en el grupo de pacientes sin AOS; ahora bien, el grupo de pacientes con AOS y en tratamiento con CPAP exhibe una relación en el mismo sentido que los pacientes sin AOS, pero sin alcanzar la significación estadística. El único cambio con respecto a la primera visita es el aumento de la concentración de ApoA, que achacamos al aumento en el uso de hipolipemiantes, y el uso de la CPAP en el grupo de AOS. Los niveles de miR34 no experimentaron una variación significativa en esta segunda visita, por lo que la AOS no parece jugar un papel fundamental en esta relación.

Otro de los miRNA que establecieron novedosas relaciones fue el miR133. Este miRNA mostró conexiones con la concentración de ApoA en el conjunto de la muestra y con los triglicéridos en el grupo de pacientes con OM sin AOS. Estos hallazgos no se encontraron en la primera visita. El miR133 se considera un miRNA con efecto protector frente al desarrollo de aterosclerosis (169). En la revisión realizada, los estudios encontrados muestran una relación entre la concentración de LDL y miR133. El primer estudio demuestra cómo la acción del miR133 en los macrófagos CD36 impide, a través de la vía del *testicular orphan nuclear receptor 4* (TR4), la entrada de oxi-LDL, evitando de esta forma la transformación del macrófago en célula espumosa y su posterior depósito en la placa de ateroma (249). Otro estudio llevado a cabo en pacientes con DM tipo 2 con y sin enfermedad coronaria demostró que aquellos que padecían la enfermedad coronaria presentaban una relación directamente proporcional entre los niveles de LDL y la expresión de miR133 circulante (250). Estos

hallazgos sugieren que el incremento de miR133 actuaría como factor protector frente al desarrollo de aterosclerosis. Nuestros resultados sugieren que el incremento de miR133 podría estar causado por el incremento de ApoA, e indirectamente por las HDL, con una función claramente preventiva frente a la aterosclerosis.

El grupo de pacientes sin AOS, en la segunda visita, fue el que más relaciones demostró: el miR126 con el colesterol total, las LDL y la ApoA, y el miR145 con los triglicéridos y la ApoA. En la primera visita, el miR126 resultó estar conectado con el incremento de ApoA únicamente en el grupo de pacientes con AOS. Por el contrario, en la segunda visita, tras la acción de la CPAP, esos hallazgos en el grupo con AOS desaparecieron. Sin embargo, se mantuvieron en el grupo de pacientes sin AOS.

Como hemos comentado previamente, el papel del miR145 en el metabolismo lipídico y su relación con la aterosclerosis no están claros. En esta segunda visita, desaparece la concordancia observada en el grupo de pacientes con AOS y, por extensión, en el conjunto de la muestra. Nuevamente, atribuimos al tratamiento con hipolipemiantes los hallazgos en el grupo de pacientes sin AOS en esta segunda visita. Concluimos, por tanto, que el tratamiento con la CPAP hizo desaparecer la concordancia entre el miR145 y el colesterol total; y, probablemente, la relación entre este y las LDL.

En definitiva, podemos concluir que el tratamiento con CPAP modifica las conexiones establecidas en la primera visita entre distintos miRNA exosomales y determinados parámetros del perfil lipídico.

6.5. EFECTO DE LA CIRUGÍA BARIÁTRICA SOBRE LA CARGA DE MICRO-RNA EXOSOMAL

Con la CB se produjo la mayor pérdida de peso, con una caída de 11 kg/m² en el conjunto de la muestra, lo que supone una pérdida del 25 % del exceso de peso en el conjunto de la muestra. Los pacientes con AOS experimentaron una caída mayor que los pacientes sin AOS, si bien estas diferencias no fueron significativas. La caída del resto de los parámetros antropométricos fue similar en ambos grupos, a excepción de la reducción del perímetro cervical, que fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con AOS. La pérdida de peso en nuestro trabajo es similar a lo descrito en la revisión bibliográfica. La mayor pérdida de peso se alcanza en el primer año y, aunque puede proseguir en el segundo, ya se mantiene a lo largo de los años (87, 251).

En la última visita, con respecto a la primera, hubo diferencias significativas en el miR16, el miR21, el miR126 y el miR320. Sin embargo, no podemos achacar a la pérdida de peso esas diferencias, ya que el tratamiento con CPAP fue el responsable de ellas. Tan solo se produjo una variación significativa respecto a la segunda visita, en relación con el miR146. Ese miRNA había experimentado en los pacientes con OM y AOS un descenso significativo respecto a la primera visita, mientras que con la pérdida de peso recuperó la expresión de esa primera visita. Estos resultados, desde nuestro punto de vista, y tras la revisión de la literatura, no se han descrito previamente.

Hasta la fecha tan solo hemos encontrado dos trabajos que analicen los miRNA exosomales en pacientes con OM antes y después de CB (252, 253). El trabajo de Hubal *et al.* (252) fue llevado a cabo en 6 mujeres afroamericanas en las que se analizaron los miRNA exosomales derivados de los adipocitos y su influencia sobre la resistencia a la insulina. A diferencia de nuestro estudio, realizan un *microarray*, en el que seleccionan miRNA que actúan sobre mRNA que participan en la resistencia a la insulina. De entre todos los miRNA que mostraron cambios significativos tras la CB, destacan el miR16 y el miR125. Ambos actúan selectivamente sobre 37 mRNA relacionados con la señalización de la insulina, pero solo se establece una correlación significativa entre la variación del miR16 y la mejoría de la resistencia a la insulina un año después de la CB. En el otro estudio, llevado a cabo por Bae *et al.* (253), se analizó el comportamiento de 12 pacientes con OM no diabéticos ni hipertensos, antes de la CB y 6 meses después. Utilizan como controles a un grupo de voluntarios sanos. En su análisis, demuestran que la pérdida de peso inducida por la CB modifica la expresión de miRNA exosomales. Ambos estudios no analizan la influencia de la AOS en sus resultados.

En nuestro grupo de pacientes también observamos estas variaciones entre la visita inicial y la de un año después de la CB. Sin embargo, esas diferencias no se reproducen en el grupo de pacientes sin AOS, pero sí en aquellos que sufren apneas. Como conclusión, pensamos que dichos miRNA vienen determinados por la existencia de AOS y no por la obesidad.

Otro estudio analizó la evolución temporal de los miRNA circulantes en los 12 primeros meses después de la CB (142). Entre los miRNA que modificaron su expresión se encontraron el miR16, que se modificó a los 9 meses, y el miR21 y el miR320, que lo hicieron en la última visita, coincidiendo con la mayor pérdida de peso. Una vez más, no se tuvo en cuenta la existencia de AOS. En nuestra revisión han sido múltiples los miRNA circulantes que se ven alterados por la pérdida de peso inducida por la CB, pero el miR320 es el que con más frecuencia aparece como alterado (142, 144, 254).

Respecto a las diferencias en esta última visita entre pacientes con AOS y sin AOS en cuanto a la expresión de miRNA, no se establecieron. Entendemos que la ausencia de diferencias en este sentido puede deberse al descenso del IAH inducido por la propia pérdida de peso. Ello hace, como se muestra en los resultados del grupo de pacientes con AOS, que tan solo queden 3 pacientes con un IAH superior a 10. Dado que 3 individuos es un número muy escaso para elaborar análisis estadístico, no se llevó a cabo. Sin embargo, si revisamos los resultados del estudio EPIOSA, se establecen diferencias significativas en el miR21, el miR126, el miR223 y el miR320 (206).

En esta última visita se estableció una relación positiva entre la SatO₂ media y el miR223. Este hallazgo iría en línea con los hallazgos de la primera visita, en la que la expresión de miR223 fue menor en pacientes con AOS, algo que ha sido descrito en modelos *in vitro* e *in vivo* (190). La variación relativa de la SatO₂ media fue el único parámetro del sueño que demostró influir de manera determinante en la variación de los miRNA respecto a la primera visita. En este caso, fueron el miR16 y el miR145 los que demostraron estar influidos por la variación de la SatO₂ media.

En el grupo de pacientes con OM y sin AOS, el incremento relativo del IAH determinó el descenso en la expresión de miR16 y miR320 respecto a la primera visita. Este resultado, aunque significativo, tiene escasa explicación técnica, ya que la variación del IAH, en pacientes con OM y sin AOS, no presenta diferencias significativas respecto a la primera visita. Por el contrario, en el grupo de pacientes con AOS, el incremento en la SatO₂ media aumentó la expresión del miR145 y el miR223.

Con la pérdida de peso experimentada después de la CB, el IMC alcanzó un protagonismo que no obtuvo en la primera visita. El miR146, que había establecido significativas relaciones con el resto de los parámetros antropométricos, en esta ocasión no manifestó ninguna. El IMC en esta visita presentó una correlación negativa con la expresión de miR16, miR223 y miR21; este último, además también mostró una correlación igualmente negativa con el perímetro abdominal. La variación en los parámetros antropométricos, en especial del perímetro abdominal, influyó en el descenso en la expresión de miR21, miR320 y miR223; sobre este último, también influyó la pérdida relativa de IMC. Estos hallazgos solo se describieron en los pacientes que inicialmente se incluyeron en el grupo de AOS. La relación entre el miR223 y el IMC se ha descrito en un grupo de niños obesos (255).

Al finalizar el estudio se establecieron relaciones significativas entre algunos miRNA y la hemoglobina glicosilada. El incremento de los niveles de hemoglobina glicosilada disminuyó significativamente la expresión de miR133. Este miRNA participa en la homeostasis de la

glucosa en el músculo esquelético. En el músculo estriado esquelético de pacientes con DM tipo 2, su expresión está reprimida por acción de la insulina, mientras que los niveles de glucosa sanguínea en ayunas muestran una relación positiva con su expresión (256, 257). Modelos *in vivo* de cultivo de músculo cardíaco y murino de células renales con nefropatía diabética han demostrado que el miR133 se ve influido positivamente por los niveles de glucosa en ayunas y la hemoglobina glicosilada (258, 259).

La hemoglobina glicosilada mostró también una relación inversa significativa, al final del estudio, con respecto al miR145 y el miR146. Estos miRNA han sido señalados como factores predictivos y de diagnóstico de estados de pre-DM tipo 2. Parece ser que el descenso en la expresión de miR145 y miR146 se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer DM tipo 2 (226). Por tanto, nuestros hallazgos en pacientes que ya han perdido peso por efecto de la CB apoyarían esta hipótesis, ya que el incremento de la hemoglobina glicosilada lleva aparejado un descenso en la expresión de este miRNA.

En el análisis del perfil lipídico de la última visita aparecieron relaciones no observadas hasta entonces. La más significativa fue la observada entre los triglicéridos y el miR320. El incremento en la concentración de esas partículas redujo significativamente la expresión de miR320 exosomal. Por el contrario, como se ha expuesto en la Tabla 5, los efectos perjudiciales de este miRNA se han relacionado con su sobreexpresión. Resultan llamativos, por tanto, los hallazgos observados en la expresión de miR320 exosomal circulante. Hay que tener en cuenta que los artículos revisados (168, 174, 191-193, 203) analizan la acción del miR320 en modelos *in vivo* y, siempre, la expresión de miRNA total, a diferencia de nuestro estudio, que analiza el comportamiento de miRNA exosomal circulante. También observamos una relación entre el miR145 y la concentración de colesterol total y ApoA. La conexión entre el miR145 y el colesterol ya se observó en la primera visita, tanto en el conjunto de pacientes con OM como en aquellos que además presentaban AOS.

Los niveles de PCR no mostraron ninguna relación en ninguna de las visitas. En la revisión realizada en PubMed con las palabras clave *circulating miRNA* y *C-reactive protein* encontramos un total de 58 artículos, y el miR21 era el que se relacionaba con mayor número de trabajos. También se han estudiado el miR133, el miR126 y el miR33. El miR155, aunque en menos publicaciones, también ha sido analizado y ha demostrado una correlación positiva con la PCR (260-262).

6.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio obtiene resultados interesantes y previamente no descritos en un campo escasamente estudiado: la influencia de la AOS en la expresión de miRNA exosomal en pacientes con OM. A la hora de la interpretación de estos resultados debemos destacar las limitaciones que podrían alterar, de algún modo, dichos resultados.

- Aunque se alcanzó el objetivo de incluir 30 pacientes (36 con AOS y 34 sin AOS), el seguimiento posterior tuvo un índice de abandono superior al 10 % previsto, en especial en el grupo de pacientes con OM y sin AOS. La escasa muestra, por tanto, permite señalar la dirección de las diferencias, pero no establecer conclusiones certeras.
- Se trata de un estudio con escasa financiación, por lo que se han tenido que elegir un grupo de miRNA, en lugar de realizar un *microarray* que permitiera estudiar un mayor número de miRNA.
- Los resultados de EPIOSA y los nuestros proceden de dos ensayos distintos, por lo que las diferencias en la comparación entre los datos de ambos trabajos pueden deberse a cuestiones metodológicas. Aunque se han incluido en el anexo 9 los resultados de dicha comparación, no se pueden extraer conclusiones, pero señalan una dirección para futuros estudios con las muestras almacenadas de ambos grupos para su análisis.
- Al finalizar el estudio, por efecto de la CB se redujo el número de pacientes con AOS a tan solo 3, por lo que no se pudieron realizar análisis para comparar los resultados entre este grupo y el de los pacientes sin AOS.

En resumen, con el trabajo descrito en esta tesis doctoral hemos mostrado, por primera vez, las diferencias en la expresión de miRNA exosomal circulante de pacientes con OM en función de la coexistencia de AOS. Nos permite, por tanto, aceptar nuestra hipótesis de trabajo de que existe un perfil epigenético propio de los pacientes con OM y AOS. Además, hemos expuesto cómo el uso de las distintas opciones terapéuticas para cada una de las condiciones (CPAP y CB) altera la expresión de una batería de miRNA exosomales.

Hemos demostrado la fuerte señal que la obesidad tiene en la expresión de miRNA y cómo la AOS modifica significativamente la expresión del miR126, el miR223 y el miR320. Del

mismo modo, hemos podido observar cómo algunos de los cambios producidos por la CB ya se habían producido por efecto de la CPAP y se mantuvieron un año después de esta.

Nuestra investigación permite, más allá de incrementar el conocimiento en la fisiopatología de estas dos enfermedades, utilizar los miRNA exosomales como biomarcadores específicos para ambas enfermedades. Confirman y afianzan la necesidad de realizar un cribado de AOS en pacientes con OM. Estos biomarcadores nos permitirían individualizar el tratamiento, acelerando la realización de la CB en aquellos pacientes con peor perfil epigenético. Por último, abre la puerta a futuros estudios, tanto clínicos como en investigación básica, que permitan dilucidar la disparidad en la actividad de los miRNA en función de si son transportados en los exosomas o se unen a proteínas o lipoproteínas.

Por último, plantea novedosas hipótesis que deben confirmarse en futuros trabajos de investigación clínica y básica. Queremos destacar, por un lado, el escaso número de estudios publicados sobre la expresión de miRNA exosomal circulante, obesidad y AOS; y, por otro, las diferencias observadas entre la expresión de miRNA circulante y miRNA exosomal circulante. Nuestros hallazgos, en muchas ocasiones contradictorios con lo descrito en la literatura, plantean distintas preguntas: ¿influye la enfermedad en el número de exosomas desprendidos por las distintas células?, ¿la capacidad de penetrar en las células del miRNA contenido en los exosomas es la misma que la del miRNA libre?, y, en relación con el propio empaquetamiento de los miRNA en el interior de los exosomas, ¿puede tener el objetivo de reducir su acción?

