

# **Inflamación sistémica en pacientes con apnea obstructiva del sueño con/sin aterosclerosis subclínica**

**Systemic inflammation in patients with  
obstructive sleep apnea with/without subclinical  
atherosclerosis**

**Trabajo de Fin de Máster 2021**

**Autor: Sergio Alarcón Sisamón**

**Tutor/director: Doctor José María Marín Trigo**

**Máster de Iniciación a la Investigación Médica**

## ÍNDICE

Índice .....	Página 1
Resumen y Abstract .....	Páginas 2-5
Introducción .....	Páginas 6-10
Justificación del estudio e hipótesis .....,.....	Página 10
Objetivos .....	Página 11
Material y métodos .....	Página 12-16
Resultados y discusión.....	Página 17-29
Conclusiones .....,.....	Páginas 30-31
Bibliografía .....	Páginas 32-36

## Resumen

Introducción: la apnea obstructiva del sueño (AOS) es un trastorno caracterizado por episodios recurrentes de obstrucción faríngea durante el sueño. Estos episodios se asocian con hipoxia y aumento de la actividad simpática, que promueve un estado de inflamación sistémica, que contribuye al aumento de eventos cardiovasculares descrito en pacientes con AOS.

Objetivos: determinar el nivel de biomarcadores inflamatorios sistémicos en pacientes con AOS, su respuesta al tratamiento con presión positiva aérea continua (CPAP) y su relación con la arteriosclerosis subclínica.

Material y métodos: se seleccionó en la cohorte EPIOSA (Epigenetics modifications and Subclinical Atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnea: The EPIOSA study, Gov trials: NTC01475421) a 47 sujetos sin AOS y 96 pacientes con AOS. El nivel de biomarcadores en plasma (PCR, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A y TNF-  $\alpha$ ) se determinó en la visita de reclutamiento y al año de seguimiento en los pacientes con OSA tratados y no tratados con CPAP. A todos ellos se les midió en cada visita el grosor de la capa intima media de las arterias carótidas y la presencia de placas de ateroma. Se estudiaron los mismos biomarcadores inflamatorios en pacientes con otras enfermedades respiratorias inflamatorias: EPOC, EPOC con AOS y asma. Las estimaciones de las diferencias de biomarcadores inter-grupos e intra-grupos se evaluaron mediante el test de Kruskal Wallis.

Resultados: la edad media de los pacientes controles, con AOS, con EPOC, con EPOC/AOS y con asma, fue de 39 años, 46 años, 70 años, 67 años y 56 años, respectivamente. La PCR resultó elevada en asma, Overlap y EPOC. Existió relación entre el AOS y el nivel de los biomarcadores inflamatorios, sobre todo tras el año de seguimiento, alcanzando la significancia estadística para IL-6, IL-10, IL-17A y TNF-alfa. El IMT (intima media thickness) de los controles fue 0,49 y el de los pacientes con AOS fue de 0.65 ( $p < 0.001$ ). Al año de tratamiento, el IMT se redujo en los pacientes tratados con CPAP, pero no en los no tratados. Sin embargo, el nivel de los biomarcadores no mostró cambios significativos.

Conclusiones: se han hallado diferencias estadísticamente significativas de los biomarcadores inflamatorios respecto al grupo control, lo que nos lleva a concluir la base fisiopatológica inflamatoria de la apnea obstructiva de sueño. El tratamiento con CPAP no demostró tener influencia en los biomarcadores inflamatorios. Por otro lado, hemos hallado una diferencia estadísticamente significativa en que los sujetos tratados con CPAP, redujeron significativamente el grosor de la capa íntima media de la arteria carótida (conocido marcador de aterosclerosis subclínica), por lo que teorizamos que dicho tratamiento podría reducir los eventos cardiovasculares en los pacientes con AOS.

Palabras clave: AOS (apnea obstructiva del sueño), CPAP (presión positiva continua en la vía aérea), interleukina, overlap, asma, EPOC.

## **Abstract**

**Introduction:** obstructive sleep apnea is a disorder characterized by recurrent episodes of pharyngeal obstruction during the dream. We consider that this collapse contributes to a state of hypoxia and increased sympathetic activity, generating a state of systemic inflammation, which facilitates the increase in cardiovascular events.

**Objectives:** to determine the level of systemic inflammatory biomarkers in OSA patients, their response to continuous positive airway pressure (CPAP) treatment and their relationship with subclinical atherosclerosis.

**Methods:** in the EPIOSA cohort (Epigenetics modifications and subclinical atherosclerosis in obstructive sleep apnea: The EPIOSA study, Gov trials: NTC01475421), 37 subjects without OSA and 92 patients with OSA were selected. The level of biomarkers in plasma (PCR, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A and TNF-  $\alpha$ ) was determined at the recruitment visit and at one year of follow-up in patients with OSA treated (n=48) and not treated with CPAP (n=44). At each visit, the thickness of the intima-media layer of the carotid arteries and the presence of atheroma plaques were measured in all of them. The same inflammatory biomarkers were studied in patients with other inflammatory respiratory diseases: COPD, COPD with OSA and asthma. Estimates of inter-group and intra-group biomarker differences were evaluated using the Kruskal Wallis test.

**Outcomes:** the mean age of the control patients, with OSA, COPD, COPD / OSA and asthma, was 39 years, 46 years, 70 years, 67 years and 56 years respectively. PCR was elevated in asthma, Overlap and COPD. There was a relationship between OSA and the level of inflammatory biomarkers, especially after one year of follow-up, reaching statistical significance for IL-6, IL-10, IL-17A and TNF-alpha. The IMT of the controls was 0.49 and that of the patients with OSA was 0.65 (p<0.001). At one year of treatment, IMT was reduced in patients treated with CPAP, but not in those untreated. However, the level of the biomarkers did not show significant changes.

Conclusions: statistically significant differences have been found in inflammatory biomarkers compared to the control group, which leads us to conclude the inflammatory pathophysiological basis of obstructive sleep apnea. Treatment with CPAP wasn't shown to influence inflammatory biomarkers. On the other hand, we have found a statistically significant difference in that subjects treated with CPAP significantly reduced the intima media thickness of the carotid artery (known marker of subclinical atherosclerosis), so we theorize that treatment could reduce the cardiovascular events in patients with OSA.

Key words: OSA (obstructive sleep apnea), interleukin, overlap, asthma, COPD.

## **Introducción**

### **Definición del concepto SAOS**

La apnea obstructiva del sueño (AOS), es el trastorno del sueño más frecuente en los adultos y se caracteriza por episodios recurrentes de obstrucción faríngea parcial o completa durante el sueño<sup>1</sup>.

La Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) define el síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) como “un cuadro de somnolencia excesiva, trastornos cognitivo-conductuales, respiratorios, cardíacos, metabólicos o inflamatorios secundarios a episodios repetidos de obstrucción de la vía aérea superior durante el sueño”<sup>2</sup>. Por tanto, el concepto SAOS incluye dos elementos fundamentales: la AOS y las consecuencias clínicas derivadas, principalmente la somnolencia diurna.

Según establece el Documento Nacional de Consenso SAOS, un número de apneas-hipopneas  $\geq 5$  eventos por hora de sueño (IAH  $>5$ ) asociado a síntomas relacionados con la enfermedad y no explicados por otras causas<sup>1</sup>, confirma el diagnóstico de la enfermedad. No obstante, esta definición presenta una serie de limitaciones, tanto por considerar como anormal un IAH  $\geq 5/h$  (ya que probablemente el umbral de normalidad sea diferente dependiendo de la edad o el sexo), como por requerir que el IAH anormal se acompañe de síntomas, teniendo en cuenta que el SAOS tiene una expresión plurifenotípica en la que existen sujetos asintomáticos, pero con un IAH elevado<sup>3,4</sup>. Pacientes con IAH elevados (p.e. IAH  $> 30$ ) muestran un mayor riesgo cardiovascular, independientemente de la presencia o ausencia de síntomas<sup>2</sup>. Así pues, para evitar confusión, en la mayor parte de la literatura se prefiere el término de “Apnea Obstructiva del Sueño” para referirse a sujetos con trastornos respiratorios del sueño en los que es dominante la presencia de eventos obstructivos durante los estudios del sueño.



