



VALORACIÓN DE LA OXIDACIÓN PROTEICA EN PACIENTES CON APNEAS DEL SUEÑO

B. Jurado Gámez¹, M.C. Fernández Marín², M.J. Cobos Ceballos¹, R. Ibáñez Meléndez¹, M.S. Arenas de Larriva¹, L. Muñoz Cabrera¹, A. Cosano Povedano¹.

¹Servicio Neumología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. ²Unidad de Neumología. Hospital Punta de Europa. Algeciras. Cádiz.

Trabajo parcialmente financiado por la Fundación Neumosur.

Resumen

Introducción: en el síndrome de apneas-hipopneas del sueño (SAHS) son frecuentes los episodios de hipoxemia-reoxigenación que pueden producir sustancias oxígeno reactivas y estrés oxidativo.

Pacientes y método: estudio prospectivo, con muestreo consecutivo, para determinar si la hipoxemia nocturna puede provocar oxidación proteica. Fueron incluidos pacientes con sospecha de SAHS, indicación de una polisomnografía, edad comprendida entre 25 y 49 años, y ausencia de enfermedad sistémica. Se compararon los resultados observados en un grupo clínico (IAH \geq 10) con los de un grupo control (IAH $<$ 5).

Resultados: se excluyeron 3 pacientes por presentar un IAH entre 5 y 10. Fueron incluidos 36 sujetos (edad = $40 \pm 6,1$ años, 30 hombres y 6 mujeres, IMC = $31 \pm 5,9$), 23 pertenecientes al grupo clínico y 13 al grupo control. En el grupo clínico, los valores de proteínas carboniladas fueron de $0,14 \pm 0,179$ nmol/mg y de $0,10 \pm 0,066$ nmol/mg en el grupo control ($p = 0,348$). No se observó correlación significativa entre las cifras de proteínas carboniladas y el índice de apneas-hipopneas ($rho = 0,197$; $p = 0,249$), índice de desaturación $>3\%$ ($rho = 0,129$, $p = 0,452$) y porcentaje de sueño con SaO₂ $<90\%$ ($rho = 0,058$, $p = 0,736$).

Conclusiones: en pacientes con edad media y SAHS moderado, las proteínas carboniladas séricas se observaron más elevadas, aunque sin alcanzar diferencias significativas.

Palabras clave: estrés oxidativo, oxidación proteica, proteínas carboniladas, síndrome de apneas-hipopneas del sueño.

Evaluation of protein oxidation in patients with sleep apnea

Abstract

Introduction: episodes of hypoxemia-reoxygenation are frequent in sleep apnea-hypopnea syndrome (SAHS) and can produce reactive oxygen substances and oxidative stress.

Patients and methods: prospective study, with consecutive sampling to determine if nocturnal hypoxemia can produce oxidation. Patients with SAHS suspicion, polysomnography indication, age between 25-49 years old and without systemic disease were included. Results obtained in clinical group (IAH \geq 10) were compared with control group (IAH $<$ 5).

Results: three patients with IAH 5-10 were excluded. Thirty-six subjects were included (age: 40 ± 6.1 years old, 30 men and 6 women, BMI = 31 ± 5.9), 23 patients were from clinical group and 13 from control group. In clinical group, carbonylated proteins values were 0.14 ± 0.179 nmol/mg and 0.10 ± 0.066 nmol/mg in control group ($p = 0.348$).

There was not significant correlation between carbonyl proteins and apnea-hypopnea index ($rho = 0.197$, $p = 0.249$), desaturation index $>3\%$ ($rho = 0.129$, $p = 0.452$) and sleep time spent with SaO₂ $<90\%$ ($rho = 0.058$, $p = 0.736$).

Conclusions: in patients with mean age and moderate SAHS, protein carbonyls were higher although not reaching significant differences.