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. La incidencia de AOS (definida por un IAH superior a 10 eventos/hora) fue del 62,5 %, dentro del rango esperable, aunque en el límite inferior.
2. La coexistencia de AOS y OM modifica la expresión de los miRNA exosomales circulantes (miR16, miR126, miR223 y miR320) respecto a la existencia de OM sin AOS.
3. El tratamiento durante 6 meses con CPAP reduce la expresión de tres de los miRNA alterados en los pacientes con AOS en la primera visita (miR16, miR126 y miR320), además de dos nuevos miRNA (miR21 y miR146), y no afecta a la expresión de miR223.
4. La CB no tiene un efecto directo sobre la expresión de los miRNA exosomales estudiados. Esto se debe a que las alteraciones de este conjunto de miRNA se producen de manera principal por el AOS.
5. Existe una relación entre parámetros antropométricos y miRNA exosomales. Especialmente, el miR146 se encuentra asociado con el perímetro abdominal en pacientes con OM, independientemente de la existencia de AOS. Estas relaciones desaparecen con la pérdida de peso.
6. Los parámetros del perfil glucémico y lipídico tienen una correlación con determinados miRNA exosomales por acción de la AOS. Tanto el tratamiento con CPAP como la CB modifican estas alteraciones.
7. Los parámetros de sueño (IAH, CT₉₀ y SatO₂ media) modifican la expresión de dos miRNA (miR16 y miR145).
8. Los parámetros gasométricos de hipoventilación (P_aCO₂ y bicarbonato), por acción de la AOS, aumentan la expresión del miR16, el miR21 y el miR320.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Durán Cantolla J, Puertas Cuesta F, Pin Arboledas G, Santa Maria Cano J, y el Grupo Español de Sueño G. Documento de consenso nacional sobre el síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Archivos de bronconeumología*. 2005;41(41):1-110
2. Lloberes P, Durán-Cantolla J, Martínez-García M, Marín J, Ferrer A, Corral J, et al. Diagnóstico y tratamiento del síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Archivos de bronconeumología*. 2011;47(3):143-56.
3. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *New England J Med*. 1993;328:1230-5.
4. Lurie A. Metabolic Disorders Associated with Obstructive Sleep Apnea in Adults. In: *Obstructive Sleep Apnea in Adults. Relationship with Cardiovascular and Metabolic Disorders*. Borer JS, editor. New York: Karger; 2011. 271 p.
5. Marshall NS, Wong KK, Liu PY, Cullen SR, Knuiman MW, Grunstein RR. Sleep apnea as an independent risk factor for all-cause mortality: the Busselton Health Study. *Sleep*. 2008;31(8):1079-85.
6. Masa JF, Rubio M, Findley LJ. Habitually sleepy drivers have a high frequency of automobile crashes associated with respiratory disorders during sleep. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(4 Pt 1):1407-12.
7. Durán J, Esnaola S, Rubio R, Rubio R, Iztueta A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Mar;163:685-9.
8. Duran-Cantolla J, Aizpuru F, Martinez-Null C, Barbe-Illa F. Obstructive sleep apnea/hypopnea and systemic hypertension. *Sleep medicine reviews*. 2009;13(5):323-31.
9. Wang X, Bi Y, Zhang Q, Pan F. Obstructive sleep apnoea and the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Respirology*. 2013;18(1):140-6.
10. Trzepizur W, Le Vaillant M, Meslier N, Pigeanne T, Masson P, Humeau MP, et al. Independent association between nocturnal intermittent hypoxemia and metabolic dyslipidemia. *Chest*. 2013;143(6):1584-9.
11. Marshall NS, Wong KK, Cullen SR, Knuiman MW, Grunstein RR. Sleep apnea and 20-year follow-up for all-cause mortality, stroke, and cancer incidence and mortality in the busselton health study cohort. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2014;10(4):355-62.
12. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with

- continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet*. 2005;365(9464):1046-53.
13. Martinez-Garcia MA, Capote F, Campos-Rodriguez F, Lloberes P, Diaz de Atauri MJ, Somoza M, et al. Effect of CPAP on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea and resistant hypertension: the HIPARCO randomized clinical trial. *Jama*. 2013;310(22):2407-15.
 14. Martinez-Garcia MA, Campos-Rodriguez F, Barbe F. Cancer and OSA: Current Evidence From Human Studies. *Chest*. 2016;150(2):451-63.
 15. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev*. 2010;90(1):47-112.
 16. Teran Santos J, Alonso Alvarez ML, Cordero Guevara J, Ayuela Azcarate JM, Monserrat Canal JM. [Sleep apnea-hypopnea syndrome and the heart]. *Revista espanola de cardiologia*. 2006;59(7):718-24.
 17. Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Regan MM, Price NJ, Dinges DF, et al. Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(4):678-83.
 18. Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, Lin HM, Follett H, Kales A, et al. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(5):2119-26.
 19. Greenberg H, Ye X, Wilson D, Htoo AK, Hendersen T, Liu SF. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;343(2):591-6.
 20. Htoo AK, Greenberg H, Tongia S, Chen G, Henderson T, Wilson D, et al. Activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea: a pathway leading to systemic inflammation. *Sleep Breath*. 2006;10(1):43-50.
 21. Tan HL, Gozal D, Wang Y, Bandla HP, Bhattacharjee R, Kulkarni R, et al. Alterations in circulating T-cell lymphocyte populations in children with obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2013;36(6):913-22.
 22. Kato M, Roberts-Thomson P, Phillips BG, Haynes WG, Winnicki M, Accurso V, et al. Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2000;102(21):2607-10.
 23. Jelic S, Lederer DJ, Adams T, Padeletti M, Colombo PC, Factor PH, et al. Vascular inflammation in obesity and sleep apnea. *Circulation*. 2011;121(8):1014-21.
 24. Ip MS, Tse HF, Lam B, Tsang KW, Lam WK. Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(3):348-53.

25. Arnardottir ES, Mackiewicz M, Gislason T, Teff KL, Pack AI. Molecular signatures of obstructive sleep apnea in adults: a review and perspective. *Sleep*. 2009;32(4):447-70.
26. Semenza GL, Prabhakar NR. HIF-1-dependent respiratory, cardiovascular, and redox responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(9):1391-6.
27. Nardelli C, Iaffaldano L, Pilone V, Labruna G, Ferrigno M, Carlomagno N, et al. Changes in the MicroRNA Profile Observed in the Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Patients after Laparoscopic Adjustable Gastric Banding. *Journal of obesity*. 2017;2017:6754734.
28. McNicholas WT, Bonsignore MR. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *The European respiratory journal*. 2007;29(1):156-78.
29. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep medicine reviews*. 2003;7(1):35-51.
30. Lavie L. Sleep-disordered breathing and cerebrovascular disease: a mechanistic approach. *Neurol Clin*. 2005;23(4):1059-75.
31. Ayas NT, White DP, Al-Delaimy WK, Manson JE, Stampfer MJ, Speizer FE, et al. A prospective study of self-reported sleep duration and incident diabetes in women. *Diabetes Care*. 2003;26(2):380-4.
32. Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, Buijs RM, Kreier F, Pickering TG, et al. Short sleep duration as a risk factor for hypertension: analyses of the first National Health and Nutrition Examination Survey. *Hypertension*. 2006;47(5):833-9.
33. Yu Y, Lu BS, Wang B, Wang H, Yang J, Li Z, et al. Short sleep duration and adiposity in Chinese adolescents. *Sleep*. 2007;30(12):1688-97.
34. Spiegel K, Knutson K, Leproult R, Tasali E, Van Cauter E. Sleep loss: a novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. *J Appl Physiol* (1985). 2005;99(5):2008-19.
35. Sateia M. International Classification of Sleep Disorders-Third Edition. *Chest*. 2014;146(5):1387 - 94.
36. Rosenthal L, Roehrs TA, Roth T. The Sleep-Wake Activity Inventory: a self-report measure of daytime sleepiness. *Biological psychiatry*. 1993;34(11):810-20.
37. Alakuijala A, Maasilta P, Bachour A. The Oxford Sleep Resistance test (OSLER) and the Multiple Unprepared Reaction Time Test (MURT) detect vigilance modifications in sleep apnea patients. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2014;10(10):1075-82.
38. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*. 1991;14(6):540-5.

39. Kapur VK, Auckley DH, Chowdhuri S, Kuhlmann DC, Mehra R, Ramar K, et al. Clinical Practice Guideline for Diagnostic Testing for Adult Obstructive Sleep Apnea: An American Academy of Sleep Medicine Clinical Practice Guideline. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2017;13(3):479-504.
40. Ferber R, Millman R, Coppola M, Fleetham J, Murray CF, Iber C, et al. Portable recording in the assessment of obstructive sleep apnea. *ASDA standards of practice. Sleep*. 1994;17(4):378-92.
41. Douglas NJ, Thomas S, Jan MA. Clinical value of polysomnography. *Lancet*. 1992;339(8789):347-50.
42. Montserrat JM, Farre R, Ballester E, Felez MA, Pasto M, Navajas D. Evaluation of nasal prongs for estimating nasal flow. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(1):211-5.
43. Ng SS, Chan TO, To KW, Ngai J, Tung A, Ko FW, et al. Validation of a portable recording device (ApneaLink) for identifying patients with suspected obstructive sleep apnoea syndrome. *Internal medicine journal*. 2009;39(11):757-62.
44. Erman MK, Stewart D, Einhorn D, Gordon N, Casal E. Validation of the ApneaLink for the screening of sleep apnea: a novel and simple single-channel recording device. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2007;3(4):387-92.
45. Morgan EJ, Zwillich CW. The obesity-hypoventilation syndrome. *The Western journal of medicine*. 1978;129(5):387-93.
46. Motta J, Guilleminault C, Schroeder JS, Dement WC. Tracheostomy and hemodynamic changes in sleep-inducing apnea. *Annals of internal medicine*. 1978;89(4):454-8.
47. Guilleminault C, Simmons FB, Motta J, Cumiskey J, Rosekind M, Schroeder JS, et al. Obstructive sleep apnea syndrome and tracheostomy. Long-term follow-up experience. *Archives of internal medicine*. 1981;141(8):985-8.
48. Sullivan CE, Issa FG, Berthon-Jones M, Eves L. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet*. 1981;1(8225):862-5.
49. Guilleminault C, Hill MW, Simmons FB, Dement WC. Obstructive sleep apnea: electromyographic and fiberoptic studies. *Experimental neurology*. 1978;62(1):48-67.
50. Loreda JS, Ancoli-Israel S, Dimsdale JE. Effect of continuous positive airway pressure vs placebo continuous positive airway pressure on sleep quality in obstructive sleep apnea. *Chest*. 1999;116(6):1545-9.
51. Rowland S, Aiyappan V, Hennessy C, Catcheside P, Chai-Coezter CL, McEvoy RD, et al. Comparing the Efficacy, Mask Leak, Patient Adherence, and Patient Preference

- of Three Different CPAP Interfaces to Treat Moderate-Severe Obstructive Sleep Apnea. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2018;14(1):101-8.
52. McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, Luo Y, Ou Q, Zhang X, et al. CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *The New England journal of medicine*. 2016;375(10):919-31.
 53. Arrizabalaga J, Calañas A, Vidal J, Masmiquel L, Diaz Fernández M, García Luna P, et al. Guía de Práctica Clínica para el manejo del Sobrepeso y la Obesidad en personas adultas. *Endocrinol Nut*. 2003;50:1-38.
 54. AACE/ACE position statement on the prevention diagnosis and treatment of obesity. *Endocr Pract* [Internet]. 1998; 4:[297-330 pp.]. Available from: <https://www.aace.com/files/obesityguide.pdf>.
 55. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *Jama*. 2005;293(15):1861-7.
 56. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *Jama*. 2006;295(13):1549-55.
 57. Ministerio de Sanidad y Consumo. Encuesta Nacional de Salud en España 2017 <https://www.msbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2017.htm> [Available from: <https://www.msbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2017.htm>].
 58. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *The New England journal of medicine*. 2017;376(3):254-66.
 59. Wadden TA. Treatment of obesity by moderate and severe caloric restriction. Results of clinical research trials. *Annals of internal medicine*. 1993;119(7 Pt 2):688-93.
 60. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-45.
 61. Bahtiyar G, Shin JJ, Aytaman A, Sowers JR, McFarlane SI. Association of diabetes and hepatitis C infection: epidemiologic evidence and pathophysiologic insights. *Curr Diab Rep*. 2004;4(3):194-8.
 62. Pao V, Lee GA, Grunfeld C. HIV therapy, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Curr Atheroscler Rep*. 2008;10(1):61-70.
 63. Sidiropoulos PI, Karvounaris SA, Boumpas DT. Metabolic syndrome in rheumatic diseases: epidemiology, pathophysiology, and clinical implications. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(3):207.

64. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(5):2409-15.
65. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(7):1793-801.
66. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research*. 2005;96(9):939-49.
67. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med*. 2009;15(8):940-5.
68. Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, Horii S, et al. Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(2):193-9.
69. Morris DL, Singer K, Lumeng CN. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2011;14(4):341-6.
70. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007;56(12):2910-8.
71. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1821-30.
72. Lecube A, Monereo S, Rubio MA, Martinez-de-Icaya P, Marti A, Salvador J, et al. Prevention, diagnosis, and treatment of obesity. 2016 position statement of the Spanish Society for the Study of Obesity. *Endocrinologia, diabetes y nutricion*. 2017;64 Suppl 1:15-22.
73. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, et al. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obesity facts*. 2015;8(6):402-24.
74. Obesity: Identification, Assessment and Management of Overweight and Obesity in Children, Young People and Adults: Partial Update of CG43. National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. London 2014.
75. Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española. <http://dle.rae.es/?id=55IykDw2018> [
76. Buchwald H, Rucker RD. The history of metabolic surgery for morbid obesity and a commentary. *World journal of surgery*. 1981;5(6):781-7.

77. Kremen AJ, Linner JH, Nelson CH. An experimental evaluation of the nutritional importance of proximal and distal small intestine. *Annals of surgery*. 1954;140(3):439-48.
78. Rubio M, Martínez C, Vidal O, Larrad A, Salas-Salvadó J, Pujol J, et al. Documento de consenso sobre cirugía bariátrica. *Rev Esp Obes*. 2004;4:223-49.
79. NIH conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. Consensus Development Conference Panel. *Annals of internal medicine*. 1991;115(12):956-61.
80. Lecube A, Monereo S, Rubio M, Martínez de Icaya P, Martí A, Salvador J, et al. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Obesidad. Posicionamiento SEEDO 2016 <https://www.seedo.es/images/site/ConsensoSEEDO2016.pdf>2016 [
81. Díez I, Martínez C, Sánchez-Santos R, Ruiz J, Frutos M, De la Cruz F, et al. Recomendaciones de la SECO para la práctica de la cirugía bariátrica y metabólica (Declaración de Vitoria-Gasteiz, 2015). *BMI*. 2015;5(3):842-5.
82. Rubio MA, Monereo S, Lecube A, Resa J, Masdevall C, de la Cruz Vigo F, et al. [Joint Position Statement of the SEEN-SECO-SEEDO-SED Societies on metabolic surgery for type 2 diabetes mellitus"]. *Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutricion*. 2013;60(10):547-8.
83. Atlas of bariatric and metabolic surgery. <https://www.ifso.com/login/2020> [
84. Casanueva FF, de la Cruz Vigo F, Goday A, Ruiz de Adana JC, Monereo S, Vilallonga R, et al. Declaración SECO-SEEDO sobre el tratamiento actual de la obesidad grave en España https://www.seedo.es/images/site/ComunicadosMedios/2016/Tratamiento_actual_de_la_obesidad_grave_en_Espana_Declaracion_SECO_SEEDO2015.pdf2015 [
85. Lecube A, de Hollanda A, Calanas A, Vilarrasa N, Rubio MA, Breton I, et al. Trends in Bariatric Surgery in Spain in the Twenty-First Century: Baseline Results and 1-Month Follow Up of the RICIBA, a National Registry. *Obesity surgery*. 2016;26(8):1836-42.
86. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrback K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2004;292(14):1724-37.
87. Adams TD, Davidson LE, Hunt SC. Weight and Metabolic Outcomes 12 Years after Gastric Bypass. *The New England journal of medicine*. 2018;378(1):93-6.
88. Buchwald H, Estok R, Fahrback K, Banel D, Sledge I. Trends in mortality in bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Surgery*. 2007;142(4):621-32; discussion 32-5.
89. Ashrafian H, Toma T, Rowland SP, Harling L, Tan A, Efthimiou E, et al. Bariatric Surgery or Non-Surgical Weight Loss for Obstructive Sleep Apnoea? A Systematic Review and Comparison of Meta-analyses. *Obesity surgery*. 2015;25(7):1239-50.

90. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell* 6 Edition. New York: Garland Science; 2015.
91. Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *Journal of cellular physiology*. 2009;219(2):243-50.
92. Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(2):170.
93. They C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(8):581-93.
94. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology*. 2005;20:22-7.
95. Castoldi M, Kordes C, Sawitza I, Haussinger D. Isolation and characterization of vesicular and non-vesicular microRNAs circulating in sera of partially hepatectomized rats. *Scientific reports*. 2016;6:31869.
96. Stein JM, Luzio JP. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *The Biochemical journal*. 1991;274 (Pt 2):381-6.
97. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57.
98. Witko-Sarsat V, Pederzoli-Ribeil M, Hirsch E, Sozzani S, Cassatella MA. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends in immunology*. 2011;32(3):117-24.
99. Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annual review of physiology*. 2015;77:13-27.
100. Kaczmarek E, Bakker JP, Clarke DN, Csizmadia E, Kocher O, Veves A, et al. Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PloS one*. 2013;8(7):e70559.
101. Cheng HS, Besla R, Li A, Chen Z, Shikatani EA, Nazari-Jahantigh M, et al. Paradoxical Suppression of Atherosclerosis in the Absence of microRNA-146a. *Circulation research*. 2017;121(4):354-67.
102. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS biology*. 2012;10(12):e1001450.
103. Vesiclepedia <http://microvesicles.org/index.html> [
104. Nolte-t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, t Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the

- selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic acids research*. 2012;40(18):9272-85.
105. Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Exosome and Macrophage Crosstalk in Sleep-Disordered Breathing-Induced Metabolic Dysfunction. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(11).
 106. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(1):108-20.
 107. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
 108. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
 109. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654-9.
 110. Gargalionis AN, Basdra EK. Insights in microRNAs biology. *Current topics in medicinal chemistry*. 2013;13(13):1493-502.
 111. Gagan J, Dey BK, Layer R, Yan Z, Dutta A. MicroRNA-378 targets the myogenic repressor MyoR during myoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(22):19431-8.
 112. Feng S, Cong S, Zhang X, Bao X, Wang W, Li H, et al. MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells. *Nucleic acids research*. 2011;39(15):6669-78.
 113. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer research*. 2005;65(14):6029-33.
 114. Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovskiy A, et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nature genetics*. 2006;38(3):356-62.
 115. Harris KS, Zhang Z, McManus MT, Harfe BD, Sun X. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(7):2208-13.
 116. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(50):52361-5.
 117. Hilton C, Neville MJ, Karpe F. MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity. *International journal of obesity*. 2013;37(3):325-32.