*Tabla 1. Criterios exigidos por la SEPAR y la AASM para el diagnóstico de SAOS<sup>3,4</sup>.*

<b>Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)</b>	<b>Academia Americana de Medicina del sueño (AASM)</b>
IAH $\geq$ 5/h asociado al menos a uno de los siguientes <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Excesiva somnolencia diurna no explicada por otras causas</li> <li>2. Dos o más de los siguientes:               <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Crisis asfícticas repetidas durante el sueño.</li> <li>b. Despertares recurrentes durante el sueño.</li> <li>c. Percepción del sueño como no reparador.</li> <li>d. Cansancio y/o fatiga durante el día</li> <li>e. Dificultad en la concentración</li> </ol> </li> </ol>	IAH $\geq$ 5/h al menos uno de los siguientes: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Excesiva somnolencia diurna, sueño no reparador.</li> <li>2. Despertares por cese de la respiración, sensación de ahogo o asfixia.</li> <li>3. El compañero de cama u otro observador refiere ronquido habitual, pausas de apnea o ambos.</li> <li>4. El paciente ha sido diagnosticado de hipertensión arterial, trastorno del estado de ánimo, disfunción cognitiva, enfermedad cerebrovascular, etc...</li> </ol>
	IAH $\geq$ 15/h independientemente de la sintomatología

### **Epidemiología del AOS**

La AOS es una entidad clínica muy frecuente. En estudios epidemiológicos llevados a cabo en EE.UU, Europa y Australia en los años 90, la prevalencia de SAOS definido como un IAH  $\geq$  5 asociado a una excesiva somnolencia diurna (Epworth > 10) oscila entre 4-6% en los hombres y el 2-4% en las mujeres de la población general adulta de edades medias<sup>5,6</sup>, aumentando en la población anciana. No obstante, los estudios epidemiológicos realizados en la última década muestran un aumento de dicha prevalencia, observándose que un IAH  $\geq$  5 está presente en el 21-84% de los hombres y en el 9-61% de las mujeres. Si nos atenemos al criterio diagnóstico de SAOS basado exclusivamente en un IAH  $\geq$  15 independientemente de la sintomatología propuesta por la AASM, la prevalencia sería del 11-50% en los hombres y del 6-23% en las mujeres<sup>5-8</sup> (tabla 2).



*Tabla 2. Prevalencia del SAOS en la población general*<sup>5-8</sup>

Autores, año	País	Nº sujetos	Hombres (H) Mujeres (M)	Edad	IAH $\geq 5$	IAH $\geq 15$
Young et al, 1993	EE. UU	602	H: 352 M: 250	30-60	H: 24% M: 9%	H: 9% M: 4%
Durán et al, 2001	España	2148	H: 1050 M: 1098	30-70	H: 26% M: 28%	
Bixler et al, 2001	EE. UU	1741	H: 1000 M: 741	20-100		H: 7% M: 2%
Young et al, 2002	EE. UU	5614	H: 2648 M: 1967	40-98	H: 42% M: 63%	H: 25% M: 11%
Peppard et al, 2013	EE. UU	1520	H: 836 M: 684	30-70	H: 34% M: 14%	H: 13% M: 6%

### **Mecanismos etiopatogénicos de la entidad**

El colapso repetitivo de la vía aérea superior durante el sueño en pacientes con síndrome de apnea obstructiva conduce a despertares recurrentes, hipoxia intermitente y a un aumento de la actividad simpática. Estos mecanismos podrían explicar, hasta cierto punto, el incremento de morbilidad cardiovascular, que numerosos expertos ya han constatado en pacientes con AOS severa<sup>9</sup>. Además, el estrés oxidativo y la inflamación sistémica se encuentra presente en algunos pacientes con esta entidad nosológica. Por lo tanto, se sugiere que podría existir una relación causa-efecto entre un estado de inflamación sistémica en el AOS y el mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Uno de los mecanismos intermedios que relacionarían estas dos entidades sería la elevación en pacientes con AOS de interleukina 6 y la proteína C reactiva, ambos biomarcadores de riesgo cardiovascular<sup>10</sup>.

No obstante, la respuesta inflamatoria sistémica en pacientes con AOS no es homogénea y está en gran parte mediada por la obesidad de muchos pacientes con AOS. En todo caso, esta variabilidad en la coexistencia de inflamación sistémica, podría ser explicada por diferencias en cambios epigenéticos inducidos por episodios de apnea y, en consecuencia, por una alteración en la expresión de genes relacionados con el proceso de aterosclerosis. En relación a la hipoxia, una característica fundamental del síndrome de la AOS, es que puede inducir una hipermetilación de ciertos genes implicados en el desarrollo de aterosclerosis<sup>11</sup>. Uno de estos genes, el Forkhead Box P3 o FOXP3, estimula la diferenciación de linfocitos, en linfocitos T reguladores (Treg) con actividad

antiaterogénica, a través de una modulación de diversas lipoproteínas del metabolismo<sup>12</sup>. El balance entre linfocitos Treg y linfocitos Th17 es determinado por la IL-6, que modula la generación, inducida por TGF-alfa (citoquina inmunosupresora) y la IL-6 (citoquina inflamatoria), puede influir en el resultado del proceso de diferenciación de subconjuntos de células T<sup>13</sup>. En pacientes con AOS el papel FOXP3 es controvertido, por un lado, *Kim et al* encontraron una sobremetilación en genes FOXP3 en niños con síndrome de apnea obstructiva severa<sup>14</sup>, mientras que nuestro grupo en adultos con AOS y sin comorbilidades, no encontró diferencias ni en el nivel de metilación de FOXP3, ni en la expresión del gen ni en el nivel de Treg circulantes, respecto a sujetos sanos.

La consideración de la AOS como una enfermedad inflamatoria de bajo grado sigue en discusión. En un metaanálisis que recogió los estudios publicados hasta 2016 (15), que incluían un total de 1297 pacientes, se reveló que la media de los niveles en suero de PCR fue 1.98 mmol/L más alta en los pacientes con AOS que el grupo control (también había diferencias significativas entre grupos respecto al IMC, y no especifica otras comorbilidades)<sup>15</sup>. La definición de inflamación sistémica se basa en altos niveles en plasma de biomarcadores inflamatorios inespecíficos, como PCR, IL-6 o leucocitos. Sin embargo, hay resultados dispares sobre la relación entre el grado de severidad de la AOS evaluado por el índice apnea-hipopnea (IAH) y los niveles de PCR/IL-6<sup>10,16</sup>. Estos biomarcadores se incrementan junto con el índice de masa corporal, independientemente de la coexistencia de SAOS, lo mismo ocurre con el IAH, como ya vimos además en el metaanálisis anteriormente descrito.

Se han asociado ciclos repetitivos de hipoxia intermitente a un incremento de diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo en pacientes con SAOS. Dado que se ha demostrado sistemáticamente que la CPAP disminuye el IAH asociado a la AOS<sup>17</sup>, existe una justificación fisiopatológica para esperar un efecto beneficioso de la terapia con CPAP en estos biomarcadores de inflamación y de estrés oxidativo.

Hay algunos estudios observacionales y pequeños ensayos clínicos (n<20-30) que han notificado que la CPAP reduce esos biomarcadores inflamatorios<sup>10, 18-20</sup>. Por el contrario, otros ensayos clínicos aleatorizados no han observado ningún efecto beneficioso de la terapia con CPAP en una amplia variedad de biomarcadores, incluyendo IL-6, IL-8, IL-10, PCR y TNF-alfa<sup>21-23</sup>.

### **Concepto de aterosclerosis subclínica**

Se define aterosclerosis subclínica (AS) como la presencia de placas de ateroma o engrosamiento anormal de las arterias sin manifestaciones asociadas. La AS es un marcador precoz de daño cardiovascular y un predictor de eventos cardiovasculares<sup>24-26</sup>. En este estudio, se pretende evaluar el efecto del AOS y de la CPAP sobre la AS y específicamente sobre el espesor de la capa íntima media de las arterias coronarias y la presencia de placas de ateroma en el territorio carotideo evaluado mediante ecografía Doppler.

### **Justificación del estudio**

Existen importantes limitaciones en los estudios anteriormente mencionados. La mayoría de ellos incluyeron sujetos con otras comorbilidades, como tabaquismo, hipertensión, obesidad o diabetes, que también se pueden considerar entidades que asocian un estado de inflamación sistémica de bajo grado. Por otra parte, existe información escasa y contradictoria sobre el papel de la CPAP en la mejoría de los niveles de los biomarcadores, existiendo estudios a favor<sup>27</sup> y en contra, ya que algunos resultados negativos se atribuyen a incluir pacientes con AOS no severa o a la coexistencia de enfermedades cardiovasculares severas<sup>28</sup>. Finalmente, no hay estudios que incluyan un grupo control sano con un tamaño muestral como el de nuestro estudio, o que hayan comparado el nivel de biomarcadores entre enfermedades respiratorias muy prevalentes, como son el asma y la EPOC.

### **Hipótesis**

Hipotetizamos que los pacientes con AOS severo sin comorbilidades asociadas presentan inflamación sistémica y el nivel de este estado inflamatorio se reducirá en los pacientes tratados con CPAP.

## **Objetivos**

- Objetivo principal: determinar el grado de inflamación sistémico medido por biomarcadores inflamatorios en pacientes con AOS, EPOC, Overlap EPOC/AOS y asma.
  
- Objetivos secundarios:
  - Determinar cambios en el nivel de biomarcadores inflamatorios en pacientes con AOS, tratados y no tratados con CPAP, tras un año de seguimiento.
  
  - Comparar las mencionadas alteraciones inflamatorias con las padecidas en pacientes con otras enfermedades respiratorias, cuya etiología inflamatoria es bien conocida, como son el asma, EPOC y el síndrome overlap.
  
  - Comparar el nivel de biomarcadores inflamatorios en pacientes con AOS con AS versus sin AS.
  
  - Comparar todos ellos con un grupo control sano.

