

Original

Variación de la expresión proteica en función de la gravedad del síndrome de apnea-hipopnea del sueño

Bernabé Jurado Gámez^{a,*}, José Luis Gómez-Chaparro Moreno^{b,c}, María Muñoz Calero^d, Julia Ruiz Laguna^b, Luis Muñoz Cabrera^a, Andrés Cosano Povedano^a y Juan López-Barea^b

^a Servicio de Neumología, Unidad de Trastornos Respiratorios del Sueño, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, España

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Córdoba, España

^c Distrito Sanitario de Córdoba, Córdoba, España

^d Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 31 de agosto de 2009

Aceptado el 22 de diciembre de 2009

On-line el 23 de febrero de 2010

Palabras clave:

Electroforesis bidimensional

Proteómica

Síndrome de apnea del sueño

RESUMEN

Objetivo: Estudio prospectivo con muestreo consecutivo y grupo control para determinar si la expresión proteica en pacientes con SAHS es diferente a la de un grupo control (IAH ≤ 5).

Pacientes y métodos: Fueron incluidos 32 pacientes, entre 35 y 60 años, a los que se les realizó una polisomnografía. Fueron excluidos los sujetos con enfermedad aguda o crónica. La primera dimensión del estudio proteómico se realizó en tiras IPG (18 cm, pH 4–7) y, la segunda, en geles SDS-PAGE por triplicado para cada grupo. Los geles se tiñeron con SYPRO-Ruby (Bio-Rad[®]), se obtuvieron las imágenes con un escáner láser FX-Imager, y el análisis de los spots se realizó con el software ProteomWeaver v4.0 (Bio-Rad[®]). Se analizaron los cambios significativos entre los geles agrupados por réplicas y por separado, considerándose un cambio significativo si la intensidad relativa en los spots fue superior o inferior en 3 veces a la del control y se observó en 2 de las 3 réplicas de cada grupo con un coeficiente de variación $< 20\%$.

Resultados: Los pacientes fueron divididos en 8 sujetos por grupo (control, leve, moderado y grave). La comparación de los geles constató diferencias significativas entre el grupo control y los 3 grupos clínicos, observándose 3 spots con sobreexpresión significativa y 7 spots subexpresados respecto al grupo control.

Conclusión: Existen cambios significativos en la expresión proteica entre un grupo control y pacientes en distintos estadios de enfermedad. El estudio proteómico puede identificar biomarcadores relacionados con el diagnóstico y gravedad del SAHS.

© 2009 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Variation in Protein Expression Depending on the Severity of Sleep Apnoea-Hypopnoea Syndrome

ABSTRACT

Objective: A prospective study with a consecutive sample and a control group to determine whether protein expression in patients with sleep apnoea-hypopnoea syndrome (SAHS) is different from that of the control group (IAH ≤ 5).

Patients and methods: A total of 32 patients aged between 35 and 60 years who had a polysomnograph performed were included. Patients with an acute or chronic were excluded. The first dimension of the proteomic study was carried out on IPG strips (18 cm, pH 4–7) and the second on SDS-PAGE gels in triplicate for each group. The gels were stained with SYPRO-Ruby (Bio-Rad[®]), the images obtained with an FX-Imager laser scanner and the spots were analysed using ProteomWeaver v. 4.0 (Bio-Rad[®]) software. Significant changes between the gels were analysed by replicates and separately, being considered a significant change if the relative intensity of the spots was three times higher or lower than that of the control and if it was observed in 2 of the 3 replicates of each group, with a coefficient of variation of $< 20\%$.

Keywords:

Two-dimensional electrophoresis

Proteomic

Sleep apnoea syndrome

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: bjg01co@hotmail.com (B. Jurado Gámez).

Results: The patients were divided into 8 subjects per group (control, mild, moderate and severe). The comparison of the gels showed significant differences between the control group and the 3 clinical groups, with significant over-expression being observed in 3 spots, and under-expression in 7 spots in the control group.

Conclusion: There are significant changes in protein expression between a control group and patients in different stages of disease. The proteomic study can identify biomarkers associated with the diagnosis and severity of the SAHS.