118. Tabet F, Cuesta Torres LF, Ong KL, Shrestha S, Choteau SA, Barter PJ, et al. High-Density Lipoprotein-Associated miR-223 Is Altered after Diet-Induced Weight Loss in Overweight and Obese Males. *PloS one*. 2016;11(3):e0151061.
119. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*. 2011;13(4):423-33.
120. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research*. 2011;39(16):7223-33.
121. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic acids research*. 2010;38(20):7248-59.
122. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):5003-8.
123. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PloS one*. 2012;7(3):e30679.
124. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:402.
125. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules*. 2014;19(2):1568-75.
126. Shah R, Tanriverdi K, Levy D, Larson M, Gerstein M, Mick E, et al. Discordant Expression of Circulating microRNA from Cellular and Extracellular Sources. *PloS one*. 2016;11(4):e0153691.
127. Sanz-Rubio D, Martin-Burriel I, Gil A, Cubero P, Forner M, Khalyfa A, et al. Stability of Circulating Exosomal miRNAs in Healthy Subjects. *Scientific reports*. 2018;8(1):10306.
128. Chen JJ, Zhao B, Zhao J, Li S. Potential Roles of Exosomal MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Application in Alzheimer's Disease. *Neural plasticity*. 2017;2017:7027380.
129. Steinbichler TB, Dudas J, Riechelmann H, Skvortsova, II. The role of exosomes in cancer metastasis. *Seminars in cancer biology*. 2017;44:170-81.
130. Zhong H, Ma M, Liang T, Guo L. Role of MicroRNAs in Obesity-Induced Metabolic Disorder and Immune Response. *Journal of immunology research*. 2018;2018:2835761.

131. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*. 2017;542(7642):450-5.
132. Murakami T, Horigome H, Tanaka K, Nakata Y, Ohkawara K, Katayama Y, et al. Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity. *Thrombosis research*. 2007;119(1):45-53.
133. Eguchi A, Lazic M, Armando AM, Phillips SA, Katebian R, Maraka S, et al. Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *Journal of molecular medicine*. 2016;94(11):1241-53.
134. Yeh CL, Cheng IC, Hou YC, Wang W, Yeh SL. MicroRNA-125a-3p expression in abdominal adipose tissues is associated with insulin signalling gene expressions in morbid obesity: observations in Taiwanese. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 2014;23(2):331-7.
135. Zhu Z, Yin J, Li DC, Mao ZQ. Role of microRNAs in the treatment of type 2 diabetes mellitus with Roux-en-Y gastric bypass. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2017;50(3):e5817.
136. Ortega FJ, Moreno M, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Fuentes-Batllevell N, Sabater M, et al. Inflammation triggers specific microRNA profiles in human adipocytes and macrophages and in their supernatants. *Clinical epigenetics*. 2015;7:49.
137. Wang Y, Wang DS, Cheng YS, Jia BL, Yu G, Yin XQ, et al. Expression of MicroRNA-448 and SIRT1 and Prognosis of Obese Type 2 Diabetic Mellitus Patients After Laparoscopic Bariatric Surgery. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;45(3):935-50.
138. Dahlman I, Belarbi Y, Laurencikiene J, Pettersson AM, Arner P, Kulyte A. Comprehensive functional screening of miRNAs involved in fat cell insulin sensitivity among women. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2017;312(6):E482-E94.
139. Nunez Lopez YO, Coen PM, Goodpaster BH, Seyhan AA. Gastric bypass surgery with exercise alters plasma microRNAs that predict improvements in cardiometabolic risk. *International journal of obesity*. 2017;41(7):1121-30.
140. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Nonell L, Puigdecenet E, Rodriguez-Hermosa JI, et al. Surgery-Induced Weight Loss Is Associated With the Downregulation of Genes Targeted by MicroRNAs in Adipose Tissue. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(11):E1467-76.
141. Hohensinner PJ, Kaun C, Ebenbauer B, Hackl M, Demyanets S, Richter D, et al. Reduction of Premature Aging Markers After Gastric Bypass Surgery in Morbidly Obese Patients. *Obesity surgery*. 2018;28(9):2804-10.

142. Alkandari A, Ashrafian H, Sathyapalan T, Sedman P, Darzi A, Holmes E, et al. Improved physiology and metabolic flux after Roux-en-Y gastric bypass is associated with temporal changes in the circulating microRNAome: a longitudinal study in humans. *BMC obesity*. 2018;5:20.
143. Blum A, Yehuda H, Geron N, Meerson A. Elevated Levels of miR-122 in Serum May Contribute to Improved Endothelial Function and Lower Oncologic Risk Following Bariatric Surgery. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2017;19(10):620-4.
144. Lirun K, Sewe M, Yong W. A Pilot Study: The Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass on the Serum MicroRNAs of the Type 2 Diabetes Patient. *Obesity surgery*. 2015;25(12):2386-92.
145. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(5):1859-67.
146. Ivan M, Harris AL, Martelli F, Kulshreshtha R. Hypoxia response and microRNAs: no longer two separate worlds. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(5A):1426-31.
147. Lacedonia D, Scioscia G, Palladino GP, Gallo C, Carpagnano GE, Sabato R, et al. MicroRNA expression profile during different conditions of hypoxia. *Oncotarget*. 2018;9(80):35114-22.
148. Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Circulating exosomes in obstructive sleep apnea as phenotypic biomarkers and mechanistic messengers of end-organ morbidity. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2018;256:143-56.
149. Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Khalyfa AA, Philby MF, Alonso-Alvarez ML, Mohammadi M, et al. Circulating Plasma Extracellular Microvesicle MicroRNA Cargo and Endothelial Dysfunction in Children with Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(9):1116-26.
150. Carreras A, Kayali F, Zhang J, Hirotsu C, Wang Y, Gozal D. Metabolic effects of intermittent hypoxia in mice: steady versus high-frequency applied hypoxia daily during the rest period. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2012;303(7):R700-9.
151. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, et al. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *The Journal of physiology*. 2003;552(Pt 1):253-64.
152. Gozal D, Gileles-Hillel A, Cortese R, Li Y, Almendros I, Qiao Z, et al. Visceral White Adipose Tissue after Chronic Intermittent and Sustained Hypoxia in Mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2017;56(4):477-87.

153. Liu KX, Chen GP, Lin PL, Huang JC, Lin X, Qi JC, et al. Detection and analysis of apoptosis- and autophagy-related miRNAs of mouse vascular endothelial cells in chronic intermittent hypoxia model. *Life sciences*. 2018;193:194-9.
154. Gharib SA, Khalyfa A, Abdelkarim A, Bhushan B, Gozal D. Integrative miRNA-mRNA profiling of adipose tissue unravels transcriptional circuits induced by sleep fragmentation. *PloS one*. 2012;7(5):e37669.
155. Marin JM, Artal J, Martin T, Carrizo SJ, Andres M, Martin-Burriel I, et al. Epigenetics modifications and Subclinical Atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnea: The EPIOSA study. *BMC pulmonary medicine*. 2014;14:114.
156. Lázaro J, Clavería P, Cabrejas C, Fernando J, Daga B, Ordoñez B, et al. Epigenetics dysfunction in morbid obesity with or without obstructive sleep apnoea: the EPIMOOSA study. *Respiratory Research*. 2020;21(1):42.
157. Drager LF, Bortolotto LA, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi GF. Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(7):706-12.
158. Kim J, Bhattacharjee R, Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Sans Capdevila O, Wang Y, et al. DNA Methylation in Inflammatory Genes among Children with Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(3):330-8.
159. García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, Del Campo F, Galdiz JB, et al. Spirometry. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Archivos de bronconeumologia*. 2013;49(9):388-401.
160. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Press*. 2013.
161. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. [ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias]. *Revista española de cardiología*. 2011;64(12):1168 e1- e60.
162. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care*. 2013;36 Suppl 1:S11-66.
163. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
164. Liang X, Xu Z, Yuan M, Zhang Y, Zhao B, Wang J, et al. MicroRNA-16 suppresses the activation of inflammatory macrophages in atherosclerosis by targeting PDCD4. *International journal of molecular medicine*. 2016;37(4):967-75.
165. Lu Y, Thavarajah T, Gu W, Cai J, Xu Q. Impact of miRNA in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018;38(9):e159-e70.

166. Barwari T, Rienks M, Mayr M. MicroRNA-21 and the Vulnerability of Atherosclerotic Plaques. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2018;26(4):938-40.
167. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Developmental cell*. 2008;15(2):261-71.
168. Chen C, Wang Y, Yang S, Li H, Zhao G, Wang F, et al. MiR-320a contributes to atherogenesis by augmenting multiple risk factors and down-regulating SRF. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(5):970-85.
169. Torella D, Iaconetti C, Catalucci D, Ellison GM, Leone A, Waring CD, et al. MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo. *Circulation research*. 2011;109(8):880-93.
170. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009;460(7256):705-10.
171. Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO molecular medicine*. 2013;5(7):1017-34.
172. Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Chan L, Zhu M, Heyll K, Corbalan-Campos J, et al. The microRNA-342-5p fosters inflammatory macrophage activation through an Akt1- and microRNA-155-dependent pathway during atherosclerosis. *Circulation*. 2013;127(15):1609-19.
173. Shi L, Fisslthaler B, Zippel N, Fromel T, Hu J, Elgheznawy A, et al. MicroRNA-223 antagonizes angiogenesis by targeting beta1 integrin and preventing growth factor signaling in endothelial cells. *Circulation research*. 2013;113(12):1320-30.
174. Tian ZQ, Jiang H, Lu ZB. MiR-320 regulates cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury by targeting AKIP1. *Cellular & molecular biology letters*. 2018;23:41.
175. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Frontiers in immunology*. 2015;6:19.
176. Pan Y, Feng T, Chan Y-C, Xu A, Lam K. OR01-3 MicroRNA-34a-Mediated FGF21 Resistance in the Adipose Tissue Contributes to Insulin Resistance and Hypoadiponectinemia in Diet-Induced Obesity. *Journal of the Endocrine Society*. 2019;3(Supplement_1).
177. Li R, Shen Q, Wu N, He M, Liu N, Huang J, et al. MiR-145 improves macrophage-mediated inflammation through targeting Arf6. *Endocrine*. 2018;60(1):73-82.

178. Sonkoly E, Pivarcsi A. microRNAs in inflammation. *International reviews of immunology*. 2009;28(6):535-61.
179. Roos J, Enlund E, Funcke JB, Tews D, Holzmann K, Debatin KM, et al. miR-146a-mediated suppression of the inflammatory response in human adipocytes. *Scientific reports*. 2016;6:38339.
180. Karckeni E, Astier J, Tourniaire F, El Abed M, Romier B, Gouranton E, et al. Obesity-associated Inflammation Induces microRNA-155 Expression in Adipocytes and Adipose Tissue: Outcome on Adipocyte Function. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(4):1615-26.
181. Zhuang G, Meng C, Guo X, Cheruku PS, Shi L, Xu H, et al. A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation*. 2012;125(23):2892-903.
182. Zhang HJ, Zhang YN, Teng ZY. Downregulation of miR16 protects H9c2(21) cells against hypoxia/reoxygenation damage by targeting CIAPIN1 and regulating the NFkappaB pathway. *Molecular medicine reports*. 2019;20(4):3113-22.
183. Rui J, Fang S, Wang Y, Lv B, Yu B, Li S. Inhibition of microRNA16 protects mesenchymal stem cells against apoptosis. *Molecular medicine reports*. 2018;18(1):902-10.
184. Du R, Sun W, Xia L, Zhao A, Yu Y, Zhao L, et al. Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-34a promotes EMT by targeting the Notch signaling pathway in tubular epithelial cells. *PloS one*. 2012;7(2):e30771.
185. Zhang J, Guo X, Shi Y, Ma J, Wang G. Intermittent hypoxia with or without hypercapnia is associated with tumorigenesis by decreasing the expression of brain derived neurotrophic factor and miR-34a in rats. *Chinese medical journal*. 2014;127(1):43-7.
186. Pan Q, Wang Y, Lan Q, Wu W, Li Z, Ma X, et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hypoxia/Reoxygenation-Injured ECs via Transferring MicroRNA-126. *Stem cells international*. 2019;2019:2831756.
187. Santamaria-Martos F, Benitez I, Ortega F, Zapater A, Giron C, Pinilla L, et al. Circulating microRNA profile as a potential biomarker for obstructive sleep apnea diagnosis. *Scientific reports*. 2019;9(1):13456.
188. Lin G, Huang J, Chen Q, Chen L, Feng D, Zhang S, et al. miR-146a-5p Mediates Intermittent Hypoxia-Induced Injury in H9c2 Cells by Targeting XIAP. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019:6581217.
189. Wu X, Chang SC, Jin J, Gu W, Li S. NLRP3 in inflammasome mediates chronic intermittent hypoxia-induced renal injury implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(12):9404-15.

190. Zeng Y, Zhang X, Kang K, Chen J, Wu Z, Huang J, et al. MicroRNA-223 Attenuates Hypoxia-induced Vascular Remodeling by Targeting RhoB/MLC2 in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Scientific reports*. 2016;6:24900.
191. Wang XH, Qian RZ, Zhang W, Chen SF, Jin HM, Hu RM. MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2009;36(2):181-8.
192. Kalbolandi SM, Gorji AV, Babaahmadi-Rezaei H, Mansouri E. Luteolin confers renoprotection against ischemia-reperfusion injury via involving Nrf2 pathway and regulating miR320. *Molecular biology reports*. 2019;46(4):4039-47.
193. Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Jones K, Qian J, et al. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation*. 2009;119(17):2357-66.
194. Zhang N, Zhang N, Song L, Xie H, Zhao C, Li S, et al. Adipokines and free fatty acids regulate insulin sensitivity by increasing microRNA-21 expression in human mature adipocytes. *Molecular medicine reports*. 2017;16(2):2254-8.
195. Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem cells*. 2009;27(12):3093-102.
196. Kim YJ, Hwang SH, Cho HH, Shin KK, Bae YC, Jung JS. MicroRNA 21 regulates the proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and high-fat diet-induced obesity alters microRNA 21 expression in white adipose tissues. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(1):183-93.
197. Guglielmi V, D'Adamo M, Menghini R, Cardellini M, Gentileschi P, Federici M, et al. MicroRNA 21 is up-regulated in adipose tissue of obese diabetic subjects. *Nutrition and healthy aging*. 2017;4(2):141-5.
198. Jones A, Danielson KM, Benton MC, Ziegler O, Shah R, Stubbs RS, et al. miRNA Signatures of Insulin Resistance in Obesity. *Obesity*. 2017;25(10):1734-44.
199. Nunez Lopez YO, Garufi G, Seyhan AA. Altered levels of circulating cytokines and microRNAs in lean and obese individuals with prediabetes and type 2 diabetes. *Molecular bioSystems*. 2016;13(1):106-21.
200. Togliatto G, Dentelli P, Gili M, Gallo S, Deregibus C, Biglieri E, et al. Obesity reduces the pro-angiogenic potential of adipose tissue stem cell-derived extracellular vesicles (EVs) by impairing miR-126 content: impact on clinical applications. *International journal of obesity*. 2016;40(1):102-11.
201. Russo A, Bartolini D, Mensa E, Torquato P, Albertini MC, Olivieri F, et al. Physical Activity Modulates the Overexpression of the Inflammatory miR-146a-5p in Obese Patients. *IUBMB life*. 2018;70(10):1012-22.