## **Material y métodos**

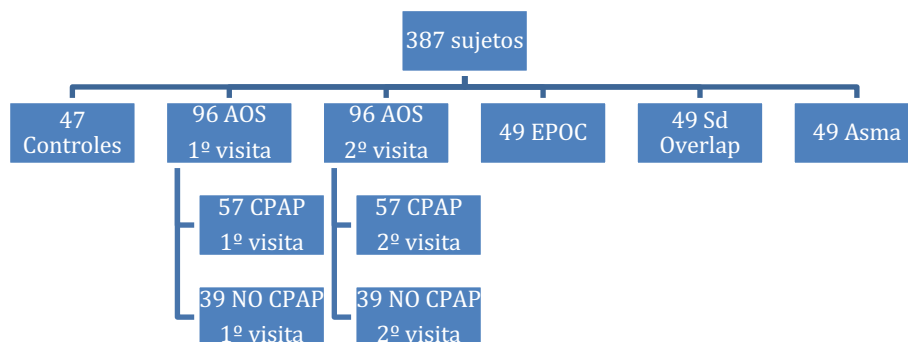
### **Criterios de inclusión-exclusión y adecuación del tamaño muestral**

Se usaron los datos de la cohorte del estudio EPIOSA<sup>29</sup> y de nuestra cohorte hospitalaria de pacientes con EPOC, Asma y síndrome overlap, con los siguientes criterios:

- **Criterios de inclusión:**
  - Sujetos sanos: constituyentes de un grupo control.
  - Sujetos con AOS: seleccionados según los criterios diagnósticos de la Sociedad Española de Neumología.
  - Sujetos con Asma: diagnóstico médico exclusivo de asma.
  - Sujetos con EPOC:
    - Tabaquismo > 10 cigarrillos al día.
    - Índice FEV1/FVC en espirometría postbroncodilatadora < 0.7.
  - Sujetos OVERLAP: criterios AOS + criterios EPOC.
- **Criterios de exclusión:**
  - Sujetos con obesidad tipo II (IMC > 35 kg/m<sup>2</sup>).
  - Presión arterial superior a 140 mmHg de sistólica y 90 mmHg de diastólica.
  - Dislipemia: excluidos aquellos pacientes en tratamiento con estatinas u otros fármacos hipolipemiantes.
  - Diabetes Mellitus: glucemia > 125 en tres mediciones o una sola medición superior a 140 o paciente en tratamiento con antidiabéticos orales o con insulina.
  - Grupo de sujetos con EPOC: exclusión de aquellos pacientes con IAH ≥ 5 (todos los sujetos tienen realizada polisomnografía).
  - Grupo AOS: exclusión de aquellos fumadores ≥ 10 cigarrillos al día y que tuvieran espirometría patológica.

Los sujetos del grupo control (n=47) fueron seleccionados de forma consecutiva a partir de la cohorte EPIOSA. Además de los criterios de inclusión / exclusión, estos individuos debían mostrar una espirometría normal y un nivel de IAH < 5 eventos/hora. El grupo con OSA lo conformaron pacientes con OSA definida por un IAH > 5, con espirometría normal e incluyó una muestra de 96 sujetos (57 tratados con CPAP y 39 no tratados con CPAP). Los pacientes con EPOC (n = 49) y con síndrome Overlap EPOC/AOS (n=49) fueron seleccionados de la cohorte TRS-CHAIN entre los que mostraban una poligrafía con un IAH < 5/h. La cohorte TRS-CHAIN es un estudio multicéntrico actualmente en marcha en España, que pretende conocer la prevalencia de la AOS entre los pacientes con EPOC. Adicionalmente, se evaluarán los biomarcadores en 49 pacientes con asma bronquial procedentes de nuestras consultas. Tras un año de seguimiento los pacientes con AOS tratados (n=57) y no tratados con CPAP (n=39) son reevaluados (2º visita) para conocer su estado clínico y repetir todas las determinaciones analíticas (Figura 1)

*Figura 1. Diagrama de flujo*



### **Determinaciones analíticas y obtención de datos**

Los datos demográficos (edad, sexo) y clínicos (talla, peso, tensión arterial, espirometría y analítica general) de cada sujeto se han obtenido de las respectivas bases de datos de las cohortes de donde proceden los sujetos tal y como se describe más arriba. Con estos datos importados de forma codificada para mantener siempre el anonimato de los sujetos, se conformó una base de datos para el propósito de este trabajo final de master y que a su vez se exportó a los programas estadísticos utilizados para su análisis. Todas

las cohortes de pacientes han sido aceptadas por el Comité Ético de la Investigación Clínica de Aragón (CEICA).

La determinación de las citoquinas evaluadas en este estudio se ha realizado por el autor de este estudio en colaboración con la Unidad de Análisis de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédico de Aragón (CIBA)

Los ensayos MULTIPLEX de Luminex están impulsados por la tecnología xMAP, diseñada para detectar y cuantificar simultáneamente múltiples proteínas secretadas (Pej citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento) o genes expresados. Esta técnica de alto rendimiento produce resultados comparables a los ensayos convencionales como ELISA y qPCR con mayor eficiencia y rendimiento. La tecnología Luminex XMAP (Multi-Analyte Profiling) permite medir múltiples proteínas en un solo pozo. Esta tecnología combina fluídica avanzada, óptica y procesamiento de señales digitales con tecnología de microesferas para brindar capacidades de ensayo multiplexado.

Luminex utiliza técnicas patentadas para codificar por colores una serie de microesferas con dos tintes fluorescentes. A través de concentraciones precisas de estos tintes, se pueden crear conjuntos de perlas de colores distintos, cada una de las cuales está recubierta con un anticuerpo de captura específico. Después de que la perla captura un analito de una muestra de prueba, se introduce un anticuerpo de detección biotinilado. A continuación, la mezcla de reacción se incuba con el conjugado de estreptavidina para completar la reacción en la superficie de cada microesfera. EMD Millipore proporciona tres instrumentos Luminex para adquirir y analizar datos utilizando dos métodos de detección. El utilizado para el estudio aportado utiliza instrumentos basados en citometría de flujo que integran componentes clave de detección XMAP, como óptica láser, fluídica avanzada y procesadores de señales digitales de alta velocidad. Se identifica cada microesfera individual y el resultado de su bioensayo se cuantifica en función de las señales informadoras fluorescentes.

En el presente trabajo se ha utilizado para el análisis el MILLIPLEX MAP KIT™ (Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay nº de cat. HSTCMAG-28SK) y se dejó calentar a temperatura ambiente. Las muestras de sobrenadante se descongelaron y clarificaron mediante centrifugación a 10.000 g durante



10 minutos. Las muestras se almacenaron en hielo hasta que se cargaron en una placa (~1 hora). Se diluyó el tampón de lavado en agua desionizada para preparar una solución, se reconstituyó 1 vial de mezcla estándar liofilizada para generar las muestras. El vial estándar se agitó en vórtex brevemente, se centrifugó suavemente durante 10s y se almacenó en hielo durante 10 min. La mezcla de perlas se agitó con vórtex durante 30s y se añadieron 50 microlitros a cada pocillo de ensayo. Se dejaron sedimentar las perlas durante 2 minutos y luego se decantó el líquido con una pipeta manual. Se agregaron 150 microlitros de tampón de lavado a cada pocillo con perlas y se dejó incubar durante 15-30 segundos adicionales. El líquido se decantó y la placa se secó suavemente sobre papel absorbente para eliminar el exceso de tampón de lavado.

Después de las etapas de lavado, se añadieron a cada pocillo 25 microlitros de anticuerpo de detección. La placa se selló, se cubrió y se agitó durante 30 minutos. Posteriormente se introduce el kit en la máquina Luminex de análisis y se procesan las muestras. Se analizaron las muestras con una medición, no por duplicado.

### **Estudio de imagen de arteriosclerosis subclínica**

En el estudio EPIOSA, el espesor de la capa íntima-media carotídea al inicio del estudio y cada año, será evaluado en todos los sujetos con un sistema de ultrasonido (IU22 Philips)<sup>29</sup>. Las imágenes de ultrasonido se adquieren mediante sondas bidimensionales lineales de alta frecuencia siguiendo el protocolo del estudio de bioimagen. La placa carotídea se define como una estructura focal que sobresale en la luz de la arteria carótida al menos 0,5 mm o  $\geq 50\%$  más gruesa que la circundante. Los territorios arteriales explorados son: arteria carótida común derecha e izquierda, bulbo carotídeo arterial derecho e izquierdo, arterias carótidas externas derechas e izquierdas. El promedio de las 6 lecturas se tomará como valor de IMT de cada sujeto, considerando como patológico un valor  $> 0.8$  mm. Definimos por tanto el concepto de aterosclerosis subclínica como aquel paciente que presenta un engrosamiento de la íntima media carotídea o al menos 1 placa de ateroma en el territorio carotídeo descrito.

### **Análisis estadístico**

Las variables categóricas se presentarán como número y porcentaje y se compararán entre grupos mediante la prueba de Fisher. Las variables cuantitativas serán evaluadas en su distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de

las citoquinas y dada su distribución no-homogénea, se realizará una transformación al logaritmo normal de cada valor antes de su comparación entre grupos. Las comparaciones grupales de las variables cuantitativas ( $n > 2$ ) se realizarán utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, seguida de una prueba U de Mann-Whitney según proceda.