© 2009 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El síndrome de apnea-hipopnea del sueño (SAHS) es un trastorno respiratorio del sueño con una prevalencia de un 2–4% entre los adultos de edad media¹. Incluye algunos síntomas como ronquido, apneas observadas, sueño no reparador y excesiva somnolencia diurna². Estos síntomas son debidos a los frecuentes episodios de colapso en la vía aérea superior que empeoran la ventilación, provocan un descenso brusco en la saturación periférica de oxígeno (SaO₂) y terminan con un microdespertar, que desestructura el sueño. Esto origina un sueño no reparador y somnolencia diurna, aspectos relacionados con empeoramiento de la calidad de vida³ y aumento del riesgo de accidentes de tráfico^{4–6}. Por otra parte, los episodios de hipoxia-reoxigenación están involucrados en la producción de radicales libres y estrés oxidativo^{7–9} y aumento de mortalidad vascular^{10–12}. Así, es fundamental realizar un diagnóstico precoz en el SAHS, máxime cuando hay un tratamiento eficaz mediante la aplicación de *continuous positive airways pressure* (CPAP)² y un retraso en el diagnóstico y tratamiento origina un consumo de recursos sanitarios.

Actualmente, la polisomnografía es la prueba de referencia para el diagnóstico del SAHS². Sin embargo, es una técnica cara, tiene una importante lista de espera y no está disponible en todos los niveles asistenciales^{13,14}. Estos factores dificultan el diagnóstico, de forma que este sólo se ha realizado en un 10% de los enfermos^{2,14}.

Determinadas patologías pueden modificar la expresión proteica. Las modernas técnicas de análisis proteómico permiten identificar estos cambios y pueden constituir una importante ayuda diagnóstica¹⁵. Aunque hay varias estrategias para el análisis de expresión proteica, la combinación más utilizada es la electroforesis bidimensional (2D-PAGE), seguida de la espectrometría de masas^{16,17}.

La identificación de marcadores séricos predictivos de un SAHS puede representar una herramienta útil en la estrategia global de la enfermedad, tanto desde el punto de vista de su diagnóstico como de un mayor conocimiento de su fisiopatología.

Hasta la fecha los estudios proteómicos en el SAHS son escasos y han sido realizados solo en población infantil¹⁸. Se postula que en el SAHS, la expresión proteica en distintos estadios de gravedad puede variar y ser diferente a la de otro grupo de sujetos sin SAHS. Por tanto, en base a la importancia sanitaria del SAHS y al interés que puede representar en estos pacientes el estudio proteómico, nuestro grupo diseñó un trabajo con el objetivo de determinar si la expresión proteica en pacientes con SAHS puede diferenciarse de la de un grupo control sin SAHS.

Pacientes y métodos

Diseño

Estudio prospectivo con muestreo consecutivo y grupo control. A cada enfermo se le realizó una historia clínica completa, recogiendo información sobre trastornos respiratorios del sueño,

haciendo especial énfasis en la comorbilidad, consumo de medicamentos. Luego se realizó una exploración física, registrando medidas de peso, talla, tensión arterial y SaO₂ (en reposo y respirando aire ambiente), y se les efectuó un hemograma y bioquímica plasmática general.

Se consideró población elegible los sujetos que acudieron a la consulta específica de trastornos respiratorios del sueño y, tras la primera evaluación médica, se indicó la realización de una polisomnografía diagnóstica por clínica de SAHS. Esta se estableció si los enfermos manifestaban ronquido y alguno de los siguientes síntomas: apneas observadas, sueño no reparador y excesiva somnolencia diurna, valorada por una escala validada al castellano (test de Epworth > 11).

Se compararon los resultados de los pacientes diagnosticados de SAHS (grupo clínico) con los obtenidos en el grupo control, donde se incluyeron a los sujetos procedentes de la consulta específica de trastornos del sueño (pareados por edad e IMC), que tras la polisomnografía no fueron diagnosticados de SAHS.

El estudio se realizó con el informe favorable del Comité Ético de Investigación, respetando los derechos fundamentales de la persona y los postulados éticos que afectan a la investigación biomédica con seres humanos, según contenido de la Declaración de Helsinki (1964), Convenio del Consejo de Europa relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina (1997), Declaración Universal de la UNESCO sobre Genoma Humano, y requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética (2007)

Selección de pacientes

Con la finalidad de evitar cambios atribuibles al género, fueron incluidos pacientes varones a los que consecutivamente se solicitó una polisomnografía diagnóstica por sospecha clínica de padecer SAHS, con edad entre 35 y 60 años y que dieron consentimiento informado para participar en el estudio.

Fueron excluidos los usuarios de drogas, incluido tabaquismo y alcoholismo, o aquellos sujetos que presentaron síntomas de enfermedad aguda o estaban diagnosticados de enfermedad crónica: cardiopatía isquémica inestable, insuficiencia cardiaca grado IV de la NYHA, insuficiencia renal crónica, hipertensión arterial sistémica grave o incontrolada, hepatopatía crónica, enfermedad cerebrovascular degenerativa, enfermedad pulmonar grave (incluyendo necesidad de oxigenoterapia nocturna).