Key words: oxidative stress, protein oxidation, proteins carbonyl, sleep apnea-hypopnea syndrome.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de apneas-hipopneas del sueño (SAHS) se caracteriza por frecuentes episodios de obstrucción de la vía aérea superior que se acompañan de descensos significativos en la saturación de oxígeno (SaO₂) y posterior normalización de la misma, una vez restaurado el ritmo respiratorio¹. Estos episodios de hipoxemia-reoxigenación pueden ocurrir en múltiples ocasiones a lo largo del sueño y suelen existir

desde varios años antes de que el paciente solicite atención médica. Se postula que estos eventos están involucrados en la producción de sustancias oxígeno reactivas (SOR) y en favorecer el estrés oxidativo²; esto es, un desbalance entre la producción y la eliminación intracelular de SOR a favor de la primera.

Las SOR pueden reaccionar con cualquier molécula ya sean lípidos, DNA o proteínas. Dentro del metabolismo proteico, la naturaleza inespecífica de algunas proteínas favorece una mayor predisposición

Recibido: 2 de abril de 2009. Aceptado: 23 de junio de 2009.

Dr. Bernabé Jurado Gámez.
bjg01co@hotmail.com

de estas para ser oxidadas, este proceso además puede facilitarse por una disminución de los sistemas antioxidantes del organismo y una menor capacidad para reciclar las proteínas oxidadas. La oxidación proteica implica una modificación no reversible a nivel celular y, por tanto, las proteínas pueden perder su función y provocar un desequilibrio en el metabolismo celular.

En el SAHS, el estrés oxidativo ha sido valorado desde distintos puntos de vista. Yamauchi M et al³, relacionaron los eventos respiratorios que acontecen en el SAHS y la producción de radicales libres. Christou et al⁴, observaron un estado antioxidante disminuido en aquellos pacientes diagnosticados de un SAHS. También Barceló et al⁵, demostraron este descenso de la capacidad antioxidante en el SAHS y mejoría tras iniciar tratamiento con CPAP.

Todos estos trabajos apuntan a una relación del SAHS con estrés oxidativo y a un posible factor de riesgo cardiovascular². Por tanto, es importante determinar si el SAHS está involucrado en la oxidación proteica, ya que se dispone de un tratamiento eficaz que corrige la hipoxemia nocturna y puede modificar este proceso. El daño oxidativo a lípidos y DNA han sido estudiados previamente, sin embargo, son escasos los trabajos que han evaluado la oxidación proteica que puede producirse en pacientes con un SAHS.

Por tanto, teniendo en cuenta estos supuestos se diseñó un trabajo dirigido a estudiar si la hipoxemia nocturna producida por el SAHS puede provocar oxidación proteica, valorada esta mediante la determinación sérica de las proteínas carboniladas.

PACIENTES Y MÉTODO

Estudio prospectivo, con muestreo consecutivo, llevado a cabo en una población elegible de pacientes que acuden a la unidad de trastornos respiratorios del sueño (UTRS) del Hospital Universitario Reina Sofía. El estudio se ha realizado con el informe favorable del Comité ético y de investigación del hospital.

Todos los pacientes fueron valorados mediante una historia clínica, examen físico, estudio analítico y radiológico, determinación de la saturación periférica de oxígeno (SaO₂), y cuando estuvo indicado espirometría y ecocardiografía. Posteriormente, se realizó una polisomnografía diagnóstica de noche completa en un período de tiempo inferior a 3 meses.

Se incluyeron en el estudio los pacientes con sospecha de padecer un SAHS e indicación de polisomnografía diagnóstica, edad comprendida entre 25 y 49 años, en ausencia de sintomatología de enfermedad

sistémica conocida. Fueron excluidos aquellos sujetos que eran fumadores activos, presentaron síntomas de infección aguda o crónica, o estaban diagnosticados de diabetes mellitus, insuficiencia cardiaca (fracción de eyección < 40%), insuficiencia renal estadio 4-5, cirrosis hepática y EPOC grado 3 y 4 de la GOLD.

En la población de estudio se consideró el diagnóstico de un SAHS a los sujetos con un IAH ≥ 10 en la polisomnografía y se incluyeron en el grupo control aquellos que mostraron un IAH < 5.