Las comparaciones por pares se realizarán mediante una prueba no paramétrica de Mann-Whitney a menos que se indique lo contrario. Los modelos de regresión lineal serán usados para evaluar el efecto de las potenciales variables explicativas (p.ej IAH) sobre el valor de cada citoquina.

La presencia de aterosclerosis subclínica (AS) se definirá para aquellos sujetos cuya IMT sea superior al tercer cuartil de la distribución de IMT entre los sujetos del grupo control. Para determinar las variables predictoras de coexistencia de AS, se utilizará un modelo regresión logística múltiple en el que se incluirán las variables que de forma individual (regresión simple) muestre un valor de  $p < 0.10$  y en todo caso se forzará la entrada en el modelo de la edad, sexo, IMC e índice de apnea-hipopnea.

La significación estadística de las diferentes estimaciones se establecerá en una  $p < 0.05$ . Los paquetes estadísticos utilizados han sido el STATA v.16, el Graph-Pad, v7 y Prism v8.

## **Resultados y discusión**

### **Características de la población estudiada**

En la tabla 3 se reflejan las principales características de los grupos estudiados en el momento de reclutamiento o baseline. Por diseño de este TFM, la distribución de edad, sexo e IMC no es comparable entre los grupos estudiados.

Respecto al grupo control, los pacientes con AOS incluyen más proporción de hombres (78%), con una edad mayor ( $46 \pm 10$  años) y un mayor IMC ( $29 \pm 4$  kg/m<sup>2</sup>). Por su parte, y respecto a los controles, los pacientes con EPOC o EPOC/AOS también incluyen más hombres, son más mayores y con un IMC más elevado. Finalmente, los pacientes con asma incluyen menos hombres (40%) y también son algo más mayores que los controles.

Dado que, según la literatura, estas variables no determinan el nivel de biomarcadores plasmáticos estudiados aquí, no pensamos que estas diferencias demográficas expliquen sus potenciales diferencias entre grupos. En la misma tabla 3, se aprecia un ligero aumento de la TAD entre los pacientes con AOS.

Por definición los pacientes con EPOC y EPOC/AOS mostraron una relación FEV1/FVC < 0.7, mientras que en los sujetos controles o con AOS esta relación fue normal, es decir, > 0.7 en todos ellos.

El IAH medio de los pacientes con AOS o con EPOC/AOS es de  $37.3 \pm 19.9$  y  $32.4 \pm 22.4$  respectivamente, indicando que la media de estos pacientes padecía un grado severo de apnea del sueño.

<b>Tabla 3.</b> Características clínicas y valor de los biomarcadores agrupados por grupos.						
<b>Variable</b>	<b>Controles</b> (n = 47)	<b>AOS</b> (n = 89)	<b>EPOC</b> (n = 47)	<b>EPOC/AOS</b> (n = 48)	<b>Asma</b> (n = 47)	<b>P valor</b>
Hombres, n (%)	24 (51)	70 (78)	25 (53)	33 (68)	19 (40)	<0.001
Edad, años	39 ± 11	46 ± 10*	70 ± 7**	67 ± 7**	56 ± 11*	<0.001
IMC, kg/m <sup>2</sup>	27 ± 4	29 ± 4*	29 ± 4	31 ± 6**	28 ± 5	0.001
Escala de Epworth	7.4 ± 4.2	9 ± 5	-	-	-	0.165
TAS, mmHg	120 ± 15	127 ± 9.9	129 ± 17	128 ± 17	127 ± 9	0.060
TAD, mmHg	75 ± 11	81 ± 8.1*	73 ± 10	72 ± 11	72 ± 15	0.001
Colesterol total, mg/dl	202 ± 40	210 ± 36	204 ± 43	204 ± 42	217 ± 50	0.339
FEV1/FVC	0.81 ± 0.06	0.82 ± 0.05	0.58 ± 0.12**	0.51 ± 0.13**	-	<0.001
IAH, eventos/h	3.5 ± 1.8	37.3 ± 19.9**	-	32.4 ± 22.4**	-	<0.001
Leucocitos, cel/mL	5.79 ± 1.69	6.69 ± 1.94	7.39 ± 2.21**	8.01 ± 2.24**	7.47 ± 2.39*	<0.001
PCR, mg/dL	0.18 ± 0.17	0.24 ± 0.27	0.69 ± 1.51	0.95 ± 1.40**	0.41 ± 0.44	<0.001
logIL-6, pg/ml	0.35 ± 1.53	0.67 ± 1.39	0.37 ± 2.18	0.39 ± 1.27	0.68 ± 1.27	0.255
LogIL-8, pg/ml	0.33 ± 1.04	0.47 ± 1.59*	1.00 ± 1.10**	0.85 ± 1.09**	0.36 ± 1.44	<0.001
LogIL-10, pg/ml	2.08 ± 0.62	2.16 ± 0.60	2.41 ± 0.58	2.19 ± 0.71	2.87 ± 0.54**	<0.001
LogIL-17A, pg/ml	2.90 ± 0.36	2.90 ± 0.41	2.89 ± 0.37	2.61 ± 0.46	3.22 ± 0.36**	<0.001
LogTNF- $\alpha$ , pg/ml	1.56 ± 0.31	1.62 ± 0.29	2.15 ± 0.35**	2.14 ± 0.33**	2.10 ± 0.28**	<0.001
<b>Abreviaciones:</b> EPOC = Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; AOS = apnea obstructiva del sueño definido por índice de apnea-hipopnea $\geq 5$ events·h <sup>-1</sup> .; IMC = índice de masa corporal; IAH = índice de apnea-hipopnea; TAS = tensión arterial sistólica; TAD = tensión arterial diastólica; FEV1/FVC = volumen espirado forzado en el primer segundo / capacidad vital forzada; IL = interleucina; PCR = proteína C-reactiva. Los datos de la PCR y de las IL, se presentan como mediana e intercuartil al 25% – 75%, el resto de variables se presentan como media (DE), o número (%). El P valor de las diferencias entre grupos ha sido obtenido mediante la prueba de Kruskal-Wallis (variables cuantitativas) o prueba de Fisher (variables categóricas). Las comparaciones de los grupos con el grupo control se han realizado mediante la prueba de Mann-Whitney o de Fisher, con las siguientes significaciones: * p<0.05, ** p< 0.01.						

Posteriormente se estudiará la misma población AOS tras un año de seguimiento, donde un subgrupo recibirá tratamiento con CPAP, mientras que el otro no. Debido a ello, se especifica la siguiente tabla, en la que se subdivide en el momento basal al grupo AOS que recibirá durante el siguiente año el tratamiento con CPAP y al que no lo recibirá.

Variable	Edad	Hombres, n (%)	IMC	IAH	FEV1/FVC PBD	TAS	TAD
OSA CPAP V1	M: 47,58** DE: 9,27	M:42 (72)	M: 30,91** DE: 3,15	M: 47,13** DE: 19,09	M: 83,41 DE: 5,59	M: 130,3* DE: 9,81	M: 83,49** DE: 9,5
OSA NO CPAP V2	M: 45,31* DE:10,86	M:26 (68)	M: 27,45 DE: 3,82	M: 22,48* DE: 11,32	M: 81,53 DE: 4,58	M: 123,2 DE: 8,75	M: 78,56 DE: 8,06

M: media, DE: Desviación Estandar.

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, respecto a los controles.

Cabe destacar la diferencia de gravedad de la enfermedad obstructiva del sueño (IAH) entre ambos grupos. Es por ello que unos sujetos recibieron tratamiento con CPAP

(más graves) y otros sujetos no (no lo precisaban o lo rechazaron).