Polisomnografía

Se realizó con un polisomnógrafo (Somnoscreen[®], Somnomedic[™], Germany). Se monitorizaron dos canales de electroencefalografía (C4/A1 y C3/A2), electrooculografía, electromiograma submentoniano y tibial anterior. El flujo aéreo se estudió con termosensores y señal de presión que fue utilizada como principal señal para el análisis. Igualmente se registró el ronquido y el esfuerzo torácico y abdominal con bandas de impedancia, una derivación electrocardiográfica (V2) y la SaO₂. Todos los estudios fueron corregidos

manualmente y de acuerdo con las recomendaciones de Rechtschaffen y Kales. Se consideró apnea el descenso significativo (> 90%) de la señal del flujo aéreo de ≥ 10 segundos de duración, e hipopnea cuando se observó un descenso evidente en el flujo aéreo (> 60% y < 90%) acompañada de una caída en la SaO₂ $\geq 3\%$ y/o un microdespertar.

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

Se consideró que la polisomnografía es válida para el diagnóstico si se obtuvo un mínimo de 180 minutos de sueño.

Para evitar un sesgo de clasificación con cifras de IAH cercanas a la normalidad, en este estudio se consideraron pacientes con SAHS aquellos que en la polisomnografía mostraron un IAH ≥ 10 , mientras en el grupo control se incluyeron a los sujetos con un IAH ≤ 5 . Se estableció la gravedad del SAHS en función del número de eventos respiratorios, considerándose el SAHS como leve (IAH ≥ 10 y ≤ 15), moderado (IAH > 15 y ≤ 30) y grave (IAH > 30).

Análisis proteómico

Tras realizar la polisomnografía, se recogieron las muestras de sangre (n=32) por venopunción a las 07:00h en tubo de extracción Vacutainer SST (BD), siguiendo el protocolo de extracción habitual de nuestro Hospital. Se permitió la formación de coágulo en frío durante 30 min, centrifugando luego a 1.500 \times g, 10 min a 4 °C. El suero resultante se dividió en alícuotas y congeló a -80 °C hasta su posterior análisis. Todo el proceso se realizó en menos de 60 min desde la extracción.

Se realizaron mezclas séricas para cada uno de los grupos del estudio (control, SAHS leve, moderado y grave). En cada individuo se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford¹⁹, de forma que cada sujeto aportara igual cantidad de proteína a la mezcla total de los grupos (control y SAHS leve, moderado y grave).

Las proteínas séricas mayoritarias fueron equalizadas con el kit Proteominer (Bio-Rad[®]) siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se limpiaron con el kit 2D Clean-up Kit (GE Healthcare) siguiendo las especificaciones del fabricante.

La primera dimensión o isoelectroenfoque se realizó con el sistema Protean IEF Cell (Bio-Rad[®]), usando tiras IPG de 18 cm de longitud y con un pH 4-7 (GE Healthcare Immobiline Drystrip). Se cargaron 50 μ g de proteína/tira que se resuspendieron en 350 μ l de tampón de rehidratación (6M urea; 0,5% Ampholine pH 3,5-10; 2% CHAPS; trazas de azul de bromofenol). Se realizaron tres réplicas para cada grupo del estudio. El isoelectroenfoque se realizó a 20 °C, siguiendo siempre el mismo protocolo y hasta llegar a una total de 52.000 V/h para todo el isoelectroenfoque.

Para la segunda dimensión se utilizó el sistema Protean Plus Dodecacecell (Bio-Rad[®]). Tras el isoelectroenfoque, las tiras IPG se equilibraron en dos pasos consecutivos de 30 min en tampón de equilibrado (50 mM Tris-HCl, pH8,8; 6 M urea; 30% glicerol; 2% SDS; trazas de azul de bromofenol) complementado en el primer paso con 10 mg/ml DTT. En un segundo paso, para el bloqueo de los grupos tiólicos, se complementó el tampón con 45 mg/ml iodoacetamida. Las tiras se colocaron sobre geles de poliacrilamida al 12,5% de 1 mm de espesor junto con marcadores de peso moleculares, y la separación se hizo en 2 pasos a 20 °C: 2,5 W/gel, 5 min y 15 W/gel, 6 h.