Polisomnografía

El estudio de sueño se realizó con un polisomnógrafo Somnoscren (Somnomedic®, Germany). La prueba se inició a las 12 h pm y terminó a las 7:30 h am. Se monitorizó dos canales de electroencefalografía (C4/A1 y C3/A2), electrooculografía, electromiograma submentoniano y tibial anterior. La ventilación oro-nasal se determinó por termosensores y señal de presión, utilizando esta última como señal principal para el análisis. Igualmente se registraron el ronquido, el esfuerzo torácico y abdominal (bandas de impedancia), el ritmo cardíaco (derivación electrocardiográfica V2) y la SaO₂. Todos los estudios fueron corregidos manualmente y de acuerdo con las recomendaciones de Rechtschaffen y Kales⁶. Se definió la existencia de una apnea si la señal del flujo oronasal descendió significativamente (>90%) con una duración de al menos 10 segundos y la hipopnea cuando se observó un descenso evidente en el flujo (>30% y <90%) junto a una caída en la SaO₂ $\geq 3\%$ y/o un microdespertar en el electroencefalograma.

Durante la polisomnografía se monitorizaron las siguientes variables respiratorias: índice de apneas-hipopneas (IAH) o suma de apneas más hipopneas por hora de sueño, SaO₂ en vigilia, SaO₂ mínima alcanzada durante el sueño, índice de desaturación de oxígeno > 3% (ID3) definido como el número de descensos en la SaO₂ $\geq 3\%$ por hora de sueño y, finalmente, el porcentaje del tiempo de sueño con SaO₂ < 90% (T90).

Se estableció que la polisomnografía fue válida para el diagnóstico si se obtuvo al menos 180 minutos de sueño.

Determinación de proteínas carboniladas

Al día siguiente del estudio polisomnográfico, se procedió a la extracción de sangre, ultracentrifugado de la misma, 2.000 g durante 15 min. a 4° C y el plasma separado en alícuotas. Todas las muestras fueron almacenadas a -80° C hasta su análisis. La concentra-

ción total de proteínas se midió utilizando la referencia Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratorios, Richmond, CA, USA). Para determinar las proteínas carboniladas se siguieron las instrucciones comerciales (Bio Cell PC, Papaloetoe, NZ) siguiendo el método Elisa. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Para calcular el contenido de proteínas carboniladas séricas (nmol/mg proteína), se construyó una curva estándar con los controles suministrados en el kit y que contienen niveles bajos, medios y altos de proteínas carboniladas lo que permitió trazar el rango de la curva estándar.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados mediante medias, desviaciones típicas, mínimos y máximos para variables continuas, y frecuencias y porcentajes para las variables categóricas. Las variables categóricas fueron analizadas mediante la chi cuadrado y la prueba exacta de Fisher. La comparación de variables continuas entre el grupo diagnosticado de SAHS y el grupo control se realizó con la prueba de la prueba U de Mann-Witney para muestras independientes, considerando un intervalo de confianza del 95%. Para establecer las correlaciones entre las variables continuas, se empleó el coeficiente por rangos (*rho*) de Spearman. Todas las correlaciones realizadas fueron bilaterales y se consideraron valores estadísticamente significativos una $p < 0,05$. Los datos se examinaron con el Statistical Package for Social Sciences para Windows (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.).

RESULTADOS

Se estudiaron a 39 pacientes, de ellos se excluyeron a 3 por presentar un IAH entre 5 y 10. Por tanto, la muestra analizada fueron 36 enfermos con una edad de $40 \pm 6,1$ años, 30 hombres y 6 mujeres, IMC de $31 \pm 5,9$.

La gravedad del SAHS se midió mediante polisomnografía, un IAH > 10 se observó en 23 pacientes (grupo clínico), mientras que en 13 el IAH fue < 5 (grupo control). En ambos grupos no se observaron diferencias en cuanto a edad y género, si bien el IMC fue menor en el grupo control. Las características clínicas de la muestra se expresan en la tabla 1.

En los pacientes con SAHS, obviamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en las variables respiratorias (tabla 1). Sin embargo, los valores de proteínas carboniladas fueron de $0,14 \pm 0,179$, mientras que en los sujetos del grupo control fue de

Tabla 1. Características clínicas y resultados de la polisomnografía: comparación de los pacientes con SAHS y los del grupo control.