202. Mahdavi R, Ghorbani S, Alipoor B, Panahi G, Khodabandehloo H, Esfahani EN, et al. Decreased Serum Level of miR-155 is Associated with Obesity and its Related Metabolic Traits. *Clinical laboratory*. 2018;64(1):77-84.
203. Ling HY, Ou HS, Feng SD, Zhang XY, Tuo QH, Chen LX, et al. CHANGES IN microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2009;36(9):e32-9.
204. Falcon S, Gentleman R. Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2007;23(2):257-8.
205. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*. 2012.
206. Sanz - Rubio D. Micro - RNAs de exosomas circulantes en apnea obstructiva del sueño. Zaragoza: Zaragoza; 2019.
207. Lecube A, Sampol G, Lloberes P, Romero O, Mesa J, Morell F, et al. Asymptomatic sleep-disordered breathing in premenopausal women awaiting bariatric surgery. *Obesity surgery*. 2010;20(4):454-61.
208. Lopez PP, Stefan B, Schulman CI, Byers PM. Prevalence of sleep apnea in morbidly obese patients who presented for weight loss surgery evaluation: more evidence for routine screening for obstructive sleep apnea before weight loss surgery. *The American surgeon*. 2008;74(9):834-8.
209. Dixon JB, Schachter LM, O'Brien PE. Predicting sleep apnea and excessive day sleepiness in the severely obese: indicators for polysomnography. *Chest*. 2003;123(4):1134-41.
210. Peromaa-Haavisto P, Tuomilehto H, Kossi J, Virtanen J, Luostarinen M, Pihlajamaki J, et al. Obstructive sleep apnea: the effect of bariatric surgery after 12 months. A prospective multicenter trial. *Sleep Med*. 2017;35:85-90.
211. Sharkey KM, Machan JT, Tosi C, Roye GD, Harrington D, Millman RP. Predicting obstructive sleep apnea among women candidates for bariatric surgery. *Journal of women's health*. 2010;19(10):1833-41.
212. Kositanurit W, Muntham D, Udomsawaengsup S, Chirakalwasan N. Prevalence and associated factors of obstructive sleep apnea in morbidly obese patients undergoing bariatric surgery. *Sleep Breath*. 2018;22(1):251-6.
213. Kolotkin RL, LaMonte MJ, Walker JM, Cloward TV, Davidson LE, Crosby RD. Predicting sleep apnea in bariatric surgery patients. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery*. 2011;7(5):605-10.
214. Lázaro J, Clavería P, Cabrejas C, Fernando J, Segura S, Marín JM. Sensitivity of a sequential model based on a questionnaire (STOP-Bang vs Dixon) and nocturnal pulse

- oximetry for screening obstructive sleep apnea in patients with morbid obesity candidates for bariatric surgery. *Endocrinología, diabetes y nutrición*. 2020.
215. Yu C, Liu Y, Sun L, Wang D, Wang Y, Zhao S, et al. Chronic obstructive sleep apnea promotes aortic remodeling in canines through miR-145/Smad3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(23):37705-16.
 216. Freitas LS, Silveira AC, Martins FC, Costa-Hong V, Lebkuchen A, Cardozo KHM, et al. Severe obstructive sleep apnea is associated with circulating microRNAs related to heart failure, myocardial ischemia, and cancer proliferation. *Sleep Breath*. 2020.
 217. Yang X, Niu X, Xiao Y, Lin K, Chen X. MiRNA expression profiles in healthy OSAHS and OSAHS with arterial hypertension: potential diagnostic and early warning markers. *Respir Res*. 2018;19(1):194.
 218. Tian R, Wang J, Yan H, Wu J, Xu Q, Zhan X, et al. Differential expression of miR16 in glioblastoma and glioblastoma stem cells: their correlation with proliferation, differentiation, metastasis and prognosis. *Oncogene*. 2017;36(42):5861-73.
 219. Hijmans JG, Diehl KJ, Bammert TD, Kavlich PJ, Lincenberg GM, Greiner JJ, et al. Association between hypertension and circulating vascular-related microRNAs. *Journal of human hypertension*. 2018;32(6):440-7.
 220. Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, Parthenakis FI, Vardas PE. MicroRNA-9 and microRNA-126 expression levels in patients with essential hypertension: potential markers of target-organ damage. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*. 2014;8(6):368-75.
 221. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(12):E2271-6.
 222. Kamali K, Korjan ES, Eftekhari E, Malekzadeh K, Soufi FG. The role of miR-146a on NF-kappaB expression level in human umbilical vein endothelial cells under hyperglycemic condition. *Bratislavske lekarske listy*. 2016;117(7):376-80.
 223. Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular research*. 2008;79(4):581-8.
 224. Hijmans JG, Diehl KJ, Bammert TD, Kavlich PJ, Lincenberg GM, Greiner JJ, et al. Influence of Overweight and Obesity on Circulating Inflammation-Related microRNA. *MicroRNA*. 2018;7(2):148-54.
 225. Cui X, You L, Zhu L, Wang X, Zhou Y, Li Y, et al. Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes. *Metabolism: clinical and experimental*. 2018;78:95-105.
 226. Vasu S, Kumano K, Darden CM, Rahman I, Lawrence MC, Naziruddin B. MicroRNA Signatures as Future Biomarkers for Diagnosis of Diabetes States. *Cells*. 2019;8(12).

227. Xu H, Guan J, Yi H, Zou J, Meng L, Tang X, et al. Elevated low-density lipoprotein cholesterol is independently associated with obstructive sleep apnea: evidence from a large-scale cross-sectional study. *Sleep Breath*. 2016;20(2):627-34.
228. Li X, Wang F, Xu H, Qian Y, Zou J, Yang M, et al. Interrelationships among common predictors of cardiovascular diseases in patients of OSA: A large-scale observational study. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2020;30(1):23-32.
229. Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature cell biology*. 2012;14(3):249-56.
230. Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, et al. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):211-7.
231. Andreou I, Sun X, Stone PH, Edelman ER, Feinberg MW. miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture. *Trends in molecular medicine*. 2015;21(5):307-18.
232. Krause BJ, Carrasco-Wong I, Dominguez A, Arnaiz P, Farias M, Barja S, et al. MicroRNAs Let7e and 126 in Plasma as Markers of Metabolic Dysfunction in 10 to 12 Years Old Children. *PloS one*. 2015;10(6):e0128140.
233. Ben-Aicha S, Escate R, Casaní L, Padró T, Peña E, Arderiu G, et al. High-density lipoprotein remodelled in hypercholesterolaemic blood induce epigenetically driven down-regulation of endothelial HIF-1 α expression in a preclinical animal model. *Cardiovascular research*. 2019.
234. Khalyfa A, Marin JM, Qiao Z, Rubio DS, Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Plasma Exosomes in OSA Patients Promote Endothelial Senescence: Effect of Long-Term Adherent Continuous Positive Airway Pressure. *Sleep*. 2019.
235. Khalyfa A, Gozal D, Masa JF, Marin JM, Qiao Z, Corral J, et al. Sleep-disordered breathing, circulating exosomes, and insulin sensitivity in adipocytes. *International journal of obesity*. 2018.
236. Sanchez-de-la-Torre M, Khalyfa A, Sanchez-de-la-Torre A, Martinez-Alonso M, Martinez-Garcia MA, Barcelo A, et al. Precision Medicine in Patients With Resistant Hypertension and Obstructive Sleep Apnea: Blood Pressure Response to Continuous Positive Airway Pressure Treatment. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;66(9):1023-32.
237. Bhattacharjee R, Khalyfa A, Khalyfa AA, Mokhlesi B, Kheirandish-Gozal L, Almendros I, et al. Exosomal cargo properties, endothelial function and treatment of obesity hypoventilation syndrome: A proof of concept study. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. 2018;14(5):797-807.

238. Myllyla M, Kurki S, Anttalainen U, Saaresranta T, Laitinen T. High Adherence to CPAP Treatment Does Not Prevent the Continuation of Weight Gain among Severely Obese OSAS Patients. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2016;12(4):519-28.
239. Quan SF, Budhiraja R, Clarke DP, Goodwin JL, Gottlieb DJ, Nichols DA, et al. Impact of treatment with continuous positive airway pressure (CPAP) on weight in obstructive sleep apnea. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2013;9(10):989-93.
240. Garcia JM, Sharafkhaneh H, Hirshkowitz M, Elkhatib R, Sharafkhaneh A. Weight and metabolic effects of CPAP in obstructive sleep apnea patients with obesity. *Respir Res*. 2011;12(1):80.
241. Labarca G, Reyes T, Jorquera J, Dreyse J, Drake L. CPAP in patients with obstructive sleep apnea and type 2 diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis. *The clinical respiratory journal*. 2018;12(8):2361-8.
242. Abud R, Salgueiro M, Drake L, Reyes T, Jorquera J, Labarca G. Efficacy of continuous positive airway pressure (CPAP) preventing type 2 diabetes mellitus in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome (OSAHS) and insulin resistance: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Med*. 2019;62:14-21.
243. Belongie KJ, Ferrannini E, Johnson K, Andrade-Gordon P, Hansen MK, Petrie JR. Identification of novel biomarkers to monitor beta-cell function and enable early detection of type 2 diabetes risk. *PloS one*. 2017;12(8):e0182932.
244. Bard JM, Dallongeville J, Hagen E, Pfister P, Ose L, Fruchart JC, et al. Comparison of the effect of fluvastatin, an hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor, and cholestyramine, a bile acid sequestrant, on lipoprotein particles defined by apolipoprotein composition. *Metabolism: clinical and experimental*. 1995;44(11):1447-54.
245. Bard JM, Ose L, Hagen E, Duriez P, Pfister P, Fruchart JC, et al. Changes in plasma apolipoprotein B-containing lipoparticle levels following therapy with fluvastatin and cholestyramine. *European Fluvastatin Study Group. The American journal of cardiology*. 1995;76(2):65A-70A.
246. Her AY, Kim JY, Kang SM, Choi D, Jang Y, Chung N, et al. Effects of atorvastatin 20 mg, rosuvastatin 10 mg, and atorvastatin/ezetimibe 5 mg/5 mg on lipoproteins and glucose metabolism. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2010;15(2):167-74.
247. Vickers KC, Landstreet SR, Levin MG, Shoucri BM, Toth CL, Taylor RC, et al. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(40):14518-23.

248. Lund-Katz S, Phillips MC. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Sub-cellular biochemistry*. 2010;51:183-227.
249. Peng XP, Huang L, Liu ZH. miRNA-133a attenuates lipid accumulation via TR4-CD36 pathway in macrophages. *Biochimie*. 2016;127:79-85.
250. Al-Muhtaresh HA, Salem AH, Al-Kafaji G. Upregulation of Circulating Cardiomyocyte-Enriched miR-1 and miR-133 Associate with the Risk of Coronary Artery Disease in Type 2 Diabetes Patients and Serve as Potential Biomarkers. *Journal of cardiovascular translational research*. 2019;12(4):347-57.
251. O'Brien PE, Hindle A, Brennan L, Skinner S, Burton P, Smith A, et al. Long-Term Outcomes After Bariatric Surgery: a Systematic Review and Meta-analysis of Weight Loss at 10 or More Years for All Bariatric Procedures and a Single-Centre Review of 20-Year Outcomes After Adjustable Gastric Banding. *Obesity surgery*. 2019;29(1):3-14.
252. Hubal MJ, Nadler EP, Ferrante SC, Barberio MD, Suh JH, Wang J, et al. Circulating adipocyte-derived exosomal MicroRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass. *Obesity*. 2017;25(1):102-10.
253. Bae YU, Kim Y, Lee H, Kim H, Jeon JS, Noh H, et al. Bariatric Surgery Alters microRNA Content of Circulating Exosomes in Patients with Obesity. 2019;27(2):264-71.
254. Wu Q, Li JV, Seyfried F, le Roux CW, Ashrafian H, Athanasiou T, et al. Metabolic phenotype-microRNA data fusion analysis of the systemic consequences of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *International journal of obesity*. 2015;39(7):1126-34.
255. Thompson MD, Cismowski MJ, Serpico M, Pusateri A, Brigstock DR. Elevation of circulating microRNA levels in obese children compared to healthy controls. *Clinical obesity*. 2017;7(4):216-21.
256. Granjon A, Gustin MP, Rieusset J, Lefai E, Meugnier E, Guller I, et al. The microRNA signature in response to insulin reveals its implication in the transcriptional action of insulin in human skeletal muscle and the role of a sterol regulatory element-binding protein-1c/myocyte enhancer factor 2C pathway. *Diabetes*. 2009;58(11):2555-64.
257. Gallagher IJ, Scheele C, Keller P, Nielsen AR, Remenyi J, Fischer CP, et al. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Genome medicine*. 2010;2(2):9.
258. Horie T, Ono K, Nishi H, Iwanaga Y, Nagao K, Kinoshita M, et al. MicroRNA-133 regulates the expression of GLUT4 by targeting KLF15 and is involved in metabolic control in cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;389(2):315-20.

259. Shao X, Kong WX, Li YT. MiR-133 inhibits kidney injury in rats with diabetic nephropathy via MAPK/ERK pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2019;23(24):10957-63.
260. Su Q, Yang H, Li L. Circulating miRNA-155 as a Potential Biomarker for Coronary Slow Flow. *Disease markers*. 2018;2018:6345284.
261. Huang YQ, Huang C, Zhang B, Feng YQ. Association of circulating miR-155 expression level and inflammatory markers with white coat hypertension. *Journal of human hypertension*. 2020;34(5):397-403.
262. Zhu GF, Yang LX, Guo RW, Liu H, Shi YK, Ye JS, et al. microRNA-155 is inversely associated with severity of coronary stenotic lesions calculated by the Gensini score. *Coronary artery disease*. 2014;25(4):304-10.

ANEXOS

ANEXO 1: APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE ARAGÓN



COMITÉ ETICO DE INVESTIGACION
CLINICA DE ARAGON
Avda. San Juan Bosco, 13
50009 Zaragoza

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE ARAGÓN

Dña. María González Hinjos, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón,

CERTIFICA

Que el estudio titulado **"Inflamación sistémica y alteraciones epigenéticas en pacientes con obesidad mórbida y apnea obstructiva del sueño. Impacto de la cirugía bariátrica"**, ha sido presentado por el Dr. Javier Lázaro Sierra, como Investigador Principal, al Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón y está pendiente de su evaluación por dicho Comité.

Lo que firmo en Zaragoza a 23 de mayo de 2014



María González Hinjos
Secretaria del CEIC de Aragón

ANEXO 2: HOJA DE INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO EPIMOOSA

HOJA INFORMACIÓN ESTUDIO EPIMOOSA

A través de esta hoja de información se le invita a participar en el estudio que a continuación le vamos a explicar.

La Obesidad y el Síndrome de Apnea del Sueño son dos enfermedades íntimamente relacionadas. La importancia de ambas radica en su papel favorecedor de múltiples enfermedades, entre ellas las enfermedades cardiovasculares.

El presente estudio pretende estudiar los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de estas enfermedades. Dado que usted se va a ver sometido a una intervención para favorecer la pérdida de peso resulta un candidato ideal para participar en el presente estudio.

El estudio comienza, aproximadamente, un año antes de la fecha programada para la intervención quirúrgica. En esta primera visita se verá sometido a la realización de una batería de pruebas que sentarán su situación al inicio del estudio. Dichas pruebas incluyen:

1. Medidas Antropométricas y de Tensión Arterial: se le medirá la circunferencia del cuello, cintura y cadera. Además, se le pesará, medirá y se tomará su Presión Arterial tras 10 minutos de reposo.

2. Análisis de Sangre y Gasometría Arterial.

3. Poligrafía Respiratoria: es el estudio del sueño. Para esta prueba deberá acudir al hospital donde se le hará entrega de un polígrafo que se colocará durante la noche. La poligrafía consiste en colocar una serie de cables en su pecho, nariz, boca y dedo para medir parámetros cardiorrespiratorios. Dicho polígrafo lo devolverá al día siguiente.

4. Espirometría con Prueba Broncodilatadora: es una prueba que consiste en soplar a través de un tubo para medir su capacidad pulmonar. Una vez realizada la primera prueba se le administrará un fármaco para ver la respuesta de sus bronquios a ese fármaco.

5. Holter de Presión Arterial y de Electrocardiograma: son pruebas que consisten en colocar unos cables que tendrá que llevar durante 24h (cada una de ellas, un total de 48h).

Las 4 primeras pruebas se llevarán a cabo en el mismo día. Se le citará para obtener los resultados la misma semana en el que se realicen. En dicha consulta, en función de los valores arrojados por la Poligrafía se le diagnosticará de un Trastorno Respiratorio del Sueño y se le pautará el tratamiento más adecuado.

En el caso de que haya sido diagnosticado de un Trastorno Respiratorio del Sueño y le hayan iniciado tratamiento con CPAP (dispositivo de presión positiva que se coloca durante el sueño para evitar las apneas), se le citará a los 3 meses para controlar que la presión administrada es la correcta.

A los 6 meses de la primera visita se someterá a una segunda visita, en la que se realizará:

1. Medidas Antropométricas.
2. Análisis de Sangre.
3. Holter de Presión Arterial y Electrocardiograma.

Previo a la cirugía se le informará sobre una recogida opcional de una muestra de la grasa de su pared abdominal para incluirla en una colección de grasa (Adipofat), cuyo responsable es el Dr. Arbonés. La aceptación del presente estudio no implica el almacenamiento de una de las muestras de grasa.

Pasados 3 y 6 meses de la intervención quirúrgica se verá sometido a un nuevo control como el de la 2ª visita. Un año después de la intervención quirúrgica se verá sometido a un nuevo estudio completa como el de su inclusión.

Cada una de las pruebas realizadas irá seguida de una consulta donde recibirá un informe de los resultados obtenidos. Los resultados de las pruebas realizadas se entregarán los martes en horario de 11:00 a 13:00 en el Hospital Royo Villanova, cada 15 minutos.

Su participación en el estudio es VOLUNTARIA.

Si en algún momento, durante su participación en el estudio, decide retirar su consentimiento a su participación del estudio, podrá hacerlo sin que ello afecte a su asistencia sanitaria.

De momento, el presente estudio no tiene fuentes de financiación, si bien se va a solicitar ayudas a la investigación a distintas sociedades científicas como son SEPAR (Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio), SADAR (Sociedad Aragonesa del Aparato Respiratorio), Instituto de Salud Carlos III, ...

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de protección de datos de carácter personal, y en su reglamento de desarrollo. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Sus datos serán tratados informáticamente y se incorporarán a un fichero automatizado de datos de carácter personal cuyo responsable es el Dr. Javier Lázaro Sierra, del Servicio de Neumología del Hospital Royo Villanova. Sus datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio y colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo en caso de urgencia médica, requerimiento de la administración sanitaria o requerimiento legal. El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio, colaboradores autorizados, autoridades sanitarias, al Comité de Ética de la Investigación del Gobierno de Aragón y personal autorizado, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismo de acuerdo a la legislación vigente.

Agradecemos su participación en el estudio.

ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del PROYECTO: INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA Y APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO. IMPACTO DE LA CIRUGÍA BARIÁTRICA

Yo, (nombre y apellidos del participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con: **JAVIER LAZARO SIERRA**, investigador principal Hospital Royo Villanova (Tfno: 976466910.Extensión 517025).