Tras la segunda dimensión, los geles se fijaron con 50% etanol y 3% ácido acético, y se tiñeron con SYPRO-Ruby (Bio-Rad[®]) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Los geles se digitalizaron con un escáner láser FX-Imager (Bio-Rad[®]) y se analizaron con el software ProteomWeaver v4.0 (Bio-Rad[®]). Para el análisis de imagen se usaron los siguientes parámetros de detección: radio mínimo: 4; intensidad mínima: 2.000; contraste mínimo: 10. Se utilizó el grupo control como referencia para el resto y se identificaron todos los cambios significativos entre los geles de los cuatro grupos, tanto agrupados por réplicas como por separado.

Análisis estadístico

Los datos se describen con medias, desviaciones típicas, mínimos y máximos para variables continuas y frecuencias y porcentajes para las categóricas. La comparación de variables continuas entre el grupo diagnosticado de SAHS y el control se realizó mediante la U de Mann-Witney, con un intervalo de confianza del 95%. Todas las comparaciones realizadas fueron bilaterales, estableciéndose valores estadísticamente significativos una p < 0,05.

Para considerar un cambio significativo en los spots de los distintos geles, se consideraron aquellos cuya intensidad relativa fuese superior o inferior en 3 veces a la obtenida en los geles control, rechazándose los que no estuvieran al menos en 2 de las 3 réplicas de cada grupo con un coeficiente de variación < 20% y p < 0,05.

Los datos fueron tratados estadísticamente mediante el «Statistical Package for Social Sciences (SPSS 14)» para Windows (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.).

Resultados

Se estudiaron 32 pacientes masculinos, edad entre 45 \pm 10,6 años e IMC de 31 \pm 5,4. De ellos, 8 eran sujetos con IAH < 5 (grupo control) y los otros 24 formaron el grupo clínico, clasificados en tres subgrupos de 8 pacientes con SAHS leve, moderado y grave, respectivamente. No se observaron diferencias en los dos grupos, control y clínico, en la edad e IMC (tabla 1). Tampoco fueron

Tabla 1

Características generales y respiratorias de los pacientes con síndrome de apnea-hipopnea del sueño y de los sujetos controles. Datos presentados como media (DE) y n (%)

Variable	Grupo Control	Grupo Clínico	p
Edad (años)	44 \pm 9,6	45 \pm 11,1	NS
IMC (kg/m ²)	29 \pm 1,7	32 \pm 6	NS
ESD (Epworth)	7 \pm 4,9	13 \pm 3,6	< 0,01
SapO ₂ vigilia (%)	96 \pm 1,8	95 \pm 1,8	NS
TAS (mmHg)	123 \pm 11	123 \pm 13,3	NS
TAD (mmHg)	77 \pm 1,3	72 \pm 10,7	NS
Glucemia (mg/dl)	98 \pm 15,7	99 \pm 12,1	NS
Creatinina (mg/dl)	0,86 \pm 0,091	0,87 \pm 0,138	NS
Colesterol total (mg/dl)	187 \pm 22	190 \pm 32,8	NS
HDL-colesterol (mg/dl)	48 \pm 11,1	50 \pm 26	NS
Triglicéridos (mg/dl)	121 \pm 69,8	124 \pm 38,8	NS
IAH (número/hora de sueño)	3 \pm 1,1	41 \pm 35,7	< 0,001
ID3 (número/hora de sueño)	7 \pm 3,4	39 \pm 31,2	< 0,001
T90 (%)	0,2 \pm 0,32	11 \pm 13,2	< 0,001
SapO ₂ mínima (%)	88 \pm 5,1	78 \pm 10,5	0,007
SapO ₂ media (%)	94 \pm 0,51	91 \pm 4,4	0,044

ESD Epworth: escala de excesiva somnolencia diurna; IAH: suma del número de apneas e hipopneas por hora de sueño; ID3: número de caídas > 3% en la SapO₂ por hora de sueño; IMC: índice de masa corporal; T90: porcentaje de sueño con SapO₂ < 90%; TAD: tensión arterial diastólica; TAS: tensión arterial sistólica.

distintas las cifras de tensión arterial sistólica y diastólica ni de los parámetros bioquímicos habituales, salvo la puntuación en la escala de Epworth que fue significativamente mayor en el grupo clínico. Lógicamente en el grupo clínico, se observa un mayor número de eventos respiratorios (IAH) y repercusión significativa en la SaO₂ nocturna (ID3, T90, SaO₂ mínima, SaO₂ media).