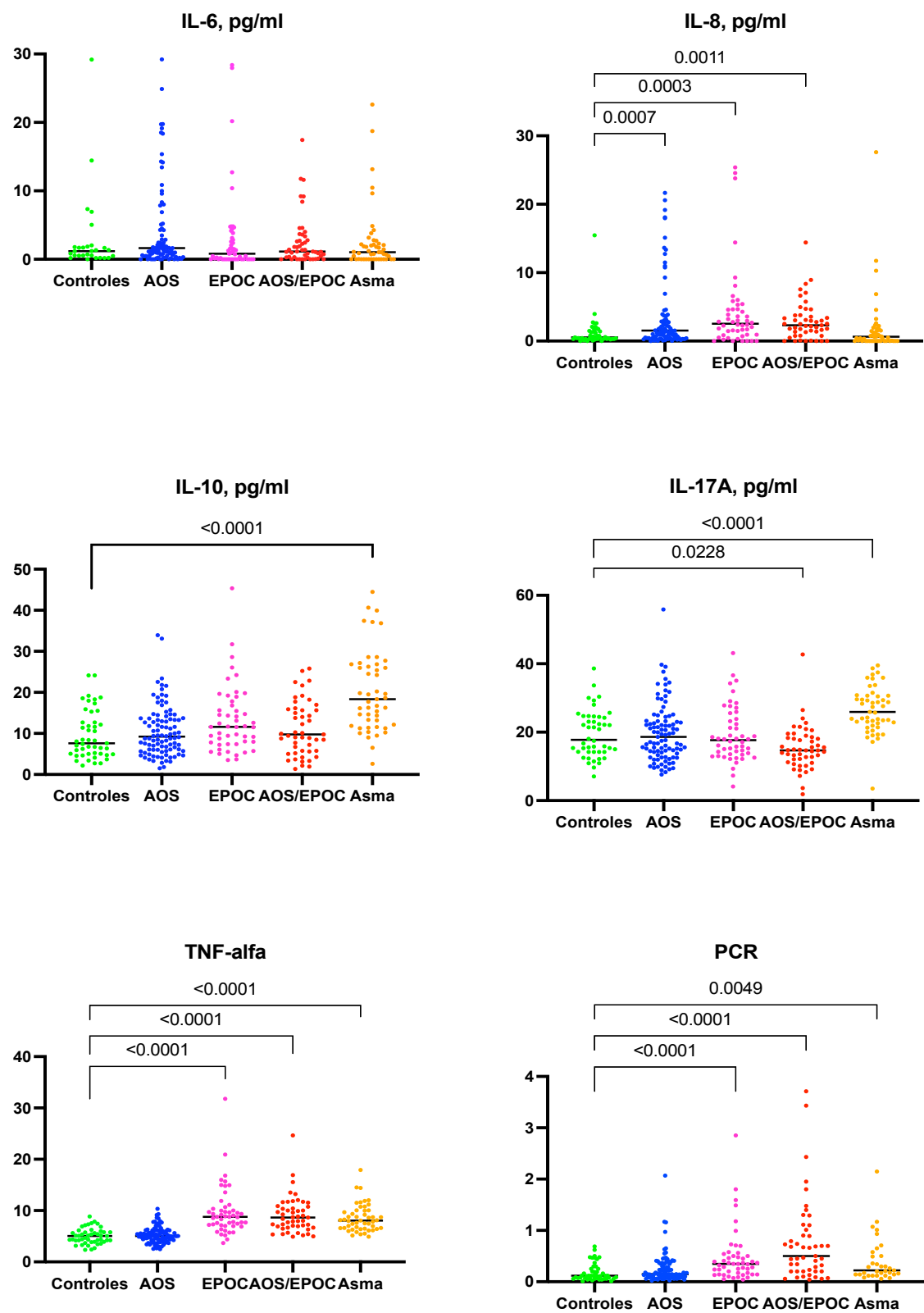
### **Distribución de los biomarcadores por grupos en el momento del reclutamiento**

Dado que los biomarcadores estudiados mostraron una distribución no-normal (figura 2), una vez transformado cada valor en su logaritmo natural, se reflejan en la tabla 3 los valores medios y su DE en cada grupo de sujetos estudiados.

Los leucocitos en sangre periférica, que son un biomarcador inespecífico de inflamación sistémica, se encuentran más elevados en pacientes con EPOC, EPOC/AOS y asma.

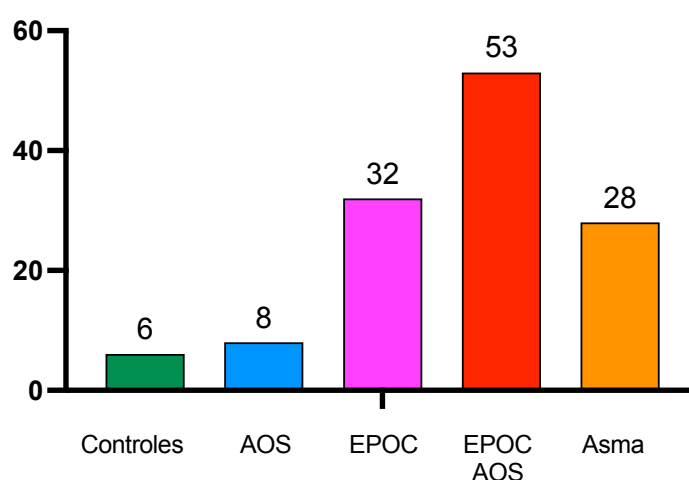
La PCR, un biomarcador no específico de inflamación sistémica, está más elevado en pacientes con EPOC, EPOC/AOS y asma, respecto a los sujetos controles y a los pacientes con EPOC. Cuando se categoriza esta variable en función del nivel de 0.5 mg/dl considerando como PCR “alta”, hemos encontrado que solo un 6% de los controles y un 8% de los pacientes con AOS muestran PCR elevada (Figura 3). Sin embargo, un 28% de los asmáticos, un 32% de pacientes con EPOC y un 53% de pacientes con EPOC/AOS muestran PCR altas, indicando que un porcentaje significativo de pacientes con EPOC/AOS muestran PCR elevadas, indicando que un porcentaje significativo de pacientes con estas enfermedades respiratorias obstructivas presentan un estado inflamatorio de baja intensidad no justificada por otros padecimientos inflamatorios.

**Figura 2.** Distribución de biomarcadores por grupos



En los pacientes con AOS, solo la IL-8 mostró un valor ligeramente más alto respecto a los sujetos control ( $p < 0.01$ ), mientras que el resto de citoquinas (IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ ) mostraron niveles similares al grupo control. En los pacientes con EPOC y EPOC/AOS, los biomarcadores pro-inflamatorios como la PCR, IL-8 y TNF- $\alpha$  mostraron niveles significativamente más altos que los controles. Por su parte, el grupo de pacientes con asma también mostro un incremento de citoquinas pro-inflamatorias como IL-17A y anti-inflamatorias como IL-10 (Tabla 3, Figura 2).

**Figura 3.** Porcentaje de sujetos con PCR alta ( $> 0.5$  mg/dl)



### Distribución de los biomarcadores por grupos al año de seguimiento

Respecto a la IL-6 objetivamos la elevación de sus parámetros respecto al grupo control, manteniéndose la significancia estadística en el grupo más grave, el cual fue el tratado con CPAP, sin objetivar un claro efecto del tratamiento sobre dicho biomarcador.

#### *Test de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis para Il-6*

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
CONTROL vs. OVERLAP	-55,08	No	ns	0,0946
CONTROL vs. EPOC	-37,07	No	ns	0,6750
CONTROL vs. CPAP 1°V	-83,17	Yes	***	0,0009
CONTROL vs. NO CPAP 1°V	-75,58	Yes	*	0,0106
CONTROL vs. CPAP2°V	-70,95	Yes	**	0,0072
CONTROL vs. NO CPAP 2°V	-60,59	No	ns	0,0769
CONTROL vs. ASMA	-43,48	No	ns	0,3584



En relación a la Il-8 objetivamos una elevación de los marcadores al momento del reclutamiento estadísticamente significativo, que tras el año de seguimiento desapareció en ambos grupos, destacando que el grupo tratado con CPAP mejoró respecto al que no recibió el tratamiento.

*Test de comparaciones de Kruskal-Wallis para Il-8*

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
CONTROL vs. OVERLAP	-72,34	Yes	*	0,0105
CONTROL vs. EPOC	-79,83	Yes	**	0,0030
CONTROL vs. CPAP 1°V	-60,57	Yes	*	0,0411
CONTROL vs. NO CPAP 1°V	-79,96	Yes	**	0,0066
CONTROL vs. CPAP2°V	-7,410	No	ns	>0,9999
CONTROL vs. NO CPAP 2°V	-43,08	No	ns	0,5229
CONTROL vs. ASMA	7,492	No	ns	>0,9999

Respecto a la Il-10, nuestros datos sugieren un empeoramiento de sus parámetros tras el año de seguimiento, por lo que no constatamos un claro efecto del tratamiento con CPAP.

*Test de comparaciones de Kruskal-Wallis para Il-10*

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
CONTROL vs. OVERLAP	-30,54	No	ns	>0,9999
CONTROL vs. EPOC	-54,50	No	ns	0,1172
CONTROL vs. CPAP 1°V	-31,61	No	ns	>0,9999
CONTROL vs. NO CPAP 1°V	6,147	No	ns	>0,9999
CONTROL vs. CPAP2°V	-77,56	Yes	**	0,0029
CONTROL vs. NO CPAP 2°V	-84,98	Yes	**	0,0031
CONTROL vs. ASMA	-138,0	Yes	****	<0,0001

En relación a la Il-17A nuestros datos sugieren un empeoramiento de sus parámetros tras el año de seguimiento, por lo que no constatamos un claro efecto del tratamiento con CPAP.

*Test de comparaciones de Kruskal-Wallis para Il-17A*

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
CONTROL vs. OVERLAP	58,34	No	ns	0,0732
CONTROL vs. EPOC	5,766	No	ns	>0,9999
CONTROL vs. CPAP 1ºV	-5,731	No	ns	>0,9999
CONTROL vs. NO CPAP 1ºV	10,42	No	ns	>0,9999
CONTROL vs. CPAP2ºV	-85,90	Yes	***	0,0007
CONTROL vs. NO CPAP 2ºV	-102,1	Yes	***	0,0002
CONTROL vs. ASMA	-97,51	Yes	***	0,0001

En relación al TNF-alfa nuestros datos sugieren un empeoramiento de sus parámetros tras el año de seguimiento, por lo que no constatamos un claro efecto del tratamiento con CPAP.