Comprendo que mi participación es VOLUNTARIA.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1) cuando quiera
- 2) sin tener que dar explicaciones
- 3) sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y **para que se realice el análisis genético (si procede).**

Deseo ser informado sobre los resultados del estudio	SI	NO
Acepto que las muestras derivadas de este estudio puedan ser utilizadas en futuras investigaciones (relacionadas con ésta), excluyendo análisis genéticos		
Doy mi conformidad para que mis datos clínicos sean revisados por personal ajeno al centro, para los fines del estudio, y soy consciente de que este consentimiento es revocable.		

He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado.

Firma del participante:

Fecha:

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado

Firma del Investigador:

Fecha:

Consentimiento informado estudio EPIMOOSA Versión 2014/01 __, fecha Abril
2014.

ANEXO 4: TEST DE EPWORTH

PREGUNTA: ¿Con qué frecuencia se queda usted dormido en las siguientes situaciones? Incluso si no ha realizado recientemente alguna de las actividades mencionadas a continuación, trate de imaginar en qué medida le afectarían.

Utilice la siguiente escala y elija la cifra adecuada para cada situación:

- 0 = Nunca se ha dormido.
- 1 = Escasa posibilidad de dormirse.
- 2 = Moderada posibilidad de dormirse.
- 3 = Elevada posibilidad de dormirse.

Situación	Puntuación
• Sentado y leyendo	
• Viendo la televisión	
• Sentado e inactivo en un espectáculo (teatro...)	
• En automóvil, como copiloto en un viaje de una hora	
• Recostado a media tarde	
• Sentado y conversando con alguien	
• Sentado después de la comida (sin tomar alcohol)	
• En su automóvil, cuando se para durante algunos minutos debido al tráfico	
Puntuación total (máximo: 24)	

ANEXO 5: PROTOCOLO DE MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Tabla 12. Protocolo de medición de la presión arterial

Medición de la presión arterial en consulta

- Permitir que el paciente se sienta durante 3-5 minutos antes de comenzar a tomar las mediciones de la presión arterial.
 - Tomar como mínimo dos mediciones de presión arterial, con el paciente sentado, dejando 1-2 minutos entre las mediciones; si los valores son muy diferentes, se toman mediciones adicionales.
 - Tomar mediciones repetidas de la presión arterial para mejorar la precisión en pacientes con arritmias, como fibrilación auricular.
 - Utilizar un manguito de presión de tamaño estándar (12-13 cm de ancho y 35 de largo), pero disponer de uno grande (...) para brazos gruesos (circunferencia del brazo > 32 cm).
 - Colocar el puño al nivel del corazón sea cual sea la posición del paciente.
 - Si se emplea el método auscultatorio, utilizar los ruidos de Korotkoff de fase I y V (desaparición) para identificar la presión sistólica y diastólica, respectivamente.
 - Medir la presión arterial en ambos brazos en la primera consulta para detectar diferencias (tomar como referencia el valor más alto).
-

Adaptado de la guía europea para el manejo de la hipertensión (160)

ANEXO 6: DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EN PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA CON Y SIN APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO

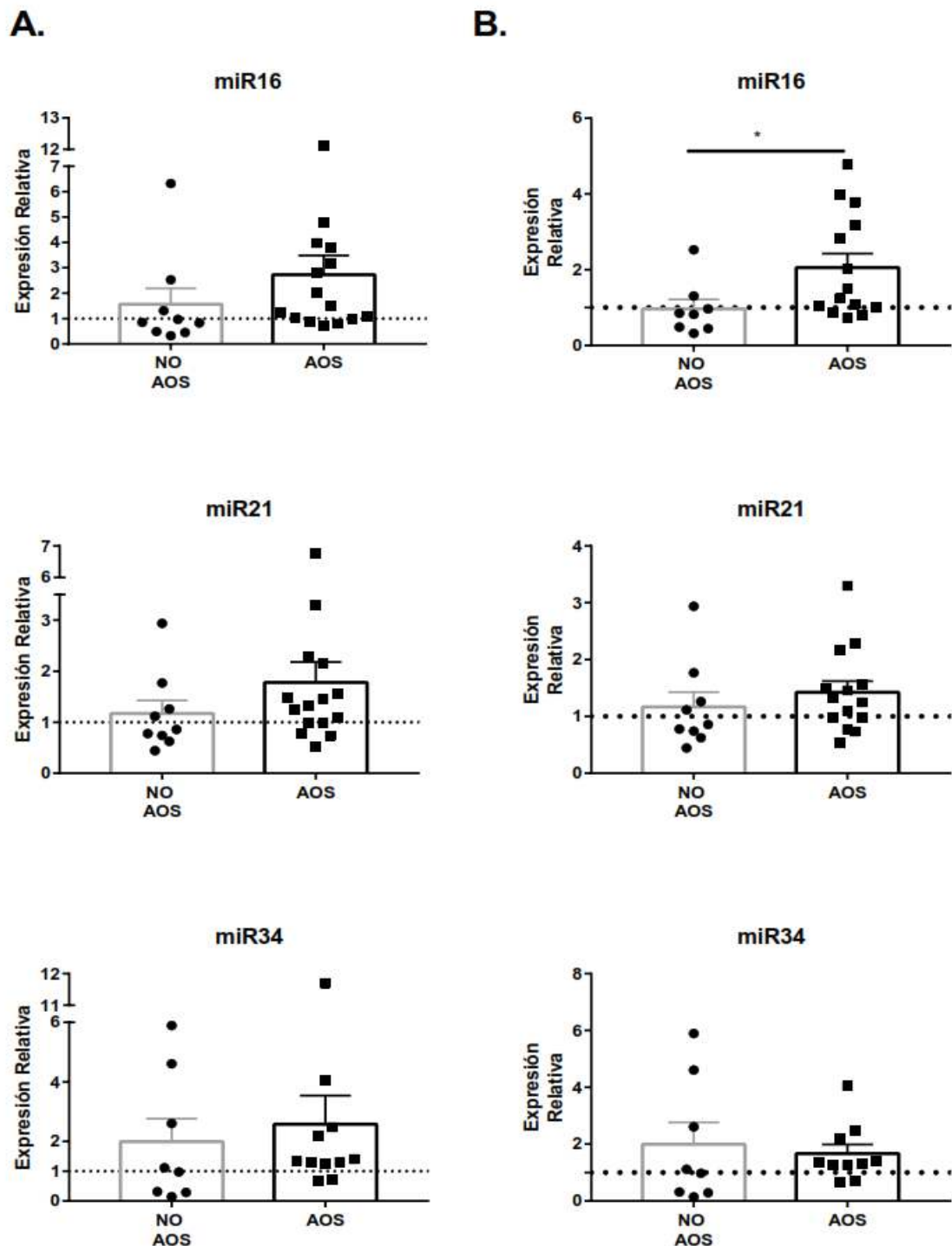


Figura 47. Diferencias en la expresión de micro-RNA en pacientes con obesidad mórbida con apnea obstructiva del sueño (AOS) y sin AOS (I)

Las figuras de la columna A muestran la descripción gráfica de la tasa de cambio para cada uno de los micro-RNA sin haber retirado los valores extremos u *outliers*. En la columna B se muestran los resultados una vez retirados.

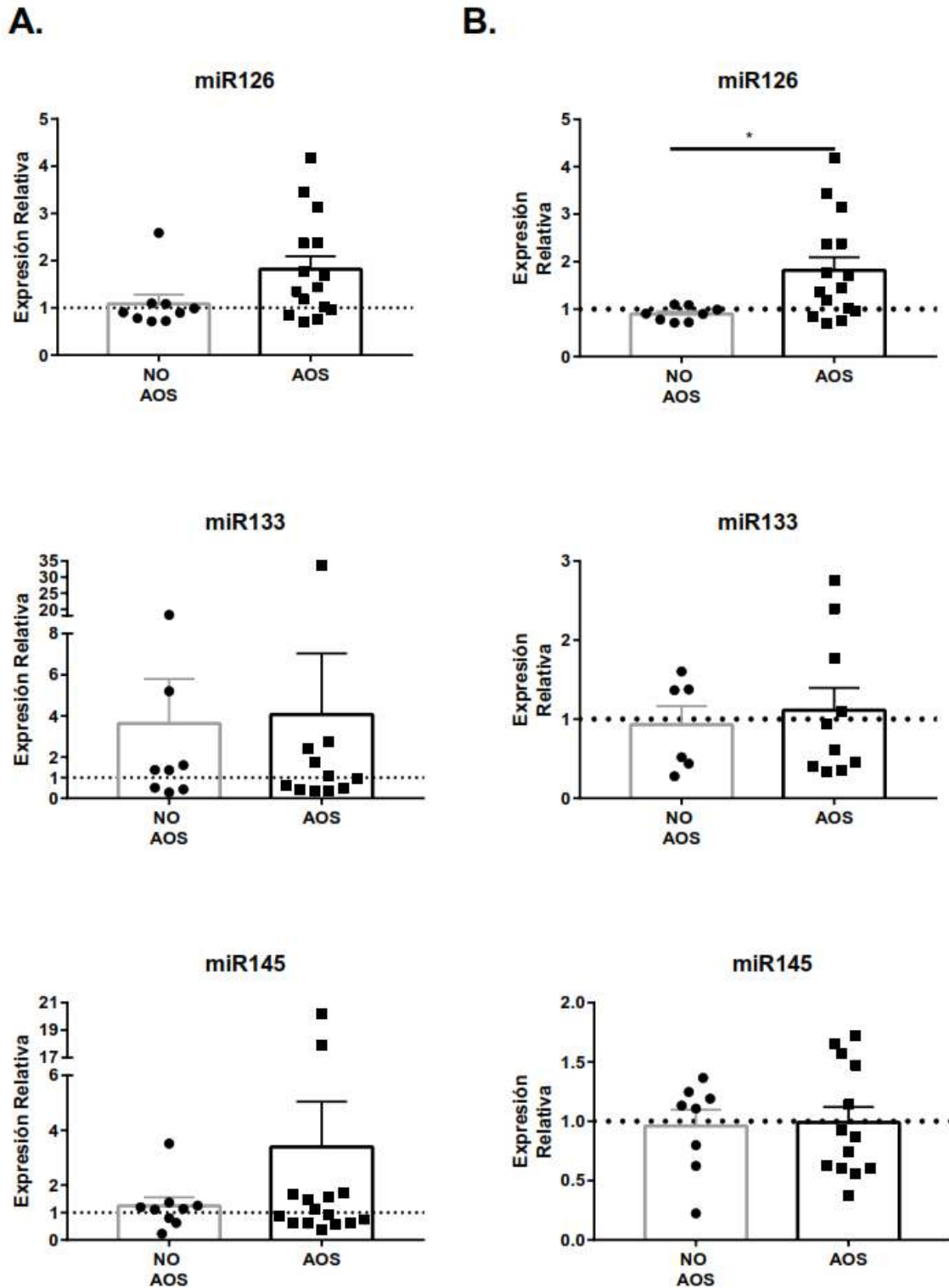


Figura 48. Diferencias en la expresión de micro-RNA en pacientes con obesidad mórbida con apnea obstructiva del sueño (AOS) y sin AOS (II)

Las figuras de la columna A muestran la descripción gráfica de la tasa de cambio para cada uno de los micro-RNA sin haber retirado los valores extremos u *outliers*. En la columna B se muestran los resultados una vez retirados.

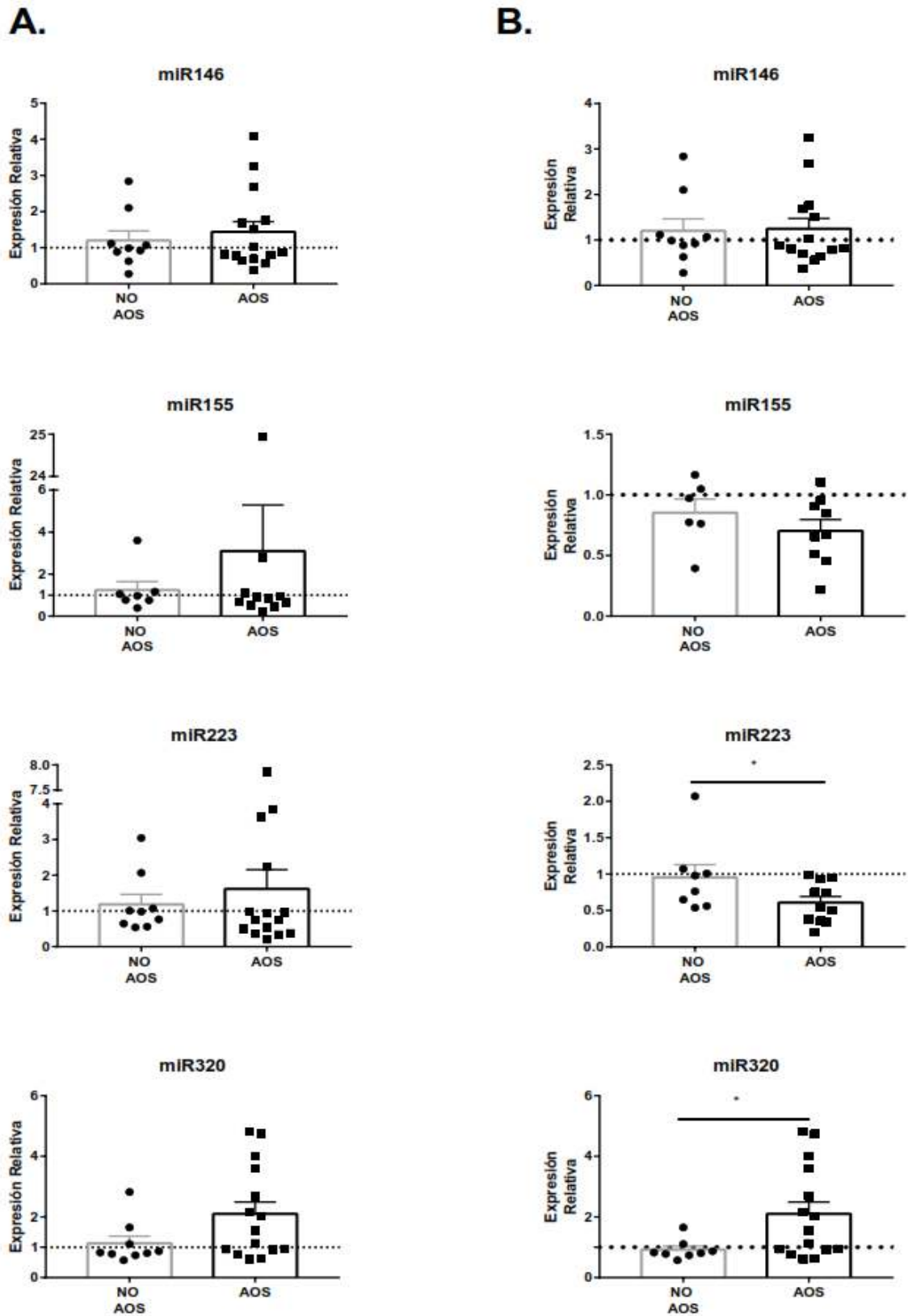


Figura 49. Diferencias en la expresión de micro-RNA en pacientes con obesidad mórbida con apnea obstructiva del sueño (AOS) y sin AOS (III)

Las figuras de la columna A muestran la descripción gráfica de la tasa de cambio para cada uno de los micro-RNA sin haber retirado los valores extremos u *outliers*. En la columna B se muestran los resultados una vez retirados.