Como se comentó anteriormente, el estudio se centró solo en aquellos spots presentes en los tres geles de cada grupo clínico y cuyas intensidades mostraron valores 3 veces por encima o 3 veces por debajo del valor del control y aplicando un coeficiente de variabilidad < 20% y un nivel de confianza del 95%. La figura 1 muestra los spots que cumplían dichos criterios: 3 spots con sobreexpresión significativa y 7 spots con intensidad significativamente menor que el grupo control. En la figura 2 se exponen los 3 spots sobreexpresados con los distintos niveles de intensidad en cada uno de los grupos (control, leve, moderado y grave). Todos ellos pueden tener interés para el diagnóstico de la enfermedad, particularmente los spots identificados con los números 3.142 y 2.984, dado que existe un aumento de expresión significativo en los tres estadios de la enfermedad respecto al grupo control. De igual forma, son de gran interés los 7 spots en los que se observó subexpresión respecto al grupo control (fig. 3). Varios de ellos disminuyeron drásticamente en los tres estadios de la enfermedad.

Discusión

En respuesta a cambios del entorno, como estrés, estado fisiológico o enfermedad, se puede alterar la expresión de ciertas proteínas. Esto se produce aumentando o disminuyendo la expresión de los genes que las codifican o por cambios de su modificación postraduccional. La 2D-PAGE es la primera aproximación para el análisis diferencial de los niveles de expresión de las proteínas séricas. Esta técnica permite la separación de numerosas proteínas y, como muestra el presente trabajo, aplicando criterios de selección restrictivos hemos identificado 3 spots con intensidades significativamente elevadas y 7 con valores disminuidos. Por tanto, en pacientes con SAHS en distintos estadios de gravedad nuestro estudio constata que, respecto al grupo control, la 2D-PAGE muestra un estado de expresión

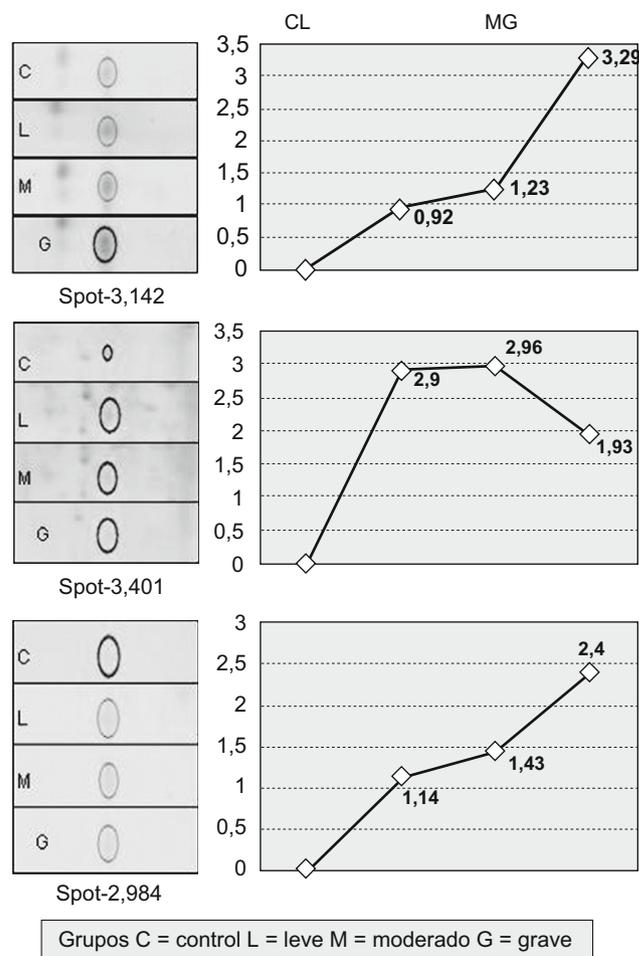


Figura 2. Regiones magnificadas de geles con los spots sobreexpresados. A la derecha, gráfica que marca (línea roja) el grado de sobreexpresión diferencial para cada spot.

proteica diferente al grupo clínico. Por tanto, la proteómica abre una nueva vía para conocer mejor los mecanismos fisiopatológicos asociados a la enfermedad y potencialmente estudiar marcadores relacionados con su diagnóstico.

El SAHS tiene una alta prevalencia y solo un escaso porcentaje de los pacientes están diagnosticados^{2,14}, lo que provoca que en muchos de ellos empeore la calidad de vida y aumente la mortalidad por accidentes de tráfico y por eventos cardiovasculares. Estos aspectos están relacionados con diversos mecanismos etiopatogénicos. La proteómica puede suponer una herramienta muy útil para el diagnóstico y para ampliar el conocimiento en los mecanismos fisiopatológicos subyacentes del SAHS. Como se muestra en la figura 2, en los enfermos con SAHS hay varios spots aumentados significativamente respecto al grupo control, por tanto útiles para el diagnóstico. Además, el incremento progresivo en sus valores en los tres estadios de enfermedad puede relacionarse con mayor gravedad y añadir un valor pronóstico. No menos importante es la subexpresión proteica observada en los pacientes con SAHS (fig. 3), lo que puede suponer que la desaparición de proteínas o la disminución de las mismas podría aportar información de interés sobre la fisiopatología de la enfermedad.