*Test de comparaciones de Kruskal-Wallis para TNF-alfa*

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
CONTROL vs. OVERLAP	-167,6	Yes	****	<0,0001
CONTROL vs. EPOC	-172,0	Yes	****	<0,0001
CONTROL vs. CPAP 1ºV	-15,41	No	ns	>0,9999
CONTROL vs. NO CPAP 1ºV	-6,517	No	ns	>0,9999
CONTROL vs. CPAP2ºV	-94,75	Yes	***	0,0001
CONTROL vs. NO CPAP 2ºV	-97,11	Yes	***	0,0004
CONTROL vs. ASMA	-158,6	Yes	****	<0,0001

**Determinantes del nivel de los biomarcadores**

En la tabla 4 se reflejan los valores de correlación de Pearson, con su valor de P correspondiente, de las diferentes citoquinas entre sí y con la edad y el IAH para el conjunto de todos los sujetos estudiados. Se evidencia como IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  y PCR, tienden a aumentar con la edad, mientras que la PCR tiende también a aumentar con el nivel de IAH. Algunas interleukinas tienen relación entre si como IL-6 con IL-8 e IL-10. Cuando se evaluó el comportamiento de los biomarcadores solo entre los grupos sin

EPOC y sin asma, es decir, entre los sujetos controles y con AOS, nuevamente se evidencia que el grado de severidad del AOS medido por el índice IAH, no guarda relación con ninguno de los biomarcadores evaluados, tal como se refleja en la tabla 5.

**Tabla 4.** Correlación por pares de Pearson de las interlequinas, edad e IAH en el conjunto de sujetos

	AgeV1	AHIV1	LIL6	LIL8	LIL10	LIL17A	LTNFalfa
AgeV1	<b>1.0000</b>						
AHIV1	<b>0.2273</b> <b>0.0033</b>	<b>1.0000</b>					
LIL6	<b>0.0190</b> <b>0.7843</b>	<b>0.1219</b> <b>0.1672</b>	<b>1.0000</b>				
LIL8	<b>0.2587</b> <b>0.0000</b>	<b>0.1181</b> <b>0.1393</b>	<b>0.3414</b> <b>0.0000</b>	<b>1.0000</b>			
LIL10	<b>0.1194</b> <b>0.0463</b>	<b>0.0743</b> <b>0.3388</b>	<b>0.1792</b> <b>0.0069</b>	<b>0.2123</b> <b>0.0006</b>	<b>1.0000</b>		
LIL17A	<b>-0.1131</b> <b>0.0596</b>	<b>-0.0550</b> <b>0.4802</b>	<b>0.0970</b> <b>0.1471</b>	<b>0.0537</b> <b>0.3901</b>	<b>0.5005</b> <b>0.0000</b>	<b>1.0000</b>	
LTNFalfa	<b>0.5406</b> <b>0.0000</b>	<b>0.1424</b> <b>0.0657</b>	<b>0.0833</b> <b>0.2123</b>	<b>0.2641</b> <b>0.0000</b>	<b>0.3198</b> <b>0.0000</b>	<b>0.1250</b> <b>0.0315</b>	<b>1.0000</b>
LPCR	<b>0.3763</b> <b>0.0000</b>	<b>0.2070</b> <b>0.0078</b>	<b>0.1184</b> <b>0.0847</b>	<b>0.1983</b> <b>0.0017</b>	<b>0.1956</b> <b>0.0010</b>	<b>0.0262</b> <b>0.6626</b>	<b>0.3420</b> <b>0.0000</b>

**Tabla 5.** Correlación por pares de Pearson de las interlequinas con IAH en los grupos control y AOS

	AHIV1	LIL6	LIL8	LIL10	LIL17A	LTNFalfa	LPCR
AHIV1	<b>1.0000</b>						
LIL6	<b>0.1204</b> <b>0.2168</b>	<b>1.0000</b>					
LIL8	<b>0.0969</b> <b>0.2690</b>	<b>0.4253</b> <b>0.0000</b>	<b>1.0000</b>				
LIL10	<b>0.0506</b> <b>0.5585</b>	<b>0.1686</b> <b>0.0826</b>	<b>0.2729</b> <b>0.0015</b>	<b>1.0000</b>			
LIL17A	<b>-0.0411</b> <b>0.6361</b>	<b>0.0062</b> <b>0.9498</b>	<b>0.2404</b> <b>0.0057</b>	<b>0.4573</b> <b>0.0000</b>	<b>1.0000</b>		
LTNFalfa	<b>0.0911</b> <b>0.2914</b>	<b>0.0016</b> <b>0.9869</b>	<b>0.0702</b> <b>0.4236</b>	<b>0.2241</b> <b>0.0087</b>	<b>0.2966</b> <b>0.0005</b>	<b>1.0000</b>	
LPCR	<b>0.1397</b> <b>0.1049</b>	<b>0.1106</b> <b>0.2566</b>	<b>0.0740</b> <b>0.3988</b>	<b>0.0969</b> <b>0.2619</b>	<b>0.0484</b> <b>0.5773</b>	<b>-0.0428</b> <b>0.6211</b>	<b>1.0000</b>

## Variables indicativas de aterosclerosis subclínica en AOS

*Tabla 6. Estadística descriptiva IMT (intima media thickness)*

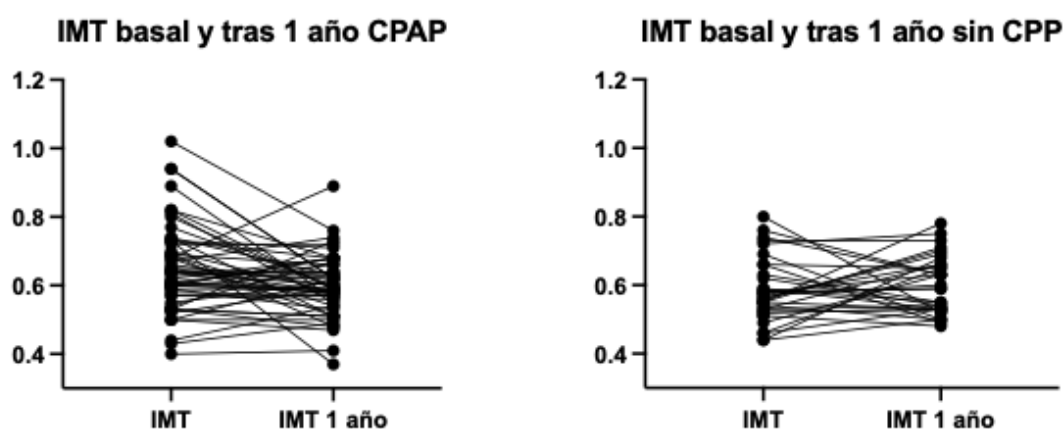
	CONTROL	AOS CPAP 1ºV	AOS NO CPAP 1ºV	AOS CPAP 2ºV	AOS NO CPAP 2ºV
Number of values	48	59	35	57	34
Minimum	0,3300	0,4000	0,4400	0,3700	0,4800
25% Percentile	0,4400	0,5700	0,5200	0,5450	0,5300
Median	0,5000	0,6400	0,5600	0,5900	0,5900
75% Percentile	0,5575	0,7200	0,6300	0,6500	0,6600
Maximum	0,6600	1,020	0,8000	0,8900	0,7800
Range	0,3300	0,6200	0,3600	0,5200	0,3000
Mean	0,4988	0,6486	0,5811	0,5981	0,5971
Std. Deviation	0,08240	0,1243	0,09106	0,08825	0,08350
Std. Error of Mean	0,01189	0,01618	0,01539	0,01169	0,01432
Lower 95% CI of mean	0,4748	0,6162	0,5499	0,5747	0,5679
Upper 95% CI of mean	0,5227	0,6810	0,6124	0,6215	0,6262
Coefficient of variation	16,52%	19,16%	15,67%	14,76%	13,99%

Nuestros resultados apuntan a que los pacientes con AOS presentan un mayor engrosamiento de la capa íntima media respecto a los pacientes sin AOS, además de un efecto beneficioso en el tratamiento con CPAP (media de 0.65 mm en la primera visita, respecto a la media de 0.60 mm en la segunda visita), alcanzando la significancia estadística con  $p=0.437$ , tras un año de seguimiento. Resultados expresados en tablas 6 y 7.

*Tabla 7. Test de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis para el IMT*

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
CONTROL vs. CPAP 1ºV	-90,53	Yes	****	<0,0001
CONTROL vs. NO CPAP 1ºV	-50,82	Yes	**	0,0069
CONTROL vs. CPAP2ºV	-66,02	Yes	****	<0,0001
CONTROL vs. NO CPAP 2ºV	-63,59	Yes	***	0,0003
CPAP 1ºV vs. NO CPAP 1ºV	39,71	No	ns	0,0572
CPAP 1ºV vs. CPAP 2ºV	24,51	Yes	*	0,4372
CPAP 1ºV vs. NO CPAP 2ºV	26,94	No	ns	0,6327
NO CPAP 1ºV vs. CPAP2ºV	-15,21	No	ns	>0,9999
NO CPAP 1ºV vs. NO CPAP 2ºV	-12,77	No	ns	>0,9999
CPAP2ºV vs. NO CPAP 2ºV	2,432	No	ns	>0,9999

*Figura 4. Evolución IMT tras un año de seguimiento con / sin CPAP.*



La tabla 8 muestra, desde otro punto de vista, cómo los pacientes AOS presentan aterosclerosis subclínica frente a los controles, hallando diferencias significativas tanto en el grosor de la capa íntima media carotídea, como en el número de pacientes con placas de ateroma ajustado respecto al número total de componentes del grupo.