ANEXO 7: RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y DEL SUEÑO

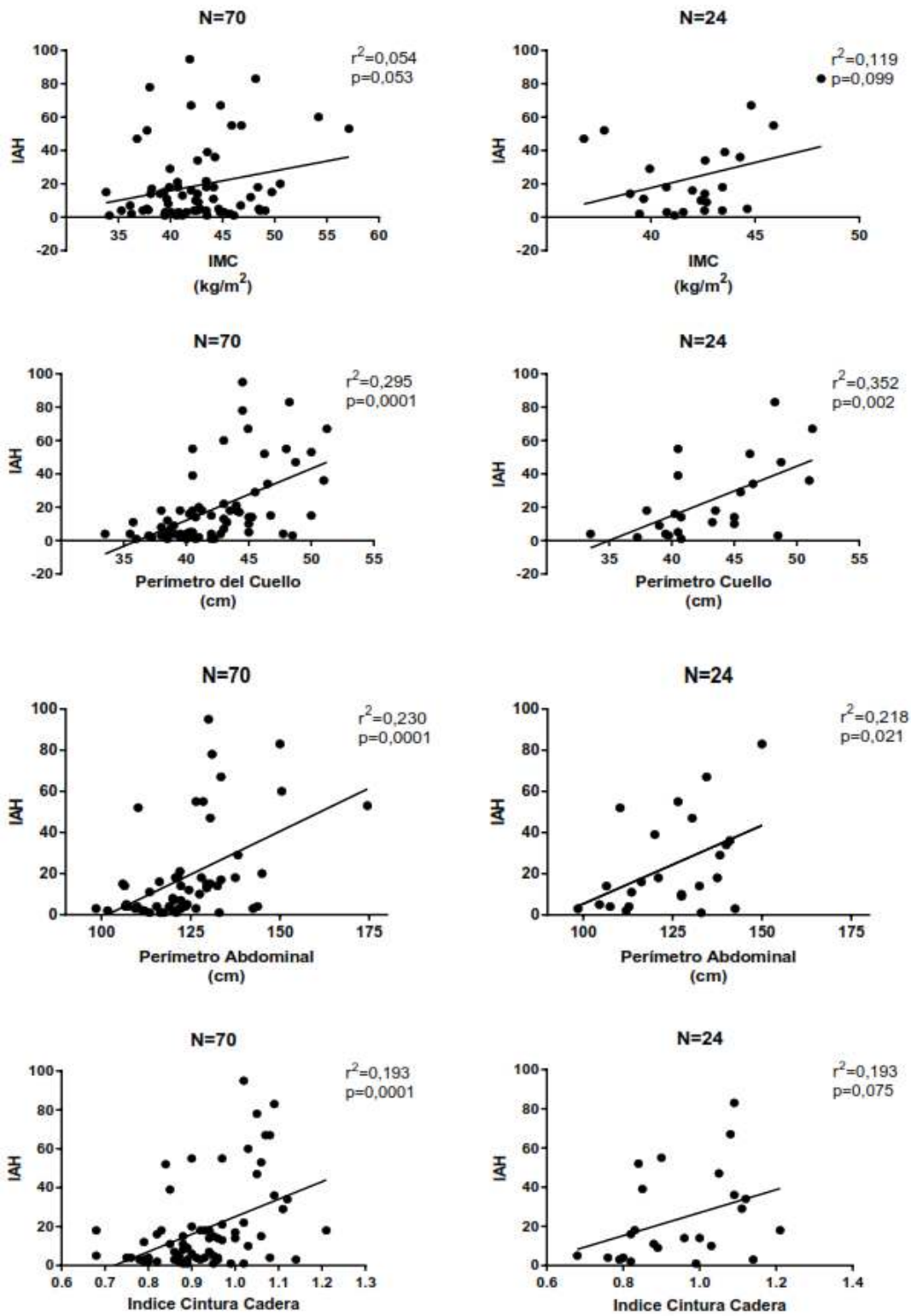


Figura 50. Relación entre los parámetros antropométricos y el índice de apneas e hipopneas (IAH)

ANEXO 8: EVOLUCIÓN DE LAS VARIABLES TRAS LA CIRUGÍA BARIÁTRICA RESPECTO A LA VISITA DE LOS 6 MESES PRECIRUGÍA

Tabla 13. Impacto de la cirugía bariátrica en la última visita respecto a la visita de los 6 meses precirugía

	Sin AOS (n = 9)		Con AOS (n = 15)	
	VISITA A LOS 6 MESES PRECIRUGÍA	VISITA A LOS 12 MESES POSTCIRUGÍA	VISITA A LOS 6 MESES PRECIRUGÍA	VISITA A LOS 12 MESES POSTCIRUGÍA
IMC (kg/m ²)	43,1 ± 1,8	32,1 ± 2,5 ***	42,5 ± 3	30,5 ± 3,9 ***
Perímetro del cuello (cm)	41,6 ± 3,4	37,1 ± 3,4 ***	45,2 ± 4,1	38,9 ± 4,6 ***
Perímetro abdominal (cm)	127,4 ± 10,5	103,4 ± 7,9 ***	131,1 ± 9,1	102,9 ± 11,2 ***
Índice cintura-cadera	0,93 ± 0,11	0,88 ± 0,09	0,99 ± 0,10	0,94 ± 0,08 *
Glucosa (mg/dl)	103,1 ± 21,9	83,5 ± 6,6 *	122,1 ± 34,1	87,3 ± 8,8 ***
Hemoglobina glicosilada (%)	5,7 ± 0,4	5,4 ± 0,1 *	6,2 ± 0,7	5,2 ± 0,3 ***
Colesterol total (mg/dl)	185,1 ± 25,7	188,2 ± 31,3	184,4 ± 32,7	174 ± 46,4
HDL (mg/dl)	55,8 ± 8,6	62,6 ± 13,4 *	44,3 ± 9,2	53,9 ± 14,5 *
LDL (mg/dl)	104,3 ± 27	106 ± 29,1	113,1 ± 35,4	103 ± 39,2
Triglicéridos (mg/dl)	124 ± 28,8	97,6 ± 30,7 *	135 ± 39,3	84,4 ± 30,1 ***
ApoA (mg/dl)	167,8 ± 24,4	171,6 ± 29,3	132,4 ± 22,6	155,4 ± 38,3 *
ApoB (mg/dl)	99,6 ± 20,1	90,2 ± 28,1	110,2 ± 28,3	89,6 ± 29,8 *
PCR (mg/dl)	0,62 ± 0,32	0,20 ± 0,15 **	0,80 ± 0,78	0,45 ± 0,78 *

ApoA: apolipoproteína A; ApoB: apolipoproteína B; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; PCR: proteína C-reactiva. Valores expresados como media y desviación estándar. Wilcoxon; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

ANEXO 9: DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EXOSOMALES EN PACIENTES HIPERTENSOS CON Y SIN DIABETES MELLITUS

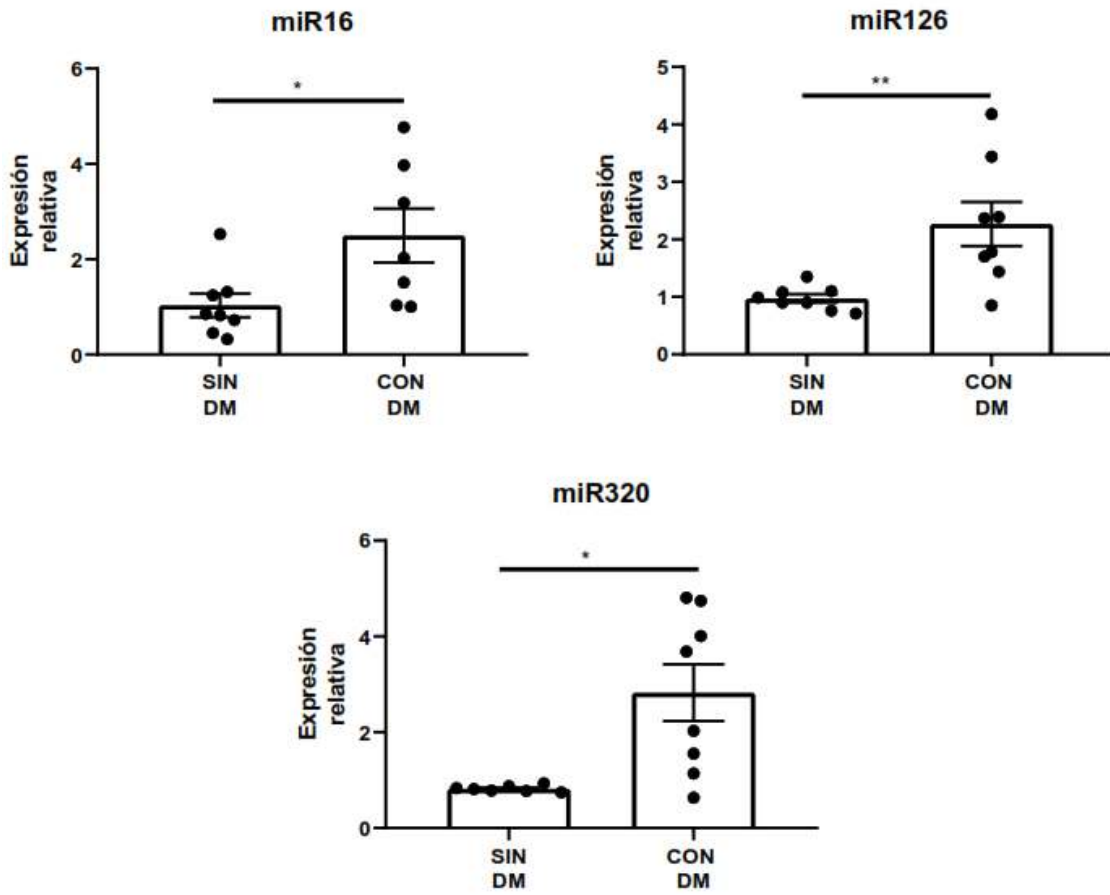


Figura 51. Diferencia en la expresión de miRNA exosomales circulantes en pacientes hipertensos con y sin DM

ANEXO 10: EXPRESIÓN DE MICRO-RNA EXOSOMALES EN PACIENTES PROCEDENTES DE EPIMOOSA Y EPIOSA

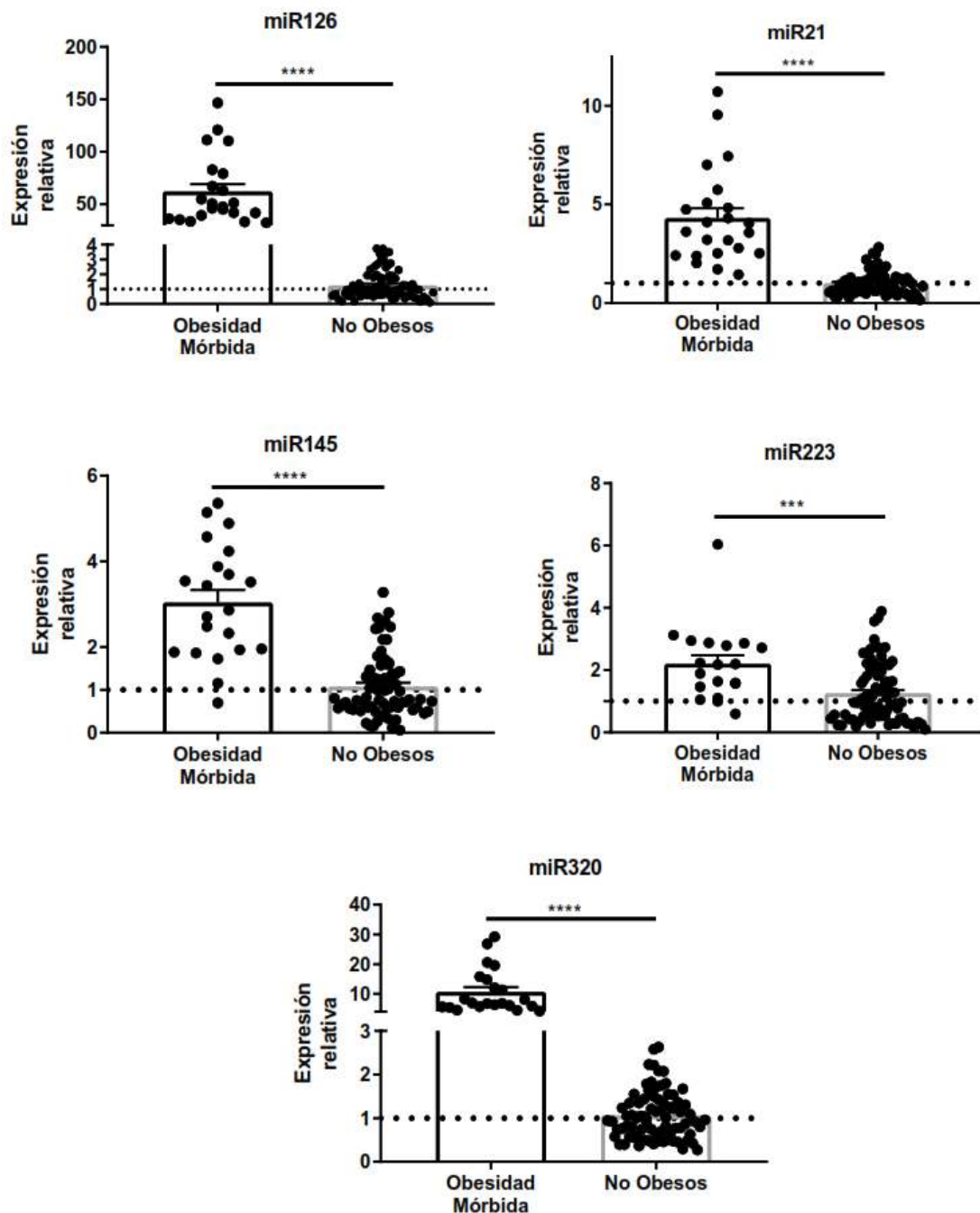


Figura 52. Diferencias en la expresión de micro-RNA exosomal en pacientes con obesidad mórbida y sin ella

Se ha tomado como valor de referencia el grupo de no obesos independientemente de a la existencia de apnea obstructiva del sueño. Hay que tener en cuenta que en los ΔC_t para el grupo de pacientes con obesidad mórbida y sin obesidad mórbida se obtuvieron en experimentos distintos. Es posible que las diferencias no sean tan acusadas.* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

ANEXO 11: PUBLICACIONES

Lázaro et al. *Respiratory Research* (2020) 21:42
<https://doi.org/10.1186/s12931-020-1302-9>

Respiratory Research

STUDY PROTOCOL

Open Access

Epigenetics dysfunction in morbid obesity with or without obstructive sleep apnoea: the EPIMOOSA study



Javier Lázaro^{1*}, Paloma Clavería¹, Carmen Cabrejas², José Fernando³, Berta Daga⁴, Beatriz Ordoñez⁴, Silvia Segura¹, David Sanz - Rubio⁵ and José M. Marín^{5,6}

Abstract

Background: Obstructive sleep apnoea (OSA) and morbid obesity (MO), defined by a body mass index ≥ 35 kg/m², are two closely related conditions. Recent studies suggest that circulating microRNA (miRNA) plays a potential role in the physiopathology of both conditions. To date, circulating miRNA expression has been studied separately in both conditions, but never jointly. The primary treatment of OSA is continuous positive airway pressure (CPAP), whereas bariatric surgery (BS) is the treatment of choice for MO. We have thus initiated the Epigenetics modification in Morbid Obesity and Obstructive Sleep Apnoea (EPIMOOSA) study ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03995836) identifier: NCT03995836).

Methods/design: EPIMOOSA is a prospective non-interventional cohort study aiming to recruit 45 MO patients who are candidates for BS. Three groups will be formed: MO without OSA, MO with OSA without CPAP and MO with OSA and CPAP. All of them will be followed up in 4 visits: baseline, 6 months prior to BS and 3, 6 and 12 months post-BS. At baseline, OSA status will be assessed by home sleep polygraphy (HSP), and CPAP will be adopted according to national guidelines. A specific standardized questionnaire (including medical conditions and AOS-related symptoms) and anthropometrical examination will be performed at each visit. Blood samples will be obtained at each visit for immediate standard biochemistry, haematology and inflammatory cytokines. For bio-banking, serum, plasma, and circulating exosomes will also be obtained. Twenty-four hours of blood pressure and electrocardiogram (ECG) Holter monitoring will be performed at all visits. A new HSP will be performed at the last visit. Finally, the three groups will be sex- and age- matched with participants in the EPIOSA study, an ongoing study aimed at understanding epigenetic changes in non-obese OSA patients.

Discussion: EPIMOOSA will evaluate changes in circulating miRNA in MO with or without OSA for the first time. In addition, EPIMOOSA will be able to elucidate the influence of OSA in MO patients and how specific and combined treatments alter miRNA expression.

Keywords: Obstructive sleep apnoea, Morbid obesity, Epigenetics, Exosomes, Bariatric surgery, Continuous positive airway pressure

* Correspondence: javilazarosdr@gmail.com

¹Respiratory Service, Hospital Royo Villanova, Avda San Gregorio, 50015 Zaragoza, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

The prevalence of obesity, defined as a body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m², in the adult population of developed countries is greater than 25% and has reached epidemic levels [1]. Obesity increases the risk of death from many causes [2, 3], being an independent risk factor in the development of several chronic diseases (cardiovascular disorders, type 2 diabetes mellitus [DM2], hyperlipidaemia, cancer, high blood pressure, liver disease, etc.) and acute concurrent processes (e.g., accidents, infections) [4, 5].

Obesity is closely related to the development of obstructive sleep apnoea (OSA) [6] and obesity hypoventilation syndrome [7]. OSA is the most common sleep breathing disorder, affecting 20% of men and 8% of women in Spain [8]. This condition is characterized by repeated episodes of partial or total obstruction of the pharynx during sleep. The main clinical implications are sleep fragmentation and chronic intermittent hypoxia (CIH). OSA and obesity are both associated with high morbi-mortality rates, although

the specific role of each condition in a given patient remains unclear.