Variable (n = 23)	SAHS (n = 13)	Grupo control	p
Edad (años)	39 \pm 3	41 \pm 5,9	0,268
Género (H/M)	18/5	10/3	0,878
IMC (kg/m ²)	32 \pm 6	29 \pm 5,1	0,024
*TAS (mm Hg)	124 \pm 12,6	122 \pm 15,8	0,632
†TAD (mm Hg)	77 \pm 11,3	72 \pm 10,3	0,114
P. carboniladas (nmol/mg)	0,14 \pm 0,179	0,10 \pm 0,066	0,348
IAH (eventos/hora de sueño)	27 \pm 11,2	3 \pm 1,1	0,000
SaO ₂ mínima (%)	78 \pm 10,6	87 \pm 4,6	0,003
SaO ₂ media (%)	92 \pm 4,2	94 \pm 0,6	0,070
§ ID3 (eventos/hora de sueño)	30 \pm 14,9	8 \pm 4,1	0,000
‡ T90 (%)	9 \pm 8,3	0,2 \pm 0,34	0,001

*TAS: tensión arterial sistólica. †TAD: tensión arterial diastólica. ‡ IAH: suma de apneas e hipopneas por hora de sueño. § ID3: número de desaturaciones $> 3\%$ por hora de sueño. ‡ T90: porcentaje de sueño con SaO₂ $< 90\%$.

$0,10 \pm 0,066$ nmol/mg, cifras inferiores aunque sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos ($p = 0,348$).

Los resultados de la correlación entre las proteínas carboniladas y las principales variables respiratorias fueron, con el IAH mostró una *rho* de 0,197 ($p = 0,249$), con el ID3 fue de *rho* 0,129 ($p = 0,452$) y finalmente con el T90 mostró una *rho* de 0,058, $p = 0,736$. En la figura 1 se expresa la correlación entre dichas variables.

DISCUSIÓN

En pacientes de edad media con un SAHS moderado, las proteínas carboniladas se encuentran ligeramente elevadas, aunque sin mostrar un aumento significativo. Por tanto, en estos pacientes la posible repercusión del estrés oxidativo sobre las proteínas es baja.

El SAHS es una enfermedad que se ha asociado a la existencia de estrés oxidativo². Se ha descrito que este mecanismo puede estar relacionado con muchos procesos fisiológicos como el envejecimiento⁷ y con la aparición de determinadas patologías como la enfermedad de Alzheimer⁸. Estudios recientes también sugieren que favorece el desarrollo de arteriosclerosis^{2,9,10}, todo lo cual añade un interés especial al SAHS.

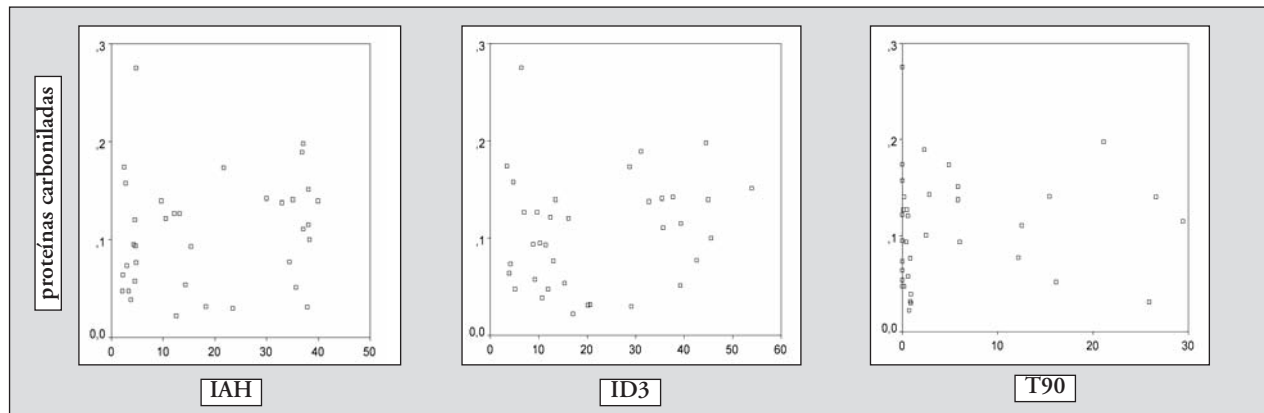


Figura 1. Correlaci3n entre los valores de las prote3nas carboniladas, en eje de ordenadas, y el 3ndice de apneas-hipopneas (IAH) e 3ndice de desaturaci3n de ox3geno >3% (ID3), en eje de abscisas.