La identificación posterior de estos spots es el siguiente paso para aislar los posibles biomarcadores. Para este fin se ha utilizado el análisis por espectrometría de masas^{16,17}. Conviene señalar, no obstante, que el descubrimiento de señales de expresión proteica características de una situación tiene valor diagnóstico, por sí sola incluso sin identificar las proteínas alteradas, como establecieron

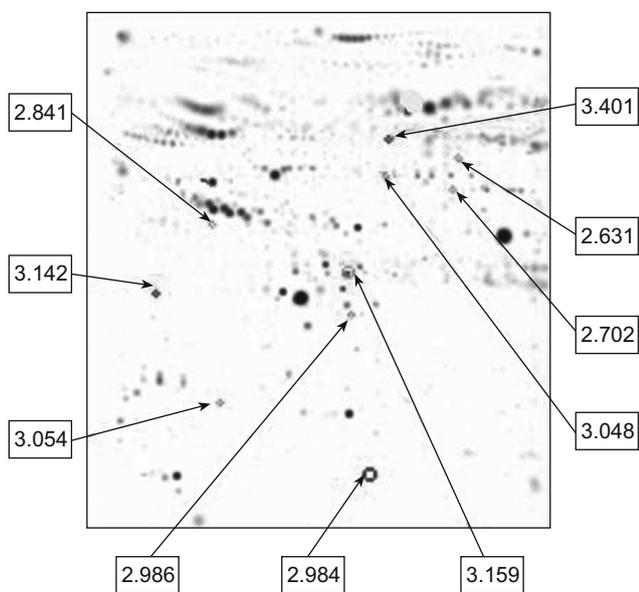


Figura 1. Gráfica que muestra, respecto al grupo control los spots sobreexpresados (en rojo) y subexpresados (en verde).