Adipose tissue from obese patients, regardless of the coexistence of OSA, suffers chronic hypoxia due to its poor vascularization, which increases the level of hypoxia-inducible factor (HIF) [9, 10]. Recent studies have suggested that HIF, which is produced in hypoxic situations, activates different epigenetic mechanisms [11]. OSA has also been associated with the presence of systemic inflammation of as-yet unknown origin. This state may be influenced by epigenetic modifications induced by de-oxygenation/re-oxygenation phenomena, in which CIH is crucial [12, 13]. Both morbid obesity (MO) and OSA patients have an increase in several factors associated with endothelial damage triggered by CIH [14]. Epigenetic changes, especially overexpression of certain miRNAs that target the vascular endothelium (Fig. 1), are an intermediary mechanism that may connect CIH with endothelial damage. In OSA patients without MO, our group has identified an increased level

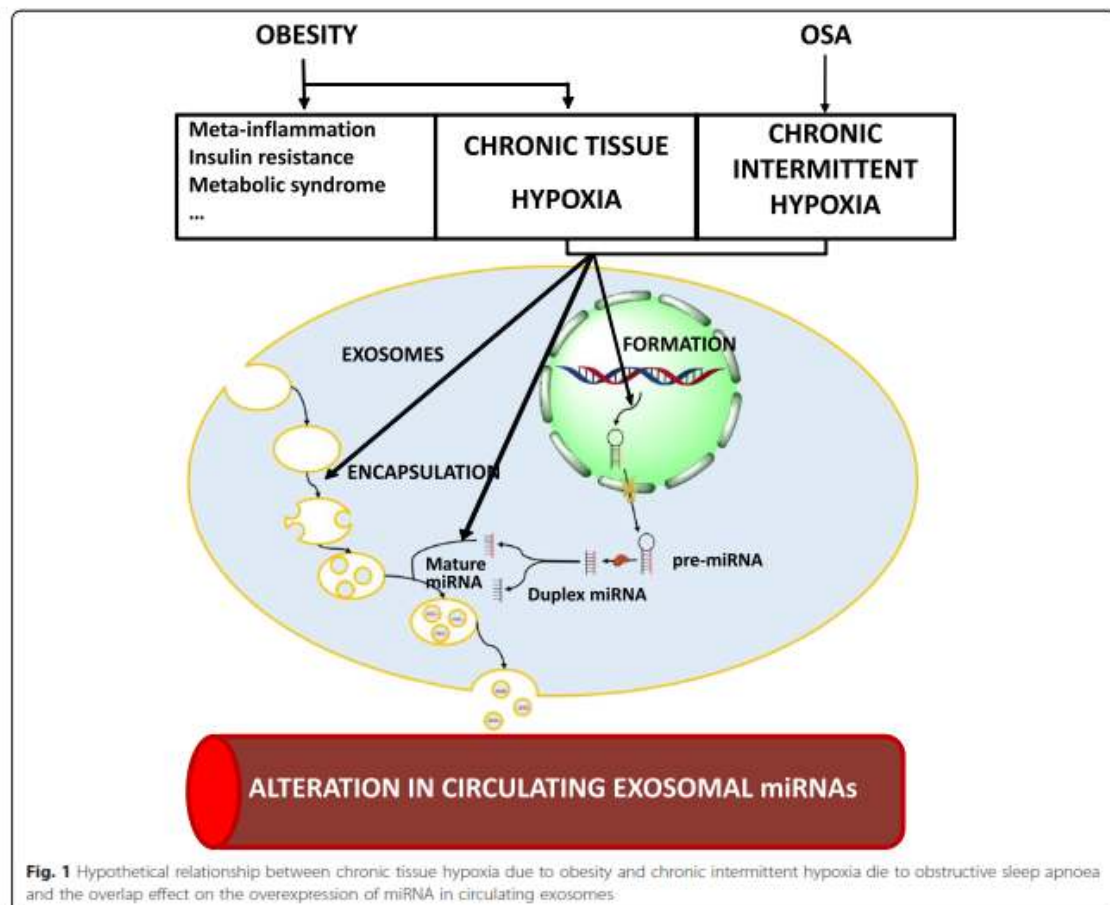


Fig. 1 Hypothetical relationship between chronic tissue hypoxia due to obesity and chronic intermittent hypoxia due to obstructive sleep apnoea and the overlap effect on the overexpression of miRNA in circulating exosomes

of certain miRNAs in circulating exosomes associated with accelerated atherosclerosis and cardiovascular risk [15, 16]. Interestingly, some of these miRNAs reduced their expression after treatment with nocturnal continuous positive airway pressure (CPAP) [15]. In obese children with OSA, Khalyfa et al. found higher levels of miRNAs from circulating exosomes involved with endothelial dysfunction. Nevertheless, the effect of OSA therapy and weight loss was not evaluated in this study. In addition, no such studies have been performed in obese adults with OSA.

Circulating exosomes are extra-vesicular vesicles that contain lipids, proteins and miRNAs that contribute to remote cell signalling and communication mechanisms in both physiological [17] and pathological processes [18]. This methodological paper describes the aims and methods of the Epigenetics dysfunction in Morbid Obesity and Obstructive Sleep Apnoea (EPIMOOSA) research project, which hypothesizes that obesity and sleep apnoea pathogenically potentiate each other as independent risk factors for cardiovascular morbi-mortality through overexpression of dysregulated miRNAs in circulating exosomes.

Methods

Study hypothesis and aim

The hypothesis of the EPIMOOSA study is that patients with a morbid obesity (MO) and OSA have a specific inflammatory phenotype and that, hypoxia-induced epigenetic changes act in synergy with the subclinical state of inflammation inherent to morbid obesity to develop this phenotype. If this hypothesis holds to be true, these changes should be reversed with CPAP and bariatric surgery (BS). In addition, we further aimed to identify epigenetic changes among exosomal miRNAs in MO patients with and without OSA and to determine whether CPAP and BS modify their levels.

Study design and setting

This is a 2-year prospective, longitudinal, non-interventional cohort study. It will be conducted in the Sleep and Bariatric Surgery Units at the Royo Villanova and Miguel Servet University hospitals in Zaragoza, Spain. The researchers of the EPIMOOSA study have a variety of expertise related to the management of sleep and respiratory disorders, obesity,

endocrinology, biostatistics, biomedical informatics, molecular biology and epigenetics. Two scientific centres will provide core services for the analysis of inflammatory biomarkers and genetics (Aragon Health Research Institute, Zaragoza, Spain) and epigenetic data analysis (University of Missouri, Columbia, MO).

Participant selection and follow-up

Patients will be selected from the bariatric surgery waiting list from both hospitals according to the selection criteria set out in Table 1. At the first visit (baseline), which will include a home sleep study (HSS), the pulmonologist will decide whether to begin CPAP therapy in accordance with Spanish standards [19]. Otherwise, patients will continue to receive their usual care by their primary physician and other specialist throughout the study. All participants will be asked to attend to a 6-month follow-up visit in which adherence to CPAP therapy (if applicable) will be assessed and a date for bariatric surgery will be set if it is still recommended. After BS, patients will attend 3-, 6- and 12-month postoperative follow-up visits.

The control group will comprise subjects without comorbidities from the EPIOSA study that is currently underway [20]. Patients with and without OSA, adjusted for sex and age (± 2 years), will be selected from the EPIOSA study population, which excludes individuals with a BMI > 35 kg/m².

Sample size

Three groups of patients will be studied in the EPIMOOSA cohort: a) subjects with MO and without OSA; b) patients with MO and OSA who do not need CPAP therapy; and c) patients with MO and OSA who require CPAP therapy. Each group will include at least 12 subjects who complete the 2-year follow-up after their inclusion at the baseline visit. The sample size was calculated to reveal significant differences in the epigenetic changes between the groups with OSA and the control group (main objective). In a previous study, Kim et al. [21] demonstrated significant differences in the DNA methylation of pro-inflammatory genes among two subgroups of eight children with OSA with high- or low c-reactive protein. In the EPIOSA cohort, we observed significant differences in exosomal miRNA between groups of 12 OSA patients versus controls [16].

Table 1 Selection criteria

INCLUSION CRITERIA	EXCLUSION CRITERIA
<ul style="list-style-type: none"> • Age 18–60 years • BMI consistently > 40 kg/m² for 3–5 years, following more than 1 year of unsuccessful controlled medical treatment • BMI 35–40 kg/m² with comorbidities susceptible to improvement with weight loss (hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia, OSA, etc.), following more than 1 year of unsuccessful controlled medical treatment • Signed informed consent form 	<ul style="list-style-type: none"> • Obesity hypoventilation syndrome or treatment with positive pressure devices • Diagnosis of systemic inflammatory disease • Neoplastic diseases in the last 5 years • Previous cardiovascular event (myocardial infarction, stroke or arterial aneurism) in the last 6 months • Pregnancy

Therefore, considering a potential loss to follow-up of 10%, we proposed the inclusion of 15 subjects per group as analysable after a minimum 2-year follow-up, which equates to a final sample size of 45 patients. These 45 patients will subsequently be compared with another 45 cases from the EPIOSA study: 15 subjects without OSA, 15 patients with OSA who refused any treatment and 15 patients with OSA who were treated with CPAP. Therefore, 90 patients in total will be included: 45 from the EPIMOOSA study and 45 from the EPIOSA study.

Measurements

Table 2 shows the variables that will be collected at each visit.

Clinical data

The following clinical data and complementary tests will be recorded at each visit: a) sociodemographic data, clinical, surgical and family history, and regular medications; b) level of daytime sleepiness based on the Epworth scale [22]; c) level of depression and anxiety based on the Hospital Anxiety and Depression Scale [23] and the Goldberg scale [24], both in their Spanish versions [25, 26]; d) weight (kg), height (cm), body mass index (BMI = weight (kg)/height (m)²), and neck, waist, and hip circumferences (cm); e) blood pressure, measured according to the European Society of Hypertension/European Society of Cardiology clinical practice guidelines [27]; and f) spirometry, measured according to the European Respiratory Society (ERS) standards [28].

Home sleep studies

We will use a validated home polygraphy system (Apnea-Link Air, ResMed[®], Sydney, Australia). The device continuously records airflow, chest movement, oxygen saturation, snoring, and body position. We define apnoea as a lack of airflow for more than 10 s and hypopnea as the reduction of airflow (> 50%) for over 10 s accompanied by a decrease in oxygen levels of more than 4%. The apnoea-hypopnoea

index [29] is calculated as the sum of the episodes of apnoea and hypopnoea per hour of recorded time. The results from all sleep studies will be analysed by trained technicians who are blind to the present protocol. Patients will receive CPAP therapy or not based on the recommendations from the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. This decision will be made by the principal investigator on a patient-by-patient basis according to the severity of AOS, cardiovascular comorbidity, and/or daytime symptomatology. Optimal titration of CPAP will be obtained using auto-CPAP (Autoset-T; ResMed, Sydney, Australia), according to previous validation procedures by the Spanish Sleep and Breathing Group [30]. Compliance with CPAP will be measured using the machines' internal timers.

24-h blood pressure and electrocardiogram (ECG) Holter monitoring

All patients will complete a 24-h blood pressure and electrocardiogram study. This measure will be performed using a Labtech[®]EC-3H/ABP (Labtech Ltd., Debrecen, Hungary) that combines a 3-channel EKG Holter and an ambulatory blood pressure monitor. These studies will be conducted the day after the home sleep study and over the 24-h period before the blood sample collection. They will be interpreted according to the guidelines published by the Spanish Society of Cardiology [31].

Blood tests

Fasting blood samples will be collected at each visit. Venous blood samples will be obtained with 21G Abbocaths, and arterial samples will be obtained with 23G ProVent[®] kits for blood gas analysis. Glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL, LDL, and apolipoprotein A and B blood levels will be analysed by spectrophotometry (IMMAGE[®] 800 Protein Chemistry Analyzer, Beckman Coulter). High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) will be determined within 2 h of collecting the blood samples using flow nephelometry. In total, 15 mL of blood will be used to obtain serum and plasma, and 5 mL of EDTA will be used to conduct genetic and epigenetic studies; these samples will be stored in a freezer at - 80 °C until analysis. Arterial blood gas analysis will be performed at baseline and at the last visit.

Exosome and miRNA analysis

Circulating exosomes and the encapsulated miRNA will be studied at the Translational Unit of the Miguel Servet Hospital in Zaragoza. Exosomes will be isolated with the miRCURY[™]Exosome Isolation Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), and miRNA will be obtained using the miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) as previously described [32]. After extracting the RNA samples, they will be reverse

Table 2 Procedures and schedule at EPIMOOSA study

VARIABLE	V0	V1	SURGERY	V2	V3	V4
Time	Baseline	6 m	12 m	15 m	18 m	24 m
Clinical History	*	*	-	*	*	*
Anthropometry	*	*	-	*	*	*
HSP	*	-	-	-	-	*
Blood test	*	*	-	*	*	*
Arterial Blood Gas	*	-	-	-	-	*
miRNA	*	*	-	-	-	*
EKG Holter	*	*	-	*	*	*
24h Blood pressure	*	*	-	*	*	*

HSP Home sleep polygraphy. * Done. - Not done

transcribed using the miRCURY LNA™ Universal RT miRNA PCR Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). Mature miRNA will then be quantified by real-time quantitative PCR using PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, Netherlands). The integrity of the analyses will be checked using the recommended spike-in control as previously described [32]. The results will be expressed following the 2^{-ΔΔ} threshold cycle (Ct) method [33]. Table 3 shows the miRNAs that will be studied in the EPIMOOSA study, which will be the same as those in the EPIOSA study.

Schedule

The study has already been initiated thanks to support from SEPAR and will overlap with the Bariatric Surgery Unit’s care strategy. The recruitment period will last for 2 years, while the follow-up will run for 6 months after the home sleep study and 1 year after surgery. As seen in Fig. 2, we plan to conduct five visits over a 2-year period, excluding the visits associated with bariatric surgery. The study schedule includes two distinct stages. The first stage features patients who have not yet undergone surgery for MO but who are being treated with CPAP for OSA for 6 months, based on their baseline HSP. This period will provide information about the impact of OSA treatment in patients with MO/OSA overlap. The second stage will start after bariatric surgery. This phase involves a 12-month postoperative follow-up with three visits, the last conducted 12 months after the BS because it is at that point when weight loss is thought to be stabilized. As part of the clinical practice at the Sleep Unit, patients on CPAP who have lost at least 20% of their baseline BMI have an additional follow-up home sleep study. If the AHI is lower than 15, the treatment is withdrawn. According to previous experience, most of these patients achieve that goal 3 to 6 months after bariatric surgery. Therefore, to evaluate the effect of BS without the concomitant effect of CPAP, the epigenetic analyses will be performed at least 12 months post-surgery.

Statistical analysis

We have predefined the following statistical procedures:

a) Description of populations. They will be expressed as mean values ± standard deviation for quantitative variables or as numbers and frequencies for qualitative

variables. b) Difference between groups: Groupwise comparisons (*n* > 2) will be performed using a nonparametric Kruskal-Wallis test followed by a Mann-Whitney U test when appropriate. Pairwise comparisons were performed using a nonparametric Mann-Whitney test unless otherwise indicated. Chi-square tests will be performed for categorical variables. c) Pearson’s or Spearman’s correlation, depending on the variables’ normality, will be used to evaluate the relationship between systemic inflammation and clinical variables. d) The interindividual variability of miRNA will be determined through the coefficient of variation. GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) and SPSS version 23.0 (IBM) statistical packages will be used for all analyses.

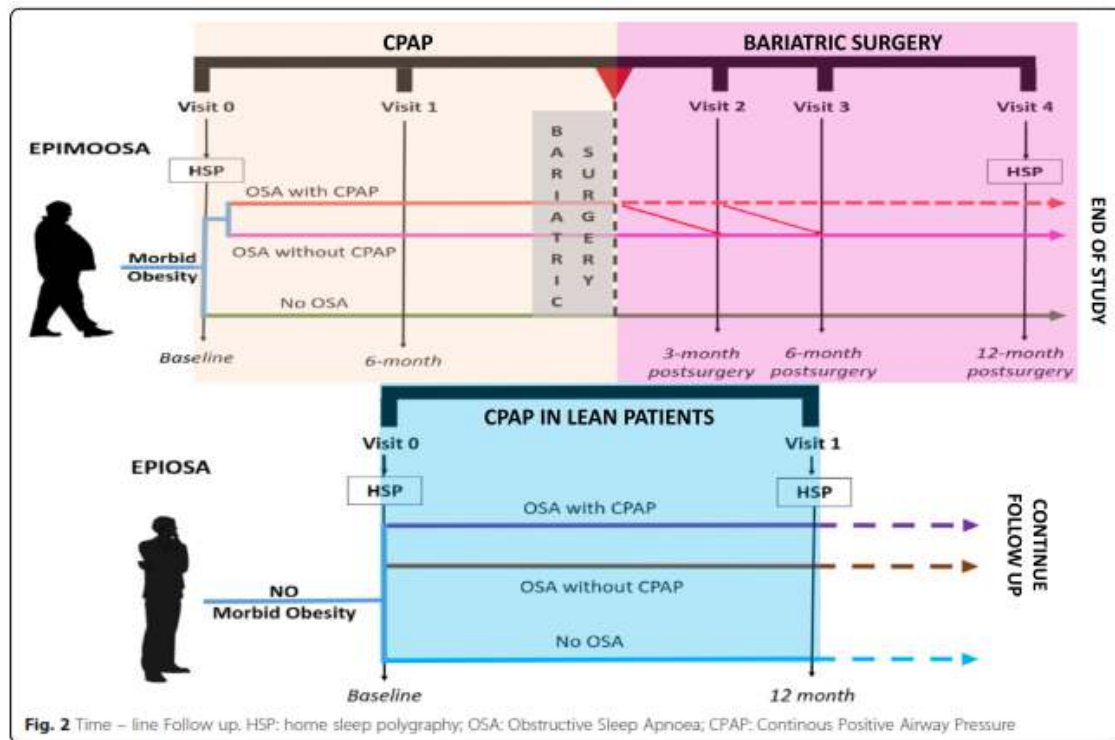
Discussion

Previous studies have evaluated the presence of epigenetic dysfunction in both children and adults with OSA (Table 4). However, most of these studies have assessed epigenetic dysfunction at the DNA methylation level [20, 21, 35, 36] or by using free miRNA in plasma [36, 37]. No such studies have been performed in obese patients with OSA, and no studies have evaluated the effect of CPAP or BS. The epigenetic changes occurring in obesity have also been widely studied, revealing that even perinatal alterations have an influence on the propensity to obesity in adulthood [38]. The authors of a study including 13 obese and non-obese adolescents found 55 different miRNAs (including miRNA 148b, miRNA 4269, miRNA 23b, miRNA 4429) in obese individuals compared to those with a BMI < 25 kg/m², and they were associated with an increase in insulin resistance, which is responsible for target organ damage in obesity [39]. The same group studied the effect of BS-induced weight loss on the exosomes and their content. Another study carried out on six African American women who underwent a gastric bypass examined the miRNAs before and 1 year after surgery and reported a change in the expression of 58 miRNAs, 10 of which were directly related to an improvement in insulin resistance [40]. None of these studies have considered the overlap effect of OSA.