IAH: suma de apneas e hipopneas por hora de sue1o. ID3: n3mero de desaturaciones > 3% por hora de sue1o. T90: porcentaje de sue1o con $\text{SaO}_2 < 90\%$.

En el SAHS uno de los mecanismos de mayor evidencia cient3fica involucra a los episodios de hipoxia-reoxigenaci3n con la aparici3n de estr3s oxidativo^{2,11}. Sin embargo, en nuestro estudio las ca3das en la SaO_2 nocturna, determinada por el ID3, y la gravedad de la desaturaci3n, valorada por el T90, no se correlacionaron con los valores de las prote3nas carboniladas.

Hasta la fecha, se han realizado varios trabajos con el objetivo de analizar la repercusi3n del estr3s oxidativo en el metabolismo de los l3pidos¹⁰⁻¹⁴, sin embargo, es infrecuente el estudio de la repercusi3n sobre oxidaci3n proteica en el SAHS. Recientemente Barreiro et al¹⁵, han estudiado el m3sculo intercostal externo de 12 pacientes con un SAHS y observaron que, comparado con el grupo control, los enfermos mostraron valores significativamente elevados de prote3nas carboniladas. Estos resultados discrepan de los obtenidos en nuestro estudio, si bien las diferencias pueden explicarse por el distinto objetivo y metodolog3a del estudio.

Como se ha comentado anteriormente, en pacientes con SAHS se ha demostrado un aumento en los marcadores de estr3s oxidativo, lo cual no es concordante con los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que nuestra muestra fue seleccionada por edad y que los pacientes presentaron un SAHS moderado, a diferencia de otros trabajos como el de Yamauchi et al³ y Barcel3 et al⁵ en los que se incluyeron enfermos con un SAHS grave.

Se ha aportado que la oxidaci3n de prote3nas, medidas por carbonilaci3n, aumenta en el suero de personas mayores en relaci3n a adultos j3venes¹⁶. En c3lulas fisiol3gicamente envejecidas se ha observado

un aumento en la producci3n de SOR, ya que al disminuir la actividad de la ATP sintetasa aumenta la producci3n de super3xido^{17,18}. Tambi3n la actividad del proteosoma es menor en c3lulas senescentes, lo que origina la acumulaci3n de prote3nas da1adas que tienden a desnaturalizarse dificultando la prote3lisis y necesitando de prote3nas accesorias que desagreguen dichos complejos¹⁹. En nuestro estudio el posible efecto de la edad en el proceso de oxidaci3n proteica se intent3 minimizar restringiendo la edad de los pacientes por debajo de 50 a1os. No obstante, es posible que la edad sea un factor que pueda favorecer la acci3n de otros mecanismos que causen estr3s. Esta cuesti3n no fue el objetivo de nuestro estudio ni hay suficiente conocimiento cient3fico sobre el tema en pacientes con SAHS, de tal forma que no puede descartarse la influencia de la edad en nuestros resultados.

Otro aspecto a tener en cuenta es que la carbonilaci3n de prote3nas implica una oxidaci3n severa y, por tanto, es marcador de un estr3s oxidativo m3s grave. Nuestros enfermos mostraron un IAH de 27 compatible con un SAHS moderado, inferior al observado en otros estudios^{12,13}.

Las prote3nas carboniladas en tejidos son compuestos muy l3biles lo cual complica su determinaci3n. De hecho frecuentemente se han utilizado varios m3todos anal3ticos para medir otras modificaciones de las prote3nas como la hidroxilaci3n arom3tica de fenilalanina y la conversi3n de tirosina a di-tirosina y nitro-tirosina, para valorar el efecto del estr3s oxidativo sobre las prote3nas²⁰. Es posible que en pacientes con un SAHS moderado la oxidaci3n de prote3nas se produzca en escasa cuant3a y que requieran para

detectarlas métodos analíticos con una sensibilidad muy alta.