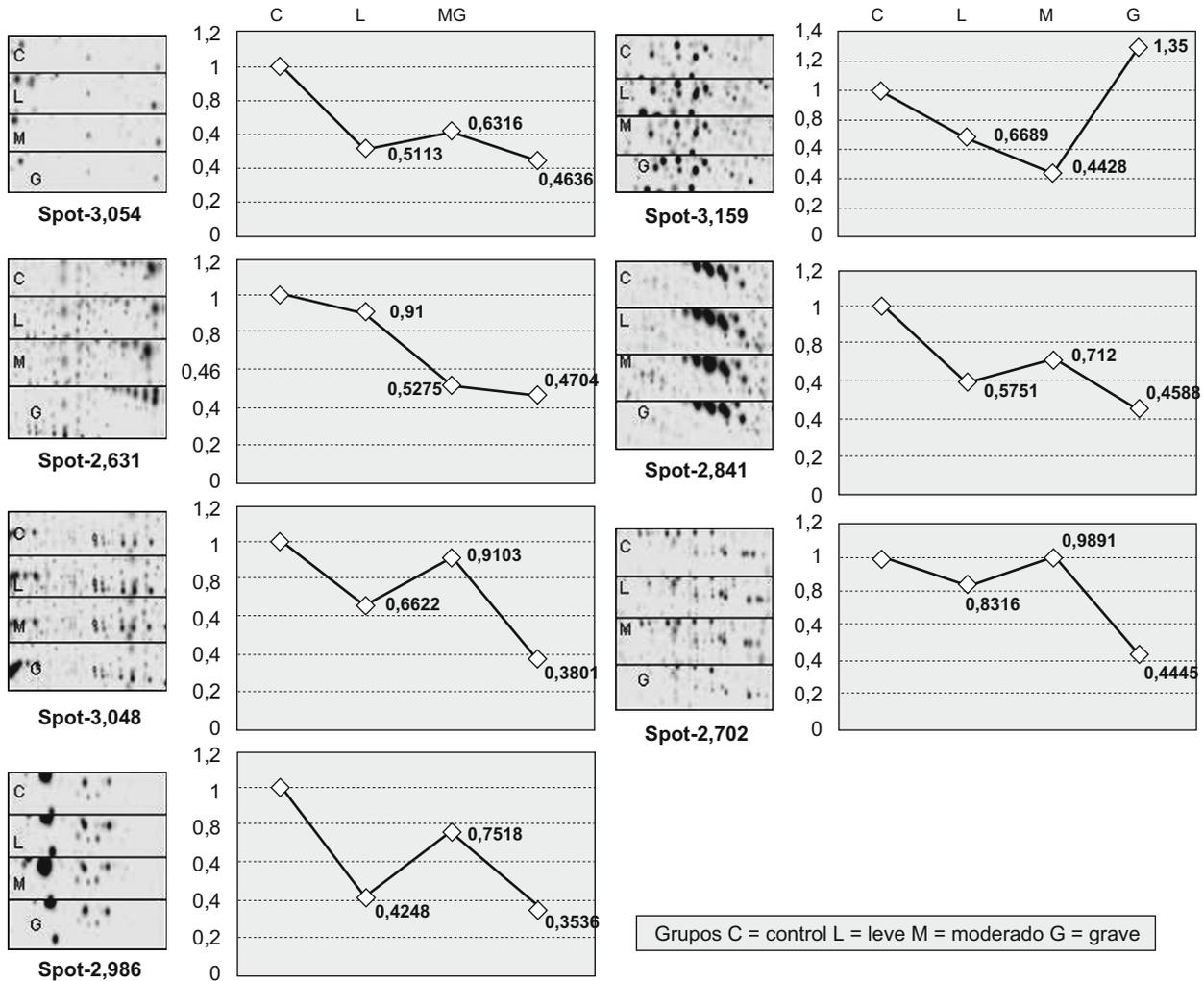


Figura 3. Regiones magnificadas de geles con los spots subexpresados. El grado de subexpresi3n diferencial para cada spot se muestra en l3nea verde.

los trabajos pioneros de Bradley²⁰ y han confirmado recientes estudios sobre contaminaci3n ambiental²¹. Actualmente, las t3cnicas prote3micas se est3n aplicando en el campo de la medicina para descubrir nuevos marcadores diagn3sticos de c3ncer^{22,23}, y constituye una herramienta muy 3til en diversas patolog3as²⁴⁻²⁸. Sin embargo, en el SAHS son muy escasos los trabajos aportados hasta la fecha¹⁸, siendo nuestro estudio el primero que determina el perfil prote3mico en pacientes adultos con SAHS en distintos estadios de gravedad.

El SAHS frecuentemente se asocia a comorbilidad, destacando la obesidad, hipertensi3n, diabetes mellitus, etc. sin embargo, los enfermos con patolog3a grave de 3rgano no fueron incluidos para evitar que la comorbilidad asociada pudiese afectar per se al perfil prote3ico e introducir un sesgo de confusi3n en el estudio. No obstante, esto puede suponer una limitaci3n ya que la muestra es menos representativa de la poblaci3n con SAHS. Otra potencial limitaci3n deriva de que algunas prote3inas no se representan bien mediante 2D-PAGE, caso de aquellas con bajo peso molecular (< 20 kDa) o puntos isoele3tricos extremos (< 4 y > 9). Por otra parte, el n3mero de 8 pacientes por grupo es lo suficientemente amplio en un estudio piloto para demostrar que hay cambios significativos en la expresi3n prote3ica, aunque ser3n necesarias nuevas investigaciones con mayor tama3o muestral para profundizar en estos aspectos. Como se comenta en el apartado de metodolog3a, se excluyeron a los enfermos con un IAH > 5 y < 10, a fin de clasificar adecuadamente a los sujetos con SAHS de aquellos que no

presentaban SAHS y evitar un sesgo de clasificaci3n. No obstante, incluir a estos pacientes en el grupo con SAHS leve pudiera alterar la expresi3n prote3ica de este grupo y te3ricamente disminuir las diferencias encontradas. A pesar de estas limitaciones, el nivel de confianza y probabilidad exigido en el an3lisis estad3stico hacen que los resultados de la investigaci3n sean concluyentes.

Nuestro trabajo es el primero que ha aplicado la prote3mica para el estudio de enfermos adultos con SAHS. A3n con las limitaciones previamente comentadas, el presente estudio demuestra que, respecto a los sujetos sin SAHS, los pacientes en distintos estadios de enfermedad muestran cambios significativos en la expresi3n prote3ica. Este hallazgo es muy interesante, pues permitir3 identificar marcadores biol3gicos 3tiles para el diagn3stico y para conocer mejor algunos mecanismos fisiopatol3gicos involucrados en el SAHS.

Financiaci3n

Proyecto parcialmente finaciado por la Fundaci3n Respira.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ning3n conflicto de intereses.