<b>Tabla 8.</b> Variables indicativas de aterosclerosis subclínica en pacientes con AOS			
<b>Variable</b>	<b>Controles</b> (n = 47)	<b>AOS</b> (n = 95)	<b>P valor</b>
Capa íntima-media carotídea, en mm (media ± DE)	0.496 ± 0.011	0.627 ± 0.012	0.0001
Pacientes con al menos 1 placa de ateroma, N (%)	3 (6.4)	22 (23)	0.014
<i>Abreviaciones:</i> AOS = apnea obstructiva del sueño definido por índice de apnea-hipopnea $\geq 5$ events·h <sup>-1</sup> .; Las comparaciones de los grupos con el grupo control se han realizado mediante la prueba U de Mann-Whitney o de Fisher según el carácter cuantitativo o categórico de la variable			

La tabla 9 expresa por qué atribuimos la mencionada aterosclerosis subclínica a la enfermedad obstructiva del sueño, debido a que ninguno de los factores por sí solo muestra una asociación significativa.

**Tabla 9.** Características clínicas y valor de los biomarcadores según la coexistencia de aterosclerosis subclínica (AS) definida por la presencia de al menos una placa de ateroma en los pacientes con AOS

Variable	Sin AS (n = 73)	AS (n = 22)	P valor
Hombres, n (%)	55 (75)	20 (90)	0.116
Edad, años	46 ± 10	46 ± 11	0.788
IMC, kg/m <sup>2</sup>	29 ± 4	28 ± 4	0.348
Escala de Epworth	9.4 ± 4.6	7.9 ± 5	0.178
TAS, mmHg	127 ± 10	126 ± 10	0.601
TAD, mmHg	81 ± 10	80 ± 8	0.784
Colesterol total, mg/dl	213 ± 36	201 ± 37	0.185
IAH, eventos/h	37 ± 20	37 ± 19	0.732
Leucocitos, cel/mL	6.67 ± 1.71	6.80 ± 2.65	0.785
PCR, mg/dL	0.27 ± 0.31	0.18 ± 0.11	0.232
logIL-6, pg/ml	0.82 ± 1.55	0.77 ± 1.45	0.904
LogIL-8, pg/ml	0.56 ± 1.14	0.57 ± 1.19	0.876
LogIL-10, pg/ml	2.21 ± 0.63	2.08 ± 0.48	0.387
LogIL-17A, pg/ml	2.92 ± 0.43	2.81 ± 0.32	0.286
LogTNF- $\alpha$ , pg/ml	1.63 ± 0.28	1.60 ± 0.31	0.723

**Abreviaciones:** EPOC = Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; AOS = apnea obstructiva del sueño definido por índice de apnea-hipopnea  $\geq 5$  events·h<sup>-1</sup>; IMC = índice de masa corporal; IAH = índice de apnea-hipopnea; TAS = tensión arterial sistólica; TAD = tensión arterial diastólica; FEV1/FVC = volumen espirado forzado en el primer segundo / capacidad vital forzada; IL = interleucina; PCR = proteína C-reactiva. Los datos de variables se presentan como media (DE), o número (%). El P valor de las diferencias entre grupos ha sido obtenido mediante la prueba de Mann-Witney (variables cuantitativas) o prueba de Fisher (variables categóricas).

Profundizando en el análisis estadístico realizamos un análisis de regresión multivariable (tabla 10) para tratar de vislumbrar la correlación entre el IMT, por tanto, la aterosclerosis subclínica, con determinadas variables. La variable que ha demostrado mayor correlación con la aterosclerosis subclínica es el IAH con un valor t de 5.33 y una  $p < 0,0001$ , sorprendentemente por encima de la edad.

*Tabla 10. Regresión multivariable para IMT*

. reg IMT AHIV1 AgeV1 TASV1 TADV1 IMCV1 Gender

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	131
Model	.623647843	6	.103941307	F(6, 124)	=	9.24
Residual	1.39455979	124	.01124645	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.3090
				Adj R-squared	=	0.2756
Total	2.01820763	130	.015524674	Root MSE	=	.10605

IMT	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
AHIV1	.0024965	.0004687	5.33	0.000	.0015688	.0034243
AgeV1	.001097	.0009321	1.18	0.241	-.0007479	.002942
TASV1	.0010505	.000944	1.11	0.268	-.000818	.002919
TADV1	.0003577	.0011506	0.31	0.756	-.0019196	.0026351
IMCV1	-.0000458	.002526	-0.02	0.986	-.0050455	.004954
Gender	-.0015787	.0213641	-0.07	0.941	-.0438643	.0407069
_cons	.3109268	.1153693	2.70	0.008	.0825786	.5392751

Posteriormente realizamos regresiones lineales para analizar por separado la relación con las dos variables más interesantes. Objetivamos una relación lógica y esperable edad-IMT, y confirmamos la asociación IAH-IMT.

*Tabla 11. Regresiones lineales para la edad e IAH, en relación a IMT*

. reg IMT AgeV1

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	134
Model	.127388796	1	.127388796	F(1, 132)	=	8.88
Residual	1.89402016	132	.014348638	Prob > F	=	0.0034
				R-squared	=	0.0630
				Adj R-squared	=	0.0559
Total	2.02140896	133	.015198564	Root MSE	=	.11979

IMT	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
AgeV1	.0028565	.0009587	2.98	0.003	.0009601	.0047529
_cons	.4557835	.0433429	10.52	0.000	.370047	.54152



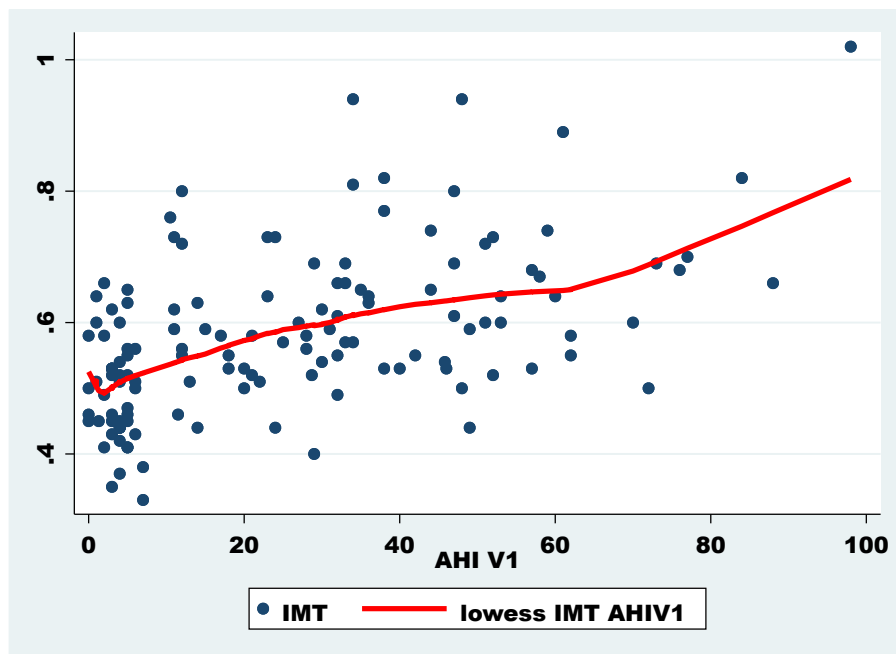
. reg IMT AHIV1

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	133
Model	.570363115	1	.570363115	F(1, 131)	=	51.59
Residual	1.44827598	131	.011055542	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.2825
				Adj R-squared	=	0.2771
Total	2.0186391	132	.01529272	Root MSE	=	.10515

IMT	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
AHIV1	.0028538	.0003973	7.18	0.000	.0020678 .0036398
_cons	.5069542	.0137285	36.93	0.000	.4797959 .5341125

*Figura 5. Asociación IMT-IAH*



En promedio, el IMT es 0.0028 mm mayor por cada punto de IAH.

## **Conclusiones**

Debido a que el objetivo fundamental de nuestro estudio es determinar los valores de interleukinas en los pacientes con AOS, tratando de que influyan la menor cantidad de factores posibles. En el momento de la elección se estableció en los AOS un límite máximo de edad de 65 años para seleccionar la muestra. Cumplen con la proporción en cuanto al sexo, respecto a la prevalencia de la entidad en la población general. A destacar que la muestra AOS no tiene otras comorbilidades, lo cual consideramos el punto fuerte del estudio. Se descartaron pacientes con otras comorbilidades, según los criterios de exclusión anteriormente descritos, que pudieran influir en los valores de los parámetros inflamatorios medidos.