Otra limitación común en todos los estudios dirigidos a valorar estrés oxidativo en pacientes con un SAHS es la dificultad para controlar la frecuente comorbilidad asociada y el posible efecto de la medicación, además del ejercicio físico diario e ingesta de betacarotenos, ascorbato, selenio y polifenoles. Por otra parte, es probable que otras variables desconocidas pudieran interferir en la medida de la oxidación proteica debido a estrés oxidativo y actuar como posibles variables confusoras. Todo ello hace especialmente complejo la determinación sérica de las proteínas carboniladas y establecer su relación con estrés oxidativo y SAHS.

En resumen, los pacientes de nuestro grupo, de edad media y con un SAHS moderado, muestran cifras de proteínas carboniladas séricas similares a los del grupo control, por lo que no hemos observado el efecto del posible estrés oxidativo a nivel protéico. Sin embargo, es recomendable diseñar un estudio con un número de muestra mayor, previamente seleccionada para controlar adecuadamente todas las variables que intervienen en el mecanismo de estrés oxidativo y que definitivamente aclare el papel del SAHS sobre la oxidación proteica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Consenso Nacional sobre el síndrome de apneas-hipopneas del sueño. Arch Bronconeumol 2005; 41(supl 4).
2. Pack AI. Advances in sleep-disorders breathing. Am J Respir Crit Care Med 2006; 73: 7-15.
3. Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, et al. Oxidative stress in obstructive sleep apnea. Chest 2005; 127: 1674-1679.
4. Christou K, Moulas AN, Pastaka C, et al. Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients. Sleep Med 2003; 4: 225-228.
5. Barceló A, Barbé F, de la Peña M, Vila M, Pérez G, Piérolas J, Durán J, Agustí AGN. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. Eur Respir J 2006; 756-760.
6. Rechtschaffen A, Kales A: A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. Los Angeles, CA, Brain Information Service/Brain Research Institute 1968, pp 1-60.
7. De Gray A D. Free radicals in aging: causal complexity and its biomedical implications. Free Rad Research 2006; 40: 1244-1249.
8. Aslan M, Ozben T. Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 2004; 1: 111-119.
9. Hayashi M, Fujimoto K, Urushibata K, Takamizawa A, Kinoshita O, Kubo K. Hypoxia-sensitive molecules may modulate the development of atherosclerosis in sleep apnoea syndrome. Respirology 2006; 11: 24-31.
10. Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 934-939.
11. Foster GE, Pouling MJ, Hanly P. Intermittent hypoxia and vascular function: implications for obstructive sleep apnoea. Exp Physiol 2007; 92: 51-65.
12. Li J, Savransky V, Nanayakkara A, Smith PL, O'Donnell CP, Polotsky VY. Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia. J Appl Physiol 2007; 102: 557-563.
13. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. Sleep 2004; 27: 123-128.
14. Hernández C, Abreu J, Abreu P, Colino R, Jiménez A. Effects of nasal positive airway pressure treatment on oxidative stress in patients with sleep apnea-hypopnea syndrome. Arch Bronconeumol 2006; 42: 125-129.
15. Barreiro E, Nowinski A, Gea J, Sliwinski P. Oxidative stress in the external intercostal muscles of patients with obstructive sleep apnoea. Thorax 2007; 62: 1095-1101.
16. Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. Free Radic Biol Med 2002; 32: 797-803.
17. Aquilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M, Nyström T. Protein oxidation in G0 cells of Saccharomyces cerevisiae depends on the state rather than the rate of respiration and is enhanced in pos9 but not yap1 mutants. J Biol Chem 2001; 276: 35396-35404.
18. Aquilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M, Nyström T. Asymmetric inheritance of oxidative damaged proteins during cytokinesis in Saccharomyces cerevisiae: a Sir2p dependent mechanism. Science 2003; 299: 1751-1753.
19. Friguet B, Bulteau AL, Chondrogianni N, Conconi M, Petropoulos I. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. Ann N Y Acad Sci 2000; 908: 143-154.
20. Stadtman ER. Importance of individuality in oxidative stress and aging. Free Radic Biol Med 2002; 33: 597-604.