Bibliografía

- Durán 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 yr. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:685–9.
- Grupo Español de Sueño. Consenso Nacional sobre el síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Arch Bronconeumol.* 2005;41.
- Moore P, Bardwell WA, Ancoli-Israel S, Dimsdale JE. Association between polysomnographic sleep measures and health-related quality of life in obstructive sleep apnea. *Eur Sleep Res.* 2001;10:303–8.
- George CFP. Sleep apnea, alertness, and motor vehicle crashes. *Am J Med Crit Care Med.* 2007;176:954–6.
- Terán-Santos J, Jiménez-Gómez A, Cordero-Guevara J. The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. Cooperative Group Burgos-Santander. *N Engl J Med.* 1999;340:847–51.
- 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;162:1407–12.
- Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, Okamoto Y, Ohnishi Y, Suzuki T, et al. Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest.* 2005;127:1674–9.
- Hernández C, Durán-Cantolla J, Lloberes P, González M. Novedades en la epidemiología, la historia natural, el diagnóstico y el tratamiento del síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño. *Arch Bronconeumol.* 2009;45:3–10.
- Barceló A, Barbé F, de la Peña M, Vila M, Pérez G, Piérolas J, et al. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J.* 2006;756–60.
- Martí S, Sampol G, Muñoz X, Torres F, Roca A, Lloberes P, et al. Mortality in severe sleep apnoea-hypopnoea syndrome patients: impact of treatment. *Eur Respir J.* 2002;20:1511–8.
- Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med.* 2005;353:2034–41.
- Marín JM, Carrizo SJ, Vicente F, Agustí A. 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;365:1046–53.
- Durán-Cantolla J, Mar J, de la Torre Muñecas G, Rubio Aramendi R, Guerra L. El síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño en España. Disponibilidad de recursos para su diagnóstico y tratamiento en los hospitales del Estado español. *Arch Bronconeumol.* 2004;40:259–67.
- Masa JF, Monserrat JM, Durán J, and the Spanish Group of Breathing Sleep Disorders. Diagnostic access for sleep apnea in Spain. *Am J Respir Crit Care.* 2004;170:195.
- Rodríguez-Ortega MJ, Grosvik BE, Rodríguez-Ariza A, Goksoyr A, López-Barea J. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics.* 2003;3:1535–43.
- Montes Nieto R, Fuentes-Almagro CA, Bonilla-Valverde D, Prieto Álamo MJ, Jurado J, Carrascal M, et al. Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. *Proteomics.* 2007;7:4376–87.
- Pütz S, Reinder J, Reinder Y, Sickmann A. Mass Spectrometry-Based Peptide Quantification: Applications and limitations. *Expert Rev Proteomic.* 2005;2:381–92.
- Sahah ZA, Jortani SA, Taiman R, Valdes R, Gozal D. Serum proteomic patterns associated with sleep-disordered breathing in children. *Pediatric Research.* 2006;59:466–70.
- Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 1976;72:248–54.
- Bradley BP, Shrader EA, Kimmel DG, Meiller JC. Protein expression signatures: an application of proteomics. *Mar Environ Res.* 2002;54:373–7.
- Vioque-Fernández A, Alves de Almeida E, López-Barea J. Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci Total Environ.* 2009;1784–97.
- Diamandis EP, Van der Merwe DE. Plasma protein profiling by mass spectrometry for cancer diagnosis: opportunities and limitations. *Clin Cancer Research.* 2005;11:963–5.
- Engwegen JY, Gast MC, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical proteomic: searching for better tumours markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27:251–9.
- Gray RD, MacGregor G, Noble D, Imrie M, Dejar M, Boyd AC, et al. Sputum proteomics in inflammatory and suppurative respiratory diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:444–52.
- Kipnis E, Hansen K, Sawa T, Moriyama K, Zurawel A, Ishizaka A, et al. Proteomic analysis of undiluted lung epithelial lining fluid. *Chest.* 2008;134:338–45.
- Jacot W, Lhermitte L, Dossat N, Pujol JL, Molinari N, Daurès JP, et al. Serum proteomic profiling of lung cancer in high-risk groups and determination of clinical outcomes. *J Thorac Oncol.* 2008;3:840–50.
- Maeda J, Hirano T, Ogiwara A, Akimoto S, Kawakami T, Fukui Y, et al. Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualisation of postoperative therapy. *B J Cancer.* 2008;98:596–603.
- Lee EJ, In KH, Kim JH, Lee SY, Shin C, Shum JJ, et al. Proteomic analysis in lung tissue of smokers and COPD patients. *Chest.* 2009;135:344–352.