En relación a los biomarcadores inflamatorios en los pacientes con AOS existen en la evidencia científica resultados contradictorios<sup>31-35</sup>. Respecto a la Il-6, existen estudios donde se observaron niveles elevados de esta interleukina respecto al grupo control<sup>26-28</sup>. Cabe destacar que hay evidencia científica de que hay correlación positiva entre la producción de Il-6 con el IMC<sup>30,31</sup> y los estudios anteriormente citados no tenían como criterio de exclusión el IMC. Por otra parte, otros estudios han obtenido resultados contradictorios<sup>32</sup>. Otros biomarcadores inflamatorios analizados han sido la Il-8, Il-10, Il-17A, TNF-alfa y PCR. En todos ellos hemos obtenido resultados similares, que nos conducen a concluir que existe una base fisiopatológica inflamatoria en la enfermedad obstructiva del sueño, sin que el tratamiento con CPAP muestre una clara influencia en la evolución de dichos parámetros tras un año de seguimiento. Tras el análisis de las interleukinas sobre nuestras muestras hemos hallado valores elevados de parámetros inflamatorios en los grupos de Asma, síndrome Overlap y EPOC como ya esperábamos, dado que se conoce su fisiopatología inflamatoria, siempre teniendo en cuenta que se encontraban durante la fase estable de la enfermedad, no en reagudización.

Los pacientes con AOS tienen un engrosamiento significativo del grosor de la íntima media de la arteria carótida. Además, el tratamiento con CPAP tienen un efecto reductor sobre el espesor de la capa íntima media al año de tratamiento, contribuyendo a reducir el riesgo cardiovascular de estos pacientes. Se trata de la conclusión más importante de nuestro estudio, al tratarse de una propuesta no establecida hasta este momento en la literatura científica. Por ello teorizamos, basándonos en los resultados

obtenidos, que el tratamiento con CPAP disminuye la aterosclerosis subclínica en los pacientes con AOS y, por tanto, según establece la literatura científica<sup>24-27</sup>, podrían sufrir una menor proporción de eventos cardiovasculares a lo largo de su vida, comparados con aquellos pacientes no tratados con CPAP. En relación a ello, destaca el grado de correlación entre IAH-IMT hallado en los análisis de regresión realizados, lo cual nos hace plantear la posibilidad de que en la práctica clínica diaria se valore la posibilidad de realizar estudio ecográfico carotídeo a los pacientes con IAH más severo, como marcador de eventos cardiovasculares futuros, con el objetivo de plantear actitudes preventivas.

## **Bibliografía**

1. Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: A population health perspective. *AM J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1217-39.
2. Grupo Español de Sueño (GES). Consenso nacional sobre el síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Arch Bronconeumol* 2005;41(Supl 4):1-100.
3. Lloberes P, Durán-Cantolla J, Martínez-García MA, Marín JM, Ferrer A, Corral J et al. Diagnosis and treatment of sleep apnea-hypopnea syndrome. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. *Arch Bronconeumol*. 2011 Mar;47(3): 143-56
4. American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders. 3rd ed. Darien, Illinois: American Academy of Sleep Medicine; 2014.
5. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N. Engl. J. Med*. 1993 29;328(17):1230-5
6. Duran J, Esnaola S, Rubio R, Iztueta A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 years. *Am J Respir Crit. Care Med*. 2001;163:685-9
7. Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, Ten Have T, Rein J, Vela-Bueno A, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: Effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:608-13
8. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta, Hagen EW, Hla KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 2013;177:1006-14

9. Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, O'Connor GT, Punjabi NM, Quan SF, Redline S, Resnick HE, Togo EK, Diener-West M et al. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation*. 2010 Jul 27;122(4):352-60.
10. Ikonomidis I, Stamatelopoulos K, Lekakis J, Vamvakou GD, Kremastinos DT. Inflammatory and non-invasive vascular markers: the multimarker approach for risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2008;199:3-11.
11. Watson JA, Watson CJ, McCann A, Baugh J. Epigenetics, the epicenter of the hypoxic response. *Epigenetics*. 2010;5:293-6.
12. Klingenberg R, Gerdes N, Badeau RM, Gistera A, Strodt D, Ketelhuth DJF et al. Depletion of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J. Clin Invest*. 2013;123:1323-34.
13. Ye J, Liu H, Zhang G, Li P, Wang Z, Huang S, Yang Q, Li Y. The Treg/Th17 imbalance in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Mediat Inflamm*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/815308>.
14. Kim J, Bhattacharjee R, Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Capdevila OS, 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.
15. Li K, Wei P, Qin Y, Wei Y. Is C-reactive protein a marker of obstructive sleep apnea?: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 May;96(19):e6850

16. Stradling JR, Craig SE, Kohler M, Nicoll D, Ayers L, Nunn AJ, Bratton DJ. Markers of inflammation: data from the MOSAIC randomised trial of CPAP for minimally symptomatic OSA. *Thorax*. 2015;70(2):181-2.
17. Oksenberg A, Arons E, Froom P. Does the severity of obstructive sleep apnea predict patients requiring high continuous positive airway pressure? *Laryngoscope*. 2006 Jun;116(6):951-5.
18. Arias MA, García-Río F, Alonso-Fernández A, Hernanz A, Hidalgo R, Martínez-Mateo V et al. CPAP decreases plasma levels of soluble tumour necrosis factor-alpha receptor 1 in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*. 2008;32(4): 1009-15.
19. Alonso-Fernández A, García-Río F, Arias MA, Hernanz A, de la Peña M, Piérola J et al. Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial. *Thorax*. 2009;64(7):581-6.
20. Steiropulos P, Tsara V, Nena E, Fiteli C, Kataropoulou M, Froudarakis M et al. Effect of continuous positive airway pressure treatment on serum cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest*. 2007;132(3):843-51.
21. Kohler M, Ayers L, Pepperell JC, Packwood KL, Ferry B, Crosthwaite N et al. Effects of continuous positive airway pressure on systemic inflammation in patients with moderate to severe obstructive sleep apnea: a randomised controlled trial. *Thorax*. 2009;64(1):67-73.
22. Paz Y Mar HL, Hazen SL, Tracy RP, Strohl KP, Auckley D, Bena J et al. Effect of continuous positive airway pressure on cardiovascular biomarkers: the sleep apnea stress randomised controlled trial. *Chest*. 2016;150(1):80-90.
23. Campos-Rodriguez F, Asensio-Cruz MI, Cordero-Guevara J, Jurado-Gamez B, Carmona-Bernal C, Gonzalez-Martinez M et al. Effect of

- continuous positive airway pressure on Inflammatory, antioxidant, and depression biomarkers in women with obstructive sleep apnea: a randomised controlled trial. *Sleep*, 2019; 42(10): 1-8.
24. Nezu T, Hosomi N, Aoki S, Matsumoto M. Carotid Intima-Media Thickness for Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23(1):18-31. doi: 10.5551/jat.31989. Epub 2015 Oct 13. PMID: 26460381.
  25. Formanowicz D, Krawczyk JB, Perek B, Lipski D, Tykarski A. Management of High-Risk Atherosclerotic Patients by Statins May Be Supported by Logistic Model of Intima-Media Thickening. *J Clin Med*. 2021 Jun 29;10(13):2876
  26. Polak JF, O'Leary DH. Carotid Intima-Media Thickness as Surrogate for and Predictor of CVD. *Glob Heart*. 2016 Sep;11(3):295-312.e3. doi: 10.1016/j.gheart.2016.08.006. PMID: 27741977.
  27. Orrù G, Storari M, Scano A, Piras V, Taibi R, Viscuso D. Obstructive Sleep Apnea, oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction- An overview of predictive laboratory biomarkers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Jun;24(12):6939-6948.
  28. Borges YG, Cipriano LHC, Aires R, Zovico PVC, Campos FV, de Araújo MTM, Gouvea SA. Oxidative stress and inflammatory profiles in obstructive sleep apnea: are short-term CPAP or aerobic exercise therapies effective? *Sleep Breath*. 2020 Jun;24(2):541-549. doi: 10.1007/s11325-019-01898-0. Epub 2019 Jul 16. PMID: 31313021.
  29. Marin JM, Artal J, Martin T, Carrizo S, Andres M, Bolea R et al. Epigenetics modifications and Subclinical Atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnea: The EPIOSA study. *BMC Pulmonary Medicine* 2014 14:114.
  30. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, et al. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Endocrinol Metab* 2000; 85:1151-8.



31. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 2003;107:1129-34.
32. Liu Z, Xu Y, Hua Q, Wang Y, Liu R , Yang Z. Additive effects of obstructive sleep apnea syndrome and hypertension on inflammatory reaction. *Afr J Biotechnol* 2011;10:11738-44.
33. Sahlman J, Miettinen K, Peuhkurinen K, et al.; Kuopio Sleep Apnoea Group. The activation of the inflammatory cytokines in overweight patients with mild obstructive sleep apnoea. *J Sleep Res* 2010;19:341-8.
34. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1313-6.
35. Constantinidis J, Ereliadis S, Angouridakis N, Konstantinidis I, Vital V, Angouridaki C. Cytokine changes after surgical treatment of obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265:1275-9.