The adipocytes of patients with MO present hyperplasia, hypertrophy and insufficient angiogenesis, which leads to tissue hypoxia and subsequently negative long-term metabolic and cardiovascular consequences [41]. Hypoxia also causes an increase in cell cytoplasm HIF 1α levels, demonstrating that such an increase activates, among other mechanisms, the release of different miRNAs such as miRNA 21 [42]. Similarly, patients with OSA who endure repeated episodes of nocturnal CIH experience a state of constant hypoxemia that lasts all night and triggers an increase in HIF 1α [43]. These

Table 3 Panel of miRNA to be studied in the EPIMOOSA protocol

EPIMOOSA miRNA panel		
UniSP2	miR-320a	miR-16-5p
UniSP5	miR-145-5p	miR-126-3p
cel-miR-39	miR-146A-5p	miR-133a-3p
let 7a-5p	miR-223-3p	miR-34a-5p
miR-21-5p	miR-155-5p	



pathophysiological coincidences are limited not only to the HIF but also to endothelial dysfunction in children with OSA and obese children without OSA. These studies revealed that children with endothelial dysfunction exhibited a significant decrease in 4 miRNAs (miRNA 16, miRNA 451, miRNA 5100, and miRNA 630), the last one being of particular interest given its association with endothelial dysfunction [34].

In the context of OSA, different epigenetic markers have been evaluated, specifically DNA methylation and, more recently, the role of miRNAs. Our group has previously studied non-obese ($BMI < 30 \text{ kg/m}^2$) adults with OSA and did not find any changes in methylation or FOXP3 expression. However, we found the dysregulation of certain miRNAs in circulating exosomes (miRNA320-5p and miRNA132-3p) associated with cardiovascular

Table 4 Published works that studied the presence of epigenetic changes in OSA

Study	Population	Primary objective	Epigenetic change	Gene	Patient characteristics
Kim et al. [21]	Children	CRP	DNA methylation	FOXP3	Matched BMI
Khalyfa et al. [34]	Children	ED	miRNA exosomes	–	Obese without OSA vs. nonobese with OSA
Chen et al. [35]	Adults	Severity OSA and EDS	DNA methylation	ILR2, NPR2, AR, SP140	BMI < 35
Kheirandish-Gozal et al. [36]	Children	ED	DNA methylation mRNA	eNOS	Matched BMI
Marin et al. [20]	Adults	Atheromatous plaques in carotid arteries	DNA methylation and expression	FOXP3	BMI < 30
Sariz-Rubio et al. [16]	Adults	Atheromatous plaques in carotid arteries	miRNA exosomes	–	BMI < 30
Sanchez de la Torre et al. [37]	Adults	Reduce BP	miRNA	miRNA 100, 378 and 486	Class 1 obese (BMI 32)

ED Endothelial dysfunction, EDS Excessive daytime sleepiness, miRNA Micro RNA

diseases that produced a non-uniform response to CPAP therapy [15]. Those findings explain the increasing interest in this field. On the one hand, epigenetic markers could be useful in identifying subjects at risk of developing certain comorbidities and could be used to monitor the progression of the underlying condition. On the other hand, there are already drugs that act on epigenetic changes, even reversing them and contributing to the treatment of several diseases, especially in the area of oncology [44].

The role of miRNA in OSA is currently a popular area of research. A sub-analysis of the HIPARCO clinical trial [37] revealed that a panel of miRNAs could be used to reliably predict which patients with refractory hypertension and OSA would respond better to CPAP therapy in terms of reducing their blood pressure. An experiment conducted by Khalyfa et al. [45] found a possible pathophysiological relationship among the circulating miRNAs of obese patients with OSA, adipocyte alterations, and the mechanisms of insulin resistance [45].

The relationship between OSA and MO has been well documented [46], showing that their coexistence greatly increases the harmful effects of both conditions on various target organs [47, 48] and that they have intrinsically linked mechanisms of action [43, 49]. Regarding the high prevalence of OSA among morbidly obese patients [7], we believe that the works cited in this article feature a significant methodological bias. The coexistence of two diseases whose close relationship has already been evidenced [50] means that any studies in this area must control both factors carefully.

Conclusion

Our study aims to evaluate, for the first time, whether patients with MO with/without OSA develop epigenetic dysfunction in circulating exosomes involved in accelerated incidents of cardiovascular diseases. Our study will provide a better understanding of the role of CPAP therapy in patients with MO/OSA overlap and the effect of BS-induced weight loss. The results could also give rise to new biomarkers to improve phenotyping in patients with either or both of the conditions and, possibly, novel therapeutic targets.

Abbreviations

BMI: Body Mass Index; BS: Bariatric Surgery; CIH: Chronic Intermittent Hypoxia; CPAP: Continuous Positive Airway Surgery; DM2: Type 2 Diabetes mellitus; ECG: Electrocardiogram; ED: Endothelial Dysfunction; EPIMGOA: Epigenetics dysfunction Morbid Obesity and Obstructive Sleep Apnoea; EPIOSA: Epigenetics modifications and subclinical atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnoea; HDL: High Density Lipoprotein; HIF: Hypoxia-inducible factor; HSP: Home Sleep Polygraphy; hsPCR: high sensitive C reactive protein; LDL: Low Density Lipoprotein; miRNA: microRNA; MO: Morbid Obesity; OSA: Obstructive Sleep Apnoea; OSAHS: Obstructive Sleep Apnoea/Hypopnea Syndrome

Acknowledgements

None.

Authors' contributions

JL, JMM study concept and design. DS will carried out the molecular genetic studies and the immunoassays. SS will performed the statistical analysis. JL, PC, CC, JF and SS will collect the data. BD and BO will review and inform 24 h blood pressure and EKG holter. All authors critically reviewed and approved the final manuscript.

Funding

This research project has received grants from the Instituto Carlos III, Madrid, Spain P115/01940, P118/01524), the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR-2017), and the Aragon Society of the Respiratory System (SADAR-2016).

Availability of data and materials

As far as is a study protocol we don't present any participant information we don't share any data.

Ethics approval and consent to participate

The study has been approved by the Aragon Institute of Health Sciences (Ethics Committee for Clinical Research of Aragon number: 23/2014). In accordance with recommendations from the Declaration of Human Rights, the Helsinki Conference and the IACS, patients must sign the informed consent form before being enrolled in the study. The study has also been registered at [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) identifier: NCT03995836.

Consent for publication

None, as far as is a study protocol.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Respiratory Service, Hospital Royo Villanova, Avda San Gregorio, 50015 Zaragoza, Spain. ²Endocrinology and Nutrition Service, Hospital Clínico Lozano Blesa, Zaragoza, Spain. ³Bariatric Surgery Unit, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain. ⁴Cardiology Service, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain. ⁵Translational Research Unit, Hospital Universitario Miguel Servet, IIS Aragón, Zaragoza, Spain and CIBER Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain. ⁶Department of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain.

Received: 8 July 2019 Accepted: 21 January 2020

Published online: 04 February 2020

References

- Ward ZJ, Long MW, Resch SC, Gortmaker SL, Cradock AL, Giles C, Hsiao A, Wang YC. Redrawing the US obesity landscape: bias-corrected estimates of state-specific adult obesity prevalence. *PLoS One*. 2016;11:e0150735.
- Global BMIMC, Di Angelantonio E, Bhupathiraju SH, Wormser D, Gao P, Kaptoge S, Berrington de Gonzalez A, Cairns BJ, Huxley R, Jackson CH, et al. body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet*. 2016; 388:776–86.
- Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, Macinnis RJ, Moore SC, Tobias GS, Anton-Culver H, Freeman LB, et al. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med*. 2010; 363:2211–9.
- Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005;366:1197–209.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348:1625–38.
- Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Nonell L, Puigdecanet E, Rodriguez-Hermosa JJ, Rovira O, Xifra G, Guerra E, Moreno M, et al. Surgery-induced weight loss is associated with the Downregulation of genes targeted by MicroRNAs in adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100: E1467–76.
- Shah N, Roux F. The relationship of obesity and obstructive sleep apnea. *Clin Chest Med*. 2009;30:455–65 vii.

8. Durán J, Esnaola S, Rubio R, Rubio R, Iztueta A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:685–9.
9. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borrás FE, Breakfield X, Budnik V, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10:e1001450.
10. Nallamshetty S, Chan SY, Loscalzo J. Hypoxia: a master regulator of microRNA biogenesis and activity. *Free Radic Biol Med*. 2013;64:20–30.
11. Bandara KV, Michael MZ, Gleadle JM. MicroRNA biogenesis in hypoxia. *Microna*. 2017;80–96.
12. Chen YC, Hsu PY, Hsiao CC, Lin MC. Epigenetics: a potential mechanism involved in the pathogenesis of various adverse consequences of obstructive sleep apnea. *Int J Mol Sci*. 2019;20:E2937.
13. Khalyfa A, Youssefina N, Foster GE, Beaudin AE, Qiao Z, Piboux V, Pun M, Hanly PJ, Kheirandish-Gozal L, Poulin MJ, Gozal D. Plasma Exosomes and Improvements in Endothelial Function by Angiotensin 2 Type 1 Receptor or Cyclooxygenase 2 Blockade Following Intermittent Hypoxia. *Front Neurol*. 2017;8:709.
14. Kaczmarek E, Bakker JP, Clarke DN, Ciszmadia E, Kocher O, Veves A, Tecilach F, O'Donnell CP, Ferran C, Malhotra A. Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One*. 2013;8:e70559.
15. Khalyfa A, Sanz-Rubio D, Marin JM, Gozal D. Plasma Exosomes and Endothelial Function in OSA Patients with Evidence of Atherosclerosis: Effect of Long-term Adherent CPAP. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195:A1210.
16. Sanz-Rubio D, Martin-Burriel I, Gil AV, Marin JM. Circulating Exosomal Mir21 and Mir320 in Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195:A4523.
17. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–54.
18. Gargalionis AN, Basdra EK. Insights in microRNAs biology. *Curr Top Med Chem*. 2013;13:1493–502.
19. Lloberes P, Durán-Cantolla J, Martínez-García M, Marin J, Ferrer A, Corral J, Masa J, Parra O, Alonso-Alvarez M, Terán-Santos J. Diagnóstico y tratamiento del síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Arch Bronconeumol*. 2011;47:143–56.
20. Marin JM, Antaj J, Martín T, Carrizo SJ, Andrés M, Martin-Burriel I, Bolea R, Sanz A, Varona L, Godino J, et al. Epigenetics modifications and subclinical atherosclerosis in obstructive sleep apnea: the EPIOSA study. *BMC Pulm Med*. 2014;14:114.
21. Kim J, Bhattacharjee R, Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Sans Capdevila O, Wang Y, Gozal D. DNA methylation in inflammatory genes among children with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:330–8.
22. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*. 1991;14:540–5.
23. Zigmond AS, Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*. 1983;67:361–70.
24. Goldberg D, Bridges K, Duncan-Jones P, Grayson D. Detecting anxiety and depression in general medical settings. *BMJ*. 1988;297:897–9.
25. Herrero MJ, Bianchi J, Peri JM, De Pablo J, Pintor L, Bulbena A. A validation study of the hospital anxiety and depression scale (HADS) in a Spanish population. *Gen Hosp Psychiatry*. 2003;25:277–83.
26. Monton C, Perez Echeverria MJ, Campos R, Garcia Campayo J, Lobo A. Anxiety scales and Goldberg's depression: an efficient interview guide for the detection of psychologic distress. *Aten Primaria*. 1993;12:345–9.
27. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, et al. 2013 ESH/ESC practice guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Press*. 2014;23:3–16.
28. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26:319–38.
29. Duarte RLM, Mello FCQ, Magalhaes-da-Silveira FJ, Oliveira ESTS, Rabahi MF, Gozal D. Comparative performance of screening instruments for obstructive sleep apnea in morbidly obese patients referred to a sleep laboratory: a prospective cross-sectional study. *Sleep Breath*. 2019;23:1123–32.
30. Masa JF, Jimenez A, Duran J, Capote F, Monasterio C, Mayos M, Teran J, Hernandez L, Barbe F, Maimo A, et al. Alternative methods of titrating continuous positive airway pressure: a large multicenter study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:1218–24.
31. Palma Gamiz JL, Arribas Jimenez A, Gonzalez Juanatey JR, Marin Huerta E, Martin-Ambrosio ES. Spanish Society of Cardiology practice guidelines on ambulatory monitoring of electrocardiogram and blood pressure. *Rev Esp Cardiol*. 2000;53:91–109.
32. Sanz-Rubio D, Martin-Burriel I, Gil A, Cubero P, Forner M, Khalyfa A, Marin JM. Stability of circulating Exosomal miRNAs in healthy subjects. *Sci Rep*. 2018;8:10306.
33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001;25:402–8.
34. Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Khalyfa AA, Philby MF, Alonso-Alvarez ML, Mohammadi M, Bhattacharjee R, Teran-Santos J, Huang L, Andrade J, Gozal D. Circulating plasma extracellular microvesicle MicroRNA cargo and endothelial dysfunction in children with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194:1116–26.
35. Chen YC, Chen TW, Su MC, Chen CJ, Chen KD, Liou CW, Tang P, Wang TY, Chang JC, Wang CC, et al. Whole genome DNA methylation analysis of obstructive sleep apnea: IL1R2, NPR2, AR, SP140 methylation and clinical phenotype. *Sleep*. 2016;39:743–55.
36. Kheirandish-Gozal L, Khalyfa A, Gozal D, Bhattacharjee R, Wang Y. Endothelial dysfunction in children with obstructive sleep apnea is associated with epigenetic changes in the eNOS gene. *Chest*. 2013;143:971–7.
37. Sanchez-de-la-Torre M, Khalyfa A, Sanchez-de-la-Torre A, Martinez-Alonso M, Martinez-Garcia MA, Barcelo A, Lloberes P, Campos-Rodriguez F, Capote F, Diaz-de-Asturi MJ, et al. Precision medicine in patients with resistant hypertension and obstructive sleep apnea: blood pressure response to continuous positive airway pressure treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66:1023–32.
38. Cordero P, Li J, Oben JA. Epigenetics of obesity: beyond the genome sequence. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18:361–6.
39. Ferrante SC, Nadler EP, Pillai DK, Hubal MJ, Wang Z, Wang JM, Gordish-Dressman H, Koeck E, Sevilla S, Wiles AA, Freishtat RJ. Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease. *Pediatr Res*. 2015;77:447–54.
40. Hubal MJ, Nadler EP, Ferrante SC, Barberio MD, Suh JH, Wang J, Dohm GL, Pories WJ, Mietus-Snyder M, Freishtat RJ. Circulating adipocyte-derived exosomal MicroRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass. *Obesity (Silver Spring)*. 2017;25:102–10.
41. Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes*. 2009;33:54–66.
42. Xu X, Kriegel AJ, Jiao X, Liu H, Bai X, Olson J, Liang M, Ding X. miR-21 in ischemia/reperfusion injury: a double-edged sword? *Physiol Genomics*. 2014;46:789–97.
43. Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities. *Chest*. 2015;147:266–74.
44. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16:203–22.
45. Khalyfa A, Gozal D, Masa JF, Marin JM, Qiao Z, Corral J, Gonzalez M, Martí S, Kheirandish-Gozal L, Egea C, et al. Sleep-disordered breathing, circulating exosomes, and insulin sensitivity in adipocytes. *Int J Obes*. 2018;42:1127–39.
46. Romero-Corral A, Caples S, López-Jimenez F, Somers V. Interactions between obesity and obstructive sleep apnea. Implications for Treatment. *Chest*. 2010;137:711–9.
47. Bahrani H, Bluemke DA, Kronmal R, Bertoni AG, Lloyd-Jones DM, Shahar E, Szklo M, Lima JA. Novel metabolic risk factors for incident heart failure and their relationship with obesity: the MESA (multi-ethnic study of atherosclerosis) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1775–83.
48. Spruyt K, Gozal D. A mediation model linking body weight, cognition, and sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:199–205.
49. Trzepizur W, Le Vaillant M, Meslier N, Pigeonne T, Masson P, Humeau MP, Bizieux-Thaminy A, Goupil F, Chollet S, Ducluzeau PH, Gagnadoux F. Independent association between nocturnal intermittent hypoxemia and metabolic dyslipidemia. *Chest*. 2013;143:1584–9.
50. Newman AB, Foster G, Givelber R, Nieto FJ, Redline S, Young T. Progression and regression of sleep-disordered breathing with changes in weight: the sleep heart health study. *Arch Intern Med*. 2005;165:2408–13.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.